



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114127288 A

(43) 申请公布日 2022.03.01

(21) 申请号 202080044288.6

申请人 莫道克大学

(22) 申请日 2020.05.07

(72) 发明人 S·威尔顿 M·C·托马斯

C·罗萨多 R·J·皮克林

(30) 优先权数据

2019901641 2019.05.14 AU

2019902095 2019.06.17 AU

2019902772 2019.08.02 AU

2019903900 2019.10.16 AU

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.16

(51) Int.Cl.

*C12N 15/113* (2006.01)

*A61K 48/00* (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2020/050449 2020.05.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/227758 EN 2020.11.19

(71) 申请人 莫纳什大学

地址 澳大利亚, 维多利亚州

权利要求书2页 说明书38页 附图55页

(54) 发明名称

晚期糖基化终产物受体RNA的调节剂和调节

(57) 摘要

提供了一种经分离或纯化的AON,其用于修饰晚期糖基化终产物受体(RAGE)中的前体mRNA剪接以调节RAGE基因转录物或其部分的剪接。

1. 一种经分离或纯化的AON,其用于修饰晚期糖基化终产物受体(RAGE)中的前体mRNA剪接以调节RAGE基因转录物或其部分的剪接。

2. 如权利要求1所述的AON,该AON选自包括以下项的列表:

a) SEQ ID NO:1-31;

b) 表3a-3d;和/或

c) SEQ ID NO:11、18、19或20。

3. 如权利要求1所述的AON,其中该AON包含经受选自以下列表的替代化学或修饰的一个或多个核苷酸位置,该列表包括:(i) 经修饰的糖部分;(ii) 对RNA酶H的抗性;和/或(iii) 寡聚模拟化学。

4. 如权利要求1所述的反义寡聚物,其中该反义寡聚物通过以下方式进一步修饰:(i) 与某一部分化学缀合;和/或(ii) 用细胞穿透肽标记。

5. 如权利要求1所述的AON,其中如果该AON中存在尿嘧啶,则该AON的该尿嘧啶(U)被胸腺嘧啶(T)置换。

6. 如权利要求1所述的AON,其中对前体mRNA剪接的该修饰导致该RAGE前体mRNA的一个或多个外显子序列的跳跃。

7. 如权利要求1所述的AON,其中对前体mRNA剪接的该修饰导致该RAGE RNA的一个或多个内含子序列的保留(连续)。

8. 一种用于治疗、预防或缓解患者中与RAGE表达有关的疾病的影响的预防性或治疗性药物组合物,该组合物包含:

a) 一种或多种如权利要求1至8中任一项所述的AON,和

b) 一种或多种药学上可接受的载剂和/或稀释剂。

9. 一种用于操纵RAGE基因转录物中的剪接的方法,该方法包括以下步骤:

a) 提供一种或多种如权利要求1至7中任一项所述的AON,并且使所述一种或多种寡聚物与靶核酸位点结合。

10. 一种用于调节RAGE同种型的表达、浓度或活性的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 向该患者施用有效量的一种或多种如权利要求1至7中任一项所述的AON或包含一种或多种如权利要求1至7中任一项所述的AON的药物组合物。

11. 一种用于治疗、预防或缓解与RAGE表达相关的疾病的影响的方法,该方法包括以下步骤:

a) 向该患者施用有效量的一种或多种如权利要求1至7中任一项所述的AON或包含一种或多种如权利要求1至7中任一项所述的AON的药物组合物。

12. 如权利要求1至7中任一项所述的经纯化和分离的AON用于制造用于治疗、预防或缓解与RAGE表达相关的疾病的影响的药物的用途。

13. 一种用于治疗、预防或缓解患者中与RAGE表达相关的疾病的影响的药盒,该药盒至少包含包装在合适容器中的如权利要求1至7中任一项所述的AON及其组合或混合物,以及使用说明书。

14. 如权利要求8所述的组合物、如权利要求9-11中任一项所述的方法、如权利要求12所述的用途或如权利要求13所述的药盒,其中该RAGE表达相关疾病选自包括以下项的列表:神经退行性疾病、癌症、肺病和炎性疾病。

15. 如权利要求8所述的组合物、如权利要求9-11中任一项所述的方法、如权利要求12所述的用途或如权利要求13所述的药盒,其中该AON与选自以下列表的第二治疗剂组合施用,该列表包括:可溶性RAGE同种型,这是一种能够调节RAGE胞质尾的化合物。

16. 如权利要求8所述的组合物、如权利要求9-11中任一项所述的方法、如权利要求12所述的用途或如权利要求13所述的药盒,其中该AON是AON的组合。

17. 如权利要求16所述的组合物、方法、用途或药盒,其中该AON的组合选自SEQ ID NO: 11和10的组合或SEQ ID NO:11和13的组合。

## 晚期糖基化终产物受体RNA的调节剂和调节

### 技术领域

[0001] 本发明涉及使用剪接转换反义寡核苷酸(AON)调节编码晚期糖基化终产物受体(RAGE)或其部分的前体mRNA的选择性剪接以修饰RAGE同种型的表达和/或活性的方法,以及使用所述调节剂治疗RAGE相关病症的方法。

### 背景技术

[0002] 晚期糖基化终产物受体(RAGE)是属于免疫球蛋白(Ig)超家族的一种多价I型跨膜糖蛋白。人RAGE(Ager)基因位于第6号染色体的主要组织相容性复合物III类区域内。它包含11个外显子和10个内含子,以及调控其转录的5'侧翼区。转录的RAGE mRNA为~1.4kb,具有短的3'UTR。

[0003] 50-55kDa糖基化RAGE蛋白在有限范围的细胞(例如血管内皮细胞、I型肺细胞、白细胞)中组成型表达,但是损伤、应激、缺氧或炎症后在大多数细胞类型和组织中可诱导RAGE表达,为促炎和促增殖信号传导提供通道。因此,RAGE表达在炎性和代谢病症中上调,这些病症包括但不限于神经退行性疾病、癌症、心血管疾病、糖尿病、自身免疫和缺血性损伤,其中RAGE也与这些疾病的发展和进展有牵连。

[0004] RAGE与一系列脑部病症有牵连,这些病症包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease);肌萎缩性侧索硬化;亨廷顿病(Huntington's disease);克-雅病(Creutzfeldt-Jakob's disease);神经退行性病状,诸如糖尿病性神经病、家族性淀粉样多神经病、夏科氏神经性关节炎(Charcot neuroarthropathy)和血管炎性神经病;神经性疼痛;胶质瘤发展和进展;缺血性脑损伤/中风,和多发性硬化。

[0005] RAGE与肿瘤生物学的许多方面有牵连,这些方面包括肿瘤细胞的生长、迁移和侵袭。许多癌症表达较高水平的RAGE(示例性实例有乳腺癌、结肠癌、肾癌和胃癌)。肺癌是例外,在肺癌中,由于随着肺细胞分化和恶性变高发生RAGE损失,RAGE表达降低。

[0006] 在C6神经胶质瘤细胞中,肿瘤体积在包含RAGE被阻断的细胞的肿瘤中显著减小。相反,过表达野生型RAGE的肿瘤快速生长并非常有效地侵袭周围组织。期望具有阻断RAGE信号传导的治疗剂作为许多常见癌症的癌症治疗,这些常见癌症诸如:神经胶质瘤/多形性成神经管细胞瘤;胰腺癌;黑色素瘤;前列腺癌;乳腺癌;肝癌/肝细胞瘤;和结肠癌。

[0007] 在健康状况下,肺部的RAGE表达是所有组织中最高的。然而,肺部中的RAGE表达通常仅见于I型肺细胞。肺部中其他细胞和其他位点处RAGE信号传导的上调与一系列肺病(lung disorder)存有牵连,这些肺病包括:慢性阻塞性肺病(COPD)/肺气肿;哮喘;吸烟/污染引起的损伤;急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征;和肺纤维化。

[0008] RAGE也关键性地参与了多种炎性病状,诸如性关节炎;骨关节炎;视网膜疾病;动脉粥样硬化;血管钙化;缺血性心脏病/心脏重塑/纤维化;心力衰竭;糖尿病性和非糖尿病性肾病;炎症性肠病;先兆子痫;多囊卵巢综合征;肝脂肪变性、纤维化、缺血性和非缺血性肝损伤;肌营养不良;脊髓损伤;皮肤炎症和衰老;和角膜炎。

[0009] 人RAGE由免疫球蛋白样胞外域、单个跨膜结构域和短(42个氨基酸)胞质尾组成。

RAGE的胞外域(也称为细胞外结构域)包括三个免疫球蛋白样区域:N端V型结构域,其后是两个C型结构域(称为C和C'或替代性地称为C1和C2)。

[0010] 晚期糖基化终产物(AGE)和非AGE配体与RAGE的胞外域的结合会激活与炎症、损伤及细胞增殖和分化有牵连的细胞内信号转导级联。RAGE激活还触发正反馈回路,其中RAGE配体-受体相互作用经由NF $\kappa$ B激活而增加RAGE的表达,从而增强后续RAGE诱导的细胞激活。事实上,发明人知道的强烈下调RAGE表达的唯一手段是减少RAGE的激活。这种情形与其他受体不同,其中增加配体水平会降低受体的表达。

[0011] 在人类中,RAGE的胞质尾长度为43个氨基酸(残基362至残基404)。该胞质尾含有对RAGE依赖性细胞激活而非配体结合至关重要的基序。RAGE的胞质尾可以在共同定位的G蛋白偶联受体被其同源配体激活后被反式激活,而非AGE配体的AGE不与RAGE胞外域结合(也称为RAGE的配体非依赖性激活),从而导致相同途径的激活(Pickering等人,J Clin Invest [临床研究杂志]2019;129:406-421)。某些共同定位的激活G蛋白偶联受体对RAGE胞质尾的RAGE配体非依赖性激活似乎是体内激活RAGE的重要途径。

[0012] 在RAGE的配体依赖性激活和RAGE的配体非依赖性激活中,细胞内信号传导由RAGE的胞质结构域介导,该胞质结构域与一系列信号传导配偶体相互作用。

[0013] 通过生成具有改变的通过配体依赖性和配体非依赖性信号传导途径激活的能力的RAGE同种型,对RAGE的选择性剪接对于调控RAGE活性也很重要。在包括恶性肿瘤、糖尿病和阿尔茨海默病在内的疾病状态中RAGE的选择性剪接发生改变。但是虽然选择性剪接似乎对于RAGE调控/失调很重要,但没有办法特异性地靶向这种机制。

[0014] 正是在这一背景下,描述了使用剪接转换AON来调节RAGE剪接以相对于全长RAGE优先生成细胞保护性RAGE同种型的本发明方法。

[0015] 以上对背景技术的讨论只是为了方便理解本发明。该讨论并不意味着确认或承认所提及的任何材料在本申请的优先权日或之前是公知常识的一部分。

## 发明内容

[0016] 广泛地说,根据本发明的一种形式,提供了经分离或纯化的AON,其用于调节编码晚期糖基化终产物受体(RAGE)或其部分的前体mRNA基因转录物的选择性剪接。

[0017] 在本发明的一个方面,提供了10-50个核苷酸的AON,其包含与在RAGE前体mRNA内含子附近或内部的区域互补的靶向序列。

[0018] 在本发明的一个方面,提供了10-50个核苷酸的AON,其包含与RAGE前体mRNA的剪接位点互补或相邻的靶向序列。

[0019] 因为诸如RNA二级结构、AON与SR蛋白之间的竞争、核内不均一核糖核蛋白(hnRNP)和/或构成剪接体的其他元件等因素可影响AON的作用,所以针对关键受体或供体剪接位点的AON将不总是会改变剪接。因此,在本发明的一个方面,提供了10至50个核苷酸的AON,其包含与RAGE前体mRNA中充当增强子或沉默子的顺式作用RNA元件互补或相邻的靶向序列,当被剪接体元件(例如蛋白剪接因子、uRNA、lncRNA)结合时,该靶向序列调节附近外显子的剪接。

[0020] 在本发明的一个方面,提供了10至50个核苷酸的AON,其包含与RAGE前体mRNA互补的靶向序列的,该靶向序列调节所述mRNA的二级结构以影响剪接位点选择。

[0021] 在本发明的一种形式中,提供了用于诱导RAGE基因转录物或其部分中的一个或多个外显子序列的排除(也称为跳跃)的经分离或纯化的AON。

[0022] 在本发明的一种形式中,提供了用于诱导RAGE基因转录物或其部分中内含子序列的保留的经分离或纯化的AON。

[0023] 在本发明的一种形式中,AON经化学修饰以防止前体mRNA-AON复合物的降解,包括但不限于磷酸二胺吗啉代寡聚物(PMO)、2'-O-甲基硫代磷酸寡核苷酸(2OMe)和2'-O-甲氧基乙基硫代磷酸寡核苷酸(2OMe)、锁核酸(LNA)修饰的AON、热稳定扭曲插入核酸(TINA)和肽核酸(PNA)。

[0024] 在本发明的一种形式中,AON与多个部分缀合以增加它们的递送,包括但不限于细胞穿透肽(CPP)、体内吗啉代寡聚物(vivo-morpholino,VMO)或肽磷酸二胺吗啉代寡聚物(PPMO)。

[0025] 优选地,AON选自包括表3a-3d中任一个所示的序列的组。优选地,AON选自包括以下项的列表:SEQ ID NO:1-31。更优选地,AON是SEQ ID NO:11、18、19或20。

[0026] 本发明的AON可以被选择为能够与选定的靶位点结合的AON,其中该靶位点是推定的mRNA剪接位点,其选自剪接供体位点、剪接受体位点、剪接增强子序列、剪接沉默子序列或调节前体mRNA二级结构的位点。当靶向供体或受体剪接位点时,靶位点也可包括一些侧翼内含子序列。

[0027] 更具体地,AON可以选自包括SEQ ID NO:1-31中的任何一个或多个和/或表3a-3d中的任何一个所示的序列,及其组合或混合物的组。更优选地,AON是SEQ ID NO:11、18、19或20。AON的组合优选地是SEQ ID NO:11和10的组合或SEQ ID NO:11和13的组合。这包括可以在严格杂交条件下与此类序列杂交的序列,与其互补的序列,含有经修饰的碱基的序列,经修饰的骨架,以及在RAGE基因转录物中具有或调节前体mRNA加工活性的其功能性截短物或延伸物。

[0028] 在某些实施例中,AON可以与靶序列100%互补,或者可以包括错配,例如以适应变体,只要在寡核苷酸与靶序列之间形成的异源双链体足够稳定以承受细胞核酸酶的作用和可能在体内发生的其他降解模式。因此,某些寡核苷酸可以在寡核苷酸与靶序列之间具有约或至少约70%的序列互补性,例如70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列互补性。

[0029] 本发明还扩展到能够与选定靶标结合以调节RAGE前体mRNA的选择性剪接的两种或更多种AON的组合,包括包含两种或更多种此类AON的构建体。这些构建体可一起用于基于AON的联合疗法。AON的组合优选地是SEQ ID NO:11和10的组合或SEQ ID NO:11和13的组合。

[0030] 根据本发明的另一方面,本发明扩展到本发明的AON序列的cDNA或克隆拷贝,以及含有本发明的AON序列的载体。本发明还进一步扩展到含有此类序列和/或载体的细胞。

[0031] 还提供了一种用于操纵RAGE基因转录物的剪接的方法,该方法包括以下步骤:

[0032] a) 提供一种或多种如本文所述的AON,并且使所述一种或多种寡聚物与靶核酸位点结合。

[0033] 还提供了一种用于治疗、预防或缓解患者中与RAGE表达有关的疾病的影响的预防

性或治疗性药物组合物,该组合物包含:

[0034] a) 一种或多种如本文所述的AON;以及

[0035] b) 一种或多种药学上可接受的载剂和/或稀释剂。

[0036] 该组合物可以包含约1nM至1000nM的本发明的每种所需AON。优选地,该组合物可以包含约10nM至500nM,最优选1nM至10nM的本发明的每种AON。

[0037] 还提供了一种用于治疗、预防或缓解与RAGE表达相关的疾病的影响的方法,该方法包括以下步骤:

[0038] a) 向该患者施用有效量的一种或多种如本文所述的AON或包含一种或多种 AON的药物组合物。

[0039] 还提供了如本文所述的经纯化和分离的AON用于制造用于治疗、预防或缓解与RAGE表达和/或活性相关的疾病的影响的药物的用途。

[0040] 还提供了一种用于治疗、预防或缓解患者中与RAGE表达相关的疾病的影响的药盒,该药盒至少包含包装在合适容器中的如本文所述的AON及其组合或混合物,以及其使用说明书。

[0041] 优选地,患者中与RAGE表达相关的疾病是神经退行性疾病、癌症、肺病或炎性疾病。

[0042] 患有与RAGE表达相关的疾病的受试者可以是哺乳动物,包括人。

[0043] 现将参照所附非限制性实例和附图描述本发明的其他方面。

## 附图说明

[0044] 在下面对本发明的几个非限制性实施例的描述中更充分地描述了本发明的其他特征。将该描述包括在内仅用于举例说明本发明的目的。不应将其理解为对上述本发明的广泛概括、披露内容或描述的限制。该描述将参考附图进行,其中:

[0045] 图1a示出了生成RAGE和RAGE\_v1的RAGE的选择性剪接。外显子以方框示出。编码序列为黑色而非编码序列为白色。成角度的线条指示剪接事件。S=提前终止密码子。

[0046] 图1b示出了在A579细胞中,通过实时RT-PCR检测,在用靶向外显子10的选定AON处理后或在对照(乱序RNA处理的)细胞中,任何RAGE mRNA(总人RAGE)剪接形式(spliciform)和含有人RAGE 9b序列的RAGE mRNA剪接形式的表达的倍数变化。

[0047] 图1c示出了在用靶向外显子10的选定AON处理A579细胞后或在对照(乱序RNA处理的)细胞中通过实时RT-PCR检测,任何RAGE mRNA(总人RAGE)剪接形式和含有外显子10的人RAGE mRNA剪接形式的mRNA表达的倍数变化。

[0048] 图1d示出了在用靶向与推定的hnRNPF结合位点相邻的外显子10的选定AON处理A579细胞后或在对照(乱序RNA处理的)细胞中通过实时RT-PCR检测,任何RAGE(总人RAGE)剪接形式和含有外显子10的人RAGE mRNA剪接形式的mRNA表达的倍数变化。

[0049] 图1e示出了编码含有不同大小的外显子8-11片段的构建体的RAGE克隆物的百分比,指示用靶向外显子10的特异性AON处理A579细胞后或对照(乱序RNA处理的)细胞中不同RAGE mRNA剪接形式的相对表达。例如,300条带指示含有外显子8、9、10和11的剪接形式(即能够信号传导的剪接形式),而250条带指示含有RAGE 9b的剪接形式,没有条带指示与外显子8缺失相关的RAGE mRNA剪接形式。

[0050] 图1f是跨越外显子8-11的DNA PCR产物的代表性凝胶图像,有不同大小的条带或没有条带(箭头)指示不同剪接形式的存在。

[0051] 图1g示出了与对照(乱序RNA处理的)细胞相比,用AON 3779处理A579细胞后,通过数字PCR测量的含有外显子10的RAGE mRNA的拷贝数。

[0052] 图1h示出了与对照(乱序RNA处理的)细胞相比,用靶向外显子10的选定AON 处理A579细胞后在细胞培养基中检测到的内源可溶性RAGE蛋白的浓度。

[0053] 图1i示出了在有和没有AON3779或AON87或对照(CTL) RNA的情况下,用编码人RAGE基因组序列(gRAGE)的DNA转染CHO细胞后,通过使用RAGE特异性抗体检测的蛋白印迹测定的,细胞培养基(左)和细胞裂解物(右)中RAGE 蛋白的表达。泳道M是标志物,泳道2是载体对照(不表达内源性RAGE),泳道3 是gRAGE+对照(乱序)RNA,泳道3是gRAGE+AON3779,且泳道4是 gRAGE+AON87。箭头指示细胞培养基中较小的可溶性RAGE(红色)和细胞裂解物中较大的全长RAGE(白色)的大小。

[0054] 图1j示出了在用编码人RAGE基因组序列(gRAGE)的DNA转染CHO细胞后,在用和不用靶向外显子10的AON转染的情况下,通过ELISA测量的培养基中可溶性RAGE蛋白的表达。

[0055] 图1k示出了在有或没有靶向与也被AON 3779靶向的位点相邻或重叠的外显子 10的选定AON的情况下,在用编码人RAGE基因组序列(gRAGE)的DNA转染 CHO细胞后,通过ELISA测量的培养基中可溶性RAGE蛋白的表达。

[0056] 图1l示出了在有或没有AON 3779的情况下,在用编码人RAGE基因组序列的 DNA转染CHO细胞后,通过ELISA测量的培养基中可溶性RAGE表达的剂量依赖性诱导。虚线表示用乱序RNA(10nM)转染的CHO细胞中可溶性RAGE的表达。

[0057] 图1m示出了与对照(乱序RNA处理的)细胞相比在用RAGE配体S100A8/9(0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )处理A549细胞后ICAM-1基因表达的诱导及其通过用靶向外显子10的选定 AON预转染的调节。

[0058] 图1n示出了与对照(乱序RNA处理的)细胞相比在用RAGE配体S100A8/9(0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )处理原代人主动脉内皮细胞(HAEC)后ICAM-1基因表达的诱导及其通过用靶向外显子10的选定AON预转染的调节。

[0059] 图1o示出了用能够诱导RAGE的反式激活的AngII处理A549细胞后ICAM-1 基因表达的诱导。值得注意的是,与对照(乱序RNA处理的)细胞相比,ICAM-1 基因表达的这种诱导也通过用靶向外显子10的选定AON预转染A579细胞来调节。

[0060] 图1p示出了与对照(乱序RNA处理的)细胞相比在用血管紧张素II(1 $\mu\text{M}$ ) 处理原代人主动脉内皮细胞(HAEC)后ICAM-1基因表达的诱导及其通过用靶向外显子10的选定AON预转染的调节。

[0061] 图1q示出了在用特异性靶向与推定hnRNP-F/H1结合位点相邻的外显子10的 AON处理HMEC细胞后或在对照(乱序RNA处理的)细胞中通过实时RT-PCR检测,任何RAGE mRNA(总人RAGE)剪接形式和含有外显子10的人RAGE mRNA 剪接形式的表达的倍数变化。

[0062] 图1r示出了用靶向与推定的hnRNPF结合位点相邻的外显子10的AON处理 HMEC后或在对照(乱序RNA处理的)细胞中,含有人RAGE 9b序列的RAGE mRNA 剪接形式的mRNA表达的倍数变化。

[0063] 图1s示出了与非靶吗啉代AON对照相比,用AON 3779的体内吗啉代寡聚物制剂

(0.1-1 $\mu$ M) 处理原代人主动脉内皮细胞 (HAEC) 对含有外显子9b的RAGE mRNA 剪接形式的表达的影响。

[0064] 图1t示出了与非靶吗啉代AON对照相比,用AON 3779的体内吗啉代寡聚物制剂(0.1-1 $\mu$ M) 处理原代人主动脉内皮细胞 (HAEC) 对培养基中可溶性RAGE蛋白的表达的影响。

[0065] 图1u示出了与非靶吗啉代AON对照相比,用AON 3779的体内吗啉代寡聚物制剂(1 $\mu$ M) 处理表达基因组人RAGE的CHO细胞对培养基中可溶性RAGE蛋白表达的影响。

[0066] 图1v示出了包括并界定外显子10的人RAGE DNA的序列,指示了上述实验中采用的不同AON及其互补靶标。紫色方框指示hnRNPF结合的推定聚G靶标。

[0067] 图1w示出了hnRNP的推定聚G靶标突变后所表达的人RAGE (突变体gRAGE M3) 的选择性剪接对观察到的响应于AON 3779转染的可溶性RAGE增加的影响的缺乏。

[0068] 图2a示出了包括并界定外显子9的人AGER的基因序列,指示下面利用的不同 AON和它们在RAGE前体mRNA上的互补靶标。

[0069] 图2b示出了在用靶向外显子9的选定AON处理A579细胞后或在对照(乱序RNA处理的) 细胞中通过实时RT-PCR检测,任何RAGE mRNA (总人RAGE) 剪接形式和含有外显子10的人RAGE mRNA剪接形式的表达。

[0070] 图2c是跨越外显子8-11的DNA PCR产物的代表性凝胶图像,有不同大小的条带或没有条带指示不同剪接形式的存在。

[0071] 图2d表示编码含有不同大小的外显子8-11片段的构建体的RAGE mRNA克隆物的百分比,指示用靶向外显子10的选定AON或乱序RNA对照 (CTL) 处理A579 细胞后不同剪接形式mRNA的相对表达。例如,300条带指示含有外显子8、9、10 和11的RAGE mRNA剪接形式(即能够信号传导的剪接形式),而250条带指示含有RAGE 9b的剪接形式,没有条带指示与外显子8缺失相关的RAGE mRNA剪接形式。

[0072] 图2e示出了在有和没有靶向外显子9的选定AON的情况下,在用编码人RAGE 基因组序列的DNA转染CHO细胞后和在对照(乱序RNA处理的) 细胞中通过ELISA 测量的培养基中可溶性RAGE蛋白的表达。ND=未检测到

[0073] 图2f示出了与对照(乱序RNA处理的) 细胞相比在用RAGE配体S100A8/9(0.6  $\mu$ g/mL) 处理后TLR-4基因表达的诱导及其在用靶向外显子9的选定AON转染后的调节。

[0074] 图2g示出了用能够诱导RAGE的反式激活的AngII (1 $\mu$ M) 处理后ICAM-1基因表达的诱导。值得注意的是,与对照(乱序RNA处理的) 细胞相比,ICAM-1基因表达的这种诱导在用靶向外显子9的选定AON转染A579细胞后受到调节。

[0075] 图2h示出了在用靶向外显子9的选定AON处理HMEC1细胞后或在对照(乱序RNA) 处理的细胞中通过实时RT-PCR检测,任何RAGE mRNA (总人RAGE) 剪接形式和含有外显子10的人RAGE mRNA剪接形式的表达的倍数变化。

[0076] 图3a示出了在用靶向外显子9的选定AON即AON 3779(作为阳性对照) 处理 A579细胞后或在对照(乱序RNA处理的) 细胞中通过实时RT-PCR检测,任何RAGE mRNA (总RAGE) 剪接形式和含有外显子10的人RAGE mRNA剪接形式的表达的倍数变化。

[0077] 图3b示出了在用靶向外显子9的选定AON即AON 3779(作为阳性对照) 处理 A549细胞后或在对照(乱序RNA处理的) 细胞中通过实时RT-PCR检测,含有外显子9b序列的RAGE mRNA剪接形式的表达的倍数变化。

[0078] 图3c示出了在用靶向外显子9的选定AON即AON 3779 (作为阳性对照) 处理 HMEC1 细胞后或在对照 (乱序RNA处理的) 细胞中通过实时RT-PCR检测,任何 RAGE mRNA (总人RAGE) 剪接形式和含有外显子10的人RAGE mRNA剪接形式的表达。

[0079] 图3d示出了在用靶向外显子9的选定AON即AON 3779 (作为阳性对照) 处理 HMEC1 细胞后或在对照 (乱序RNA处理的) 细胞中通过实时RT-PCR检测,含有外显子9b的RAGE mRNA剪接形式的表达的倍数变化。

[0080] 图3e示出了在用靶向内含子9的特异性AON即AON 3779 (作为阳性对照) 处理表达基因组人RAGE的A579细胞后,或在对照 (乱序RNA处理的) 细胞中,通过ELISA检测的培养基中可溶性RAGE的浓度。

[0081] 图3f示出了包括并界定内含子9的人RAGE DNA的序列,指示了AON及其互补靶标。

[0082] 图4a示出了在用靶向RAGE前体mRNA的AON处理表达基因组鼠类RAGE的 CHO细胞后,或在对照 (乱序RNA处理的) 细胞中,通过ELISA检测的培养基中可溶性RAGE的浓度。

[0083] 图4b示出了在用靶向鼠类RAGE的外显子9的选定AON (50nM) 处理PMAEC 后或在对照 (乱序RNA处理的) 细胞中,实时RT-PCR上任何RAGE mRNA (总鼠类RAGE) 剪接形式和含有外显子10和11的RAGE mRNA剪接形式的表达的倍数变化。

[0084] 图4c示出了在用靶向鼠类RAGE的外显子9的选定AON (10nM) 处理PMAEC 后或在对照 (乱序RNA处理的) 细胞中任何mRNA RAGE (总鼠类RAGE) 和含有外显子10和11的RAGE mRNA剪接形式的表达的倍数变化。

[0085] 图4d示出了在用靶向鼠类RAGE的外显子9的特异性AON (10nM) 处理PMAEC 细胞后或在对照 (乱序RNA处理的) 细胞中,培养基中可溶性RAGE蛋白的浓度。

[0086] 图4e示出了在用AON m3779 (10nM) 处理PMAEC后或在对照 (乱序RNA处理的) 细胞中,实时RT-PCR上任何RAGE mRNA (总鼠类RAGE) 剪接形式和含有外显子10和11的RAGE mRNA剪接形式的表达的倍数变化。

[0087] 图4f示出了在用AON 3779 (10nM) 即AON m3779处理表达基因组鼠类RAGE 的CHO细胞后,或在对照 (乱序RNA处理的) 细胞中,培养基中可溶性RAGE蛋白的浓度。

[0088] 图4g示出了在用AON 3779 (10nM) 即AON m3779处理表达基因组人RAGE 的CHO细胞后,或在对照 (乱序RNA处理的) 细胞中,培养基中可溶性RAGE蛋白的浓度。

[0089] 图4h示出了在用AON m3779或非靶吗啉代AON处理小鼠精确切下的肺部切片 48小时后,在实时RT-PCR上任何RAGE mRNA (总RAGE) 剪接形式和含有外显子 10和11的RAGE mRNA剪接形式的表达。

[0090] 图4i示出了在用AON m3779或媒介物 (盐水) 处理小鼠精确切下的肺部切片后,在实时RT-PCR上任何RAGE mRNA (总RAGE) 和含有外显子9b的RAGE mRNA 剪接形式的时间依赖性表达。

[0091] 图4j示出了与非靶AON对照相比,在向C57B16小鼠每日皮下注射AON m3779 一周后,在实时RT-PCR上任何RAGE mRNA (总小鼠RAGE) 剪接形式和含有外显子9b或外显子10的鼠类RAGE mRNA剪接形式的肺部表达的倍数变化。

[0092] 图4k示出了与非靶AON对照相比,在将AON m3779的吗啉代制剂经气管内滴注到C57B16小鼠中后48小时,在实时RT-PCR上任何RAGE mRNA (总小鼠RAGE) 剪接形式和含有外显子10和11的鼠类RAGE mRNA剪接形式的肺部表达的倍数变化。

[0093] 图4l示出了与媒介物对照相比,在将AON m3779的2-0' Me制剂经气管内滴注到C57B16小鼠中后48小时,在实时RT-PCR上任何RAGE mRNA(总小鼠RAGE) 剪接形式和含有外显子10和11的鼠类RAGE mRNA剪接形式的肺部表达的倍数变化。\*指示相对于基线 $p=0.01$ 。

[0094] 图4m示出了向C57B16小鼠气管内注射AON m3779、AON4105和无菌水对照两天后,与基线出血相比,循环可溶性RAGE的倍数变化(%)。

[0095] 图5a示出了在有和没有靶向不同区域外显子10的选定AON的组合的情况下用编码人RAGE基因组序列(gRAGE)的DNA转染CHO细胞后,或在对照(乱序RNA 处理的)细胞中,通过实时RT-PCR测量的含有外显子9b的RAGE mRNA剪接形式的表达。

[0096] 图5b示出了在有和没有靶向外显子10的5' 剪接位点的选定AON的组合的情况下用编码人RAGE基因组序列(gRAGE)的DNA转染CHO细胞后,或在对照(乱序RNA处理的)中,通过ELISA测量的培养基中可溶性RAGE蛋白的表达。

[0097] 图5c示出了在有和没有靶向外显子10的3' 和5' 剪接位点的选定AON的组合或对照RNA的情况下用编码人RAGE基因组序列(gRAGE)的DNA转染CHO细胞后,通过ELISA测量的培养基中可溶性RAGE蛋白的表达。方框指示包括AON 3779 的处理。

[0098] 图5d示出了在有和没有靶向外显子10的相邻区域的选定AON的组合的情况下用编码人RAGE基因组序列的DNA转染CHO细胞后,或在对照(乱序RNA)处理的细胞中,通过实时RT-PCR测量的含有外显子9b的RAGE mRNA剪接形式的表达。

[0099] 图5e示出了在有和没有选定AON的组合或对照(乱序RNA)的情况下,用编码小鼠RAGE的鼠类基因组序列的DNA转染CHO细胞后,通过ELISA测量的培养基中可溶性RAGE蛋白的表达。

## 具体实施方式

### [0100] 发明详述

[0101] 反义寡核苷酸(AON)是短的、合成的、反义的、经修饰的DNA或RNA链,这些链可以通过沃森-克里克碱基配对与前体RNA/mRNA选择性地杂交并选择性地调节靶RNA的功能。

[0102] 当AON用于调节mRNA的选择性剪接时,常常将它们称为剪接转换寡核苷酸(SSO)。在本发明中,术语AON和SSO可以互换使用。SSO与前体mRNA碱基配对并通过阻断剪接机制的组分与前体mRNA之间发生的RNA-RNA碱基配对或蛋白-RNA结合相互作用来破坏转录物的正常剪接库。SSO可以诱导选定外显子的“跳跃”和/或内含子序列的保留以调节翻译产物。这可以通过以下方式来实现:直接靶向剪接位点,或靶向在通过调节特异性蛋白的结合或改变前体mRNA的二级结构来使剪接增强或沉默中所涉及到的顺式作用序列。

[0103] 治疗性SSO可用于治疗遗传病症,以跳跃有缺陷或未对齐的部分,从而允许生成内部缺失的,但现在作为治疗剂的功能性蛋白。

[0104] 选择性剪接被认为是晚期糖基化终产物受体(RAGE)转录后基因调控的重要层。尽管大多数RAGE以其全长同种型表达,但通过选择性剪接生成许多不同的编码同种型(也称为剪接形式),包括具有N端截短、C端截短的剪接形式和保留内含子序列的剪接形式。这些不同的剪接形式可以通过竞争性配体结合或通过从结合配偶体置换全长蛋白而充当全长RAGE受体的可能调控剂。在不同组织诸如肺、肝、肾、平滑肌、内皮细胞和脑中已经鉴定了超过二十种剪接形式。

[0105] 不同的RAGE基因剪接变体已根据人类基因命名委员会(Human Gene Nomenclature Committee)命名为RAGE:RAGE\_v1至RAGE\_v19。例如,内含子9(外显子9b)的(连续)保留导致跨膜结构域和胞质结构域的提前终止和完全损失,生成占人类循环RAGE的~5%的C截短的可溶性剪接形式(RAGE\_v1,内源分泌型 RAGE或esRAGE)。由于缺乏任何信号传导元件或跨膜结构域,esRAGE能够充当诱饵受体,从而与全长RAGE竞争配体或增加配体清除。较高的esRAGE循环水平与改善的健康结果和寿命相关,而较低的esRAGE与许多疾病状态相关,包括但不限于动脉粥样硬化、糖尿病、代谢综合征、心血管病死亡、贫血、孤独症和各种致瘤状态。用重组esRAGE治疗糖尿病小鼠会减轻动脉粥样硬化、血管炎症、肾和视网膜损伤。

[0106] RAGE $\Delta$ (也称为DN RAGE或RAGEv20)缺乏细胞内结构域的16个氨基酸,但保留配体结合和跨膜结构域,因此充当细胞表面RAGE的显性负抑制剂。通过 RAGE的一些或全部Ig-V结构域的插入、缺失或去除,在细胞外结构域中产生变化的剪接事件也可影响配体结合结构域。例如,N-RAGE始于外显子3中的交替起始位点,因此没有配体结合所需的信号肽或V结构域。

[0107] 据报道,在糖尿病、一些癌症和阿尔茨海默病中,RAGE的剪接出现异常(因此 RAGE信号传导功能失调)。

[0108] esRAGE型剪接中外显子10的跳跃归因于高等真核生物中内含子长度的限制。大约45个核苷酸必须将5'剪接位点与分支点隔开,并且分支点与3'剪接位点之间的最小距离似乎分别为约18个核苷酸。因此,短于70个核苷酸的内含子在哺乳动物中极为罕见,并且不能有效地剪掉。当选择内含子9中的esRAGE 5'剪接位点时,此位点与邻接外显子10的3'剪接位点之间的距离为46个核苷酸,大大短于内含子长度的下限。因此,使用内含子9的下游esRAGE 5'剪接位点和包含外显子10将是互斥的。在所分析的已知剪接变体中,使用内含子9中的下游esRAGE 5'剪接位点的所有变体跳跃外显子10;相反,使用内含子9中的上游RAGE 5'剪接位点的所有变体则包括外显子10。因此,可获得的证据表明内含子9中两个替代性5'剪接位点中的任一个的选择与外显子10的包含或排除相结合。调控这种剪接的手段或外部调节手段以前一直是未知的。

[0109] 本发明使用SSO选择性地操纵RAGE前体mRNA的选择性剪接模式,导致生成非功能性的或充当诱饵受体以拮抗全长RAGE的配体依赖性激活和配体非依赖性反式激活的天然RAGE mRNA剪接形式。

[0110] 值得注意的是,在这些剪接位点处没有共同的RAGE多态性。RAGE序列是高度保守的。因此,与用外显子跳跃技术管理遗传病症不同,不需要个性化或个体化的序列修饰。

[0111] 本发明提供了通过开发调节RAGE前体mRNA或其部分的选择性剪接的AON 来治疗、预防或改善其中RAGE与发展或进展有牵连的疾病的影响的替代性方法,这些疾病包括但不限于神经退行性疾病、癌症、肺病或炎症性疾病。

[0112] 广泛地说,根据本发明的一个方面,提供了用于调节晚期糖基化终产物受体(RAGE)基因转录物或其部分中的前体mRNA剪接的经分离或纯化的AON。优选地,提供了用于诱导RAGE前体mRNA或其部分中的外显子排除和/或内含子保留的经分离或纯化的AON。

[0113] 本发明提供了能够与晚期糖基化终产物受体(RAGE)基因转录物上的选定靶标结合以调节RAGE基因转录物或其部分中的前体mRNA剪接的AON。

[0114] 例如,在本发明的一个方面,提供了10至50个核苷酸的AON,其包含与RAGE 前体 mRNA的区域或其部分互补的靶向序列,该区域或其部分与在调控mRNA的选择性剪接中涉及到的蛋白的结合相关。

[0115] 表1:人RAGE基因序列

5'上游序列	.....aggactctgtgccaaaggcatgaattcctagcattccctgtgacaagac
外显子 1	GACTGAAAGATGGGGGCTGGAGAGAGGGTGCAGGCCCCACCTAGGGCGGAGGCCACA GCAGGGAGAGGGGCAGACAGAGCCAGGACCCTGGAAGGAAGCAGGATGGCAGCCGG AACAGCAGTTGGAGCCTGGGTGCTGGTCCTCAGTCTGTGGG
内含子 1-2	gtgagccactccctcaaccccactg.....cctctaccatggtgctatctcccag
外显子 2	GGGCAGTAGTAGGTGCTCAAACATCACAGCCCGGATTGGCGAGCCACTGGTGTGAA GTGTAAGGGGGCCCCCAAGAAACCACCCAGCGGCTGGAATGGAACTG
内含子 2-3	gtaagcgggctcctgttgagcct.....ttagccctgtctctgttctag
外显子 3	AACACAGGCCGGACAGAAAGCTTGAAGGTCCTGTCTCCCCAGGGAGGAGGCCCTGG GACAGTGTGGCTCGTGTCTTCCCAACGGCTCCCTCTTCCGCTGTCTGGGATCC AGGATGAGGGGATTTTCCGGTGCCAGGCAATGAACAGGAATGAAAGGAGACCAAGTC CAACTACCGAGTCCGTGTCTACC
内含子 3-4	glaagaattccagggtcttctcaa.....tctgactggattttctccctcag
外显子 4	AGATTCCTGGGAAGCCAGAAATTGTAGATTCTGCCTCTGAACTCACGGCTGGTGTTC AATAAG
内含子 4-5	gtagtggaagaagcaggagaagta.....tctgaggtcaccactcttccccag
外显子 5	GTGGGGACATGTGTGTCAGAGGGAAGCTACCCTGCAGGGACTCTTAGCTGGCACTTGG ATGGGAAGCCCCTGGTGCCTAATGAGAAGG
内含子 5-6	gtgagtcclaagggtgcccccaagc.....aattgtcttatcctccatcatag
外显子 6	GAGTATCTGTGAAGGAACAGACCAGGAGACACCCTGAGACAGGGCTCTTCACACTGCA GTCGGAGCTAATGGTGACCCAGCCCGGGGAGGAGATCCCCGTCCCACCTTCTCCTGT AGCTTCAGCCCAGGCCTTCCCCGACACCGGGCCTTGCGCACAGCCCCATCCAGCCC CGTGTCTGGG
内含子 6-7	gtgagcatagggtggggagggcccca.....acctcaaaccttccaactcccag
外显子 7	AGCCTGTGCCTCTGGAGGAGGTCCAATTGGTGGTGGAGCCAGAAGGTGGAGCAGTAG CTCCTGGTGGAACCGTAACCCTGACCTGTGAAGTCCCTGCCAGCCCTCTCTCAAACT CACTGGATGAAGGAT
内含子 7-8	gtgagtgacctggagagaggggctg.....gtctctctccccctccccaccag

[0116]

[0117]	外显子 8	GGTGTGCCCTTGCCCTTCCCCCAGCCCTGTGCTGATCCTCCCTGAGATAGGGCCTC AGGACCAGGGAACCTACAGCTGTGTGGCCACCCATTCCAGCCACGGCCCCAGGAAA GCCGTGCTGTCAGCATCAGCATCATCG
	内含子 8-9	gtgagacctctcccaagccctaca.....gactggatccaactttgtctccag
	外显子 9	AACCAGGCGAGGAGGGGCCAACTGCAG
	内含子 9-10	gtgaggggttgataaagtcagga.....ctcaatttcctgtctccgtacag
	外显子 10	GCTCTGTGGGAGGATCAGGGCTGGGAACCTAGCCCTGGCCCTGGGGATCCTGGGAG GCCTGGGGACAGCCCGCTCATTGGGGTCATCTTGTGGCAAAGGCGGCAACGCC GAGGAGAGGAGAG
	内含子 10-11	gtgagtgagaaagccagaccctc.....cattcccccaatcttctctcag
	外显子 11	GAAGGCCCCAGAAAACCAGGAGGAAGAGGAGGAGCGTGCAGAACTGAATCAGTCGGA GGAACCTGAGGCAGGCGAGAGTAGTACTGGAGGGCCTTGGGGGCCACAGACAGAT CCCATCCATCAGCTCCCTTTTCTTTTCCCTTGAAGTCTTGGCCTCAGACCAACTCTC TCCTGTATAATCTCTCTCTGTATAACCCACCTTGCCAAGCTTTCTTCTACAACCAGAGC CCCCACAATGATGATTAACACCTGACACATCTTGC
	3'下游序列	tcttgtgtctgtgtgtgtatgagacacaacctcaccctataccct.....

[0118] 表2:人RAGE基因的结构域

[0119]	外显子	结构域
	1	N端信号肽
	2	V型免疫球蛋白结构域
	3	V型免疫球蛋白结构域
	4	V型免疫球蛋白结构域
	5	C型免疫球蛋白结构域1和2
	6	C型免疫球蛋白结构域1和2
	7	C型免疫球蛋白结构域1和2
	8	C型免疫球蛋白结构域1和2
	9	C型免疫球蛋白结构域1和2
	10	跨膜结构域
	11	疏水性细胞内胞质结构域

[0120] 与其他基于AON的疗法不同,本发明不通过RNA酶H的募集来诱导增加的RNA 降解,其中RNA酶H优先结合并降解双链体中与RAGE基因的DNA结合的RNA。它也不依赖于AON与RAGE基因组DNA的杂交或AON与mRNA的结合来调节通过干扰正常功能诸如复制、转录、易位和翻译而产生的RAGE蛋白的量。相反,AON 用于调节RAGE基因转录物或其部分中的前体mRNA剪接,并诱导外显子“跳跃”或内含子序列的(连续)保留。该策略优选降低能够介导RAGE依赖性信号传导的RAGE mRNA剪接形式的表达和/或增加缺乏能够介导RAGE依赖性信号传导的功能结构域的RAGE mRNA剪接形式的生成。

[0121] 根据本发明的第一方面,提供了能够与RAGE基因转录物上的选定靶标结合以调节RAGE基因转录物或其部分中的前体mRNA剪接的AON。广泛地说,提供了用于在RAGE基因转录物或其部分中诱导靶向外显子排除/内含子保留的经分离或纯化的AON。

[0122] “分离的”是指大体上或基本上不含在其天然状态下通常伴随它的组分的物质。例如,如本文所用,“分离的多核苷酸”或“分离的寡核苷酸”可以指已从天然存在状态下位于其侧翼的序列中纯化或移除的多核苷酸,例如从基因组中与DNA片段相邻的序列中移除的

该DNA片段。当涉及细胞时,术语“分离”是指从来源受试者(例如,患有多核苷酸重复疾病的受试者)中纯化细胞(例如,成纤维细胞、淋巴母细胞)。在DNA、mRNA或蛋白的上下文中,“分离”是指从来源(例如细胞)中回收DNA、mRNA或蛋白。

[0123] 可以说AON是“针对”或“靶向”与之杂交的靶序列。在某些实施例中,靶序列包括包含预加工的mRNA的3'或5'剪接位点、分支点或剪接调控中涉及到的其他序列(包括剪接增强子和剪接沉默子以及决定影响剪接的RNA的二级结构的位点)的区域。靶序列可以处于外显子内或处于内含子内或跨越内含子/外显子连接处。

[0124] 在某些实施例中,AON与靶RNA(即,剪接位点选择受调节的RNA)具有足够的序列互补性,以有效的方式阻断靶RNA(例如,前体mRNA)的区域。在示例性的实施例中,RAGE前体mRNA的此类阻断用以通过掩蔽剪接体蛋白的结合位点(否则将调节剪接)和/或通过改变靶向RNA的结构来调节剪接。在一些实施例中,靶RNA是靶前体mRNA(例如,RAGE基因前体mRNA)。

[0125] AON与靶RNA序列具有足够的序列互补性以调节靶RNA剪接意指AON具有足以触发否则将调节剪接的天然蛋白的结合位点的掩蔽的序列,和/或改变靶RNA的三维结构。

[0126] 可以使选定的AON更短,例如约12个碱基,或更长,例如约50个碱基,并且包括少量的错配,只要该序列足够互补以在与靶序列杂交时实现剪接调节,并且任选地与RNA形成具有45°C或更高的T<sub>m</sub>的异源双链体。

[0127] 优选地,AON选自包括SEQ ID NO:1-31和/或表3a-3d中任一个所示的序列的组。更优选地,AON是SEQ ID NO:11、18、19或20。

[0128] 在某些实施例中,靶序列与AON之间的互补程度足以形成稳定的双链体。AON与靶RNA序列的互补区域可以短至8-11个碱基,但可以是12-15个碱基或更多,例如10-50个碱基、10-40个碱基、12-30个碱基、12-25个碱基、15-25个碱基、12-20个碱基或15-20个碱基,包括这些范围之间的所有整数。约16-17个碱基的AON通常足够长以具有独特的互补序列。在某些实施例中,如本文所讨论的,可能需要最小长度的互补碱基来达到必需的结合T<sub>m</sub>。

[0129] 在某些实施例中,长达50个碱基的寡核苷酸可能是合适的,其中至少最小数目的碱基,例如10-12个碱基与靶序列互补。然而,一般而言,在小于约30个碱基的寡核苷酸长度下细胞中受到促进的摄取或主动摄取得以优化。对于本文进一步描述的磷酸二胺吗啉代寡聚物(PMO)AON,结合稳定性和摄取的最佳平衡通常发生在18-25个碱基的长度下。包括由约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个碱基组成的AON(例如,PMO、PMO-X、PNA、LNA、TINA、2'-OMe)。

[0130] 在某些实施例中,AON可以与靶序列100%互补,或者可以包括错配,例如以适应变体,只要在寡核苷酸与靶序列之间形成的异源双链体足够稳定以承受细胞核酸酶的作用和可能在体内发生的其他降解模式。因此,某些寡核苷酸可以在寡核苷酸与靶序列之间具有约或至少约70%的序列互补性,例如70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列互补性。

[0131] 如果存在错配,通常在杂交双链的末端区域比中间不稳定性低。根据充分理解的双链体稳定性原理,允许的错配数目将取决于寡核苷酸的长度、双链体中G:C碱基对的百分

比、双链体中的错配位置。尽管此类AON不一定与靶序列100%互补,但它有效地与靶序列稳定且特异性地结合,以便调节靶前体RNA的剪接。

[0132] AON与靶序列之间形成的双链体的稳定性是结合 $T_m$ 和双链体对细胞酶促裂解的敏感性的函数。寡核苷酸相对于互补序列RNA的 $T_m$ 可通过常规方法测量,诸如 Hames等人, *Nucleic Acid Hybridization*[核酸杂交], IRL出版社,1985,第107-108页描述的那些或如 Miyada C.G.和Wallace R.B.,1987,*Oligonucleotide Hybridization Techniques*[寡核苷酸杂交技术], *Methods Enzymol.*[酶学方法]第154卷第94-107页所述的那些。在某些实施例中,相对于互补序列RNA,AON可具有高于体温且优选高于约45°C或50°C的结合 $T_m$ 。还包括在60-80°C或更高范围内的 $T_m$ 。

[0133] 变体另外的实例包括在SEQ ID NO:1-31和/或表3a-3d中任一个所示序列的整个长度上具有约或至少约70%序列同一性或同源性,例如70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性或同源性的AON。更优选地,AON是SEQ ID NO:11、18、19或20。

[0134] 更具体地,提供了能够与选定靶位点结合以修饰RAGE基因转录物或其部分中的前体mRNA剪接的AON。AON优选地选自SEQ ID NO:1-31和/或表3a-3d中任一个所示的序列。更优选地,AON是SEQ ID NO:11、18、19或20。

[0135] 对前体mRNA剪接的修饰优选地诱导mRNA的一个或多个外显子的“跳跃”或去除或内含子的保留。由于内部截短或提前终止,与亲本全长RAGE蛋白相比时,所得蛋白优选具有较短的长度。这些截短的RAGE蛋白可称为全长RAGE蛋白的剪接形式。

[0136] 生成的mRNA的剩余外显子可以是框内的并且产生较短的蛋白,该较短的蛋白具有类似于亲本全长蛋白的序列,只是它在原始3'与5'末端之间的区域中具有内部截短。在另一种可能性中,外显子跳跃可以诱导产生下述蛋白的移码,其中该蛋白的第一部分与亲本全长蛋白基本上相同,但是其中该蛋白的第二部分由于移码而具有不同的序列(例如无义序列)。替代性地,由于阅读框的破坏和翻译提前终止的存在,外显子跳跃可诱导提前终止蛋白的产生。提前终止蛋白可以是mRNA提前终止(例如,外显子10和/或11的跳跃)的结果,或者可以是内含子(例如RAGE 9b)连续或错义跳跃的结果,从而提供含有外显子10和/或11mRNA的mRNA,但不提供由这些外显子编码的蛋白的表达。

[0137] 跳跃外显子1至9中的单个外显子将优选地破坏RAGE转录物的阅读框。这将通过无义介导的衰变导致RNA的降解增加。

[0138] 跳跃外显子1至11的单个外显子将优选地保持阅读框完好。这将优选地导致翻译成内部截短的蛋白。截短的蛋白或RAGE mRNA剪接形式可具有完全消除的功能,可具有降低的功能或充当诱饵受体。

[0139] 优选地,这些截短的、无义的或提前终止的蛋白缺乏一个或多个功能结构域,这些功能结构域涉及RAGE配体对细胞内信号传导途径的诱导或并置的GPCR对RAGE的非配体依赖性反式激活。例如,外显子10编码跨膜结构域,并且去除该外显子可以生成可溶性RAGE蛋白,该蛋白可以潜在地充当配体诱导的经由RAGE进行的信号传导的可溶性诱饵或竞争性拮抗剂。截短的、无义的或提前终止的蛋白可进一步缺乏其他因子的附着或结合位点,去除这些位点可导致RAGE蛋白与相关信号传导途径的相互作用减少。

[0140] 替代性地,去除一个或多个外显子可导致RAGE蛋白的错误折叠和蛋白成功转运通过膜的能力降低。

[0141] 存在内部截短的蛋白(即,缺乏由一个或多个外显子编码的氨基酸的蛋白)是优选的。如果RAGE蛋白受到抑制,则当身体试图补偿RAGE蛋白总量的减少时,可能存在RAGE转录升高的问题。相反,内部截短的蛋白(优选缺乏完整RAGE蛋白的一个或多个特征)的存在应足以防止转录升高,但由于功能性RAGE蛋白总量的减少仍提供治疗优势。

[0142] 本发明的AON诱导的外显子跳跃不需要完全或甚至基本上消除RAGE蛋白的功能。优选地,经由外显子跳跃过程调节选择性剪接导致RAGE蛋白的功能降低或受损。

[0143] 使用不同跳跃策略产生的RAGE的不同同种型可产生信号传导活性消除或降低的蛋白,这些蛋白可优选地用于治疗或预防与RAGE活性相关的不同疾病,诸如神经退行性疾病、癌症、肺病或炎性疾病。选择性剪接策略可形成截短的蛋白或功能降低的蛋白,这些蛋白可优选地用作与RAGE表达和活性相关的疾病的特定方面、形式或进展的治疗。

[0144] 使用AON的本发明的跳跃过程可以排除(跳跃)单个外显子,或者可以导致一次跳跃两个或更多个外显子。

[0145] 使用AON的本发明的跳跃过程可以包括保留内含子序列,有或没有直接跳跃一个或多个外显子。

[0146] 本发明的AON可以是能够与选定靶标结合以诱导RAGE基因转录物中的外显子排除的两种或更多种AON的组合。该组合可以是两种或更多种AON的混合物和/或包含连接在一起的两种或更多种或者两种或更多种AON的构建体。

[0147] 表3a:用于调节人RAGE外显子9中的选择性剪接的AON序列

SEQ ID NO	AON#	名称	序列 (5'至3')
1	3668	H-AGERex9A (-10+15)	CCUCCUCGCCUGGUUCUGGAAGACA
2	3669	H-AGERex9A (+02+21)	UUGGCCCCUCCUCGCCUGGU
3	3670	H-AGERex9A (+08+27)	CUGCAGUUGGCCCCUCCUCG
4	3671	H-AGERex9D (+07-13)	UCAAACCCUCACCUGCAGU
5	4103	H-AGERex9A (+3+27)	CCUGCAGUUGGCCCCUCCUCGCCUG
6	4104	H-AGERex9A (+10+27)	CCCCUCACCUGCAGUUGGCCCCUCC
7	4105	H-AGERex9A (+8+25)	GCAGUUGGCCCCUCCUC
8	4106	H-AGERex9D (+22-3)	CACCUCAG UUG GCCCCUCCUCGCC

[0149] 表3b. 用于调节人RAGE外显子10中的选择性剪接的AON序列

SEQ ID NO	AON#	名称	序列 (5'至 3')
9	3777	AGER_H10A (-10+15)	AUCCUCCCACAGAGCCUGUACGGAG
10	3778	AGER_H10A (-5+20)	CCCUGAUCCUCCCACAGAGCCUGUA
11	3779	AGER_H10A (+90+114)	GGCGUUGCCGCCUUUGCCACAAGAU
12	3780	AGER_H10D (+20-5)	CUCACCUCUCCUCUCCUCGGCGUUG
13	3781	AGER_H10D (+15-10)	CUCCACUCACCUCUCCUCUCCUCGG
[0150] 14	82	AGER_H10A (+60+79)	AGCAGGGCGGCUGUCCCCAG
15	83	AGER_H10A (+75+99)	GCCACAAGAUGACCCCAAUGAGCAG
16	84	AGER_A10 (+80+104)	CCUUUGCCACAAGAUGACCCCAAUG
17	85	AGER_A10 (+85+109)	UGCCGCCUUUGCCACAAGAUGACCC
18	87	AGER_H10 (+95+119)	UCCUCGGCGUUGCCGCCUUUGCCAC
19	90	AGER_H10A (+90+102)	UUUGCCACAAGAU
20	93	AGER_H10A (+88+107)	CCGCCUUUGCCACAAGAUGA

[0151] 表3c. 用于调节人RAGE内含子9中的选择性剪接的AON序列

SEQ ID NO	AON#	名称	序列 (5'至 3')
[0152] 21	88	AGER_H10A (-75-51)	UUUCUUGUUGACCAUCCCCCAGUC
22	89	AGER_H10A (-86-62)	CCAUCCCCCAGUCACAUGUGUUGG

[0153] 表3d. 用于调节鼠类RAGE的选择性剪接的AON序列

SEQ ID NO	AON#	名称	序列 (5'至 3')
23	3672	M-AgerEx9A (-10+15)	CCUCCUCGCCUGGUUCUGGAAGACA
24	3673	M-AgerEx9A (+02+21)	CUGGCCCCUCAUCGCCGGUU
25	3674	M-AgerEx9A (+08+27)	CUUCAGCUGGCCCCUCAUCG
26	3675	M-AgerEx9D (+07-13)	UCCAGUCCUCACCUUCAGC
[0154] 27	m3779	M-AgerEx10A (+90+114)	UGGGUUGUCGUUUUCGCCACAGGAU
28	m97	M-AgerEx10A (+48,+70)	ACUACUCCCAGGCCUCCCAGGAU
29	m98	M-AgerEx10A (+56+79)	GCAGGGCUACUACUCCCAGGCA
30	m101	M-AgerEx10D (-15+10)	UCUCACUCACCUCUCCUCACGCCUG
31	m102	M-AgerEx10A (-5+20)	CCCAGACUCACCCACAGAGCCUGUA

[0155] 本发明进一步提供了一种用于调节RAGE基因转录物中的选择性剪接的方法,该方法包括以下步骤:

[0156] 提供一种或多种如本文所述的AON,并且使所述一种或多种寡聚物与靶核酸位点结合。

[0157] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于调节RAGE前体mRNA的选择性剪接的核酸序列靶标,该核酸序列靶标包含选自由SEQ ID NO:1-31和/或表3a-3d中任一个所示的序

列组成的组核酸序列的DNA等效物,以及与其互补的序列。更优选地, AON是SEQ ID NO:11、18、19或20。AON可以是AON的组合,优选SEQ ID NO: 11和10的组合或SEQ ID NO:11和13的组合。

[0158] 设计AON以完全掩蔽共有剪接位点可能不一定会在靶向外显子的剪接方面产生变化。此外,发明人已经发现,当设计AON时,AON本身的大小或长度并不总是主要因素。对于一些靶标,短至20个碱基的AON能够诱导一些外显子包含,在某些情况下比针对相同外显子的其他较长(例如25个碱基)的寡聚物更有效。

[0159] 发明人还已发现,似乎不存在可被AON阻断或掩蔽以重新定向剪接的任何标准基序。已经发现,必须凭经验对每个基因靶标设计AON并且评估它们各自的功效。

[0160] 更具体地,AON可选自表3a-3d中任一个所示的那些。序列优选地选自SEQ ID NO:1-31中的任何一个或多个及其组合或混合物组成的组。更优选地,AON是SEQ ID NO:11、18、19或20。AON的组合优选地是SEQ ID NO:11和10的组合或SEQ ID NO: 11和13的组合。这包括可以在严格杂交条件下与此类序列杂交的序列,与其互补的序列,含有经修饰的碱基的序列,经修饰的骨架,以及在RAGE基因转录物中具有或调节前体mRNA加工活性的其功能性截短物或延伸物。

[0161] 当每个分子中足够数目的相应位置被可以彼此氢键结合的核苷酸占据时,寡聚物和DNA、cDNA或RNA彼此互补。因此,“可特异性杂交的”和“互补的”是用于表示足够程度的互补或配对使得在寡聚物与DNA、cDNA或RNA靶标之间发生稳定且特异性的结合的术语。本领域中应理解,AON的序列不必与其可特异性杂交的靶序列100%互补。当化合物与靶DNA或RNA分子的结合干扰靶DNA或RNA产物的正常功能,并且在需要特异性结合的条件下,即在体内测定或治疗性处理的情况下在生理条件下,以及在体外测定的情况下在进行这些测定的条件下,有足够程度的互补性以避免AON与非靶序列的非特异性结合,则该AON是可特异性杂交的。

[0162] 选择性杂交可以在低、中或高严格条件下进行,但优选在高严格条件下进行。本领域技术人员将认识到,除了碱基组成、互补链的长度和杂交核酸之间核苷酸碱基错配的数目之外,杂交的严格性还将受到诸如盐浓度、温度或有机溶剂等条件的影响。严格的温度条件通常将包括超过30°C,典型地超过37°C,以及优选地超过45°C,优选地至少50°C,并且典型地60°C-80°C或更高的温度。严格的盐条件一般将小于1000 mM,典型地小于500mM,且优选地小于200mM。然而,参数的组合比任何单个参数的量度重要得多。严格的杂交条件的实例是65°C和0.1x SSC (1x SSC=0.15M NaCl,0.015M柠檬酸钠pH 7.0)。因此,本发明的AON可包括与表3a-3d中任一个提供的序列或SEQ ID NO:1-31选择性杂交的寡聚物。更优选地,AON是SEQ ID NO: 11、18、19或20。

[0163] 应理解,结构蛋白中外显子末端的密码子排列可能并非总是在密码子末端处断裂,因此可能需要从前体mRNA中删除一个以上外显子以确保mRNA的框内阅读。在此类情形下,可能需要通过本发明的方法选择多种AON,其中每一种针对负责诱导所需外显子和/或内含子的包含的不同区域。在给定的离子强度和pH下, $T_m$ 是50%的靶序列与互补多核苷酸杂交所处的温度。此类杂交可以发生在AON与靶序列“接近”或“基本”互补以及精确互补的情况下。

[0164] 通常,当与AON的核苷酸在至少约14个核苷酸的链段上存在至少约55%同一性,优

选至少约65%，更优选至少约75%且最优选至少约90%、95%、98%或99%同一性时，将发生选择性杂交。如所述，同源性比较的长度可以是更长的链段，并且在某些实施例中常常将是至少约九个核苷酸，通常至少约12个核苷酸，更通常至少约20个，常常至少约21、22、23或24个核苷酸，至少约25、26、27或28个核苷酸，至少约29、30、31或32个核苷酸，至少约36个或更多个核苷酸的链段。

[0165] 因此，本发明的AON序列优选地与本文序列表中所示的序列具有至少75%，更优选至少85%，更优选至少86%、87%、88%、89%或90%的同源性。更优选存在至少91%、92%、93%、94%或95%，更优选至少96%、97%、98%或99%的同源性。通常，AON的长度越短，获得选择性杂交所需的同源性越高。因此，在本发明的AON由少于约30个核苷酸组成的情况下，优选的是，与本文序列表中列出的AON相比，百分比同一性大于75%，优选大于85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。核苷酸同源性比较可以通过序列比较程序进行，诸如GCG Wisconsin Bestfit程序或GAP (Deveraux等人, 1984, *Nucleic Acids Research* [核酸研究] 12, 387-395)。以这种方式，可以通过在比对中插入空位来比较与本文引用的序列长度相似或基本上不同的序列，此类空位例如通过GAP使用的比较算法来确定。

[0166] 本发明的AON可以具有与靶序列同源性降低的区域以及与靶序列有精确同源性的区域。寡聚物不必在其整个长度上具有精确同源性。例如，寡聚物可以具有与靶序列相同的至少4或5个碱基的连续链段，优选与靶序列相同的至少6或7个碱基的连续链段，更优选与靶序列相同的至少8或9个碱基的连续链段。寡聚物可以具有与靶序列相同的至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个碱基的链段。寡聚物序列的剩余链段可间断性地与靶序列相同；例如，剩余序列可以具有相同的碱基，后面是不相同的碱基，后面是相同的碱基。替代性地(或同样)，寡聚物序列可具有散布有不完全同源的链段的若干相同序列链段(例如3、4、5或6个碱基)。此类序列错配将优选没有或很少有剪接转换活性损失。

[0167] 术语“调节(modulate)”或“调节(modulates)”包括“增加”或“减小(decrease)”一个或多个可量化的参数，任选地以限定的和/或统计上显著的量。术语“增加(increase)”或“增加(increasing)”、“增强(enhance)”或“增强(enhancing)”或“刺激(stimulate)”或“刺激(stimulating)”通常是指一种或多种AON或组合物在细胞或受试者中产生或引起相对于没有AON时或对照化合物引起的反应更大的生理反应(即，下游效应)的能力。术语“减小(decreasing)”或“减小(decrease)”通常是指一种或多种AON或组合物在细胞或受试者中产生或引起相对于没有AON时或对照化合物引起的反应降低的生理反应(即，下游效应)的能力。

[0168] 相关的生理或细胞反应(体内或体外)对于本领域技术人员而言将是显而易见的，并且可以包括在有需要的细胞、组织或受试者中增加编码RAGE的前体mRNA中特定外显子的排除，减少编码RAGE的前体mRNA的量或减少功能性RAGE蛋白的表达。“增加的”或“增强的”量通常是统计上显著的量，并且可以包括是没有AON(不存在试剂)时或对照化合物产生的量的1.1倍、1.2倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍或更多倍(例如，500倍、1000倍)(包括其间且在1以上的所有整数和小数点，例如1.5、1.6、1.7、1.8)的增加。术语“降低”或“抑制”通常可涉及一种或多种AON或组合物“减少”相

关生理或细胞反应(诸如本文所述的疾病或病状的症状)的能力,如根据诊断领域中的常规技术所测量。相关的生理或细胞反应(体内或体外)对于本领域技术人员而言将是显而易见的,并且可以包括疾病诸如癌症、神经退行性疾病、肺病和其他炎性疾病的症状或病理的减轻。与没有AON时或对照组合物产生的反应相比,反应的“减少”可以是统计上显著的,并且可以包括1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的减少,包括其间的所有整数。

[0169] AON的长度可以变化,只要它能够与前体mRNA分子内的预期位置选择性地结合。此类序列的长度可根据本文所述的选择程序来确定。通常,AON的长度将为约10个核苷酸,长度最多约50个核苷酸。然而,应当理解,该范围内的任何核苷酸长度都可用于该方法中。优选地,AON的长度为10至40、10至35、15至30个核苷酸长或20至30个核苷酸长,最优选约25至30个核苷酸长。例如,寡聚物的长度可以是20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0170] 如本文所用,“AON”是指允许核碱基通过沃森-克里克碱基配对与RNA中的靶序列杂交以在靶序列内形成寡核苷酸:RNA异源双链体的核苷酸或核苷酸类似物的线性序列。术语“AON”、“寡聚物”和“反义化合物”可以互换用于指寡核苷酸。环状亚基可基于核糖或另一种戊糖,或在某些实施例中,基于吗啉基(参见以下对吗啉代寡核苷酸的描述)。除了本领域已知的其他反义试剂外,还考虑到肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)和2'-O-甲基寡核苷酸。

[0171] 包括非天然存在的AON或“寡核苷酸类似物”,包括具有以下方面的AON或寡核苷酸:(i)经修饰的骨架结构(例如不同于天然存在的寡核苷酸和多核苷酸中发现的标准磷酸二酯连键的骨架)和/或(ii)经修饰的糖部分(例如吗啉基部分而非核糖或脱氧核糖部分)。寡核苷酸类似物支持能够通过沃森-克里克碱基配对与标准多核苷酸碱基氢键结合的碱基,其中类似物骨架以容许寡核苷酸类似物分子与标准多核苷酸(例如单链RNA或单链DNA)中的碱基之间以序列特异性方式进行这种氢键结合的方式呈现碱基。优选的类似物是具有基本上不带电荷的含磷骨架的那些。

[0172] 产生AON的一种方法是2'羟基核糖位置的甲基化和硫代磷酸酯骨架的并入产生表面上类似于RNA但对核酸酶降解更具抗性的分子,但是本发明领域的技术人员将知道可用于本发明目的的其他形式的合适骨架。

[0173] 为了避免前体mRNA在与AON形成双链体期间降解,该方法中使用的AON可适于最小化或防止内源RNA酶H的裂解。这种性质是高度优选的,因为用未甲基化的寡聚物(胞内或在含有RNA酶H的粗提物中)处理RNA导致前体mRNA:AON双链体的降解。能够绕过或不诱导此类降解的任何形式的经修饰的AON都可以用于本发明方法中。可通过修饰本发明的AON使其包含部分不饱和脂族烃链和一个或多个极性基团或带电基团(包括羧酸基团、酯基团和醇基团)来获得核酸酶抗性。

[0174] 当与RNA形成双链体时不被细胞RNA酶H裂解的AON的实例是2'-O-甲基衍生物。此类2'-O-甲基-寡核糖核苷酸在细胞环境和动物组织中是稳定的,并且它们与RNA的双链体具有比它们的核糖或脱氧核糖对应物更高的 $T_m$ 值。替代性地,本发明的核酸酶抗性AON可以有最后3'-末端核苷酸中的至少一个被氟化。还替代性地,本发明的核酸酶抗性AON在最后

3'-末端核苷酸碱基中的至少两个之间具有硫代磷酸酯键连接,优选在最后四个3'-末端核苷酸碱基之间具有硫代磷酸酯键连接。

[0175] 也可以用替代性的寡核苷酸化学方法实现增加的剪接转换。例如,AON可以选自包括以下项的列表:氨基磷酸酯或磷酰二胺吗啉代寡聚物(PMO);PMO-X;PPMO;肽核酸(PNA);锁核酸(LNA)及其衍生物,包括 $\alpha$ -L-LNA、2'-氨基LNA、4'-甲基 LNA和4'-O-甲基LNA;乙烯桥接核酸(ENA)及其衍生物;硫代磷酸酯寡聚物;三环DNA寡聚物(tcDNA);三环硫代磷酸酯寡聚物;2'-O-甲基修饰的寡聚物(2'-OMe);2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE);2'-氟代,2'-氟代阿拉伯糖(FANA);非锁核酸(UNA);热稳定扭曲插入核酸(TINA)、己糖醇核酸(HNA);环己烯基核酸(CeNA);2'-氨基(2'-NH<sub>2</sub>);2'-O-亚乙基胺或作为mixmer或作为gapmer的前述的任何组合。为了进一步提高递送功效,上面提到的经修饰的核苷酸常常与脂肪酸/脂质/胆固醇/氨基酸/碳水化合物/多糖/纳米颗粒等一起缀合至糖或核碱基部分。这些缀合的核苷酸衍生物也可用于构建外显子跳跃AON。反义寡核苷酸诱导的人RAGE基因转录物的剪接修饰通常使用硫代磷酸酯骨架上的寡核糖核苷酸、PNA、2OMe或MOE修饰的碱基。尽管2OMeA0用于寡核苷酸设计,但由于当作为阳离子脂质复合物递送时它们在体外有效摄取,这些化合物对核酸酶降解敏感,并且被认为对于体内或临床应用不是理想的。当使用替代性化学方法生成本发明的AON时,本文提供的序列的尿嘧啶(U)可被胸腺嘧啶(T)置换。

[0176] 在本发明的AON内包括非天然存在的寡聚物或“寡核苷酸类似物”,包括具有以下方面的寡聚物:(i)经修饰的骨架结构(例如不同于天然存在的寡核苷酸和多核苷酸中发现的标准磷酸二酯连键的骨架)和/或(ii)经修饰的糖部分(例如吗啉基部分而非核糖或脱氧核糖部分)。寡聚物类似物支持能够通过沃森-克里克碱基配对与标准多核苷酸碱基氢键结合的碱基,其中类似物骨架以容许寡聚物类似物分子与标准多核苷酸(例如单链RNA或单链DNA)中的碱基之间以序列特异性方式进行这种氢键结合的方式呈现碱基。优选的类似物是具有基本上不带电荷的含磷骨架的那些。

[0177] 不激活RNA酶H的反义寡核苷酸可以根据已知技术制备(参见,例如,美国专利5,149,797)。此类AON,可以是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸序列,仅仅含有在空间上阻碍或防止RNA酶H与含有寡聚物作为其一个成员的双链体分子结合的任何结构修饰,该结构修饰基本上不会阻碍或破坏双链体形成。因为双链体形成中所涉及的寡聚物部分基本上不同于RNA酶H与其结合中所涉及的那些部分,所以可获得许多不激活RNA酶H的AON。例如,此类AON可以是寡聚物,其中至少一个或全部核苷酸间桥接磷酸残基是经修饰的磷酸酯,诸如甲基磷酸酯、甲基硫代磷酸酯、磷酰吗啉、磷酰哌嗪、硼磷酸酯、酰胺连键和氨基磷酸酯。例如,每隔一个核苷酸间桥接磷酸残基可以如所述进行修饰。在另一个非限制性实例中,此类AON是其中至少一个或全部核苷酸含有2'低级烷基部分(诸如C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>直链或支链、饱和或不饱和烷基,诸如甲基、乙基、乙烯基、丙基、1-丙烯基、2-丙烯基和异丙基)的分子。例如,每隔一个核苷酸可以如所述进行修饰。

[0178] 虽然上述AON是本发明AON的优选形式,但本发明包括其他寡聚反义分子,包括但不限于如下所述的寡聚物模拟物。

[0179] 可用于本发明的优选AON的具体实例包括含有经修饰的骨架或非天然核苷间连键的寡聚物。如本说明书中所定义,具有经修饰的骨架的寡聚物包括在骨架中保留磷原子的那些和在骨架中没有磷原子的那些。出于本说明书的目的,并且如本领域中有时提及的,在

它们的核苷间骨架中没有磷原子的经修饰的寡聚物也可以被认为是 AON。

[0180] 在其他优选的寡聚物模拟物中,核苷酸单元的糖和核苷间连键(即骨架)均被新基团置换。维持碱基单元以与适当的核酸靶化合物杂交。一种此类寡聚化合物,即已经证实具有优异杂交性质的寡聚物模拟物,被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,寡聚物的糖骨架被含酰胺的骨架,尤其是氨基乙基甘氨酸骨架置换。这些核碱基得以保留并且直接或间接地结合至该骨架的酰胺部分的氮杂氮原子。

[0181] 另一种优选的化学物质是不受任何已知的核酸酶或蛋白酶降解的磷酸二胺吗啉代寡聚物(PMO)寡聚化合物。这些化合物不带电荷,当与RNA链结合时不激活RNA 酶H活性,并且已经证实在体内施用后会发挥持续的剪接调节作用(Summerton和 Weller, Antisense Nucleic Acid Drug Development [反义核酸药物开发], 7, 187-197)。

[0182] 经修饰的寡聚物可以含有一个或多个经取代的糖部分。寡聚物也可以包括核碱基(在本领域中常常简称为“碱基”)修饰或取代。某些核碱基对提高本发明的寡聚化合物的结合亲和力是特别有用的。这些包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2、N-6 和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。已经证实5-甲基胞嘧啶取代会使核酸双链体稳定性增加0.6-1.2°C,甚至更特别是当与 2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0183] 本发明寡聚物的另一种修饰涉及将增强寡聚物的活性、细胞分布或细胞摄取的一个或多个部分或缀合物化学连接到寡聚物。此类部分包括但不限于脂质部分(诸如胆固醇部分)、胆酸、硫醚(例如己基-S-三苯甲基硫醇)、硫代胆固醇、脂肪链(例如十二烷二醇或十一烷基残基)、磷脂(例如二-十六烷基-外消旋甘油或三乙铵1,2-二-O-十六烷基外消旋甘油-3-H-磷酸酯)、聚胺或聚乙二醇链或金刚烷乙酸、棕榈基部分、肉豆蔻基或十八烷基胺或己氨基-羰基-羟胆固醇部分。

[0184] 已经将细胞穿透肽添加到磷酸二胺吗啉代寡聚物中以增强细胞摄取和核定位。已经证实不同的肽标签会影响摄取效率和靶组织特异性,如Jearawiriyapaisarn等人(2008), Mol. Ther. [分子疗法] 16 9, 1624-1629中所示。

[0185] 对于给定化合物中的所有位置而言不需要均一地进行修饰,并且事实上可以将上述修饰中的多于一种并入单一化合物中,或者甚至并入寡聚物内的单一核苷处。本发明还包括是嵌合化合物的AON。在本发明的上下文中,“嵌合”AON或“嵌合体”是AON,特别是寡聚物,其含有两个或更多个化学上不同的区域,每个区域由至少一个单体单元组成,在寡聚物化合物的情况下即是核苷酸。这些寡聚物通常含有至少一个区域,其中寡聚物经修饰以便赋予寡聚物或AON对核酸酶降解增加的抗性,增加的细胞摄取,和用于增加对靶核酸的结合亲和力的附加区域。

[0186] AON及其变体的活性可以根据本领域的常规技术进行测定。例如,检查的RNA 和蛋白的剪接形式和表达水平可以通过用于检测转录的核酸或蛋白的剪接形式和/或表达的多种公知方法中的任一种来评估。此类方法的非限制性实例包括RNA剪接形式的RT-PCR,接着是PCR产物的大小分离,核酸杂交方法例如Northern印迹和/或使用核酸阵列;核酸扩增方法;用于检测蛋白的免疫学方法;蛋白纯化方法;以及蛋白功能或活性测定。

[0187] RNA表达水平可以通过从细胞、组织或生物体制备mRNA/cDNA(即,转录的多核苷酸),并通过使mRNA/cDNA与参考多核苷酸(测定的核酸的补体)或其片段杂交来评估。cDNA

可任选地在与互补多核苷酸杂交之前使用多种聚合酶链反应或体外转录方法中的任一种进行扩增；优选地，它不进行扩增。还可以使用定量PCR检测一种或多种转录物的表达以评估转录物的表达水平。

[0188] 本发明提供了AON诱导的RAGE基因转录物的剪接转换，临床相关的寡聚物化学和递送系统，以将RAGE剪接操纵引导至治疗水平。全长RAGE mRNA的量大幅降低，以及因此RAGE基因转录的RAGE蛋白的量大幅降低通过以下方式实现：

[0189] a) 使用成纤维细胞细胞系通过以下的实验评估进行体外寡聚物精制：(i) 内含子增强子靶基序，(ii) AON长度和寡聚物混合物的开发，(iii) 化学物质的选择，和(iv) 添加细胞穿透肽(CPP)以增强寡聚物递送；以及

[0190] b) 详细评价生成具有一个或多个缺失外显子的RAGE转录物的新方法。

[0191] 因而，本文证明RAGE前体mRNA的选择性剪接可用特异性AON调节。以这种方式，可以获得全长(能够进行信号传导的)RAGE蛋白的量的功能性显著减少，和/或可以实现非信号传导诱饵受体RAGE mRNA剪接形式(RAGE\_v1)或其他诱饵受体的增加，从而减少与诸如神经退行性疾病、癌症、肺病和其他炎性疾病等疾病相关的严重病理。

[0192] 根据本发明使用的AON可以通过公知的固相合成技术方便地制备。用于此类合成的设备由包括例如应用生物系统公司(Applied Biosystems)(加州福斯特市(Foster City, Calif.))在内的几个供应商销售。在美国专利号4,458,066中描述了一种用于在改性固体支撑物上合成寡聚物的方法。

[0193] 可以另外地或替代性地采用本领域已知的用于此类合成的任何其他手段。使用类似技术制备寡聚物诸如硫代磷酸酯和烷基化衍生物是公知的。在一个此类自动化实施例中，二乙基-亚磷酰胺用作原材料并且可以如Beaucage等人(1981)Tetrahedron Letters [四面体快报], 22:1859-1862所述那样合成。

[0194] 本发明的AON是体外合成的，不包括生物来源的反义组合物，或设计用于指导 AON体内合成的遗传载体构建体。本发明的分子还可以与其他分子、分子结构或化合物的混合物，例如脂质体，受体靶向分子，口服、直肠、局部或其他制剂包封、缀合或以其他方式缔合，以辅助摄取、分布和/或吸收。

[0195] 本发明的AON还可用作可用于疾病治疗目的的预防剂或治疗剂。因此，在一个实施例中，本发明提供以治疗有效量与药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂配混的与RAGE前体mRNA中的选定靶标结合以诱导如本文所述的有效且一致的外显子跳跃的AON。

[0196] 因此本发明提供了一种用于治疗、预防或缓解患者中与RAGE表达相关的疾病的影响的预防性或治疗性药物组合物，该组合物包含：

[0197] a) 一种或多种如本文所述的AON，和

[0198] b) 一种或多种药学上可接受的载剂和/或稀释剂。

[0199] 优选地，与RAGE表达相关的疾病选自包括以下项的列表：神经病症、癌症；心血管病症；消化病症；呼吸病症、肌肉骨骼病症、结缔组织病症、肾脏病症、生殖病症、皮肤病症、眼部病症和内分泌病症。

[0200] 在本发明的一种形式中，RAGE相关病症是选自下组的心血管病症：动脉粥样硬化、缺血性心脏病、心肌炎、心内膜炎、心肌病、急性风湿热、慢性风湿性心脏病、脑血管疾病/中风、心力衰竭、血管钙化、外周血管疾病和淋巴管炎。

[0201] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症是选自下组的消化系统病症:牙周炎、食管炎、胃炎、胃十二指肠溃疡、克罗恩病(Crohn disease)、溃疡性结肠炎、缺血性结肠炎、肠炎和小肠结肠炎、腹膜炎、酒精性肝病、肝炎、中毒性肝病、胆汁性肝硬化、肝纤维化/肝硬化、非酒精性脂肪肝病/非酒精性脂肪肝炎(NAFLD/NASH)、肝脏创伤以及肝损伤、创伤或手术恢复。

[0202] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症是选自下组的癌症:唇、口和咽的恶性肿瘤,消化器官的恶性肿瘤,呼吸和胸内器官的恶性肿瘤,骨和关节软骨的恶性肿瘤,黑素瘤和皮肤的其他恶性肿瘤,间皮和软组织的恶性肿瘤,乳房的恶性肿瘤,女性生殖器官的恶性肿瘤,男性生殖器官的恶性肿瘤,泌尿道的恶性肿瘤,眼、脑和中枢神经系统其他部分的恶性肿瘤,甲状腺和其他内分泌腺的恶性肿瘤,淋巴、造血组织和相关组织的恶性肿瘤,不明确的、继发性和/或未特定部位的恶性肿瘤。

[0203] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症为神经病症并且选自下组:中枢神经系统的炎性疾病、主要影响中枢神经系统的全身性萎缩、锥体束外和运动障碍,帕金森病(Parkinson's disease)、中枢神经系统的脱髓鞘疾病、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、局限性脑萎缩、路易体病(Lewy body disease)、癫痫、偏头痛、神经性疼痛、糖尿病性神经病、多神经病、神经胶质瘤发展和进展、脊髓创伤和缺血性脑损伤 / 中风、脑创伤以及脑损伤、创伤或手术恢复。

[0204] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症为肌肉骨骼病症并且选自下组:肌营养不良、先天性和沉积性肌病、多肌炎、重症肌无力、皮肌炎、包涵体肌炎、肌肉萎缩和肌肉损伤。

[0205] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症为精神病症并且选自下组:痴呆、阿尔茨海默病、血管性痴呆、成瘾、精神分裂症、主要情感障碍、抑郁症、躁狂症、双相型障碍和焦虑症。

[0206] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症为呼吸(肺部)病症并且选自下组:急性上呼吸道感染、鼻炎、鼻咽炎、鼻窦炎、喉炎、流感和肺炎、急性支气管炎、急性细支气管炎、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、支气管扩张、肺气肿、由外部试剂引起的慢性肺病、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、嗜酸性粒细胞增多症和胸膜炎、肺部创伤以及肺损伤、创伤或手术恢复。

[0207] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症为结缔组织病症并且选自下组:骨关节炎、感染性关节炎、类风湿性关节炎、银屑病性和肠病性关节炎、幼年型关节炎、痛风和其他晶体性关节炎、糖尿病性关节炎、结节性多动脉炎、变应性肉芽肿性血管炎(Churg-Strauss)、黏膜皮肤淋巴结综合征[川崎病]、超敏性血管炎、古德帕斯丘综合征(Goodpasture syndrome)、血栓性微血管病、韦格纳肉芽肿病(Wegener granulomatosis)、主动脉弓综合征[高安(Takayasu)]、巨细胞动脉炎、风湿性多肌痛、显微镜下多血管炎、低补体血症性血管炎、全身性红斑狼疮、皮多肌炎、多肌炎、系统性硬化、CR(E)ST综合征、干燥综合征(Sicca syndrome)[舍格伦(Sjögren)]、混合性结缔组织病、白塞氏病(Behçet disease)、创伤性肌肉损伤、扭伤、劳损和骨折。

[0208] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症为肾脏病症并且选自下组:肾小球肾炎、肾炎、糖尿病性肾病、间质性肾炎、阻塞性和反流性肾病、急性肾衰竭和慢性肾病。

[0209] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症为生殖病症并且选自下组:前列腺炎、前列腺肥大、前列腺发育不良、输卵管炎、卵巢炎、盆腔炎性疾病(PID)、多囊卵巢综合征、宫颈炎、宫颈非典型增生、阴道炎、外阴炎。

[0210] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症是选自下组的皮肤病症:皮炎、湿疹、天疱疮/类天疱疮、银屑病、玫瑰糠疹、扁平苔藓、荨麻疹、多形性红斑、结节性红斑、晒伤、角化病、光老化性皮肤溃疡、浅表皮肤损伤和开放性伤口。

[0211] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症是选自下组的眼部病症:角膜炎、结膜炎、视网膜炎、青光眼、巩膜炎、巩膜外层炎、脉络膜视网膜炎、糖尿病性视网膜病、黄斑水肿、早产儿视网膜炎和视神经炎、眼创伤以及眼损伤、创伤或手术恢复。

[0212] 在本发明的一种形式中,RAGE相关病症是选自下组的内分泌病症:糖尿病、胰岛素抵抗、葡萄糖耐量降低和甲状腺炎。

[0213] 该组合物可以包含约1nM至1000nM的本发明的每种所需AON。优选地,该组合物可包含约1nM至500nM、10nM至500nM、50nM至750nM、10nM至500nM、1nM至100nM、1nM至50nM、1nM至40nM、1nM至30nM、1nM至20nM,最优选1nM至10nM的本发明的每种AON。

[0214] 该组合物可包含约1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、20nm、50nm、75nm、100nm、150nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm、500nm、550nm、600nm、650nm、700nm、750nm、800nm、850nm、900nm、950nm或1000nm的本发明的每种所需AON。

[0215] 本发明进一步提供了一种或多种AON,其适于以适合递送至患者的形式帮助对诸如RAGE表达相关疾病或病理等疾病症状的预防性或治疗性处理、预防或改善。

[0216] 短语“药学上可接受的”是指分子实体和组合物是生理上可耐受的,并且当施用给患者时,通常不会产生过敏或类似不良反应,诸如胃部不适等。术语“载剂”是指与化合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类药物载剂可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。水或盐水溶液及右旋糖和甘油水溶液优选用作载剂,特别是对于注射液而言。合适的药物载剂在Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学],第18版,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版有限公司(Mack Publishing Co., Easton,PA), (1990)中有描述。

[0217] 在本发明的更具体的形式中,提供了包含治疗有效量的一种或多种本发明的AON以及药学上可接受的稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载剂的药物组合物。此类组合物包括各种缓冲液含量(例如Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐)、pH和离子强度的稀释剂以及添加剂,诸如洗涤剂 and 增溶剂(例如吐温80(Tween 80)、聚山梨醇酯80),抗氧化剂(例如抗坏血酸、焦亚硫酸钠),防腐剂(例如硫柳汞、苯甲醇)和填充物质(例如乳糖、甘露醇)。该材料可以掺入聚合化合物诸如聚乳酸、聚乙醇酸等的颗粒制备物中或掺入脂质体中。也可以使用透明质酸。此类组合物可影响本发明蛋白和衍生物的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除率。参见,例如,Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学],第18版(1990,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版有限公司(Mack Publishing Co., Easton,PA) 18042)第1435-1712页,其通过援引并入本文。该组合物可以制成液体形式,或者可以呈干粉,诸如冻干形式。

[0218] 应当理解,根据本发明提供的药物组合物可以通过本领域已知的任何手段施用。优选地,用于施用的药物组合物通过注射、口服、局部施用或通过肺或鼻途径施用。适当的

途径可由本领域技术人员视治疗中受试者的状况来确定。

[0219] 在某些实施例中,本披露的AON可通过肺或鼻途径递送(例如,经由掺入AON的雾化盐水)。在肺部中发现RAGE mRNA在健康人组织中的最高内源性表达并且可经由气道接近。吸入式寡核苷酸是呼吸道疾病的新兴治疗方式。气道独特地衬有肺表面活性物质,这些表面活性物质主要由两性离子脂质组成。这些表面活性物质脂质在呼吸道的pH下具有阳离子特性。当吸入阴离子寡核苷酸时,它们倾向于被表面活性物质吸附,产生重新配制的颗粒,已经假设这些颗粒被支气管和肺泡上皮细胞有效地吸收到肺细胞中。值得注意的是,已经证实AON能够经受雾化过程。

[0220] 在某些实施例中,AON更优选通过静脉内、动脉内、腹膜内、肌内或皮下施用途径递送。血管或血管外循环、血液或淋巴系统和脑脊髓液是可以引入AON的一些非限制性部位。

[0221] 在某些实施例中,可以采用直接CNS递送,例如,可以使用脑室内或鞘内施用作为施用途径。

[0222] 用于局部施用的制剂包括其中本披露的寡聚物与局部递送剂诸如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂配混的那些。脂质和脂质体包括中性(例如,二油酰基磷脂酰DOPE乙醇胺、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰基磷脂酰胆碱)、阴性(例如二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油DMPG)和阳离子性(例如二油酰基四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰基磷脂酰乙醇胺DOTMA)。对于局部或其他施用,本披露的寡聚物可包封在脂质体内或者可与脂质体形成复合物,特别与阳离子脂质体形成复合物。替代性地,寡聚物可以与脂质,特别是与阳离子脂质复合。脂肪酸和酯、其药学上可接受的盐及其用途在美国专利号6,287,860和/或1999年5月20日提交的美国专利申请序列号09/315,298中有进一步描述。

[0223] 在某些实施例中,本披露的AON可通过透皮方法递送(例如,经由将AON掺入到例如乳液中,其中此类AON任选地包装到脂质体中)。此类透皮和乳液/脂质体介导的递送方法在本领域中描述用于AON递送,例如在美国专利号6,965,025中。

[0224] 本文所述的AON也可经由可植入装置递送。此类装置的设计是本领域公认的方法,例如美国专利号6,969,400中描述的合成植入物设计。

[0225] 用于口服施用的组合物和制剂包括粉末或颗粒剂、微粒、纳米颗粒、在水或非水介质中的悬浮液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、小袋、片剂或小片。可能需要增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂。口服制剂是其中本披露的寡聚物连同一种或多种渗透增强剂表面活性剂和螯合剂一起施用的那些。表面活性剂包括脂肪酸和/或其酯或盐、胆汁酸和/或其盐。胆汁酸/盐和脂肪酸及其用途在美国专利号6,287,860中有进一步描述。在一些实施例中,本披露提供了渗透增强剂的组合,例如脂肪酸/盐与胆汁酸/盐组合。示例性的组合是月桂酸、癸酸和UDCA的钠盐。其他渗透增强剂包括聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-十六烷基醚。本披露的寡聚物可以以颗粒形式(包括喷雾干燥的颗粒)口服递送,或复合形成微粒或纳米颗粒。寡聚物复合剂及其用途在美国专利号6,287,860中有进一步描述。寡聚物的口服制剂及其制备在U.S. 6,887,906、09/315,298(1999年5月20日提交)和/或US 20030027780中有详细描述。

[0226] 用于肠胃外、鞘内或心室内施用的组合物和制剂可包括无菌水溶液,该无菌水溶液还可以含有缓冲剂、稀释剂和其他合适的添加剂,诸如但不限于渗透增强剂、载剂化合物

和其他药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0227] 治疗有用量的AON的递送可以通过先前公开的方法实现。例如，AON的细胞内递送可以经由包含AON与有效量的嵌段共聚物的配混物的组合物进行。在美国专利申请US 20040248833中描述了这种方法的实例。在Mann CJ等人(2001)Proc,Natl. Acad.Science [美国国家科学院院刊], 98 (1) 42-47和在Gebiski等人(2003)Human Molecular Genetics [人类分子遗传学], 12 (15) :1801-1811中描述了将AON递送到细胞核的其他方法。在US 6, 806, 084中描述了将核酸分子通过表达载体以裸DNA或与脂质载剂复合的方式引入细胞中的方法。

[0228] 可能需要在胶体分散体系中递送AON。胶体分散体系包括大分子复合物、纳米囊、微球、珠粒和基于脂质的体系,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体或脂质体制剂。这些胶体分散体系可用于制造治疗性药物组合物。

[0229] 脂质体是可以用作体外和体内递送媒介物的人工膜囊泡。这些制剂可以具有净阳离子、阴离子或中性电荷特征,并且具有用于体外、体内和离体递送方法的有用特征。已经证实大的单层囊泡可包封相当大百分比的含有大分子的水性缓冲液。RNA和 DNA可以包封在水性内部并以生物活性形式递送至细胞 (Fraley等人,Trends Biochem. Sci.[生物化学趋势]6:77,1981)。

[0230] 为了使脂质体成为有效的基因转移媒介物,应当存在以下特征:(1) 高效包封目标AON,同时不损害其生物活性;(2) 与非靶细胞相比,与靶细胞优先大幅结合;(3) 高效递送囊泡的水性内容物至靶细胞的细胞质;以及(4) 遗传信息的准确和有效表达 (Mannino等人,Biotechniques[生物技术],6:682,1988)。脂质体的组成通常是磷脂 (特别是高相变温度磷脂) 通常与类固醇 (尤其是胆固醇) 的组合。也可以使用其他磷脂或其他脂质。脂质体的物理特征取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,据信,带正电荷的脂质体与带负电荷的DNA分子相互作用形成稳定的复合物。据信,pH敏感性或带负电荷的脂质体会捕获DNA而不是与它复合。阳离子和非阳离子脂质体均已用于将DNA递送至细胞。

[0231] 脂质体还包括“空间稳定的”脂质体,如本文所用的术语“空间稳定的”脂质体是指包含一种或多种特化脂质的脂质体,特化脂质当掺入到脂质体中时,相对于缺乏此类特化脂质的脂质体,导致循环寿命增加。空间稳定的脂质体的实例是其中脂质体的形成囊泡的脂质部分的一部分包含一种或多种糖脂或是具有一种或多种亲水性聚合物诸如聚乙二醇(PEG)部分的衍生物的那些脂质体。脂质体及其用途在U.S. 6,287,860中有进一步描述。

[0232] 本文所述的AON也可经由可植入装置递送。此类装置的设计是本领域公认的方法,例如美国专利号6,969,400中描述的合成植入物设计,该专利的内容通过援引以其全文并入本文。

[0233] 可以使用本领域公认的技术(例如,转染、电穿孔、融合、脂质体、胶体聚合物颗粒和病毒及非病毒载体以及本领域已知的其他手段)将反义寡核苷酸引入细胞中。所选择的递送方法将至少取决于待治疗的细胞和细胞的位置,并且对于本领域技术人员将是显而易见的。例如,可以通过表面上具有特定标志物的脂质体实现定位以引导脂质体,直接注射到含有靶细胞的组织中,特异性受体介导的摄取等。

[0234] 如本领域已知的,可以使用例如涉及脂质体介导的摄取、脂质缀合物、聚赖氨酸介

导的摄取、纳米颗粒介导的摄取和受体介导的胞吞作用的方法,以及另外的非胞吞递送模式,诸如显微注射、透化(例如,链球菌溶血素-O透化、阴离子肽透化)、电穿孔和本领域已知的各种非侵入性非胞吞递送方法(参考Dokka和Rojanasakul, *Advanced Drug Delivery Reviews* [高级药物递送综述] 44, 35-49, 通过援引以其全文并入)来递送AON。

[0235] AON还可与其他药学上可接受的载剂或稀释剂组合以产生药物组合物。合适的载剂和稀释剂包括等渗盐水溶液,例如磷酸盐缓冲盐水。组合物可以配制成用于肠胃外、肌内、静脉内、皮下、眼内、口服或透皮施用。

[0236] 所描述的施用途径仅旨在作为指导,因为熟练的从业者将能够容易地确定用于任何特定动物和病状的最佳施用途径和任何剂量。

[0237] 已经尝试了在体外和体内将功能性新遗传物质引入细胞中的多种方法(Friedmann (1989) *Science* [科学], 244:1275-1280)。这些方法包括将待表达的基因整合到经修饰的逆转录病毒中(Friedmann (1989) 同上;Rosenberg (1991) *Cancer Research* [癌症研究] 51 (18), 增刊:5074S-5079S);整合到非逆转录病毒载体中(Rosenfeld等人 (1992) *Cell* [细胞], 68:143-155;Rosenfeld等人 (1991) *Science* [科学], 252:431-434);或经由脂质体递送与异源启动子-增强子元件连接的转基因(Friedmann (1989) 同上;Brigham等人 (1989) *Am. J. Med. Sci.* [美国医学科学杂志], 298:278-311;Nabel等人 (1990) *Science* [科学], 249:1285-1288;Hazinski等人 (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.* [美国呼吸细胞与分子生物学杂志], 4:206-209;以及Wang和Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* [美国国家科学院院刊] (USA), 84:7851-7855);与配体特异性的基于阳离子的转运系统偶联(Wu和Wu (1988) *J. Biol. Chem.* [生物化学杂志], 263:14621-14624) 或使用裸DNA、表达载体(Nabel等人 (1990), 同上);Wolff等人 (1990) *Science* [科学], 247:1465-1468)。将转基因直接注射到组织中仅产生局部表达(Rosenfeld (1992) 同上);Rosenfeld等人 (1991) 同上;Brigham等人 (1989) 同上;Nabel (1990) 同上;和 Hazinski等人 (1991) 同上)。Brigham等人的小组(*Am. J. Med. Sci.* [美国医学科学杂志] (1989) 298:278-311和*Clinical Research* [临床研究] (1991) 39 (摘要))报道了静脉内或气管内施用DNA脂质体复合物后仅体内转染小鼠的肺部。人类基因治疗程序的综述文章的实例是:Anderson, *Science* [科学] (1992) 256:808-813;Bartreau等人 (2008), *Curr Gene Ther* [当今基因疗法]; 8 (5):313-23;Mueller等人 (2008). *Clin Rev Allergy Immunol* [过敏与免疫学临床综述]; 35 (3):164-78;Li等人 (2006) *Gene Ther.* [基因疗法], 13 (18):1313-9;Simoes等人 (2005) *Expert Opin Drug Deliv* [药物递送专家见解]; 2 (2):237-54。

[0238] 本发明的AON涵盖任何药学上可接受的盐、酯或此类酯的盐,或在施用给包括人在内的动物后能够(直接或间接)提供其生物活性代谢物或残基的任何其他化合物。因此,作为实例,本披露还涉及本发明化合物的前药和药学上可接受的盐、此类前药的药学上可接受的盐和其他生物等效物。

[0239] 术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的生理学上和药学上可接受的盐:即,保留母体化合物的所需生物活性而不会对其产生不期望的毒理学作用的盐。对于寡聚物,药学上可接受的盐的优选实例包括但不限于(a)与阳离子(诸如钠、钾、铵、镁、钙)、聚胺(诸如精胺和亚精胺)等形成的盐;(b)与无机酸(例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等)形成的酸加成盐;(c)与有机酸形成的盐,这些有机酸例如乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、马来

酸、富马酸、葡糖酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、苯甲酸、鞣酸、棕榈酸、海藻酸、聚谷氨酸、萘磺酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、萘二磺酸、聚半乳糖醛酸等；以及(d)由元素阴离子(诸如氯、溴和碘)形成的盐。本发明的药物组合物可以多种方式施用,这取决于需要局部治疗还是全身治疗以及待治疗的区域。施用可以是局部(包括眼部和粘膜,以及直肠递送)、肺部(例如通过吸入或吹入粉末或气雾剂)(包括通过喷雾器、经气管内、鼻内、表皮和透皮)、口服或肠胃外。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输注;或颅内(例如鞘内或心室内)施用。据信,具有至少一个2'-O-甲氧基乙基修饰的寡聚物特别适用于口服施用。优选地,AON经由皮下或静脉内途径递送。

[0240] 可以方便地以单位剂型呈现的本发明的药物制剂可以根据制药业中公知的常规技术制备。此类技术包括将活性成分与药物载剂或赋形剂缔合的步骤。一般而言通过将活性成分与液体载剂或细分固体载剂或两者均匀且紧密地缔合,然后,如果需要,使产品成形来制备制剂。

[0241] 在一个实施例中,以有效产生至少200-400nM AON的峰值血液浓度的量和方式施用AON。典型地,通常定期施用一剂或多剂AON,持续约一周至两周。口服施用的优选剂量为每70kg约1mg至1000mg寡聚物。在一些情况下,可能需要大于1000 mg寡聚物/患者的剂量。对于静脉施用,优选的剂量为每70kg约0.5mg至1000mg寡聚物。对于静脉内或皮下施用,AON可以约120mg/kg的剂量每天或每周施用。

[0242] AON可以在短时间内定期施用,例如每天施用,持续两周或更短时间。然而,在一些情况下,在更长的时间段内间歇性地施用寡聚物。施用之后或同时可以是抗生素或其他治疗性处理的施用。治疗方案可以基于免疫测定、其他生物化学试验和接受治疗的受试者的生理检查的结果按照指示进行调整(剂量、频率、途径等)。

[0243] 给药取决于待治疗的疾病状态的严重程度和反应性,治疗过程持续几天至几个月,或直至实现治愈或达到疾病状态的减弱。最佳给药方案可以根据患者体内药物积聚的测量值计算。普通技术人员可以容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。最佳剂量可以根据单个寡聚物的相对效力而变化,并且通常可以基于在体外和体内动物模型中发现有效的EC50来估计。一般而言,剂量为0.01 $\mu$ g至100g/kg体重,并且可以每天、每周、每月或每年给予一次或多次,或甚至每2至20年给予一次。基于测量的药物在体液或组织中的停留时间和浓度,本领域的普通技术人员可以容易地估计给药的重复率。在治疗成功后,可能需要让患者进行维持治疗以防止疾病状态的复发,其中以范围为0.01 $\mu$ g至100g/kg体重的维持剂量施用寡聚物,每天一次或多次至每20年一次。

[0244] 使用本发明的AON的有效体内治疗方案可以根据施用的持续时间、剂量、频率和途径以及接受治疗的受试者的状况而变化(即,预防性施用对比响应于局部或全身感染的施用)。因此,为了获得最佳治疗结果,此类体内疗法常常将会需要通过适于治疗的特定类型的病症的试验进行监测,并相应地调整剂量或治疗方案。

[0245] 可以例如通过本领域已知的疾病的一般指标来监测治疗。体内施用的本发明的AON的功效可以从在施用AON之前、期间和之后取自受试者的生物样品(组织、血液、尿液等)确定。此类样品的测定包括(1)使用本领域技术人员已知的程序,例如电泳凝胶迁移率测定,监测存在或不存在与靶序列和非靶序列形成异源双链体;(2)监测通过标准技术诸如RT-PCR、Northern印迹、ELISA或Western印迹测定的突变mRNA相对于参照正常mRNA或蛋白

的量。

[0246] 核内寡聚物递送是AON的主要挑战。不同的细胞穿透肽(CPP)在不同的条件和细胞系中不同程度地定位PMO,发明人评价了新型CPP将PMO递送至靶细胞的能力。术语CPP或“增强细胞摄取的肽部分”可互换使用并且是指阳离子细胞穿透肽,也称为“转运肽”、“载体肽”或“肽转导结构域”。如本文所示的肽具有在给定细胞培养群体的约或至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%细胞内诱导细胞穿透的能力,并且在全身施用后允许大分子在体内多个组织内易位。CPP是本领域中公知的,并且例如在美国申请号2010/0016215中披露,该申请通过援引以其全文并入。

[0247] 因此,本发明提供了与细胞穿透肽组合用于制造治疗性药物组合物的本发明的AON。

[0248] 根据本发明的另一方面,提供了一种或多种如本文所述的用于基于AON的疗法的AON。优选地,该疗法用于与RAGE表达有关的病状。更优选地,用于与RAGE 表达有关的病状的疗法是用于选自以下的疾病的疗法:癌症、神经退行性疾病、肺病和炎性疾病。

[0249] 更具体地,AON可选自由表3a-3d中任一个中所列的任何一种或多种AON和/或SEQ ID NO:1-31,以及它们的组合或混合物组成的组。更优选地,AON是SEQ ID NO:11、18、19或20。这包括可以在严格杂交条件下与此类序列杂交的序列,与其互补的序列,含有经修饰的碱基的序列,经修饰的骨架,以及在RAGE基因转录物中具有或调节前体mRNA加工活性的其功能性截短物或延伸物。

[0250] 本发明还扩展到能够与选定靶标结合以诱导RAGE基因转录物中的外显子排除的两种或更多种AON的组合。该组合可以是两种或更多种AON的混合物,包含连接在一起的两种或更多种或两种或更多种AON的构建体,用于基于AON的疗法。AON的组合优选地是SEQ ID NO:11和10的组合或SEQ ID NO:11和13的组合。

[0251] 本发明提供了一种用于治疗、预防或缓解与RAGE表达相关的疾病的影响的方法,该方法包括以下步骤:

[0252] a) 向该患者施用有效量的一种或多种如本文所述的AON或包含一种或多种 AON的药物组合物。

[0253] 此外,本发明提供了一种用于治疗、预防或缓解癌症、神经退行性疾病、肺病和炎性疾病的影响的方法,该方法包括以下步骤:

[0254] a) 向该患者施用有效量的一种或多种如本文所述的AON或包含一种或多种 AON的药物组合物。

[0255] 优选地,该疗法用于经由外显子跳跃策略降低功能性RAGE蛋白的水平。RAGE 水平的降低优选通过修饰RAGE基因转录物或其部分中的前体mRNA剪接而降低转录物水平来实现。

[0256] RAGE的降低将优选导致RAGE相关病状或病理(诸如神经退行性疾病、癌症、肺病和炎性疾病)的症状的数量、持续时间或严重程度降低。

[0257] 如本文所用,受试者(例如哺乳动物,诸如人)或细胞的“治疗”是在试图改变个体或细胞的自然过程中使用的任何类型的干预。治疗包括但不限于施用药物组合物,并且可以预防性地进行或在病理事件开始或与病原体接触后进行。还包括“预防性”治疗,这可以涉及降低所治疗的疾病或病状的进展速率、延迟该疾病或病状的发生、或降低其发生的严

重程度。“治疗”或“预防”不一定表示完全根除、治愈或预防疾病或病状或其相关症状。

[0258] 根据本发明的另一方面,提供了一种或多种如本文所述的AON在制造用于调节或控制与RAGE表达相关的疾病的药物中的用途。

[0259] 本发明还提供了如本文所述的经纯化和分离的AON用于制造用于治疗与RAGE 表达相关的疾病的药物的用途。

[0260] 提供了如本文所述的经纯化和分离的AON用于制造用于治疗、预防或缓解与 RAGE 表达相关的疾病的影响的药物的用途。

[0261] 优选地,RAGE相关病理或疾病是神经退行性疾病、癌症、肺病或炎性疾病。

[0262] 根据本发明的另一方面,本发明扩展到本发明的AON序列的cDNA或克隆拷贝,以及含有本发明的AON序列的载体。本发明还进一步扩展到含有此类序列和/或载体的细胞。

[0263] 本发明的AON可以与另一种治疗分子共同施用。例如,AON可以与第二治疗剂一起施用,该第二治疗剂是能够调节RAGE胞质尾的化合物,诸如肽。此类化合物包括:IQGAP-1、diaphanous-1、蛋白激酶C $\zeta$  (PKC $\zeta$ )、Dock7、MyD88、TIRAP、ERK1/2、嗅觉受体2T2、ADP/ATP移位酶2、蛋白磷酸酶1G、IRAK4、蛋白DJ-1 (PARK7)、调宁蛋白-3、脑发育蛋白 (Drebrin)、细丝蛋白 (Filamin) B、Ras相关蛋白Rab-13、根蛋白 (Radixin) /埃兹蛋白 (Ezrin) /膜突蛋白 (Moesin)、蛋白脂质蛋白2、冠蛋白 (Coronin)、S100 A11、琥珀酰辅酶A连接酶[形成GDP]亚基 $\alpha$ 、Hsc70相互作用蛋白、凋亡抑制剂5、神经毡蛋白 (neuropilin)、裂解刺激因子、生长因子受体结合蛋白2、sec61 $\beta$ 亚基或Nck1。

[0264] 本发明还提供了用于治疗、预防或缓解患者中与RAGE表达相关的疾病或病状的药盒,该药盒至少包含包装在合适容器中的用于修饰RAGE基因转录物或其部分中的前体mRNA剪接的经分离或纯化的AON,以及其使用说明书。

[0265] 在一个优选的实施例中,药盒将含有至少一种如本文所述的AON,SEQ ID NO: 1-31和/或表3a-3d中任一个所示的序列中的任何一个或多个,或如本文所述的AON 的混合物。药盒还可以包含外围试剂,诸如缓冲剂、稳定剂等。更优选地,AON是 SEQ ID NO:11、18、19或20。

[0266] 因此,提供了一种用于治疗、预防或缓解患者中与RAGE表达相关的疾病或病状的药盒,该药盒至少包含包装在合适容器中的本文所述的AON,SEQ ID NO:1-31 和/或表3a-3d中任一个所示的序列中的任何一个或多个及其组合或混合物,以及其使用说明书。更优选地,AON是SEQ ID NO:11、18、19或20。AON的组合优选地是 SEQ ID NO:11和10的组合或SEQ ID NO:11和13的组合。

[0267] 优选地,该疾病或病状选自包括以下项的列表:癌症、神经退行性疾病、肺病或炎性疾病。

[0268] 药盒的内容物可以是冻干的,并且药盒可以另外含有用于重构冻干组分的合适溶剂。药盒的各个组分将被包装在单独的容器中,与此类容器相关的可以是由监管药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通知,该通知反映了该机构批准制造、使用或销售以供人类施用。

[0269] 当药盒的组分以一种或多种液体溶液提供时,液体溶液可以是水溶液,例如无菌水溶液。对于体内使用,可以将表达构建体配制成药学上可接受的可注射组合物。在这种情况下,容器装置本身可以是吸入器、注射器、移液管、滴眼管或其他类似设备,可以从这些容

器装置中将制剂施加到动物的受影响区域(诸如肺部),注射到动物体内,或甚至施加到药盒的其他组分中并与药盒的其他组分混合。

[0270] 药盒的组分也可以干燥或冻干形式提供。当试剂或组分以干燥形式提供时,通常通过添加合适的溶剂进行重构。设想溶剂也可以提供在另一容器装置中。不考虑容器的数目或类型,本发明的药盒还可以包括或包装有用于辅助将最终的复合组合物注射/施用或放置在动物体内的仪器。此类仪器可以是吸入器、注射器、移液管、镊子、量匙、滴眼管或任何此类医学上批准的递送媒介物。

[0271] 本领域的普通技术人员应当理解,上述方法的应用对于鉴定适合用于治疗许多其他疾病的AON具有广泛的应用。

[0272] 本发明的AON还可以与替代疗法诸如药物治疗联合使用。

[0273] 因此,本发明提供了一种治疗、预防或改善与RAGE表达相关的疾病或病状的影响的方法,其中本发明的AON和另一种与治疗、预防或改善与RAGE表达相关的疾病或病状的影响相关的替代疗法依次或同时施用。优选地,该疾病或病状选自包括以下项的列表:神经退行性疾病、癌症、肺病或炎性疾病。

[0274] 总则

[0275] 本领域技术人员将理解,除了具体描述的那些之外,本文描述的本发明易于改变和修改。应当理解,本发明包括所有此类改变和修改。本发明还包括说明书中单独或共同提及或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及这些步骤或特征的任何和所有组合或任何两个或更多个。

[0276] 本发明的范围不受本文描述的特定实施例的限制,这些实施例仅旨在用于举例说明的目的。功能上等效的产品、组合物和方法显然在本文所述的本发明的范围内。

[0277] 本文引用的所有出版物(包括专利、专利申请、期刊论文、实验室手册、书籍或其他文件)的全部披露内容通过援引并入本文。不承认任何参考文献都构成现有技术或者是在本发明所涉领域中工作的技术人员的公知常识的一部分。

[0278] 在本文中引用的每个文件、参考文献、专利申请或专利明确地通过援引以其全文并入本文,这意味着读者应将它作为本文的一部分来阅读和考虑。在本文中引用的文件、参考文献、专利申请或专利在本文中不再重复仅仅是出于简洁的原因。

[0279] 本文或通过援引并入本文的任何文件中提及的任何产品的任何制造商的说明书、描述、产品规格和产品清单特此通过援引并入本文,并且可用于本发明的实践。

[0280] 如本文所用,术语“导出的”和“导出自”应理解为表示特定整数可从特定来源获得,但不一定直接从该来源获得。

[0281] 如本文所用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一”、“一种(个)”和“该”包括复数指示物。

[0282] 在整个说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”或诸如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”的变型将被理解为暗示纳入所陈述的整数或整数的组,但不排除任何其他整数或整数的组。

[0283] 除了的操作实例中,或在另外指明的情况下,否则在说明书和权利要求书中使用的表示成分的量、反应条件等的所有数字均应理解为在所有情况下由术语“约”修饰。因此,除非指出相反,否则在说明书和权利要求书中列出的数值参数是近似值,其可以根据本发

明所寻求获得的所需性质而变化。因此，“约80%”意指“约80%”还有“80%”。至少，每个数值参数都应当根据有效数位的数字和普通的舍入方法来解释。

[0284] 尽管阐述本发明广泛范围的数值范围和参数是近似值，但具体实例中列出的数值是尽可能精确地报告的。然而，任何数值固有地含有由其相应的试验测量中存在的标准偏差所必然引起的某些误差。

[0285] 本文所用的选定术语的其他定义可在本发明的详细描述中找到并通篇适用。除非另有定义，否则本文所使用的所有其他科学和技术术语均具有与本发明所属领域普通技术人员所通常理解的含义。

[0286] 包含本说明书中所包括的核苷酸和氨基酸序列信息的序列标识号(“SEQ ID NO:”)汇总于说明书结尾并且已经使用Patentln 3.0版程序进行了编制。每个核苷酸或氨基酸序列在序列表中用数字指示符<210>，其后是序列标识符(例如<210>1、<210>2等)来标识。每个核苷酸或氨基酸序列的长度、序列类型和来源生物体分别由数字指示符字段<211>、<212>和<213>中提供的信息标识。

[0287] 提出并公开了反义寡聚物命名系统以区分不同的反义寡聚物(参见Mann等人，(2002) J Gen Med[普通医学杂志]4,644-654)。当测试全部针对相同靶区域的几种略有不同的反义寡聚物时，这种命名变得特别相关，如下所示：

[0288] H#A/D(x:y)

[0289] 第一个字母标明物种(例如H:人,M:鼠类)

[0290] “#”标明靶外显子数目

[0291] “A/D”分别指示外显子起点/末端处的受体或供体剪接位点

[0292] (x y)表示退火坐标，其中“-”或“+”分别指示内含子或外显子序列。例如，A(-6+18)指示靶外显子之前的内含子的最后6个碱基和靶外显子的前18个碱基。最近的剪接位点将是受体，所以这些坐标前面将会有“A”。描述供体剪接位点处的退火坐标可以是D(+2-18)，其中最后2个外显子碱基和前18个内含子碱基对应于反义寡聚物的退火位点。将由A(+65+85)表示的完全外显子退火坐标是从该外显子开始的第65个和第85个核苷酸之间(包括端值)的位点。

[0293] 以下实例更全面地描述使用上述发明的方式，以及阐述实施本发明各个方面的最佳模式。应当理解，这些方法并不限制本发明的范围，而是为了说明的目的而呈现。

[0294] 实例

[0295] 在以下每个实例中，除非上下文另有要求，否则以下一般材料和方法适用。

[0296] 将人微血管内皮细胞(HMEC1)在MCDB 131培养基(含10mM谷氨酰胺、EGF和氢化可的松的10%FCS)中培养。将人肺上皮细胞(A549)(癌)在F-12K培养基(含2mM谷氨酰胺的10%FBS)中培养。从(野生型)C57b16小鼠和AGER KO小鼠的主动脉分离原代主动脉内皮细胞(PMAEC)，并在杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)/补充有F12内皮细胞生长补充物(ECGS)的培养基中培养。

[0297] 对于用AON转染，将上皮细胞或内皮细胞接种到48孔板中保持24或48小时，然后使用lipofectamine 3000试剂(0.15ul/孔的lipofectamine 3000;0.4ul/孔P3000/孔)，用靶向人AGER(对于HMEC1和A549)和小鼠PMAEC细胞的鼠AGER的外显子9的AON或用相应对照(表3a-3d)转染。将细胞与AON/阳离子脂质复合物在37°C下孵育24小时，此后将细胞裂解，

提取RNA并使用TRIZOL技术或Cells to CT 方法生成cDNA。

[0298] 为了测量对人RAGE前体mRNA选择性剪接的影响,使用实时RT-PCR引物测定RAGE的第11外显子、外显子9b或跨越外显子8-10的表达,分别表示所有RAGE mRNA剪接变体中保留的表达(mRNA),外显子9b的保留或编码跨膜-胞质尾的 RAGEv1同种型的表达。胞质尾的外显子8-10的PCR信号相对于外显子11的减少表明较少的RAGE mRNA剪接形式含有外显子10,并且细胞产生较少的全长RAGE蛋白同种型(能够信号传导)。在鼠类细胞和组织中,跨越鼠类RAGE mRNA外显子10-11 的引物用于表示含有外显子10的RAGE mRNA剪接形式的表达。

[0299] 还收集培养基并通过ELISA测定可溶性RAGE的水平。在通过ELISA测试之前,使用分子量截留过滤器浓缩培养基(6ml)。

[0300] 中国仓鼠卵巢(CHO)细胞高水平表达重组蛋白,使其成为研究以改变蛋白分泌为终点的前体mRNA剪接的调控的理想系统。作为更好地研究AON对导致胞外可溶性RAGE表达和分泌的RAGE剪接的影响的模型系统,使用Lipofectamine 2000,用编码人基因组AGER(gRAGE)序列(排除天然5'和3'非翻译区)的质粒连同AON 转染在F12培养基(补充有10% FBS)中生长的CHO细胞。2天后,收集培养基,使用分子量截留过滤器浓缩并使用抗hRAGE抗体(R&D系统公司(R&D systems)) 通过western印迹检测。

[0301] 为了确定施用AON后检测到的RAGE变体的确切序列,使用Trizol方法提取 RNA并且使用寡dT引物生成cDNA,之后使用RAGE的5'和3'UTR序列的RAGE 特异性引物进行PCR并且进行半嵌套PCR扩增RAGE序列的混合物。将凝胶纯化的 RAGE条带克隆到TA克隆载体中,然后转化到大肠杆菌Top10细胞中。选择50个以上的菌落使用MultiNA序列分析仪,使用跨越外显子8-11的引物进行表征以确定 RAGE插入片段的大小。将每种大小的5种克隆送去进行桑格测序(sanger sequencing) 以确认与条带大小一致的RAGE序列剪接形式。

[0302] 为了测量干预RAGE的配体依赖性和配体非依赖性激活的功能影响,将细胞暴露于AT1R同源配体Ang II (1 $\mu$ M) 或RAGE配体S100A8/A9 (0.6ug/mL) 细胞4 小时。然后将细胞冷冻储存,直到使用Cells to Ct方法提取mRNA和合成cDNA。通过定量实时RT-PCR估计NF $\kappa$ B亚基、p65 (RelA) 或NF $\kappa$ B激活的靶基因(例如ICAM-1) 的基因表达的变化,该定量实时RT-PCR使用基于对累积荧光的实时检测的TaqMan 系统(ABI Prism 7700,美国加州福斯特市PE生物系统,珀金埃尔默公司(Perkin-Elmer Inc, PE Biosystems, Foster City, CA, USA)) 进行。将基因表达归一化为18S mRNA并报告为与未处理的对照小鼠/细胞中的表达水平相比的倍数变化,未处理的对照小鼠/细胞中的表达水平给予任意值1。

[0303] 实例1. 使用靶向外显子10中的顺式作用RNA元件的反义寡核苷酸调节人细胞中RAGE的选择性剪接

[0304] 本实例证明RAGE前体mRNA的剪接可使用靶向RAGE前体mRNA 的外显子10中的顺式作用RNA元件的AON来调节。

[0305] RAGE前体mRNA天然地经受选择性剪接,生成一系列mRNA剪接形式。这些 RAGE剪接形式的大多数含有外显子10和11两者,分别编码RAGE的跨膜结构域和胞质结构域,因此产生的蛋白同种型能够被RAGE配体激活并被并置的GPCR反式激活,以诱导促炎和促增殖信号传导。外显子9中的替代性5'剪接位点选择也可导致外显子9的83个核苷酸延伸(外显子9B;图1a)。因为该替代性剪接位点与外显子 10起始处的3' (受体) 剪接位点之间的距离仅为46个核苷酸,比真核生物中内含子长度的下限短得多,因此跳过外显子10,而选择外显子11起

始处的3' (受体) 位点。这种选择性剪接也引入了提前终止密码子,但由于它与最后一个外显子-外显子连接处紧密(29bp)靠近而不经受无义介导的衰变。因此,由这种选择性剪接产生的成熟mRNA (RAGE\_v1,图1a)编码缺少分别由外显子10和11编码的膜保留和胞质信号传导所需的元件的蛋白同种型,因此分泌并天然存在于循环、支气管肺泡和脑脊髓液中。这种esRAGE可以充当诱饵受体,从而与细胞表面全长RAGE竞争配体或增加配体的清除。由外显子9b编码的新型17-氨基酸C端也可以对RAGE信号传导或多聚化具有独立的作用。

[0306] 用10nM靶向外显子10的AON转染人肺上皮细胞(A549)导致含有外显子9b的RAGE mRNA剪接形式的表达变化(图1b)。如通过实时RT-PCR测量的,一些AON,尤其是AON 3779,与对照(乱序RNA处理的)细胞相比,增加了含有外显子9b的RAGE mRNA剪接形式的表达。其他也靶向外显子10的AON,尤其是AON 3777和3781没有影响。

[0307] 用10nM浓度的靶向外显子10的AON转染人肺上皮细胞(A549)也导致RAGE mRNA剪接形式的表达变化,使得如通过实时RT-PCR所测量的,当与对照(乱序RNA处理的)细胞相比时,一些AON,尤其是AON 3779、3780、3781、82、83和87降低含有外显子10的RAGE mRNA剪接形式(即编码胞质尾的信号传导元件)的表达(图1c和图1d)。其他也靶向外显子10的AON,尤其是AON 3777、84和85没有影响。

[0308] 然后分离在存在和不存在靶向外显子10的选定AON时在人肺上皮细胞(A549)中表达的所有RAGE mRNA剪接形式,并克隆到大肠杆菌Top10细胞中。使用跨越外显子8和外显子11的引物,测定每个RAGE插入片段的大小。用靶向外显子10的选定AON,尤其是AON 3779和3778处理,导致含有250kB大小片段的RAGE mRNA剪接形式的表达增加(图1e),表明外显子9b的保留。

[0309] 靶向外显子10的所有AON也降低了表达300kB条带的mRNA克隆的表达百分比,表示外显子8-10中含有的能够信号传导的元件的完全表达。具体而言,AON 3779导致含有300kB大小片段的RAGE mRNA剪接形式减少49%(图1f)。

[0310] 靶向外显子10的所有AON还诱导完全缺失外显子8(通过桑格测序确认并通过MultiNA分析仪上的凝胶上箭头指示的空泳道表示;图1f)和“无带”片段(图1e)的RAGE mRNA剪接形式的从头表达。

[0311] 用靶向外显子10的AON,尤其是AON 3777和3778转染人肺上皮细胞(A549)也导致含有大小为276和430kB片段的RAGE mRNA剪接形式的从头表达(图1e),分别表示外显子9的非典型去除和外显子9、9b和外显子10的保留。

[0312] 用10nM靶向外显子10的AON,尤其是AON 3779转染人肺上皮细胞(A549)也导致含有外显子10的RAGE mRNA剪接形式的拷贝数与对照(乱序RNA处理的)细胞相比变化,如数字PCR所测量的(图1g)。

[0313] 用10nM靶向外显子10的AON,尤其是AON 3779转染人肺上皮细胞(A549)也增加了内源可溶性RAGE释放到培养基中(图1h),这与含有外显子9b的RAGE mRNA剪接形式的表达增加一致。

[0314] 用编码人RAGE基因组序列(gDNA)的质粒转染CHO细胞导致基因产物的选择性剪接,基因产物包括通过Western印迹检测分泌到细胞培养基中的少量内源性RAGE(红色箭头),与RAGE的正常剪接模式一致(图1i)。当这些表达人基因组RAGE的CHO细胞用AON 3779或AON 87共转染时,分泌到培养基中的内源可溶性RAGE(esRAGE)的量增加(图1i)。同时,当

表达人基因组RAGE的CHO细胞用AON 3779或AON 87共转染时,细胞(白色箭头)中表达和保留的全长RAGE减少。细胞还在细胞内含有增加量的C-截短的RAGE。

[0315] 在表达人基因组RAGE的CHO细胞中,在用靶向外显子10的选定AON(包括 AON 3779、AON 82、83、84和85)转染后,如ELISA测量的可溶性RAGE的定量的量也增加(图1j)。其中,AON 3779的效果最大。

[0316] 用在与AON 3779相似的区域中靶向外显子10的一些其他AON,包括AON 90 和93(图1k),以与AON 3779相似的量(10nM),如ELISA测量的可溶性RAGE 的定量的量也增加。在用AON 3779转染后,从表达人基因组RAGE的CHO细胞中释放的可溶性RAGE的定量的量以剂量依赖性方式增加(图1l)。

[0317] 用10nM靶向外显子10的AON,尤其是AON 3779转染人肺上皮细胞(A549),也调节在用RAGE-配体S100A8/A9(0.6 $\mu$ g/mL)激活RAGE后对促炎信号传导的诱导,导致对ICAM-1表达的诱导(图1m)。

[0318] 用10nM靶向外显子10的AON,尤其是AON 3779、3780、81、82和83转染人主动脉内皮细胞(HAEC)也防止在暴露于RAGE配体S100A8/A9(0.6 $\mu$ g/mL;图 1m)后对ICAM-1表达的诱导。

[0319] 用10nM靶向外显子10的AON,尤其是AON 3779转染人肺上皮细胞(A549),也调节了在通过血管紧张素II(1 $\mu$ M)激活AT1受体后,RAGE反式激活后对促炎信号传导的诱导,导致对ICAM-1表达的诱导(图1o)。

[0320] 用10nM靶向外显子10的AON,尤其是AON 3777、3779、3780、3780、3782 和3783转染人主动脉内皮细胞(HAEC),也调节对促炎信号传导的诱导,包括在用血管紧张素II(1 $\mu$ M;图1p)激活AT1受体后,在RAGE的配体非依赖性反式激活后对ICAM-1表达的诱导。其他靶向外显子10的AON,尤其是AON 3778和84没有影响。

[0321] 用10nM靶向外显子10的AON,尤其是AON 3779、3780、82、83和87转染人微血管内皮细胞(HMEC1)导致RAGE mRNA剪接形式的表达变化,包括含有外显子10的RAGE mRNA剪接形式的表达降低(图1q)。用10nM靶向外显子10的 AON,尤其是AON 3779和87转染人微血管内皮细胞(HMEC1)也诱导含有外显子 9b的RAGE mRNA剪接形式的表达增加(图1r)。

[0322] 具有共价连接的八-胍树形分子的吗啉代-寡核苷酸(称为体内吗啉代寡聚物)可用于体外和体内而不需要转染试剂。用AON 3779的体内吗啉代寡聚物制剂(1 $\mu$ M) 处理人主动脉内皮细胞(HAEC)导致RAGE mRNA剪接形式的表达变化,包括含有外显子9b的RAGE mRNA剪接形式的增加,如通过RT-PCR测量的(图1s)。另外,与用对照吗啉代AON处理的细胞相比,细胞培养基中esRAGE的表达也增加(图1t)。在没有转染试剂的情况下用AON 79处理没有效果。在有转染试剂的情况下用AON 3779转染示为阳性对照。

[0323] 用AON 3779的体内吗啉代寡聚物制剂(1 $\mu$ M)处理表达人基因组RAGE的CHO 细胞也增加可溶性RAGE的表达,如ELISA所测量的(图1u)。

[0324] 已知聚(G)链段,特别是GGGG基序可充当表达沉默子,并且它们常常被hnRNP H和F结合(Sohail等人,BMC Genomics[BMC基因组学].2014)。假设RAGE剪接部分地受内含子9/外显子9b内富含G的顺式元件和核内不均一核糖核蛋白H调控,这对于上游RAGE 5'剪接位点的优先利用是必需的。聚(G)链段有利于外显子跳跃,因为hnRNP H的结合需要连续的G链段。AON在富含G的区域中通常具有弱亲和力和降低的功效。外显子10含有三个GGGG基序,其

中一个基序被识别为hnRNPF 结合靶标并且侧翼为AON 3779、3787和AON 3782(图1v)。然而,使该区域突变(RAGE突变体M3)对外显子剪接或对AON3779的反应没有影响(图1w),表明我们通过使AON靶向这些区域以调节RAGE的剪接来调节RAGE剪接的新型沉默子,这从现有技术中尚未预测。

[0325] 实例2.使用靶向外显子9中的顺式作用RNA元件的反义寡核苷酸调节人细胞中RAGE的选择性剪接

[0326] 本实例证明RAGE前体mRNA的选择性剪接可使用靶向RAGE前体mRNA的外显子9中的顺式作用RNA元件的AON来调节(图2a)。

[0327] 用10nM浓度的一些靶向外显子9的AON,尤其是AON 3668、3669、3670、4103、4104、4105转染人肺上皮细胞(A549),当与对照(乱序RNA处理的)细胞相比时,降低了含有外显子10的RAGE mRNA剪接形式的表达,如通过实时RT-PCR所测量的(图2b)。另外的靶向外显子9的AON,尤其是AON 4106没有影响。然而,RAGE mRNA的总体表达在用靶向外显子9的所有AON处理后略微升高。

[0328] 分离在存在和不存在靶向外显子9的选定AON时在人肺上皮细胞(A549)中表达的所有RAGE mRNA剪接形式,并克隆到大肠杆菌Top10细胞中。使用跨越外显子8-11的引物,测定每个RAGE插入片段的大小(图2c)。靶向外显子9的所有AON降低了表达300kB条带的mRNA克隆的表达百分比(图2d),表示外显子10和11中含有的能够信号传导的元件的完全表达。具体而言,AON 3670导致含有300kB大小片段的RAGE mRNA剪接形式减少(图2d)。

[0329] 用靶向外显子9的AON,尤其是AON 3669、3670、4103转染人肺上皮细胞(A549)也诱导RAGE mRNA剪接形式的从头表达,其中外显子8被跳过(在multiNA分析仪上用空泳道表示;图2c)

[0330] 用靶向外显子9的AON,尤其是AON 3669、3670、4103和4105转染人肺上皮细胞(A549)也导致含有276kB片段的RAGE mRNA剪接形式的从头表达,表明外显子9从剪接形式中去除(图2d)。

[0331] 在用含有人RAGE基因组序列(gRAGE)的质粒转染的CHO细胞中,用靶向外显子9中的RAGE剪接位点的一些AON,特别是AON 3669和3671,如ELISA测量的,分泌到培养基中的可溶性RAGE的量当与对照(乱序RNA处理的)细胞相比时适度地增加(图2e)。

[0332] 用不同浓度的靶向外显子9的AON,尤其是AON 3669、3670和4103转染人肺上皮细胞(A549),也抑制在用RAGE-配体S100A8/A9(0.6 $\mu$ g/mL)激活RAGE后对促炎信号传导的诱导,包括对TLR-4基因表达的诱导(图2f)。其他靶向外显子9的AON,尤其是AON 3668和4104没有影响。

[0333] 用10nM靶向外显子9的AON,尤其是AON 3669、3670和4104转染人肺上皮细胞(A549)也调节在用血管紧张素II(1 $\mu$ M;图2g)激活AT1受体后,经由RAGE的配体非依赖性反式激活后对促炎信号传导的诱导。其他靶向外显子9的AON,尤其是AON 3668、3671和4103没有影响。

[0334] 用10nM靶向外显子9的AON,尤其是AON 3669和3670转染人微血管内皮细胞(HMEC)也降低含有外显子10的内源RAGE mRNA剪接形式的表达(图2h)。

[0335] 实例3.使用靶向外显子9B中的顺式作用RNA元件的反义寡核苷酸调节人细胞中RAGE的选择性剪接

[0336] 本实例证明RAGE的选择性剪接可使用靶向RAGE前体mRNA的外显子9b中的RNA元件的AON来调节。

[0337] 在大多数RAGE同种型中通过选择性剪接去除外显子9b(图1e)。这种去除可能需要剪接形式与外显子9b中的基序相互作用。我们假设使用AON调节这些结合元件也可以调节RAGE前体mRNA的选择性剪接。

[0338] 用10nM浓度的靶向外显子9b的AON转染人肺上皮细胞(A549)导致RAGE mRNA剪接形式的mRNA表达变化。RAGE的总体表达在用靶向外显子9b的两种AON处理后略微升高(图3a)。另外,如通过实时RT-PCR测量的,与乱序对照处理的细胞相比,在用AON 88转染后,含有外显子10的RAGE mRNA剪接形式的表达适度降低(图3a)。用AON 88和89,含有外显子9b的RAGE mRNA剪接形式的表达也适度增加(图3b)。用靶向外显子10的AON 3779转染示为阳性对照。

[0339] 用10nM浓度的靶向外显子9b的AON转染人微血管内皮细胞(HMEC)也导致含有外显子10的RAGE mRNA剪接形式的表达降低(图3c)和含有外显子9b的RAGE mRNA剪接形式的表达增加(图3d)。同样,RAGE mRNA的总体表达在用靶向外显子9b的两种AON处理后略微升高(图3c)。用靶向外显子10的AON 3779转染示为阳性对照。

[0340] 在用含有人RAGE基因组序列(gRAGE)的质粒转染的CHO细胞中,用靶向外显子9b的一些AON,特别是AON 89(图3e),如ELISA测量的,分泌到培养基中的可溶性RAGE的量当与对照RNA相比时适度地增加。用靶向外显子10的AON 3779转染示为阳性对照。

[0341] 图3f中示出了内含子9和用于AON 88和89互补靶向的人RAGE序列。

[0342] 实例4. 使用靶向RAGE前体mRNA中的顺式作用RNA元件的反义寡核苷酸调节鼠类RAGE的选择性剪接

[0343] 本实例证明RAGE前体mRNA的选择性剪接也可以使用靶向鼠类RAGE前体 mRNA中的外显子9、9B和10中的顺式作用RNA元件的某些AON来调节,并且可以在体外、离体和体内证明这种调节。

[0344] 为了测试AON对鼠类RAGE的选择性剪接的影响,用含有鼠类RAGE基因组序列的质粒转染CHO细胞。这导致分泌少量的esRAGE。用靶向鼠类RAGE的AON,尤其是AON m3779(设计成在实例1中详述的人RAGE序列中被AON 3779所靶向的同等序列中靶向鼠类RAGE序列的外显子10的AON)和AON m101转染,增加 esRAGE分泌到细胞培养基中(图4a)。

[0345] 用靶向RAGE外显子9的AON(50nM)转染原代小鼠主动脉内皮(PMAEC)细胞(表3d)。与它们各自的阴性对照相比,这种处理导致RAGE mRNA剪接形式表达的适度变化。具体而言,AON 3674和3675能够降低含有外显子10的RAGE mRNA剪接形式的表达,如通过实时RT-PCR所测量的(图4b)。

[0346] 然而,用10nM的这些AON转染PMAEC对RAGE mRNA剪接形式的表达没有显示出显著影响(图4c)。用50nM的AON 3674和3675转染培养的PMAEC后24小时,分泌到培养基中的可溶性RAGE水平适度增加(图4d)。

[0347] 用m3779(10nM)转染表达鼠类基因组RAGE的CHO细胞降低了含有外显子10的RAGE mRNA剪接形式的表达,如通过实时RT-PCR所估计的(图4e)并且与对照(乱序RNA处理的)细胞相比增加了esRAGE的分泌(图4f)。靶向人RAGE序列的AON 3779也增加esRAGE分泌,但不如AON m3779多。

[0348] 当将设计成靶向鼠类RAGE序列的外显子10的AON转染到表达人RAGE基因组序列的CHO细胞中时,质粒AON m3779(设计成靶向鼠类RAGE外显子10)也诱导细胞培养基中可溶性人RAGE的增加(图4g)。然而,AON 3779(特异性靶向人RAGE外显子10)在调节人基因组RAGE方面比AON m3779更有效。该数据证明靶向外显子10中特定序列的AON可有效调节RAGE剪接,尽管存在非同一性区域。

[0349] 为了测试靶向鼠类组织中的RAGE的AON的作用,从小鼠中获得精确切下的肺部切片(PCLS),然后离体培养。简言之,将小鼠人道处死,用琼脂糖灌注其取出的肺部,取圆柱形芯,然后用组织切片机切割,从而产生具有均匀直径和厚度的肺部切片。然后在组织培养条件下将PCLS浸没在多孔板中的培养基中。24小时后,再用体内吗啉代寡聚物AON 3779或非靶对照转染PCLS 48小时。用AON 3779处理导致含有外显子9b的RAGE mRNA的表达显著增加而含有外显子10的RAGE mRNA剪接形式的表达降低(图4h),在给药后72小时观察到对外显子9b的作用最大(图4i)。

[0350] 为了验证靶向RAGE剪接的AON的体内相关性,给雄性C57b16小鼠皮下注射 AON m3779(每天1mg/kg),持续7天。含有外显子9b的RAGE mRNA剪接形式的表达在小鼠肺部中增加,而含有外显子10的剪接形式在用AON m3779皮下处理一周后减少(图4j)。

[0351] 为了验证它们作为吸入治疗剂的潜力,将活小鼠麻醉,然后将30 $\mu$ L在无RNA酶的水中的11 $\mu$ M体内吗啉代寡聚物-AON m3779或非靶体内吗啉代寡聚物对照(作为阴性对照)使用插管经由气管或单独使用水递送到肺部。逆转麻醉,并且在48小时后杀死小鼠。与单独用水(没有显著影响)相比,用m3779进行气管内处理导致含有外显子10的RAGE mRNA剪接形式的肺表达显著降低。含有外显子9b的RAGE mRNA同种型的表达也增加。(图4k)。当与单独的媒介物(无菌水)相比时,气管内递送30 $\mu$ L的11 $\mu$ M 2'-O'-Me-硫代磷酸酯AON m3779后观察到含有外显子10的 RAGE mRNA剪接形式的表达的类似降低(图4l)。另外,当与无菌水或靶向人RAGE的无效AON 4105相比时,在用AON m3779处理小鼠后也观察到循环可溶性RAGE的增加(图4m)。

[0352] 实例5. 使用靶向RAGE前体mRNA的反义寡核苷酸的组合调节RAGE的选择性剪接

[0353] 本实例证明RAGE的选择性剪接可使用靶向RAGE前体mRNA中不同的顺式作用RNA元件的AON的组合来调节。

[0354] 外显子的定义被认为是通过促进靶标保留或排除的多组分“跨外显子”识别复合物的组装来调控的。在AON 3779与RAGE前体mRNA中的外显子10结合以增加 esRAGE的生成后,我们推测外显子10中的其他调控靶标可能变得更关键,包括但不限于预测的剪接位点。而且,在AON 3779的存在下,通过使用其他AON选择性地靶向RAGE前体mRNA中外显子10中的这些顺式作用RNA元件,我们将防止从外显子排除中的任何逃逸,并进一步调节RAGE剪接以优选生成esRAGE。

[0355] 预测RAGE外显子10的二级结构含有通过中心较链区连接的两个发夹环。推测使用AON 3779靶向3'发夹中的外显子增强子序列将增加备选5'发夹中靶标的重要性,包括外显子10中的上游5'剪接位点。

[0356] 为了验证该假说,将含有编码人基因组RAGE的质粒的CHO细胞用AON 3779 (10nM)与靶向外显子10中的5' (受体)预测剪接位点的其他AON(也是10nM)组合转染。当与单独的AON 3779或对照乱序RNA处理的细胞相比时,该组合处理导致RAGE mRNA剪接形式的表达变

化,使得一些组合,尤其是AON 3779+3777、3779+3778显著增加含有外显子9b的RAGE mRNA同种型的表达,如通过实时 RT-PCR所测量的(图5a)。该组合还增加了通过ELISA在培养基中测量的esRAGE 蛋白的产生(图5b)。AON 3997和AON 3778的组合在低剂量(5nM+5nM)下也更有效。值得注意的是,AON 3777和AON 3778在10nM下本身几乎没有影响。

[0357] 在另一个实验中,用AON 3779与靶向外显子10中的3'或5'剪接位点的其他AON 组合转染含有编码人基因组RAGE的质粒的CHO细胞。一些组合也导致RAGE mRNA剪接形式的表达变化,使得一些组合,尤其是AON 3779+3778、3779+3781 和3779+3778+3781与单独的AON 3779或乱序对照处理的细胞相比显著增加可溶性RAGE的表达,如通过ELISA所测量的(图5c)。当使用AON 93或AON 87代替 3779时这种增加是类似的,但与AON 3779组合(以方框表示)是最强的并且总体上最一致。

[0358] 用也靶向外显子10中的相邻区域的AON的其他组合,尤其是AON 3779+3782、3779+3784、3779+3785转染人肺上皮细胞(A549)对含有外显子9b的RAGE同种型的表达没有超过单独的AON 3779的、显著的影响(图5d)。值得注意的是,这些AON也靶向5'发夹(类似于AON 3779)和/或中心铰链区,与组合有效的、靶向另一(3')发夹上的外显子增强子的AON 3777或3778不同。

[0359] 将含有编码鼠类RAGE基因组序列的质粒的CHO细胞用AON m3779与靶向外显子10中的3'或5'剪接位点的AON组合转染。当与单独的AON m3779相比时,这种组合处理导致RAGE mRNA剪接形式的表达变化,使得一些组合,尤其是AON m3779+m102显著增加可溶性RAGE向细胞培养基中的分泌,如通过ELISA所测量的(图5e)。

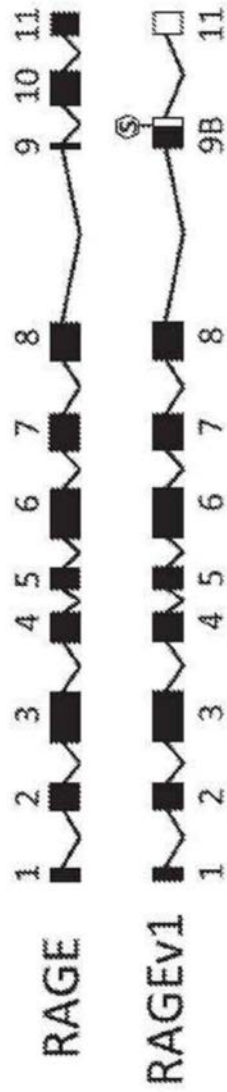


图1a

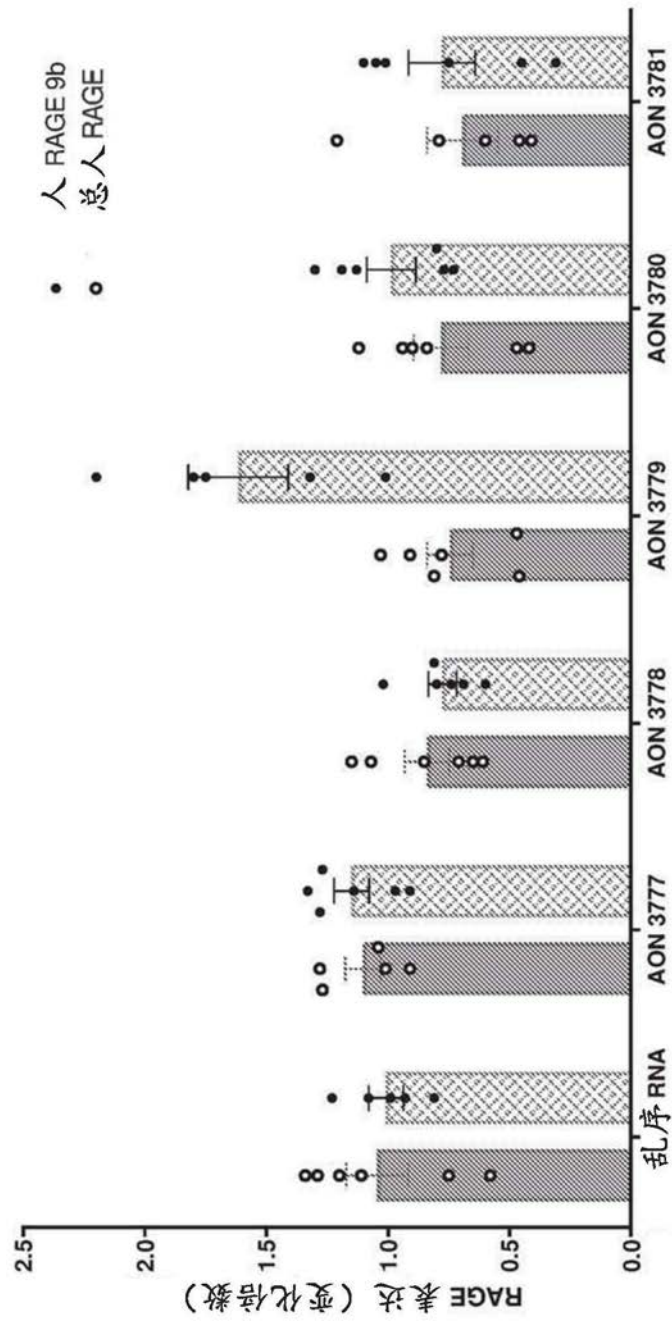


图1b

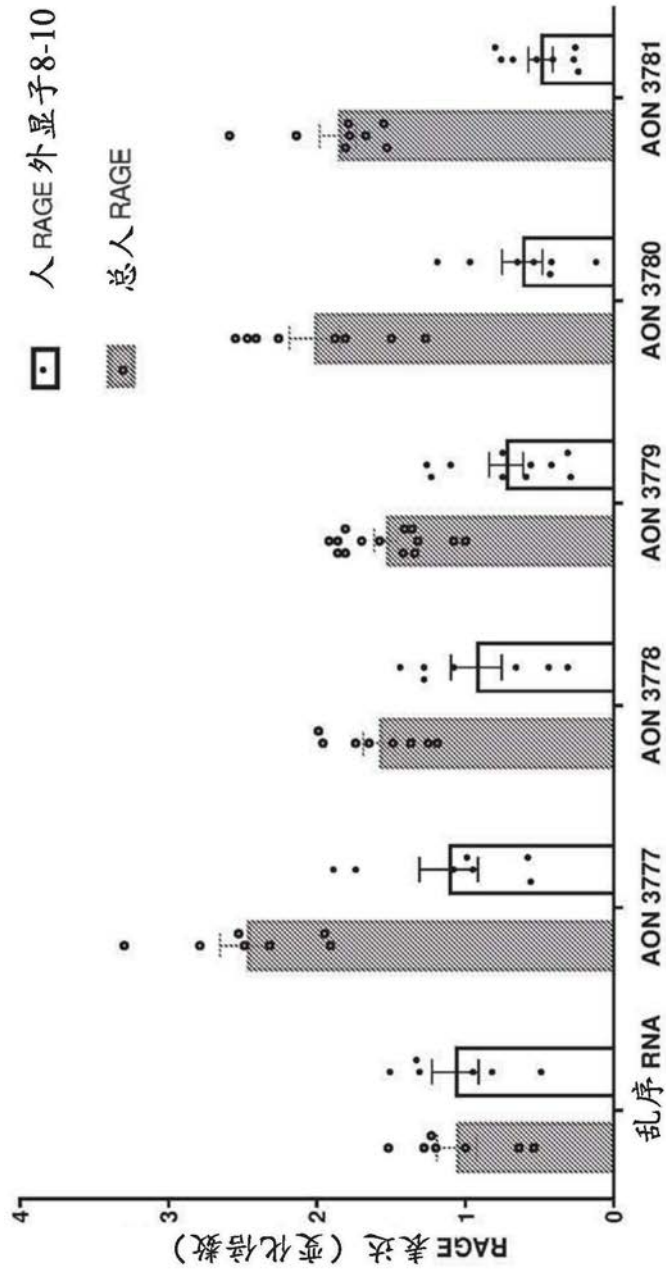


图1c

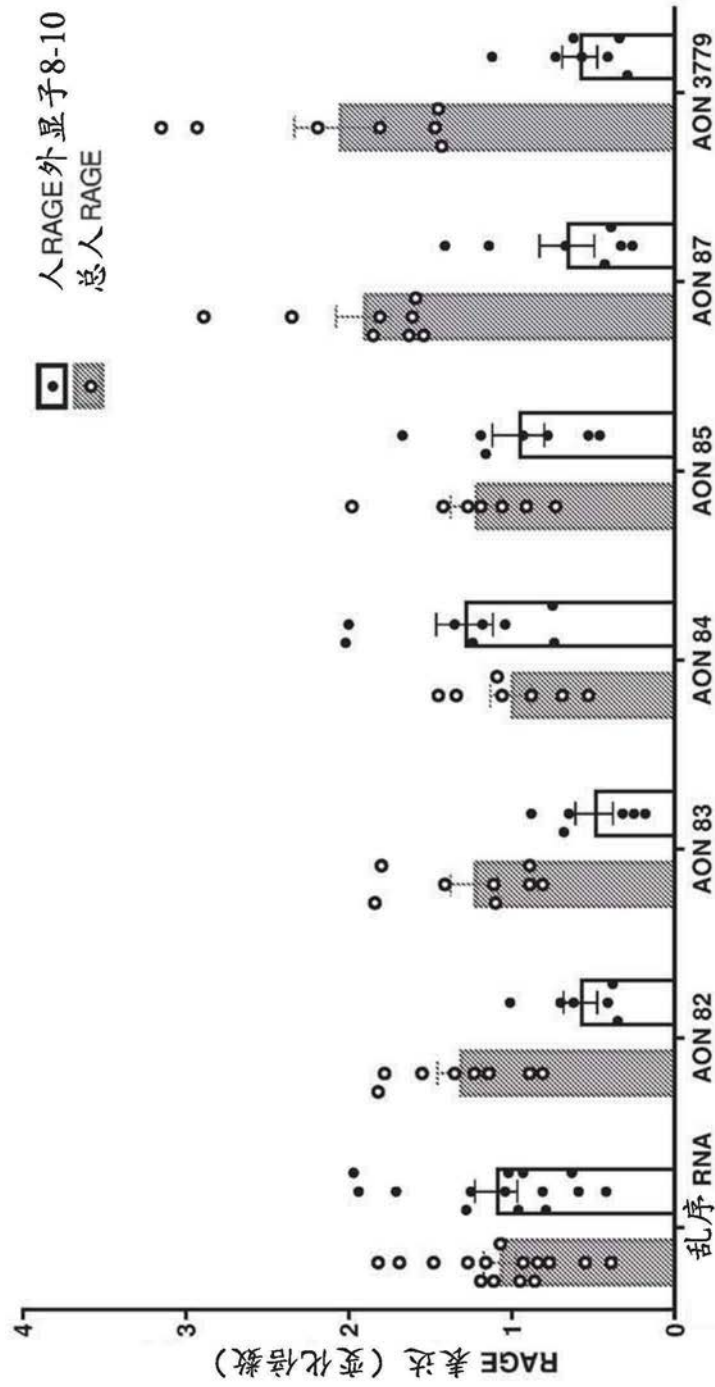


图1d

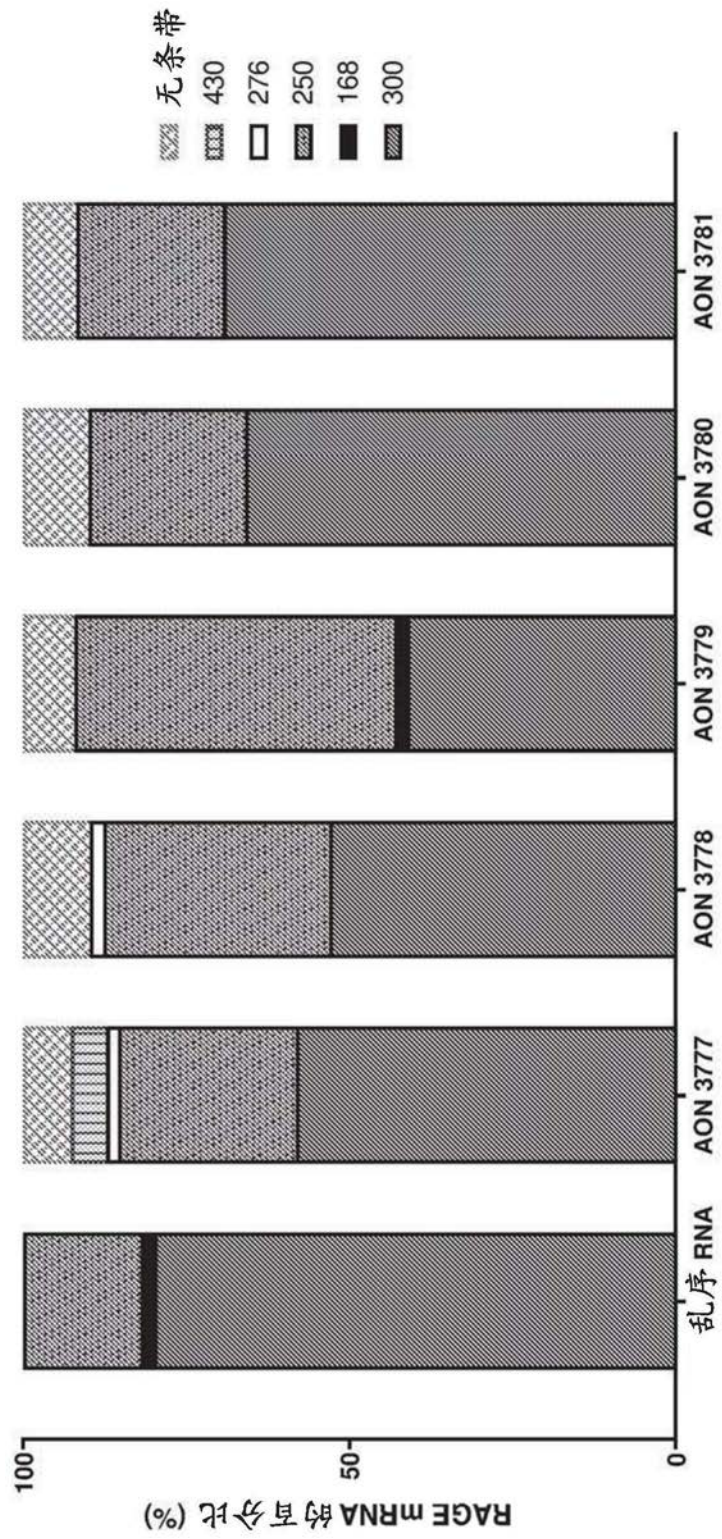


图1e

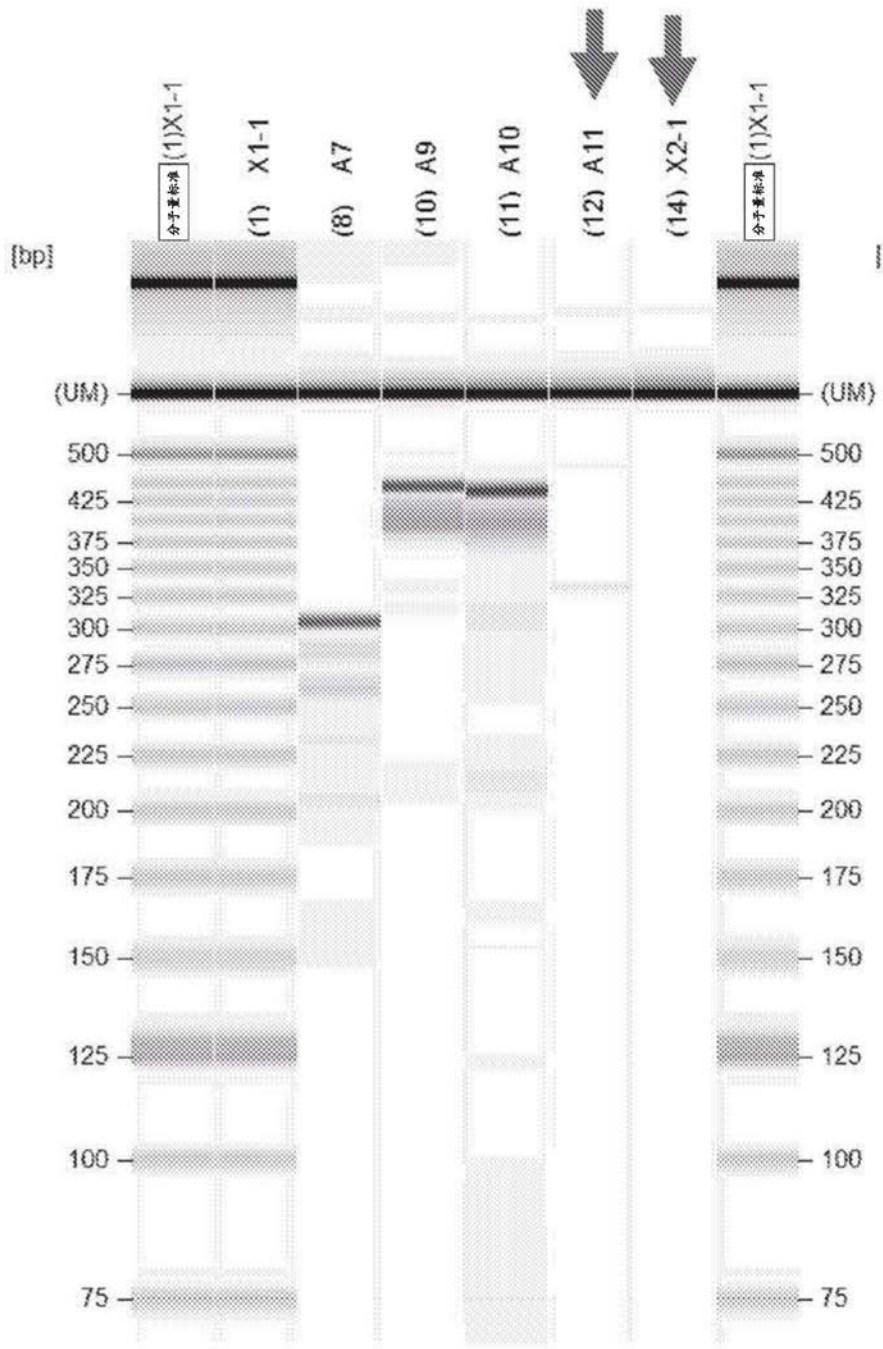


图1f

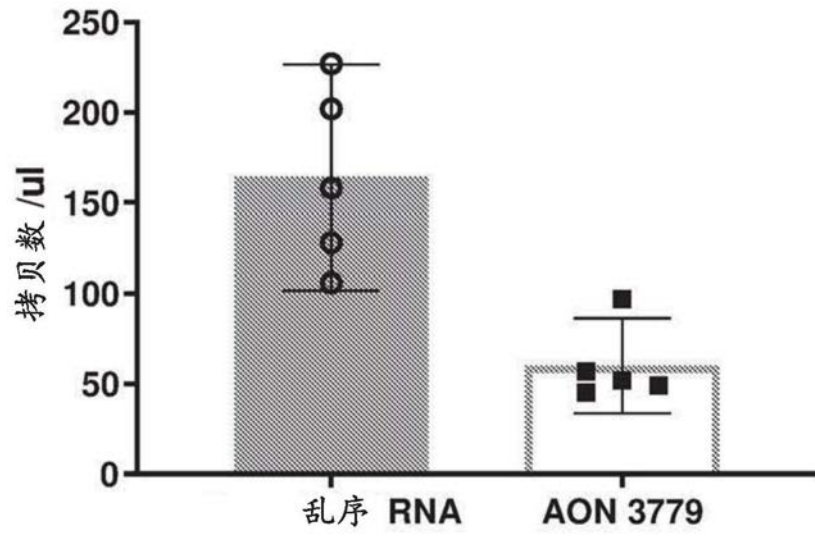


图1g

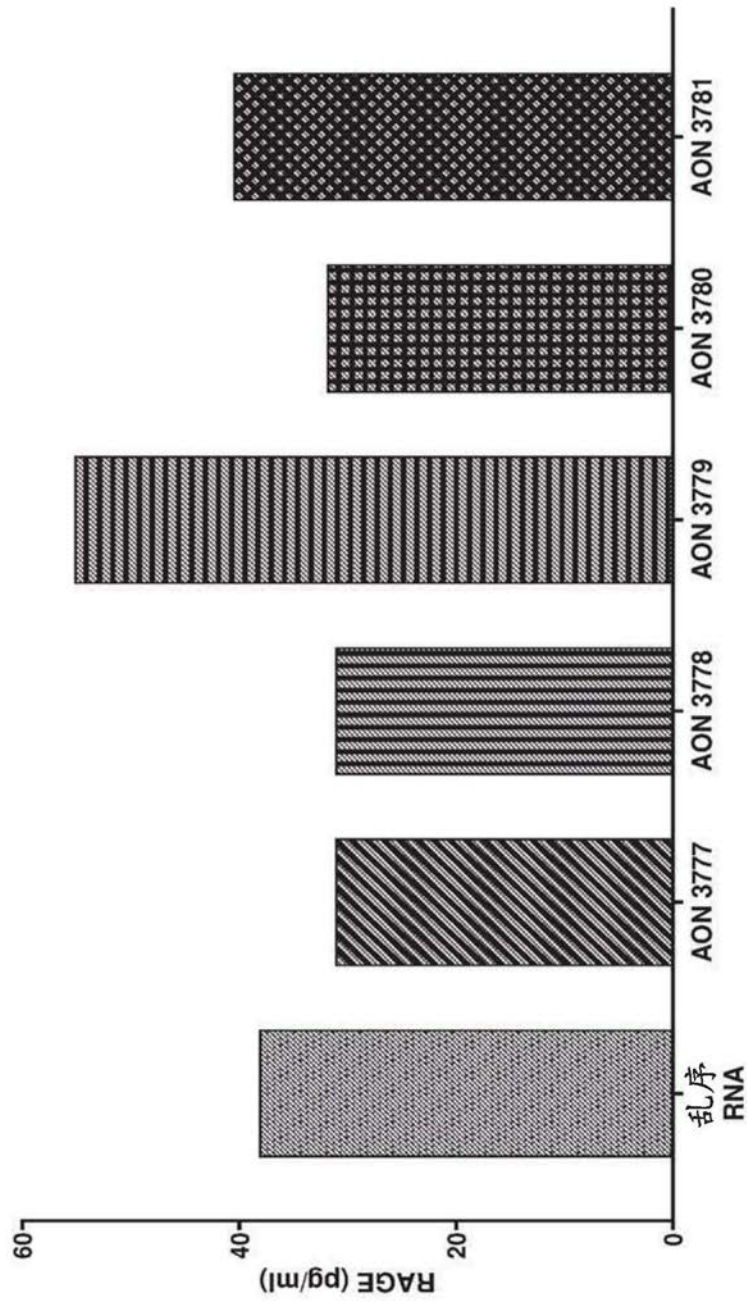


图1h



图1i

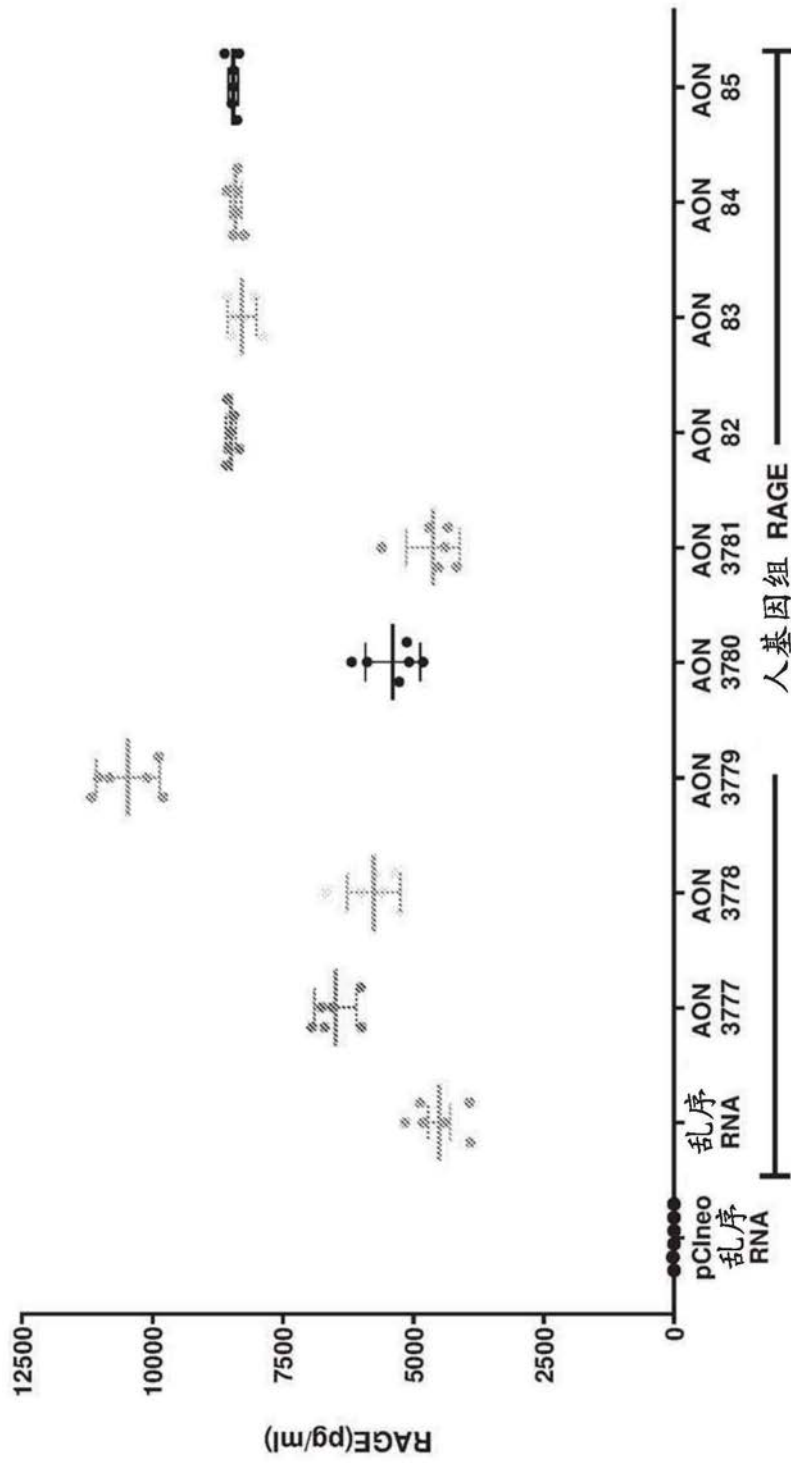


图1j

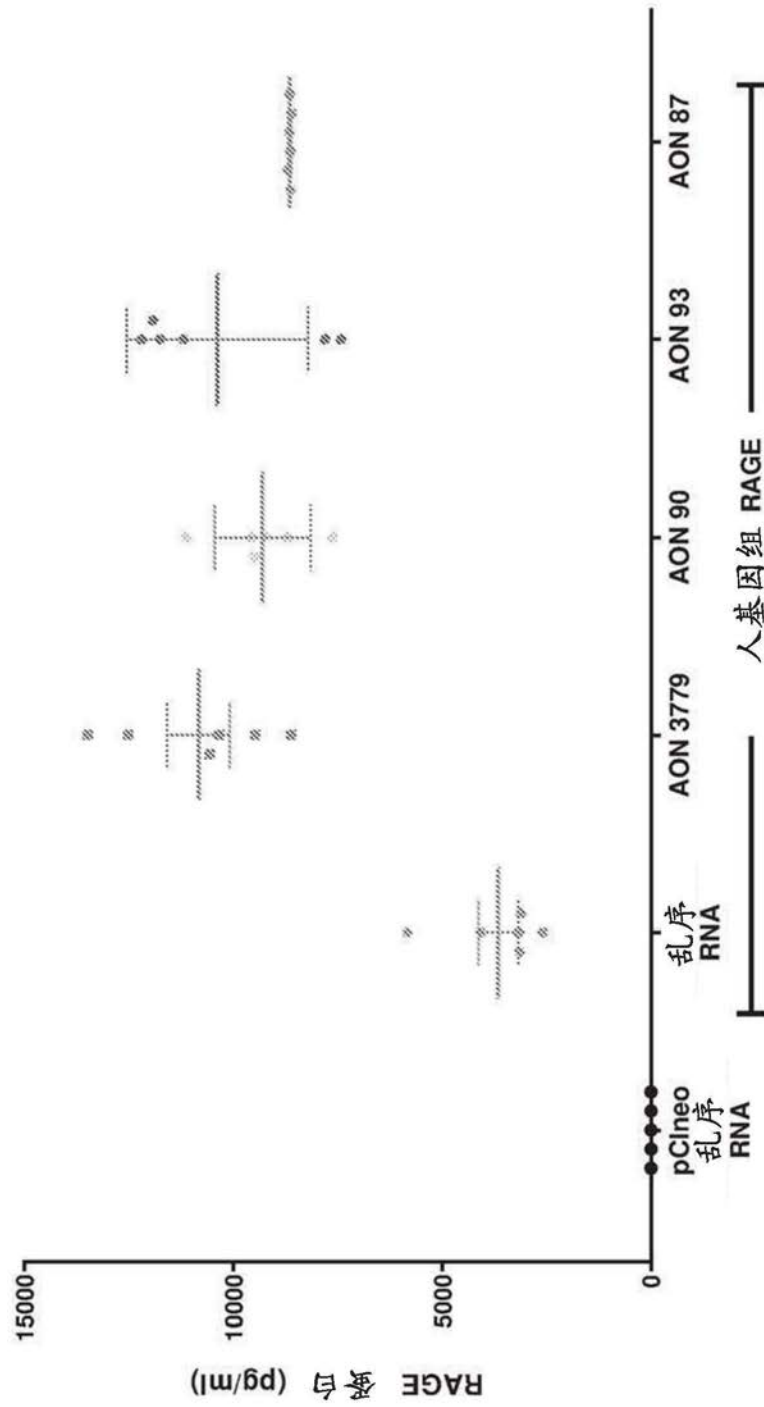


图1k

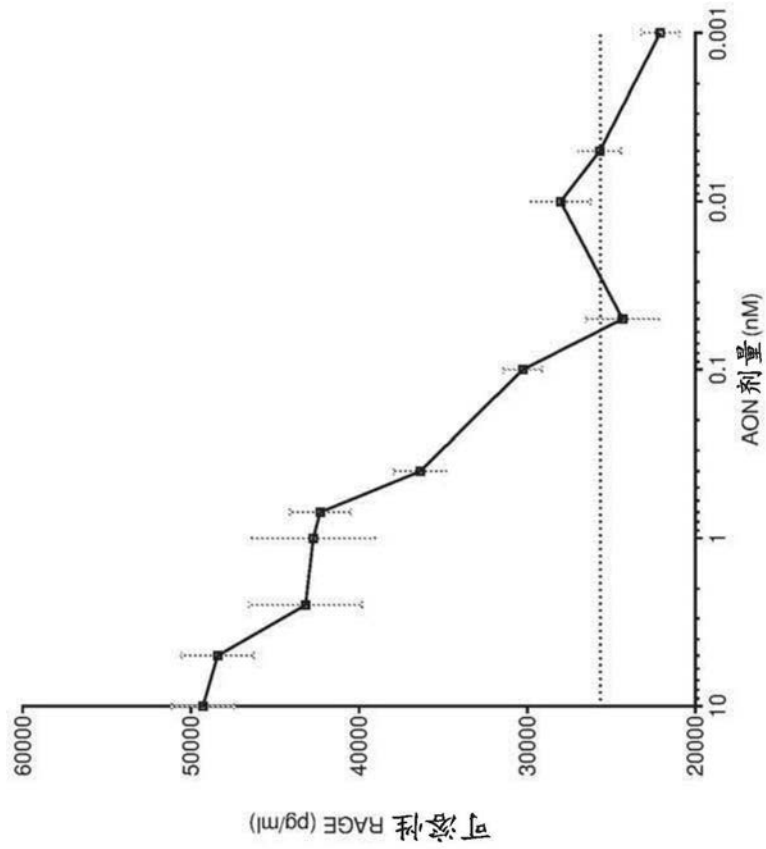


图11

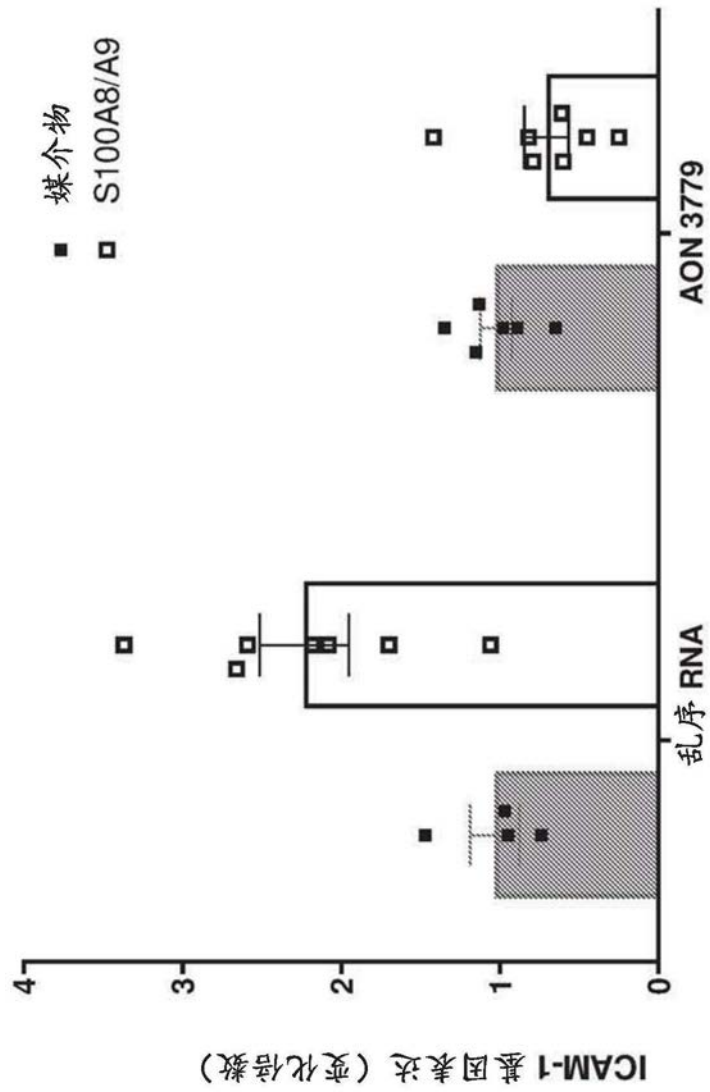


图1m

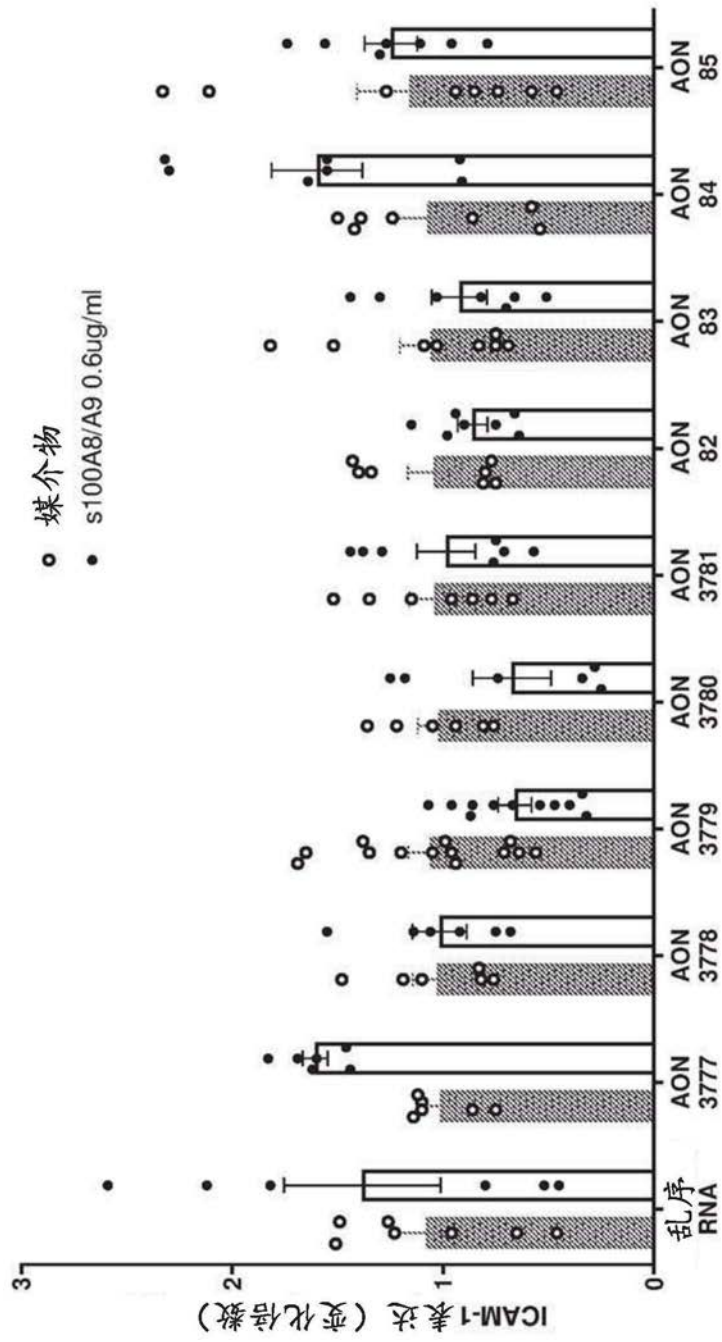


图1n

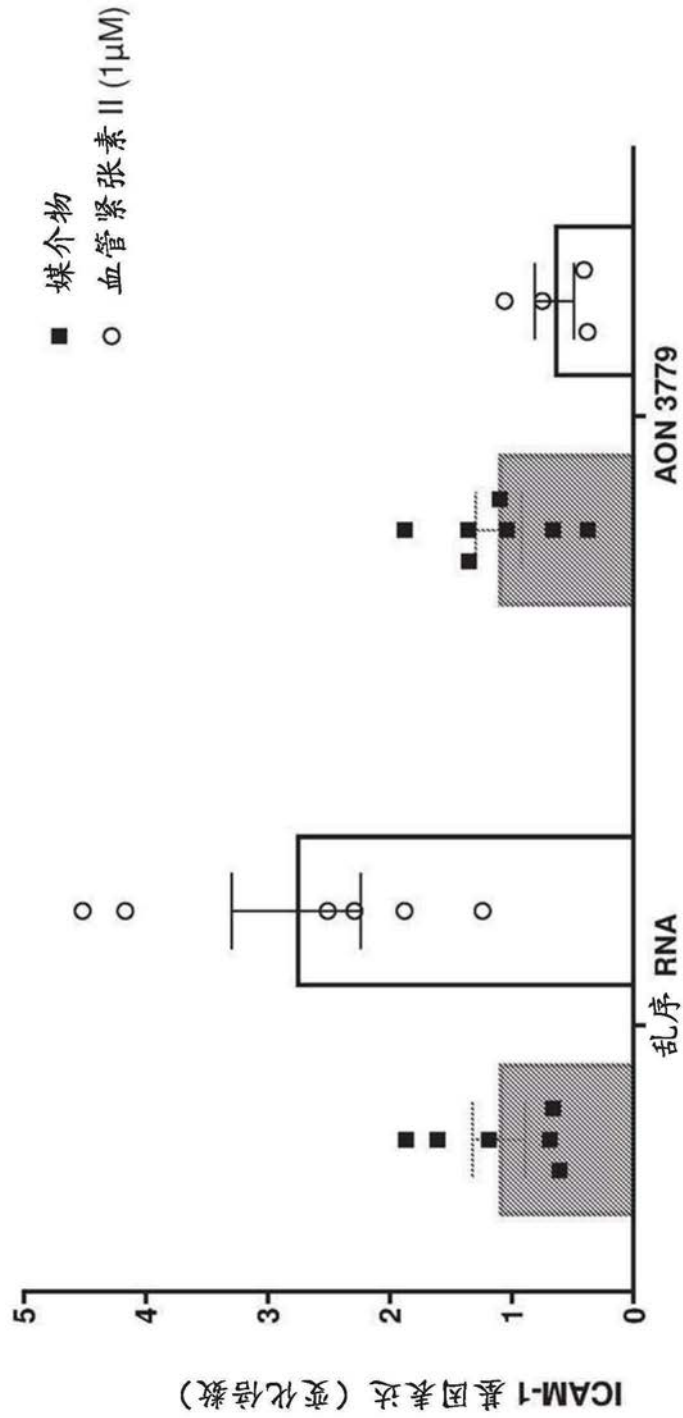


图10

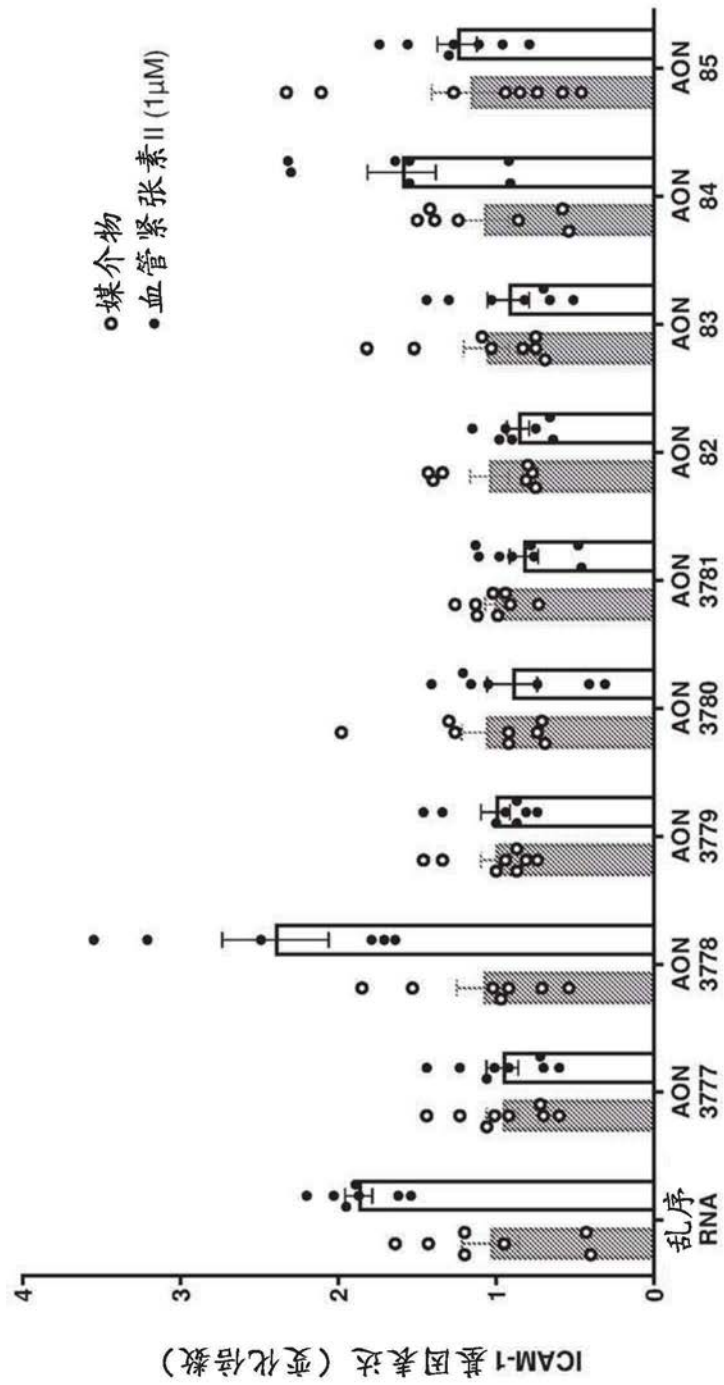


图1p

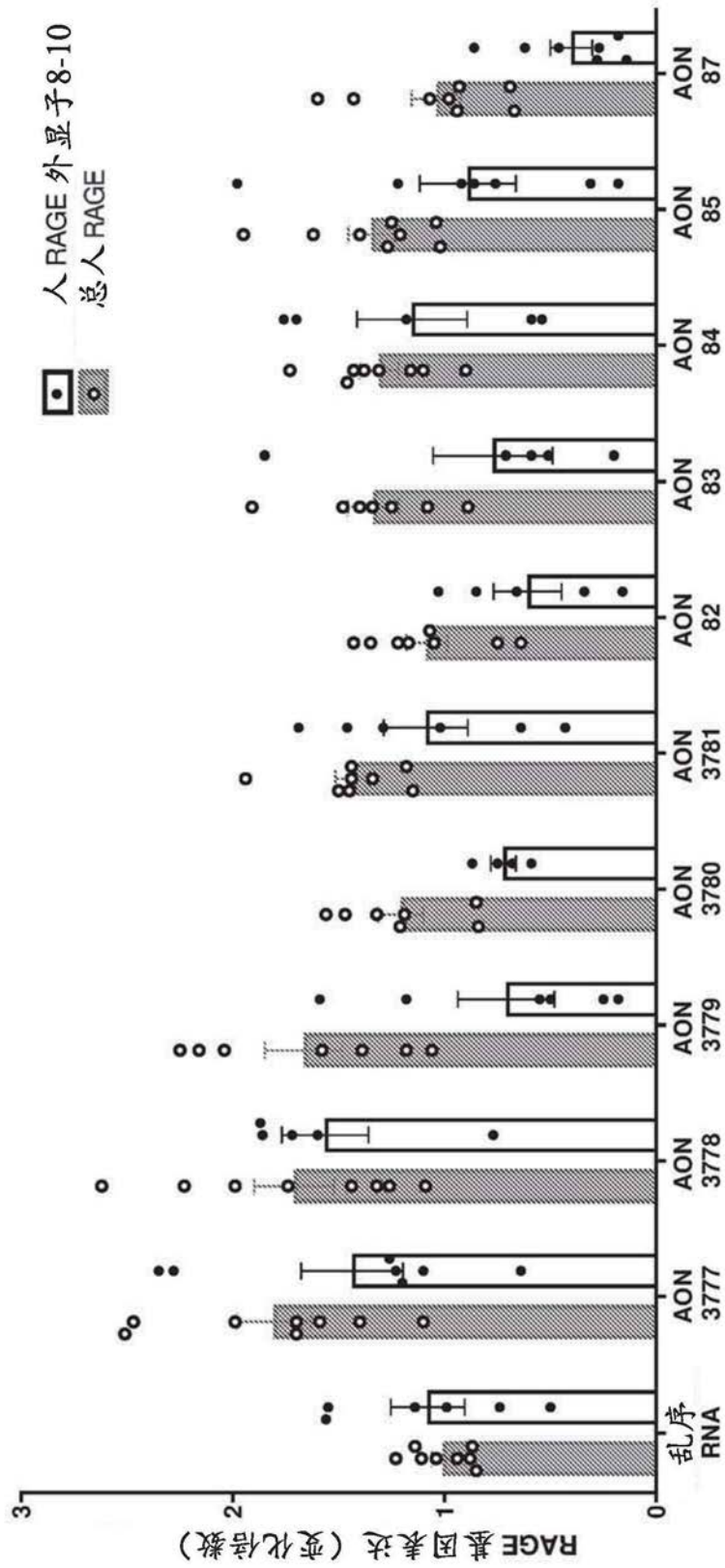


图1q

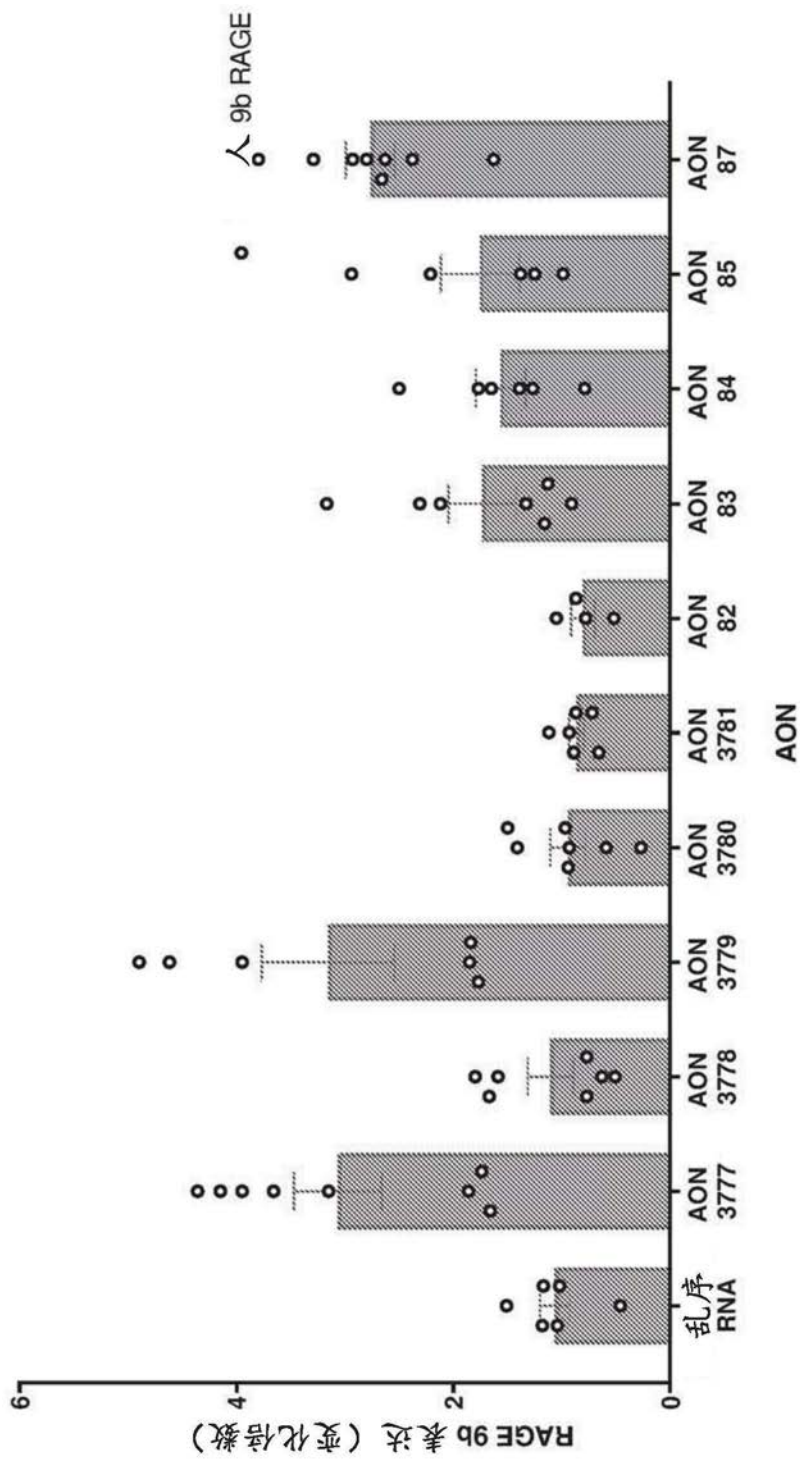


图1r

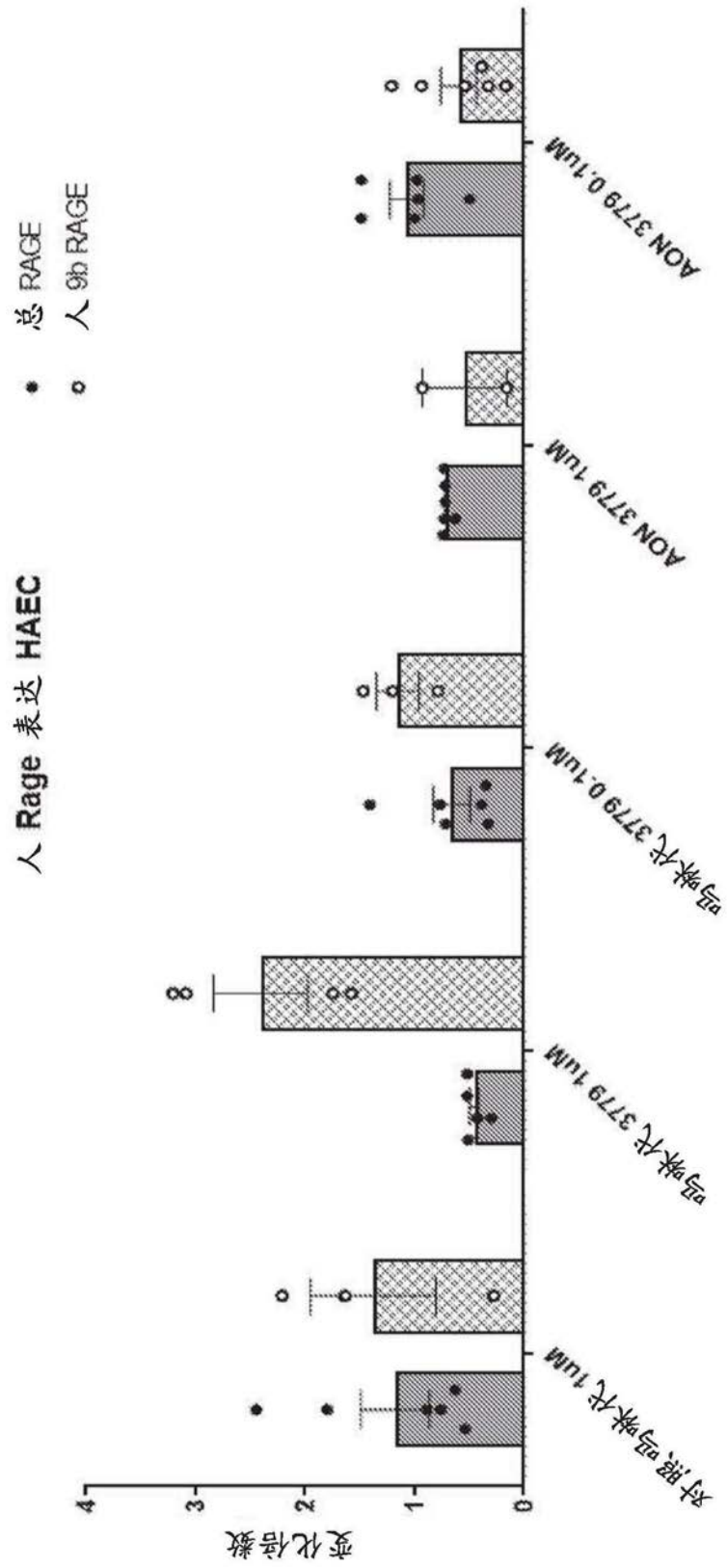


图1s

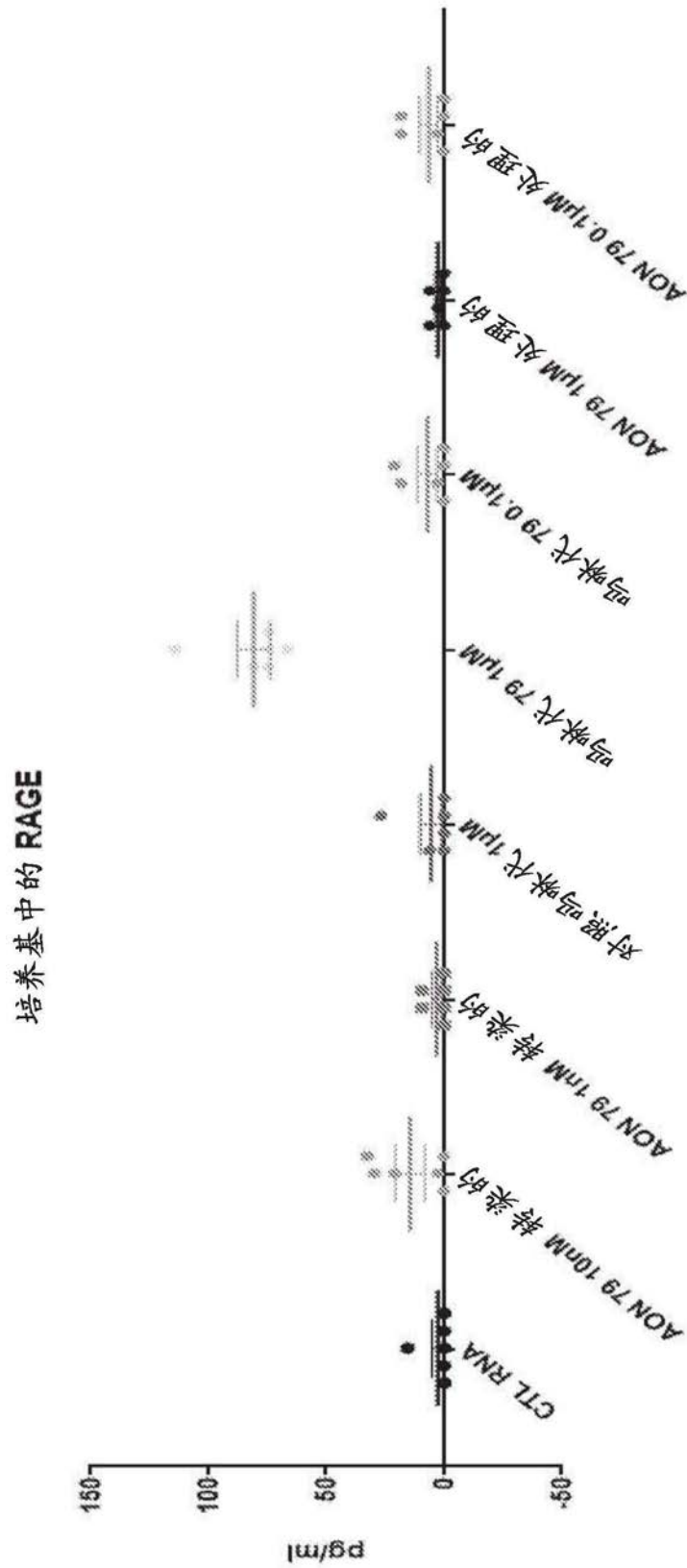


图1t

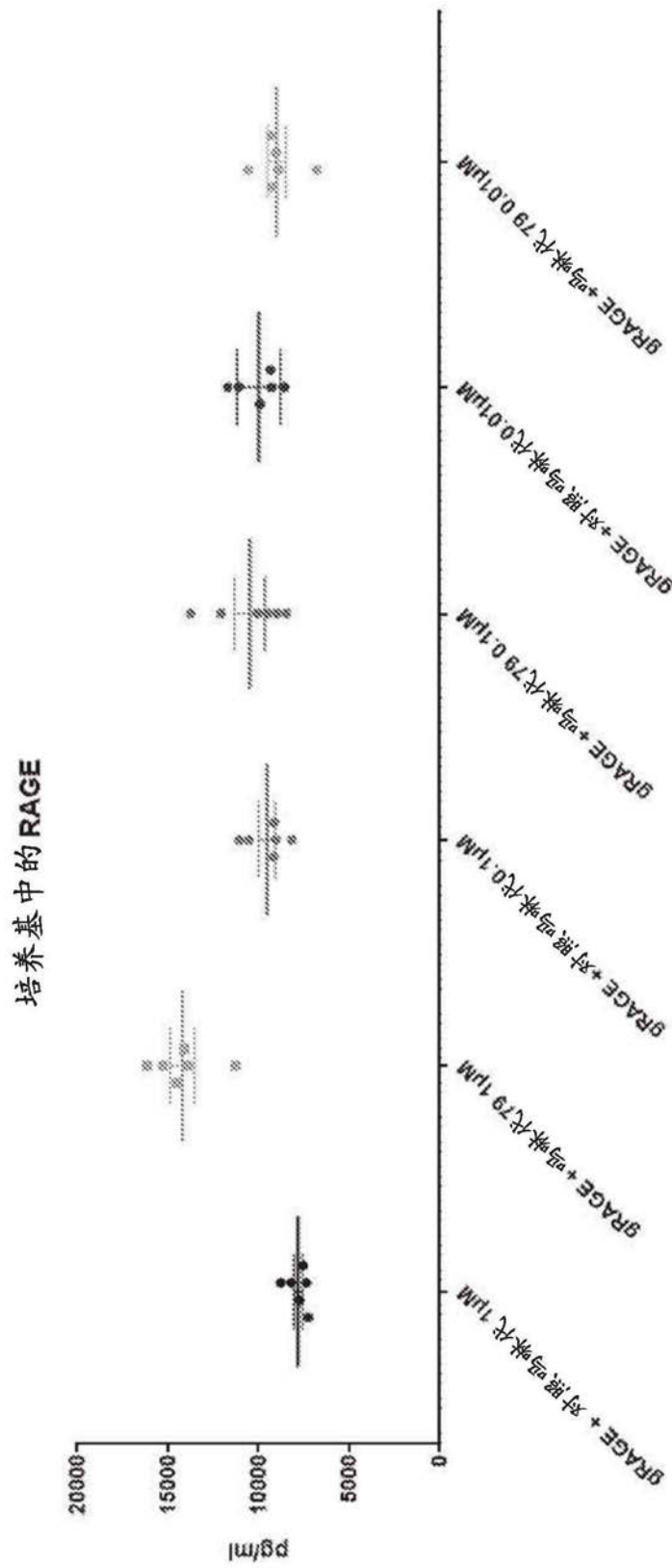


图1u



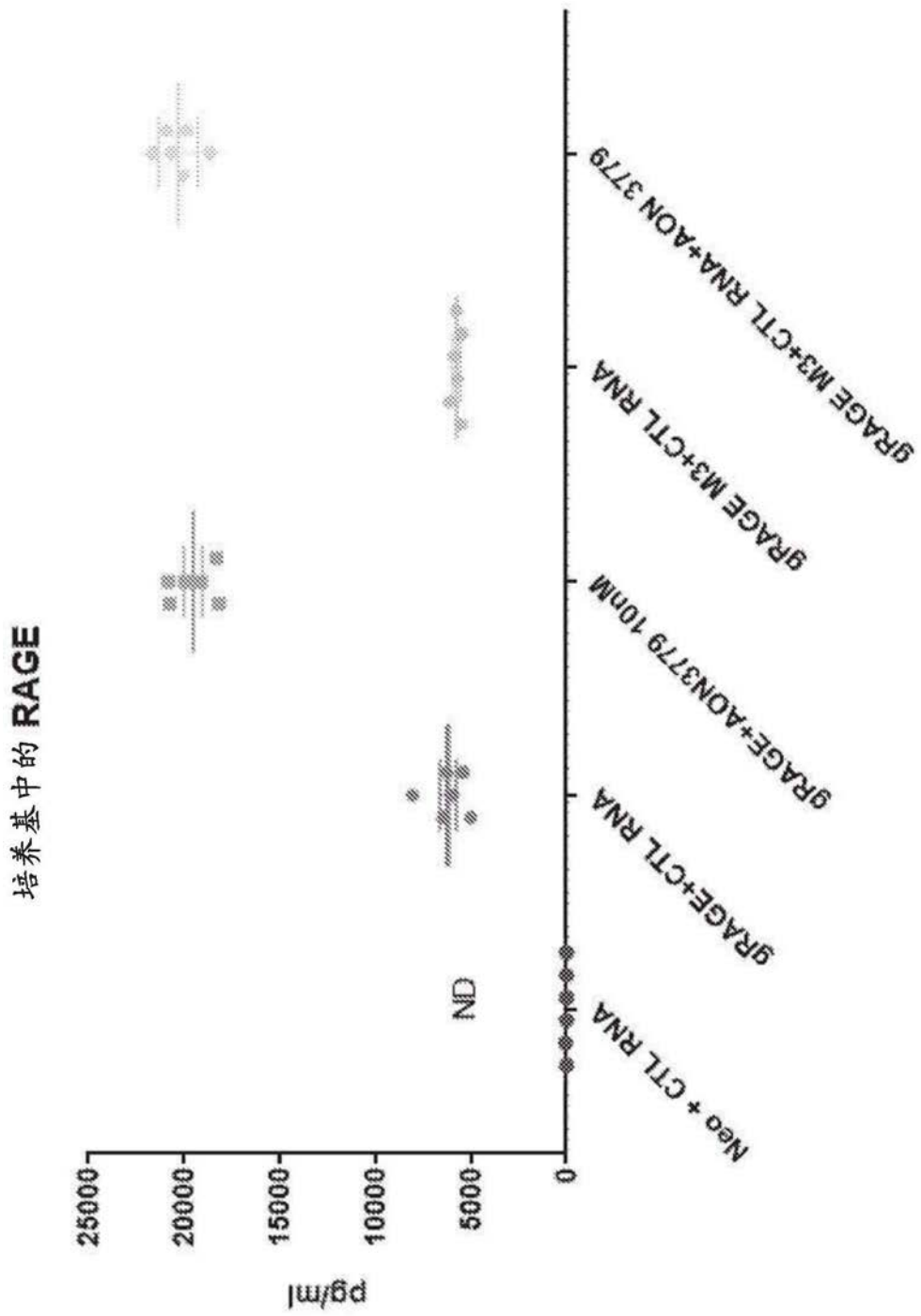


图1w

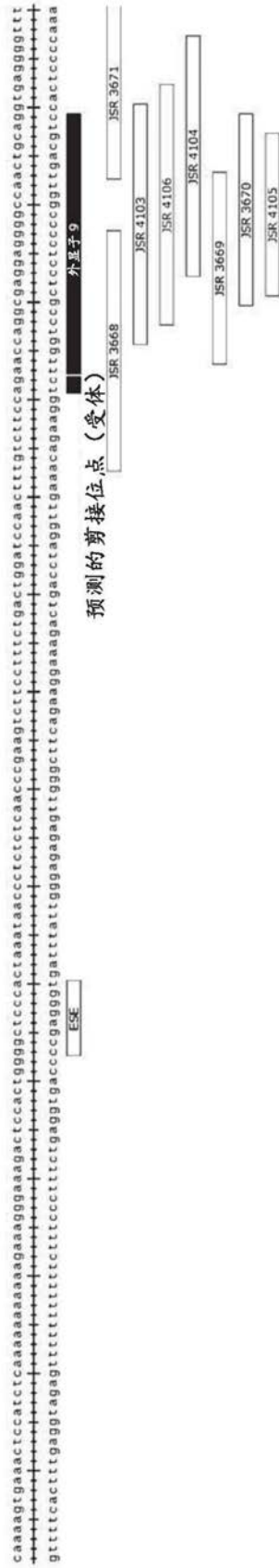


图2a

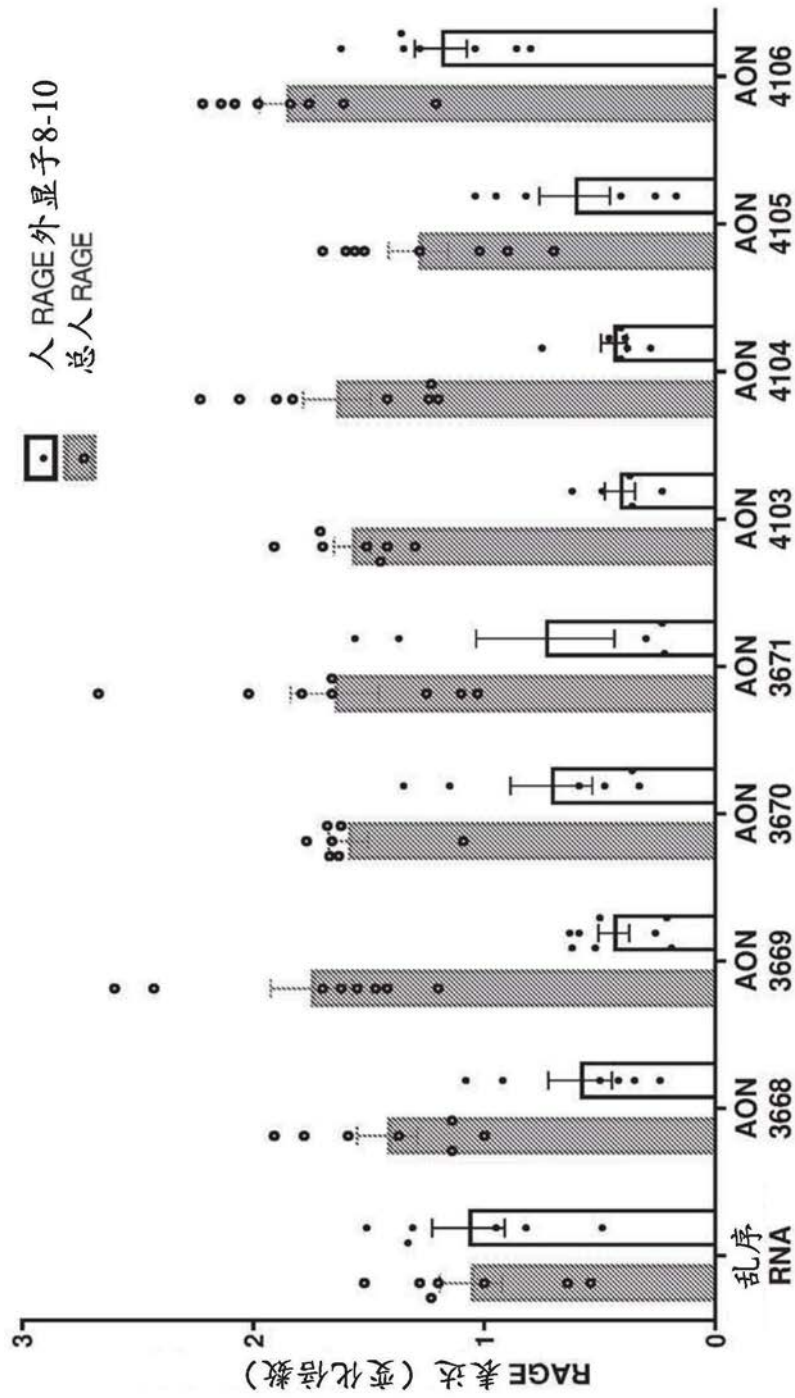


图2b

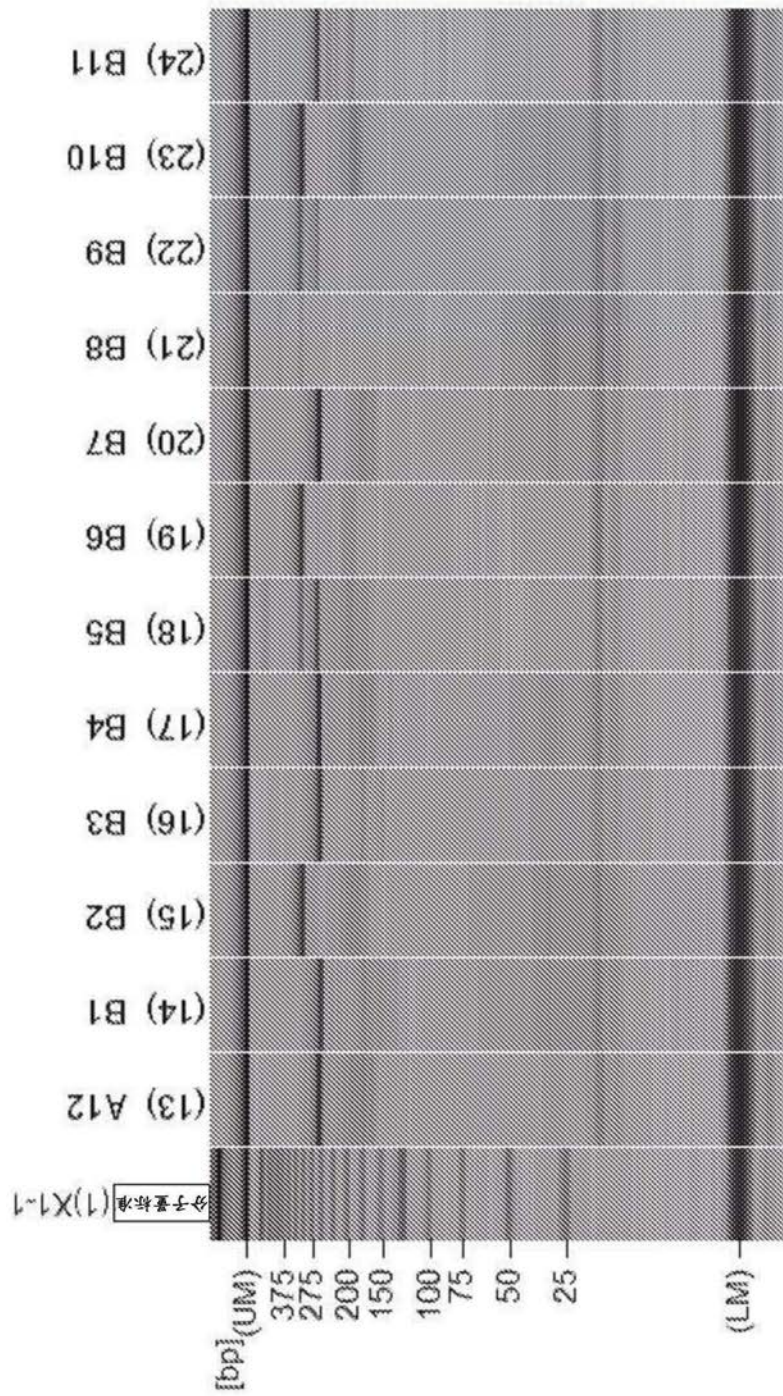


图2c

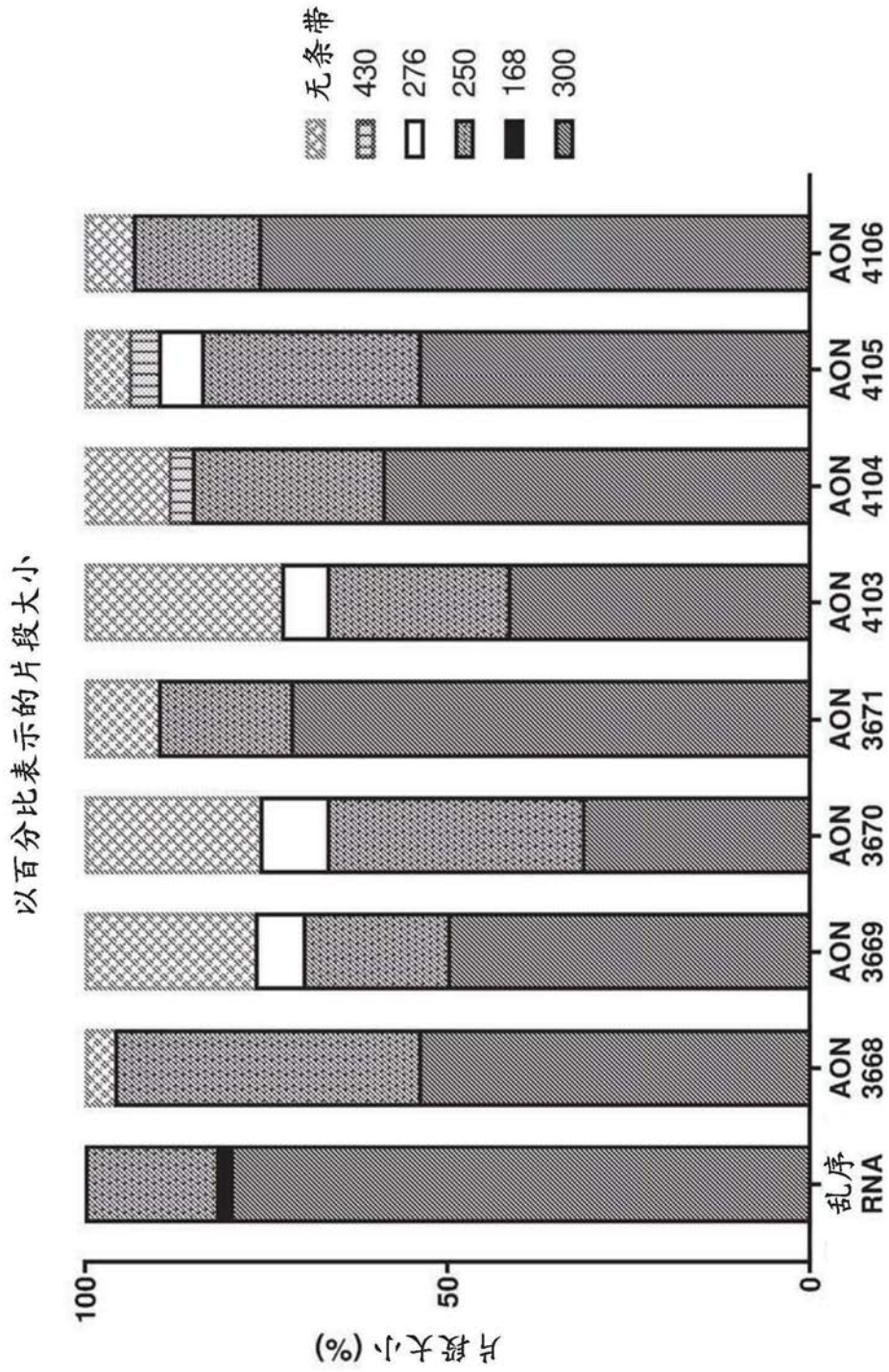


图2d

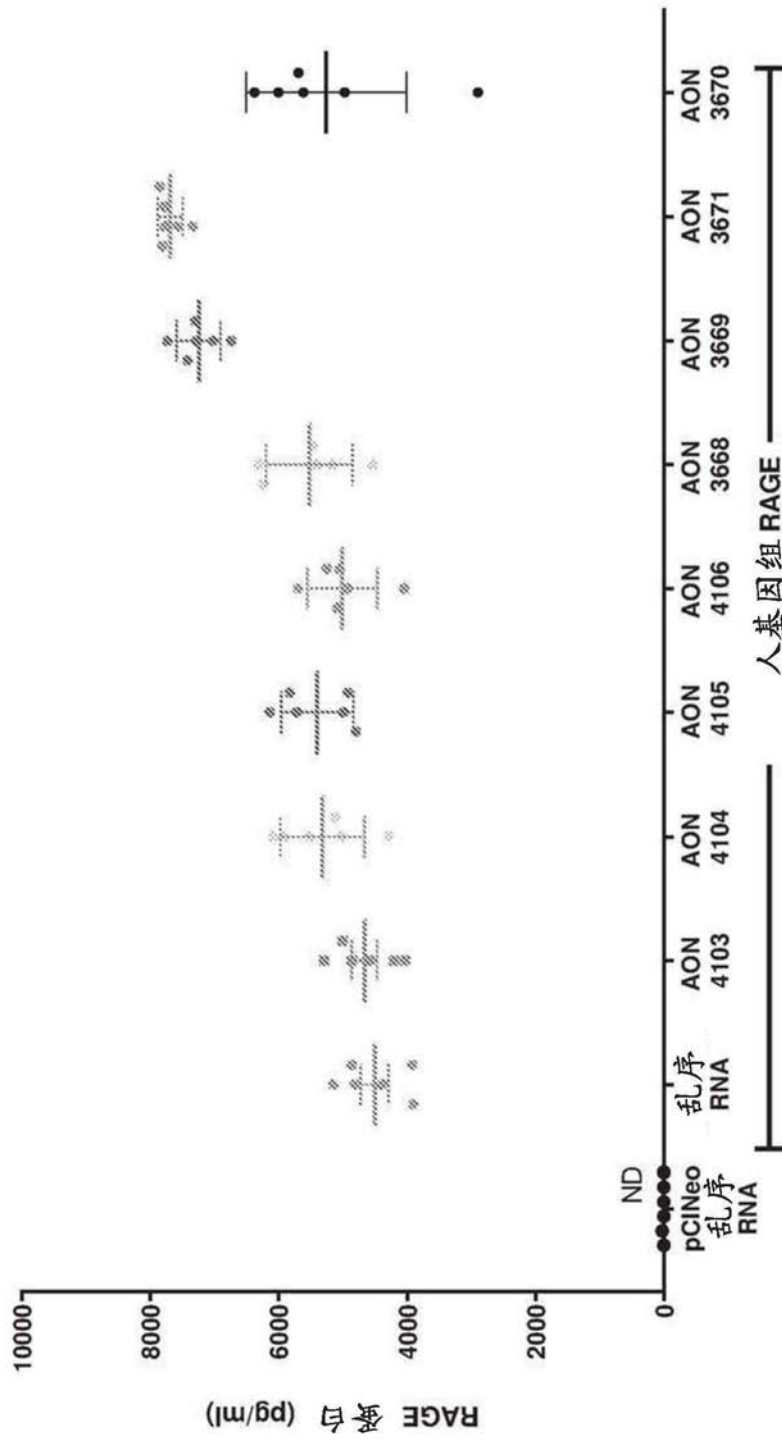


图2e

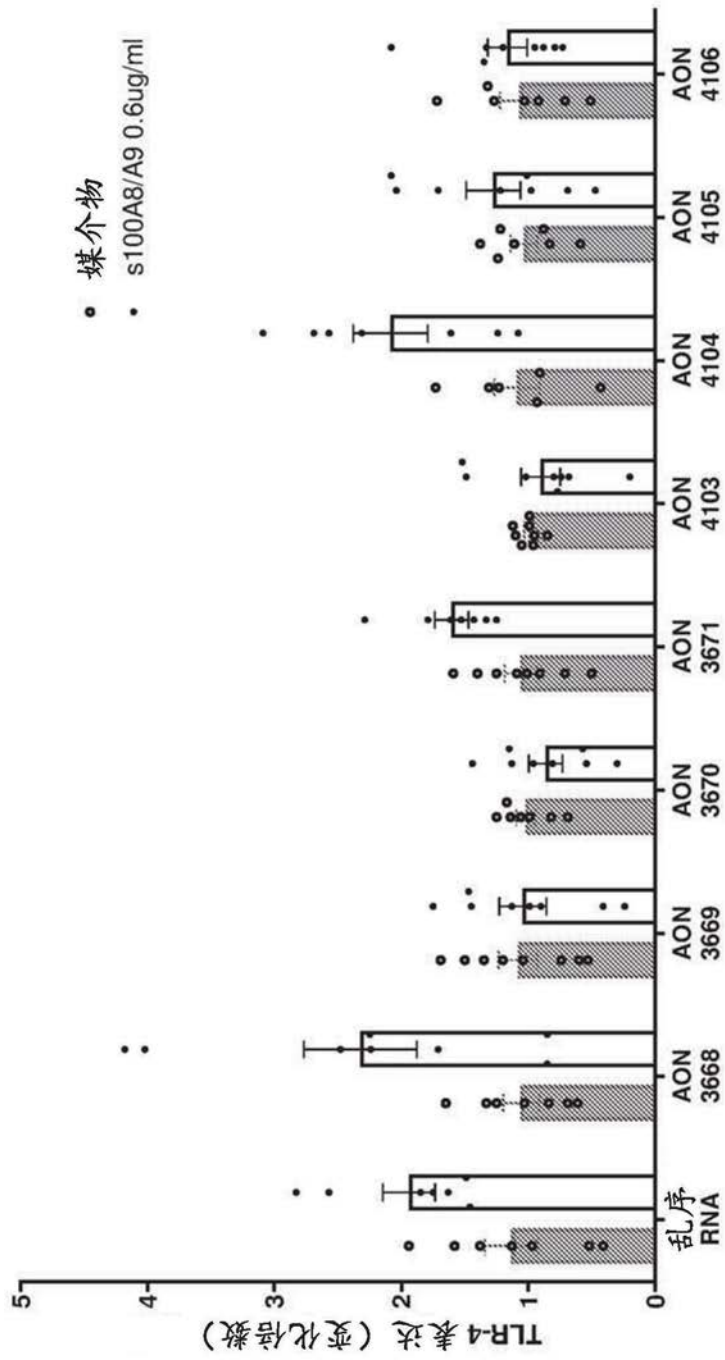


图2f

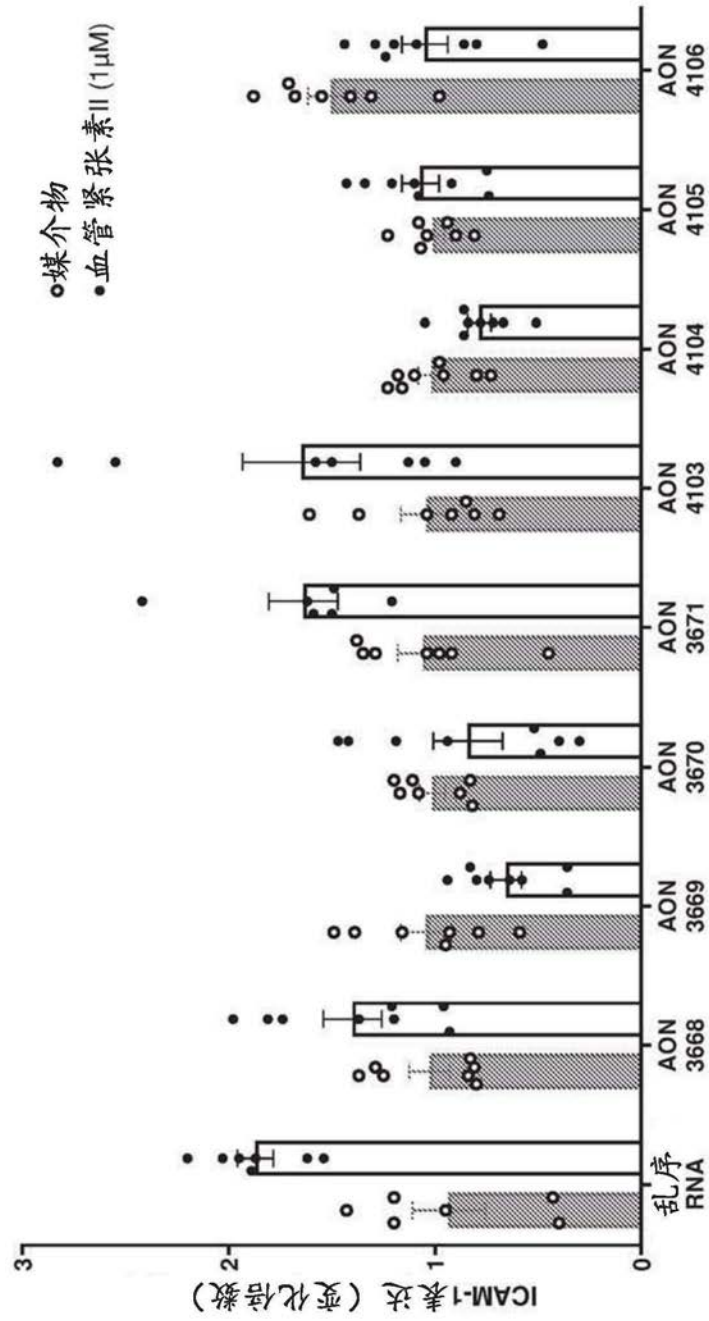


图2g

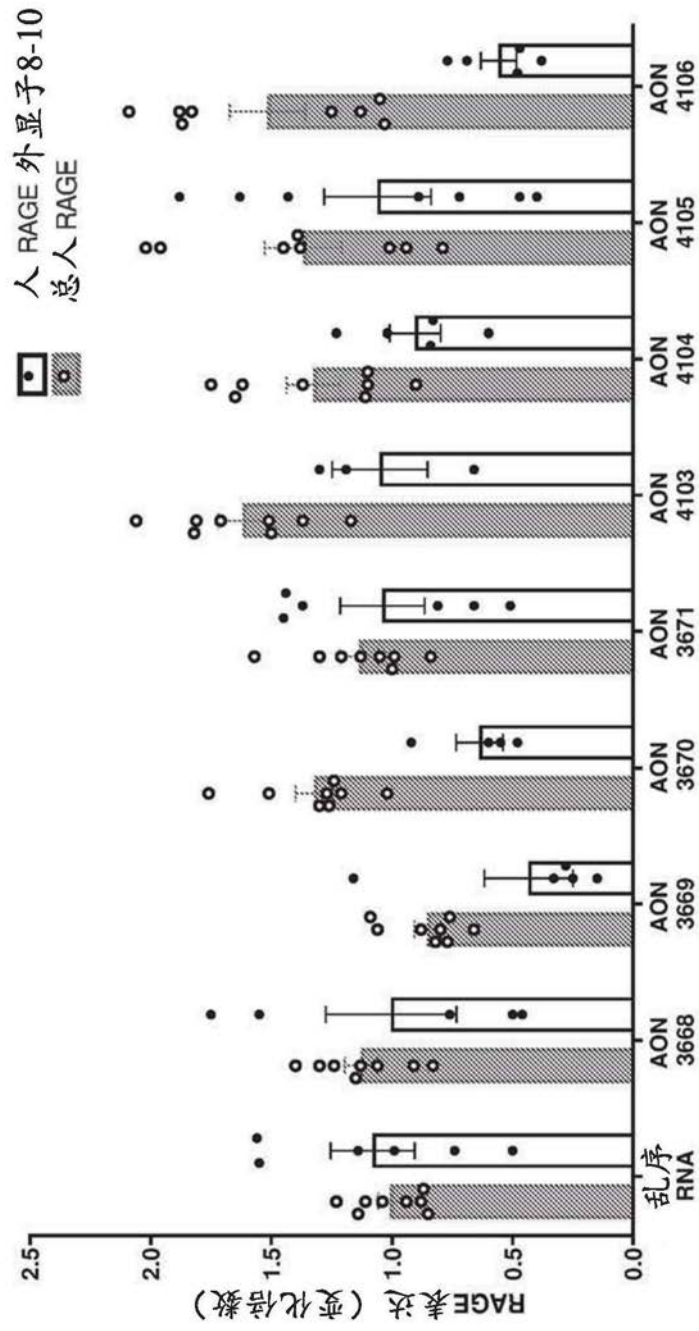


图2h

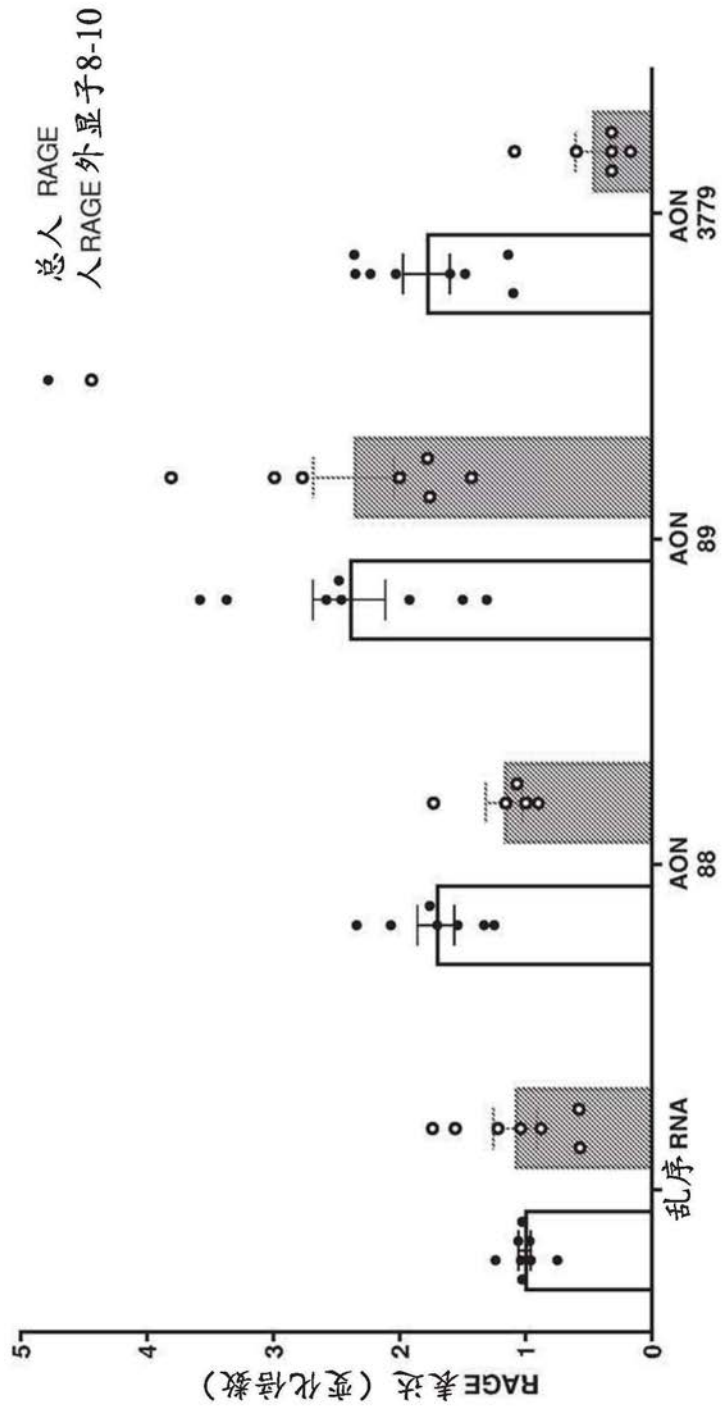


图3a

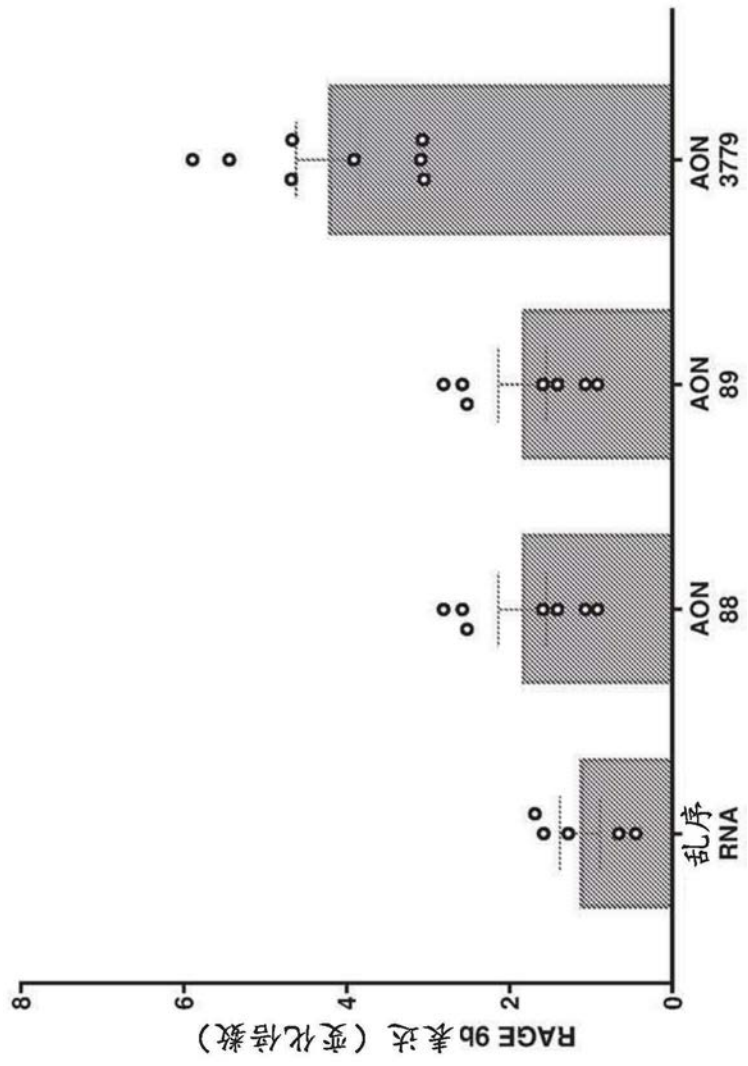


图3b

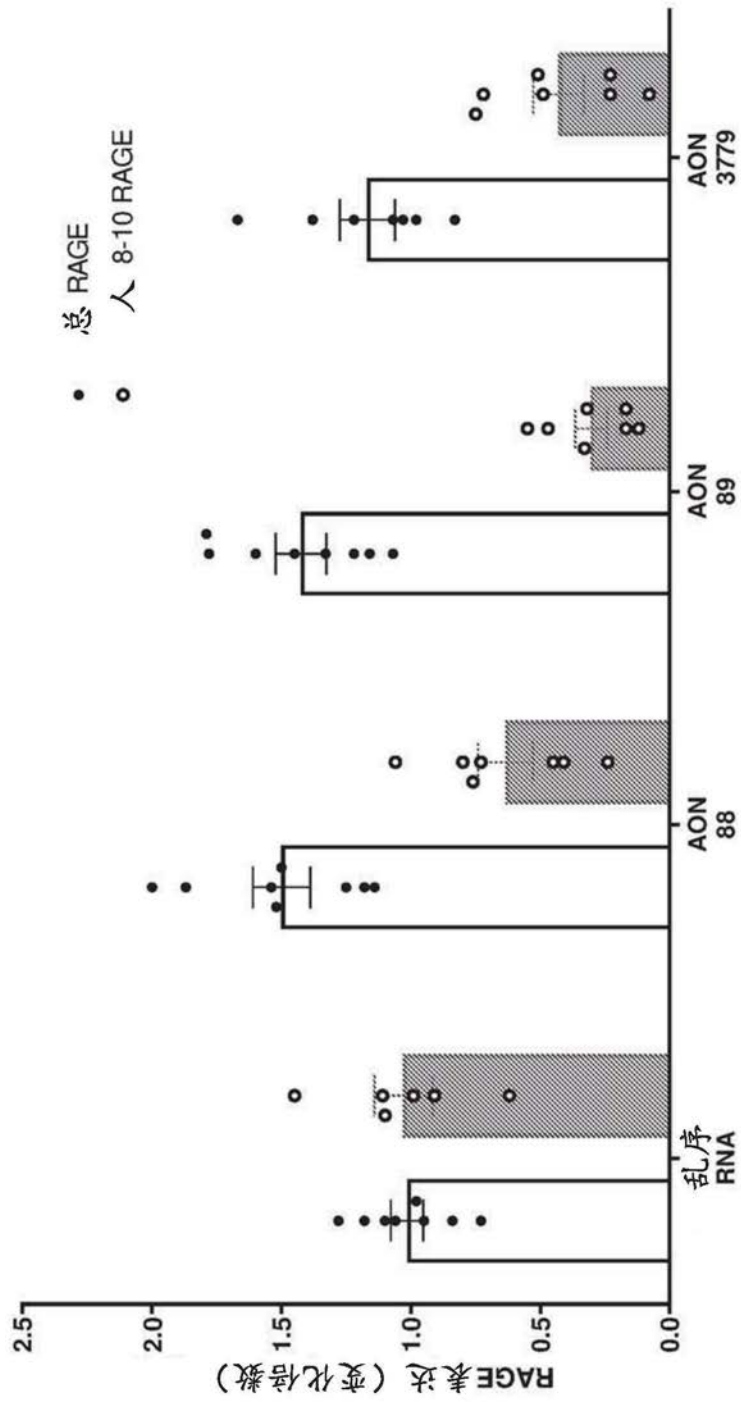


图3c

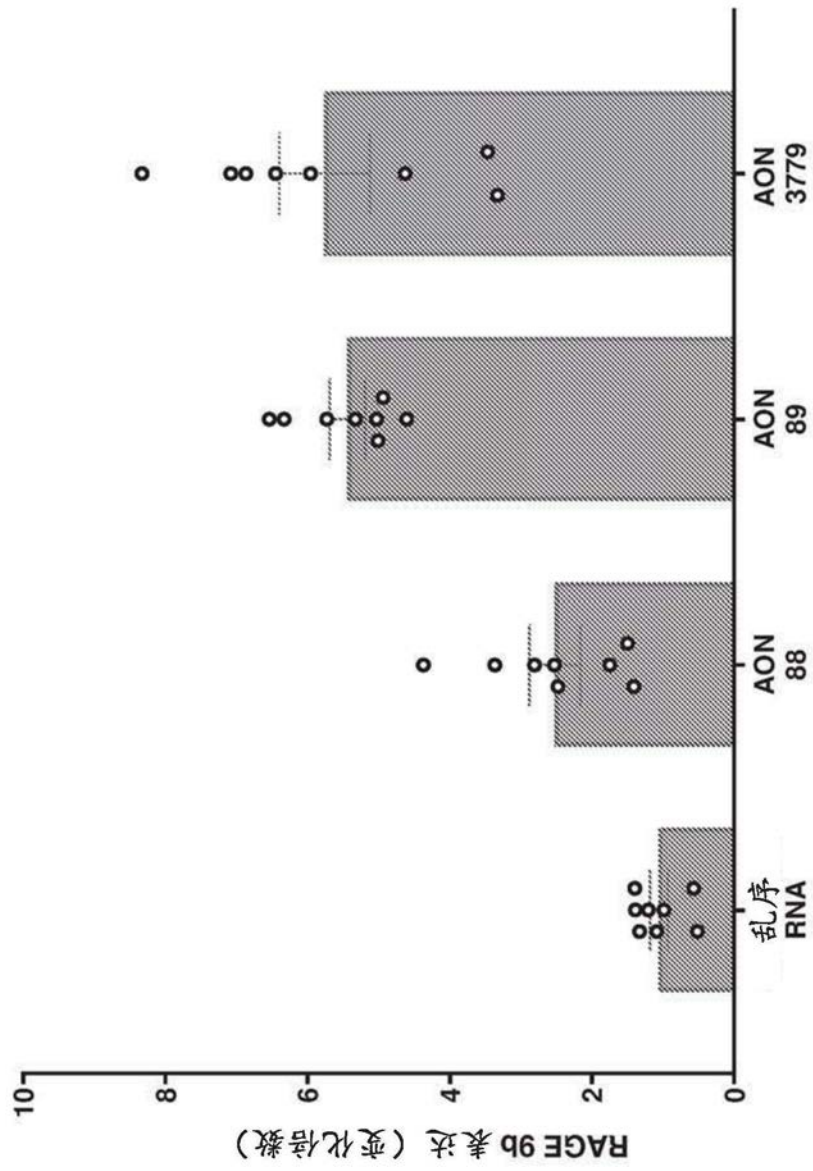


图3d

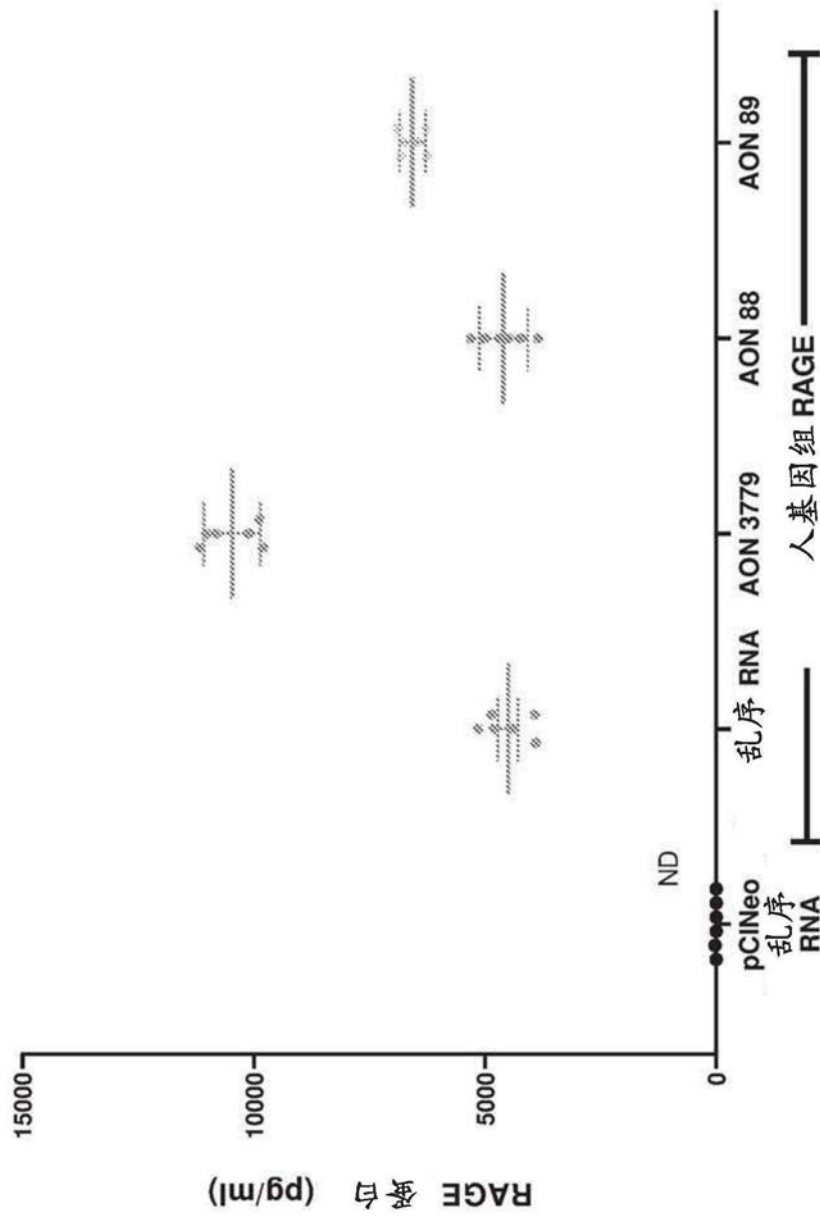


图3e



图3f

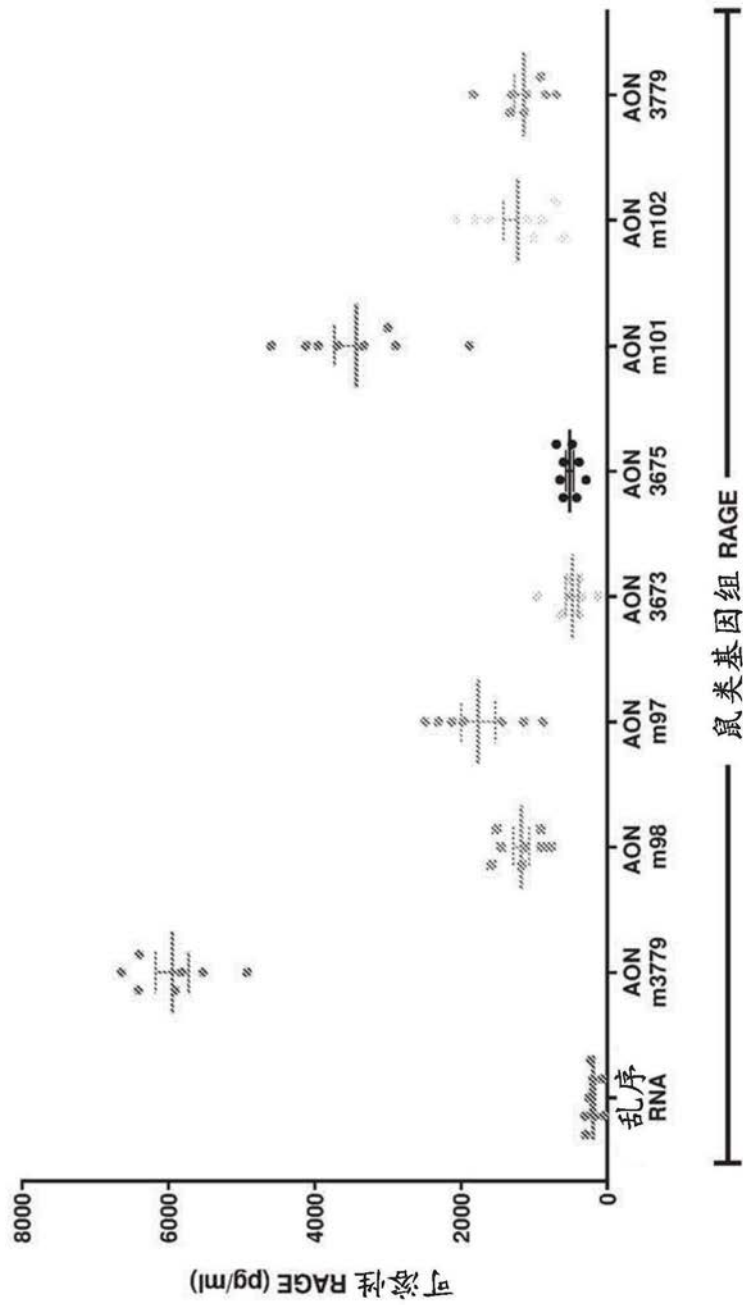


图4a

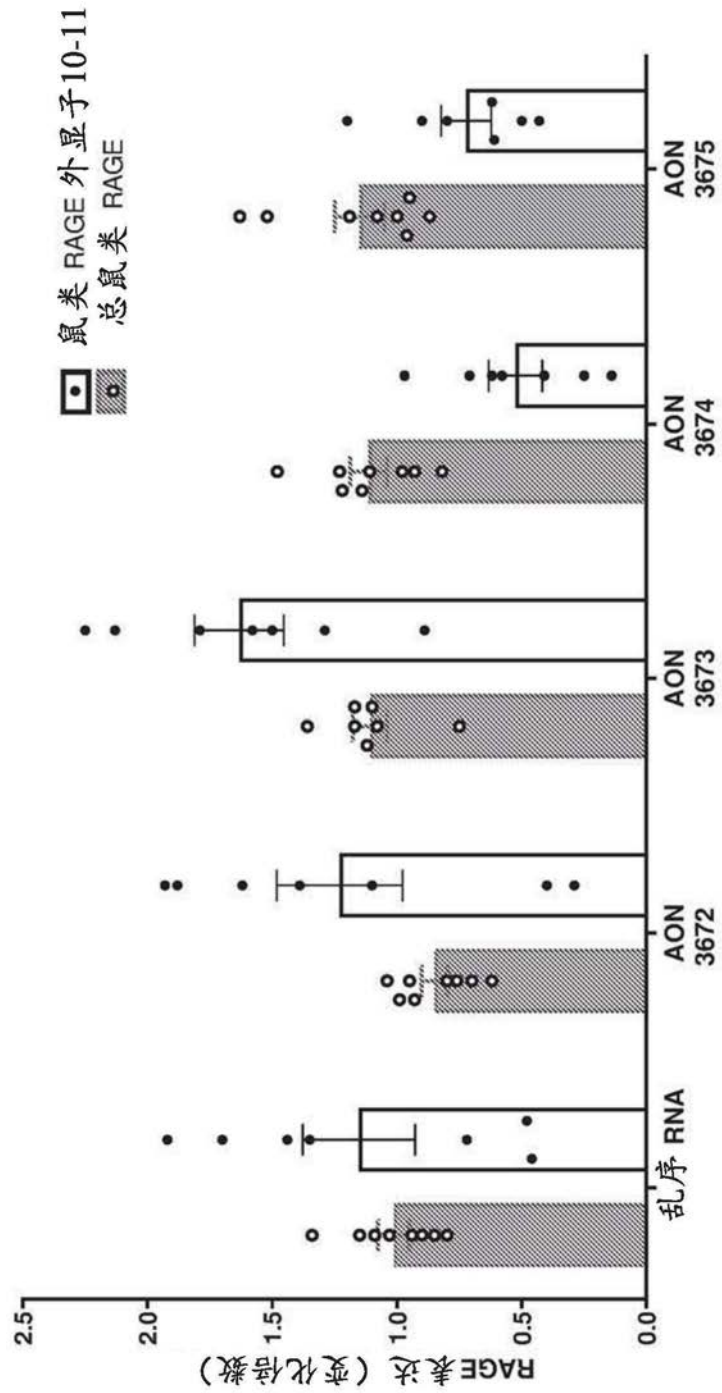


图4b

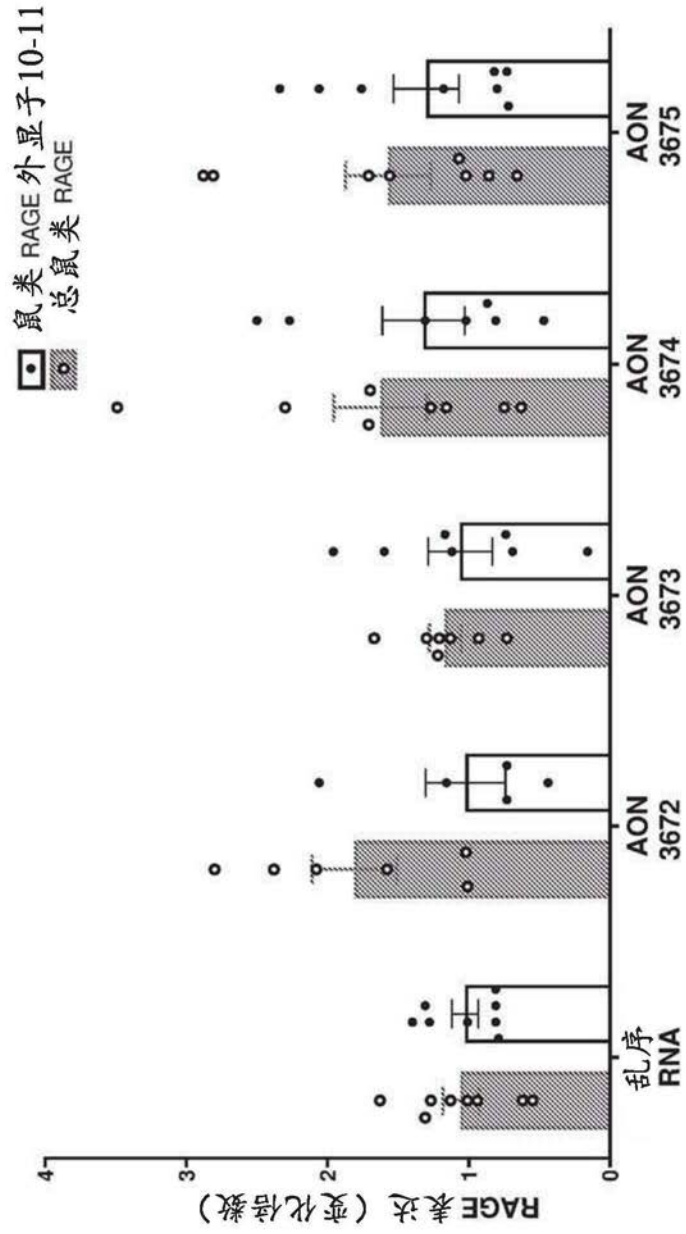


图4c

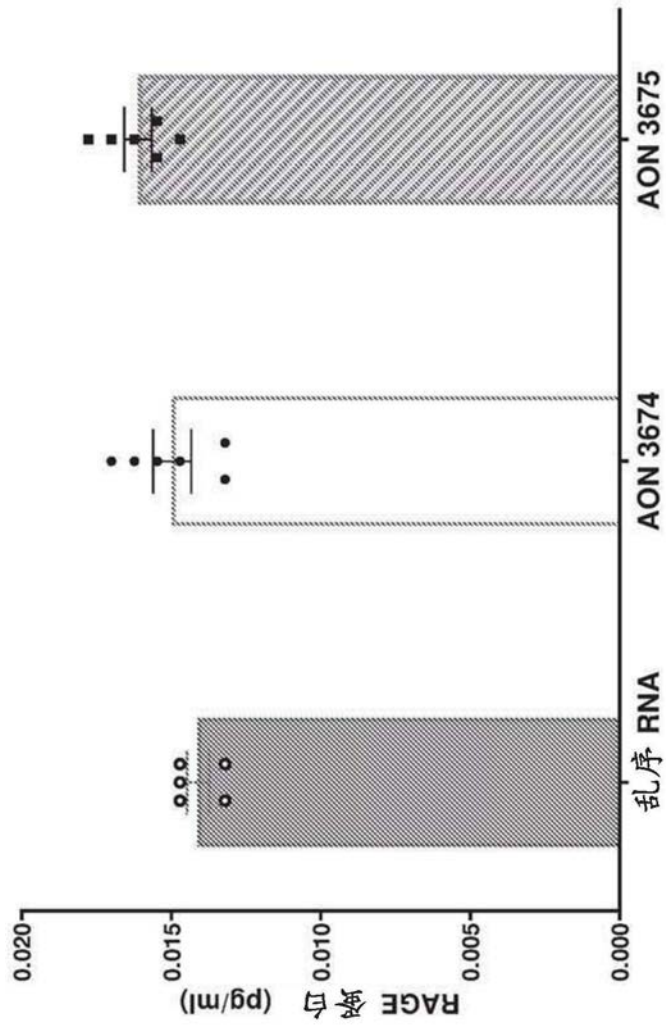


图4d

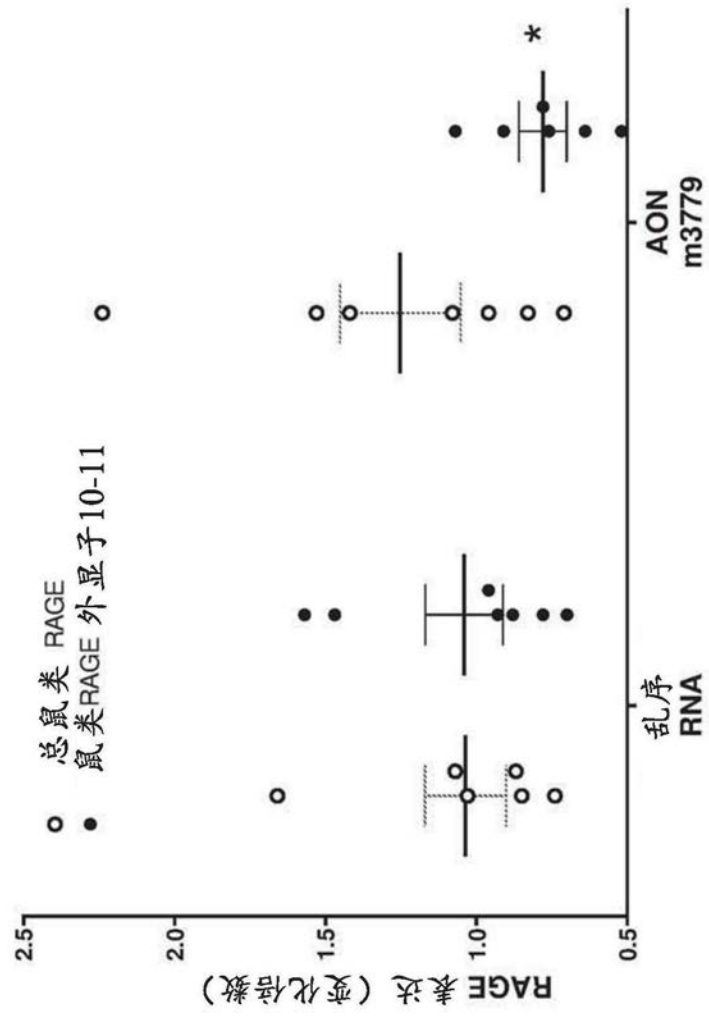


图4e

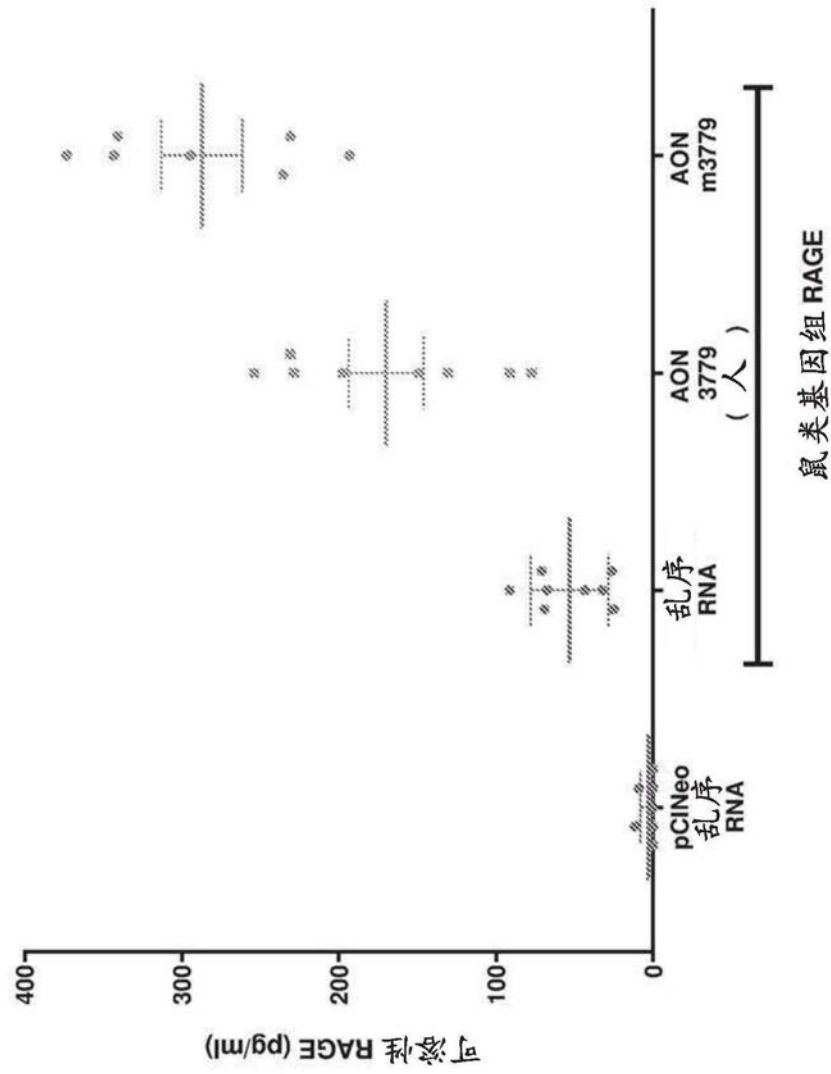


图4f

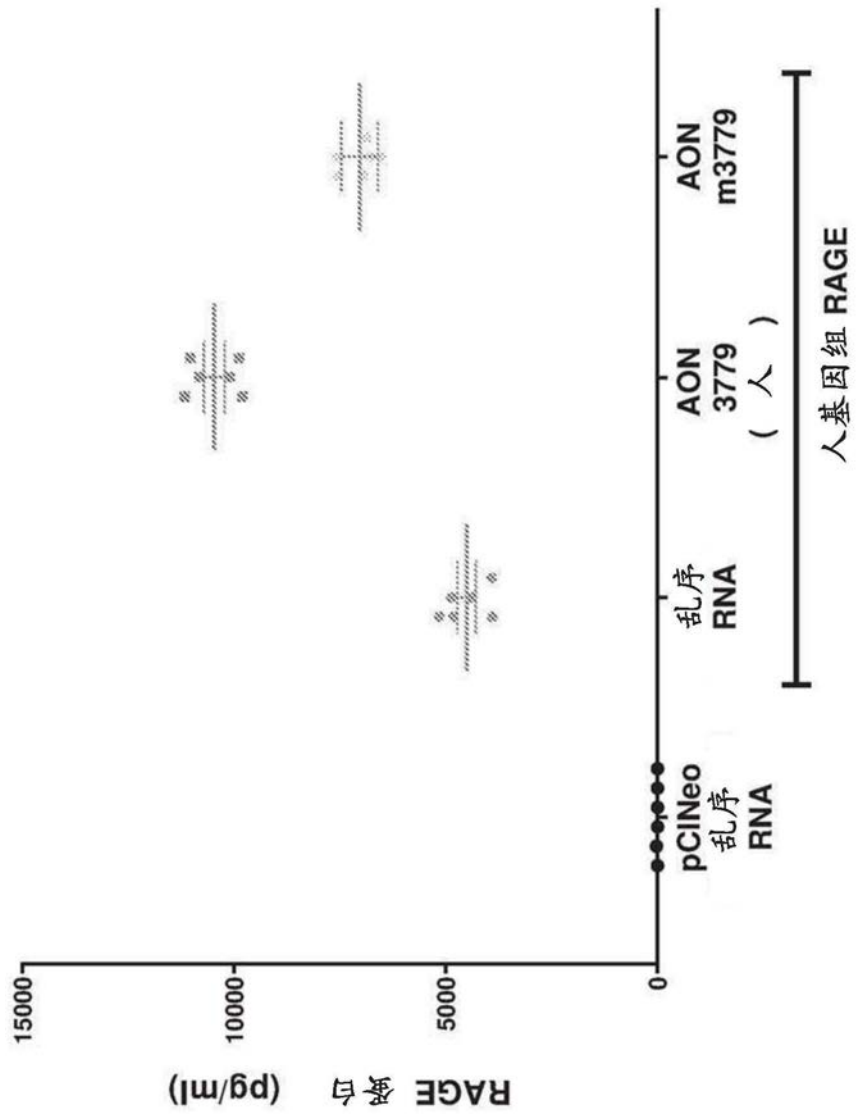


图4g

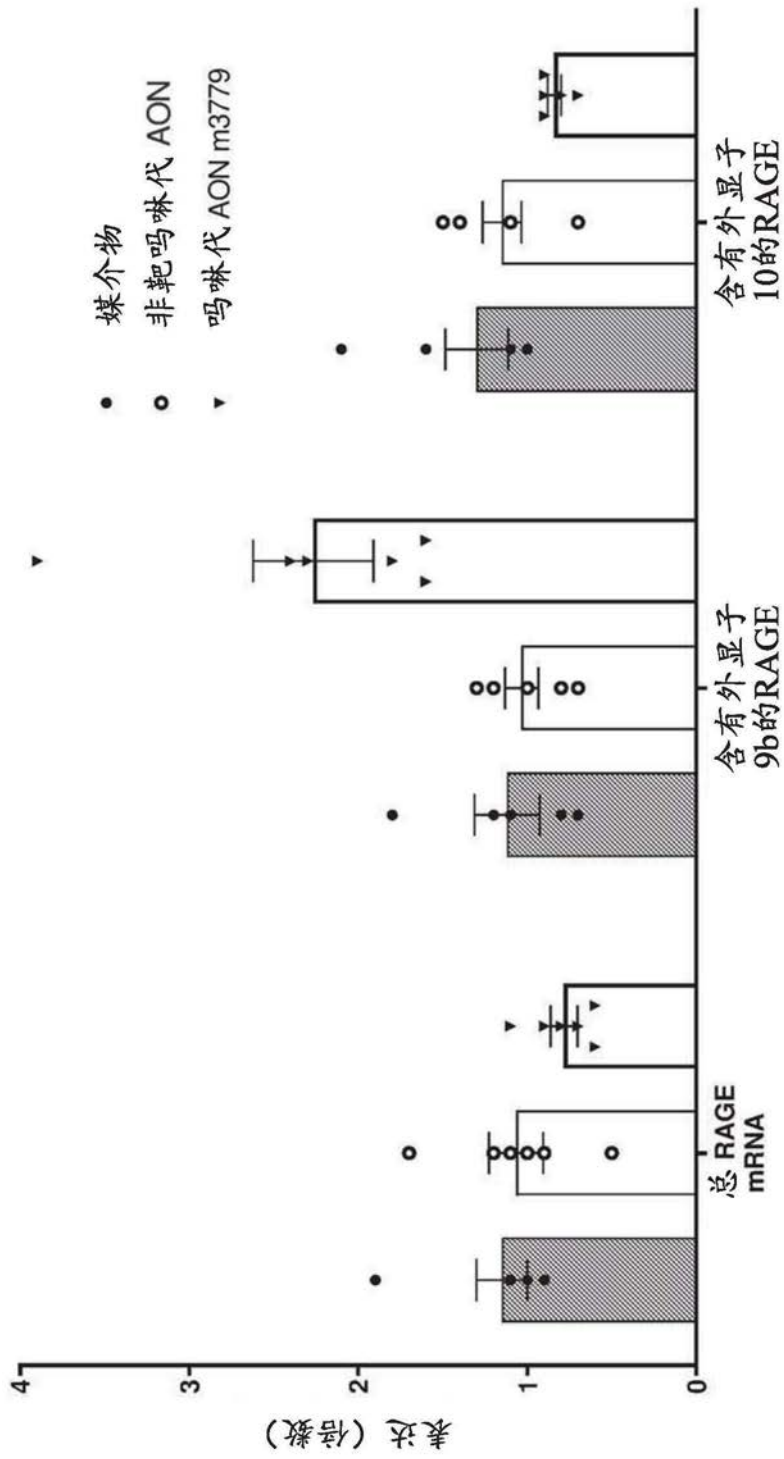


图4h

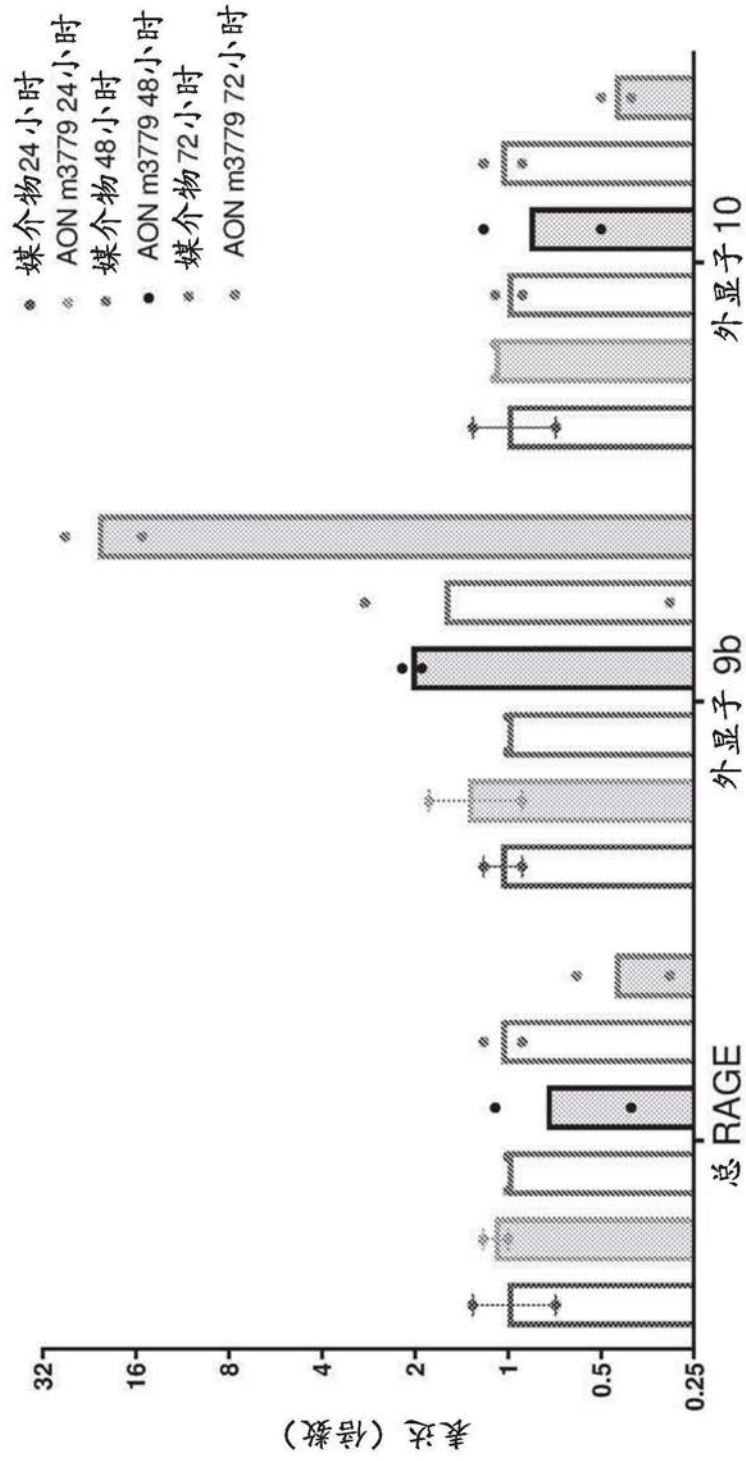


图4i

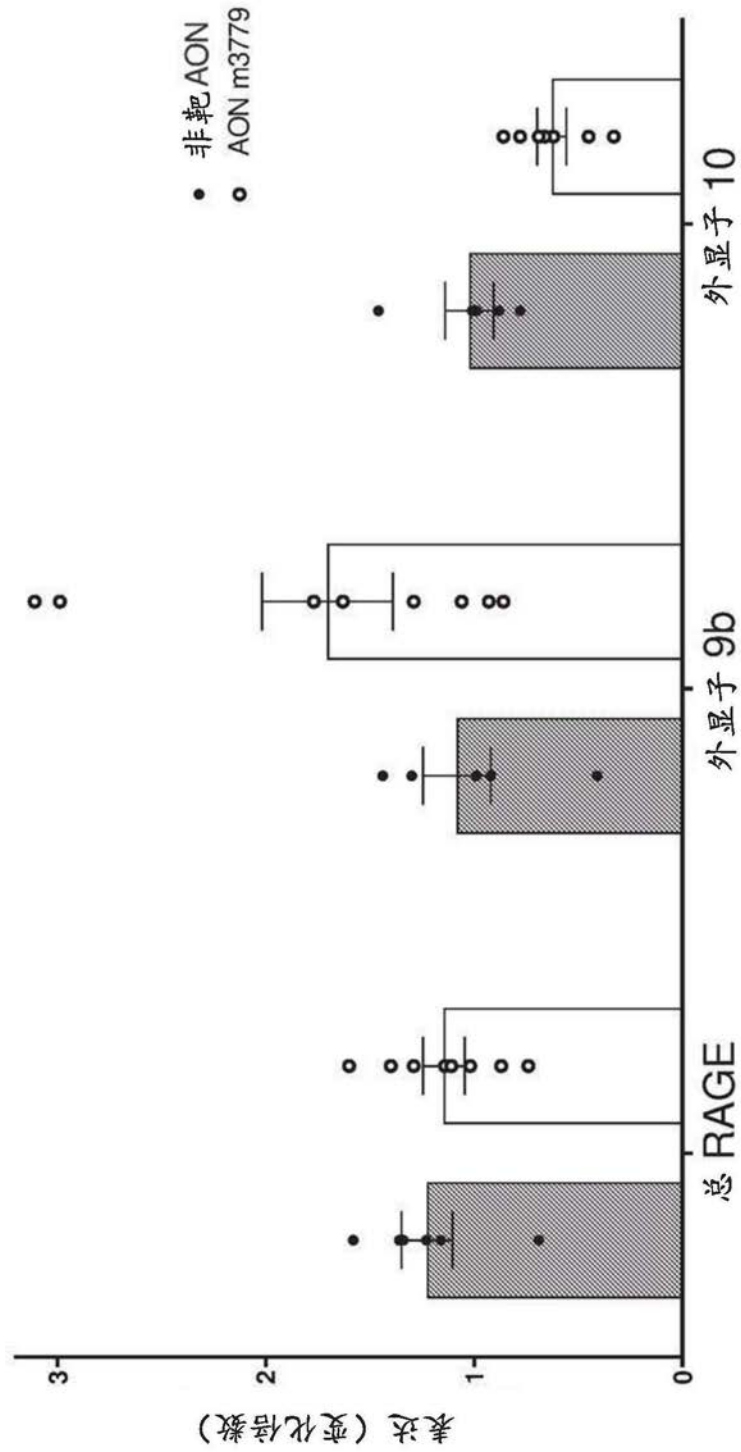


图4j

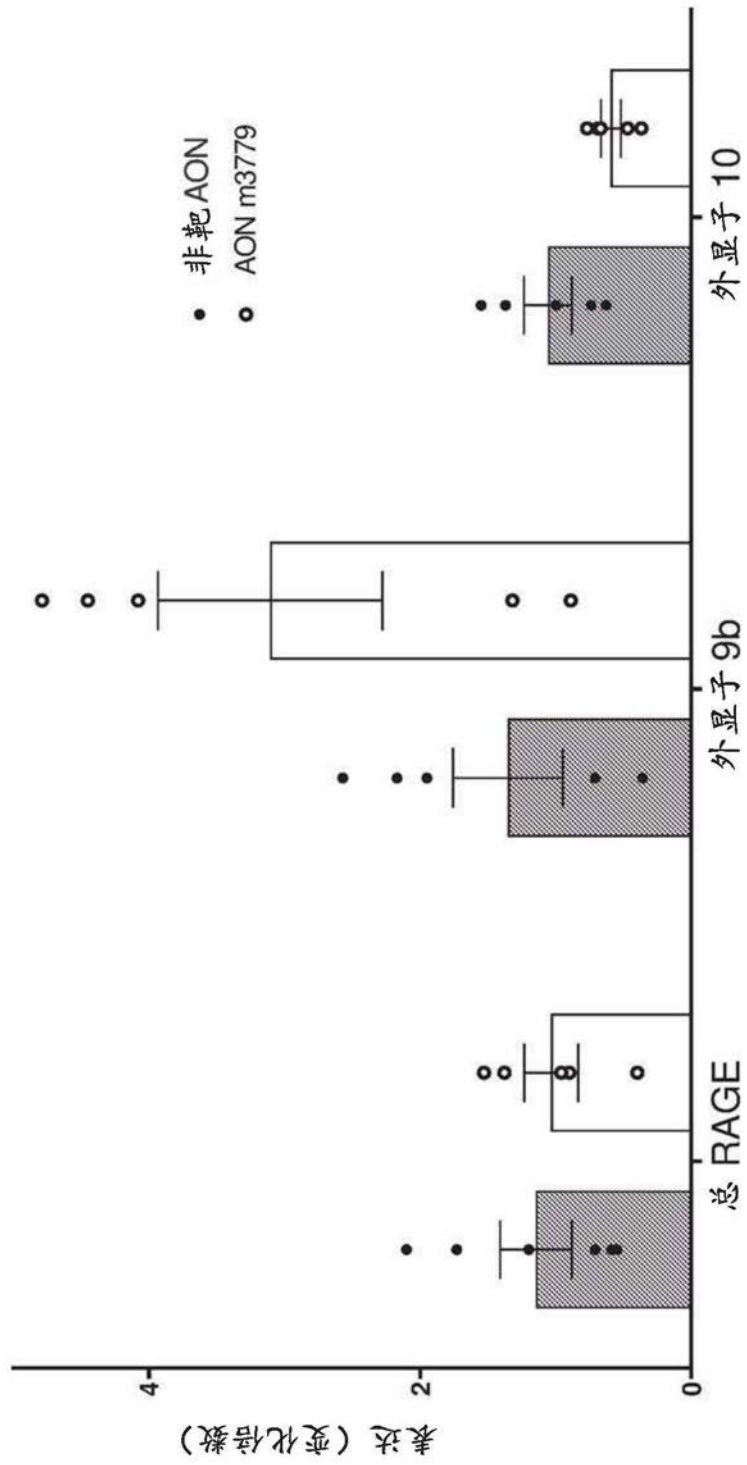


图4k



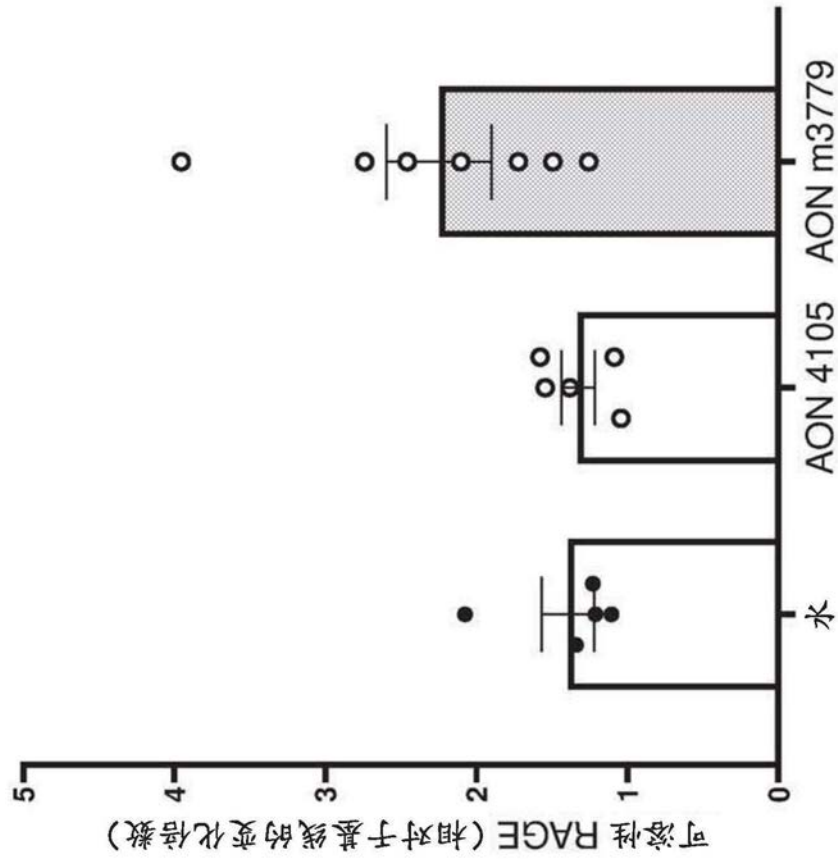


图4m

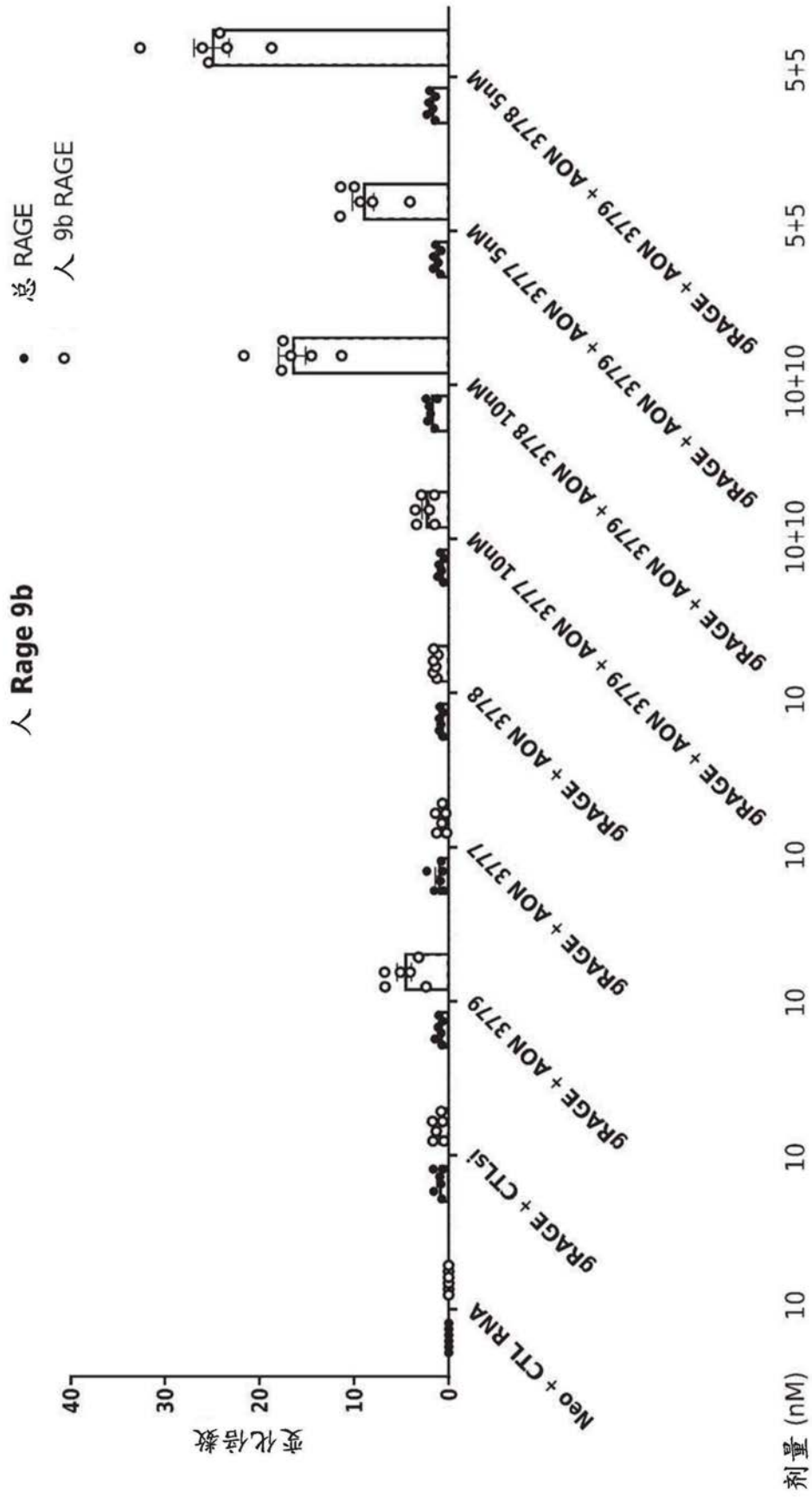


图5a

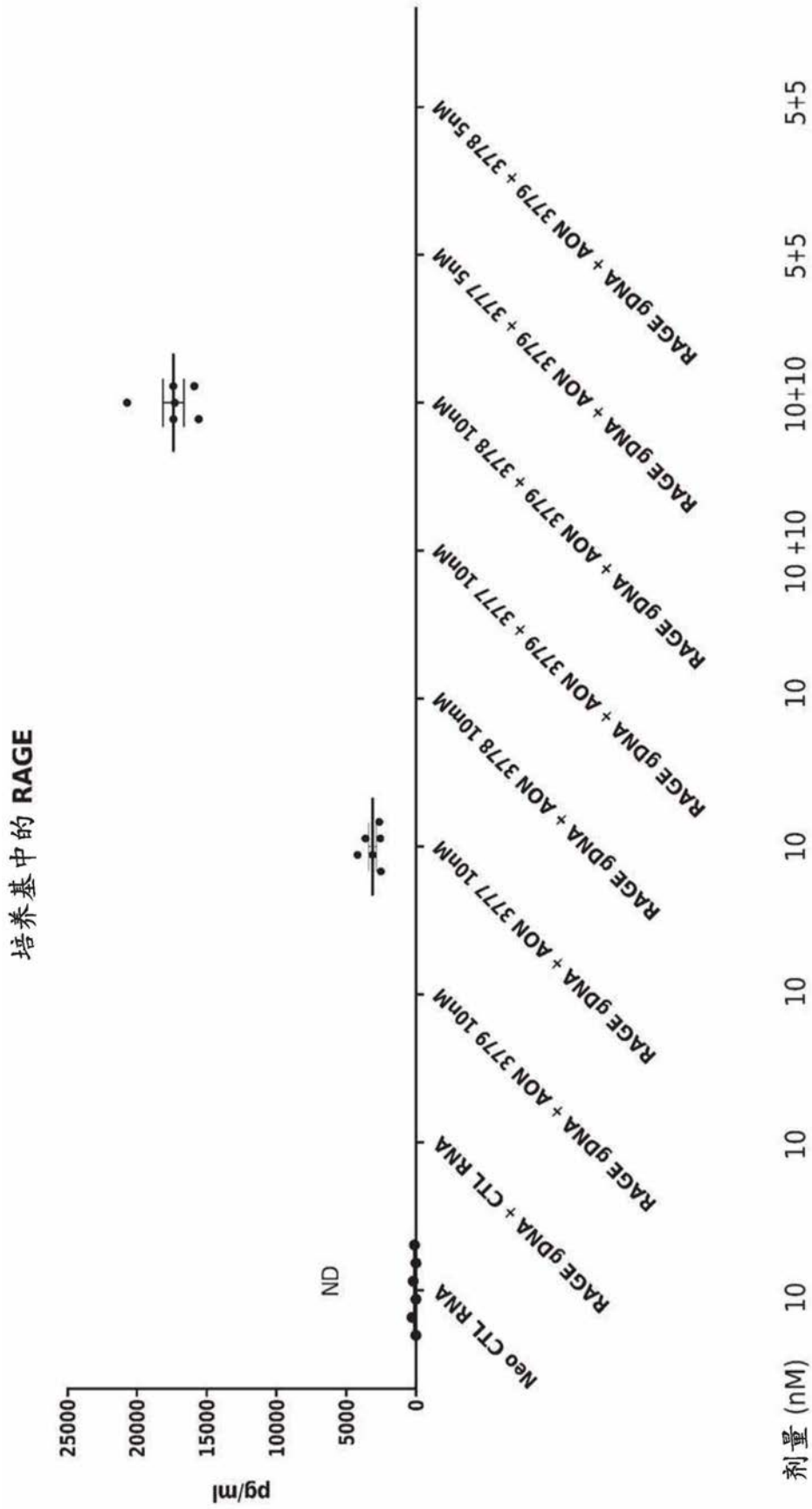


图5b

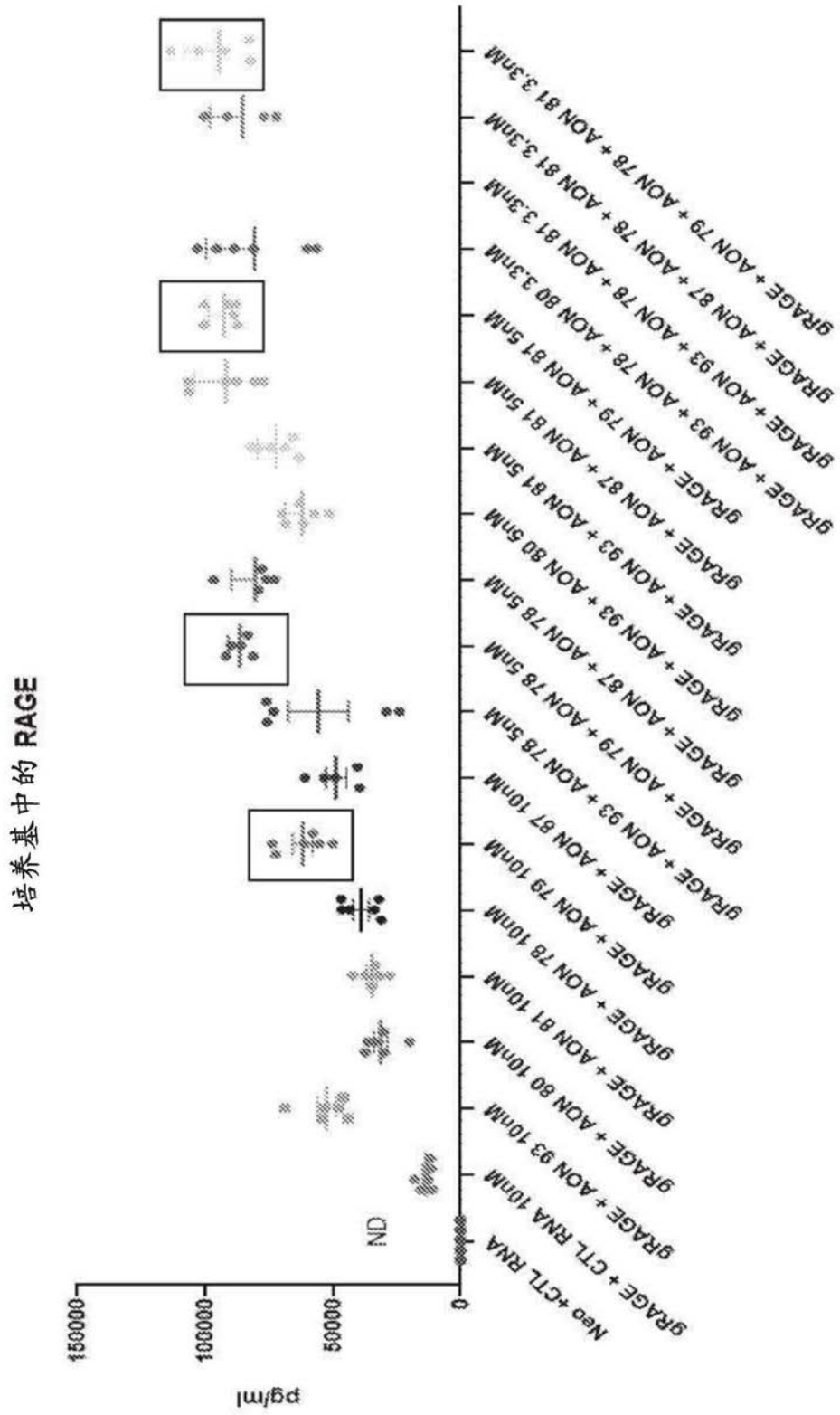


图5c

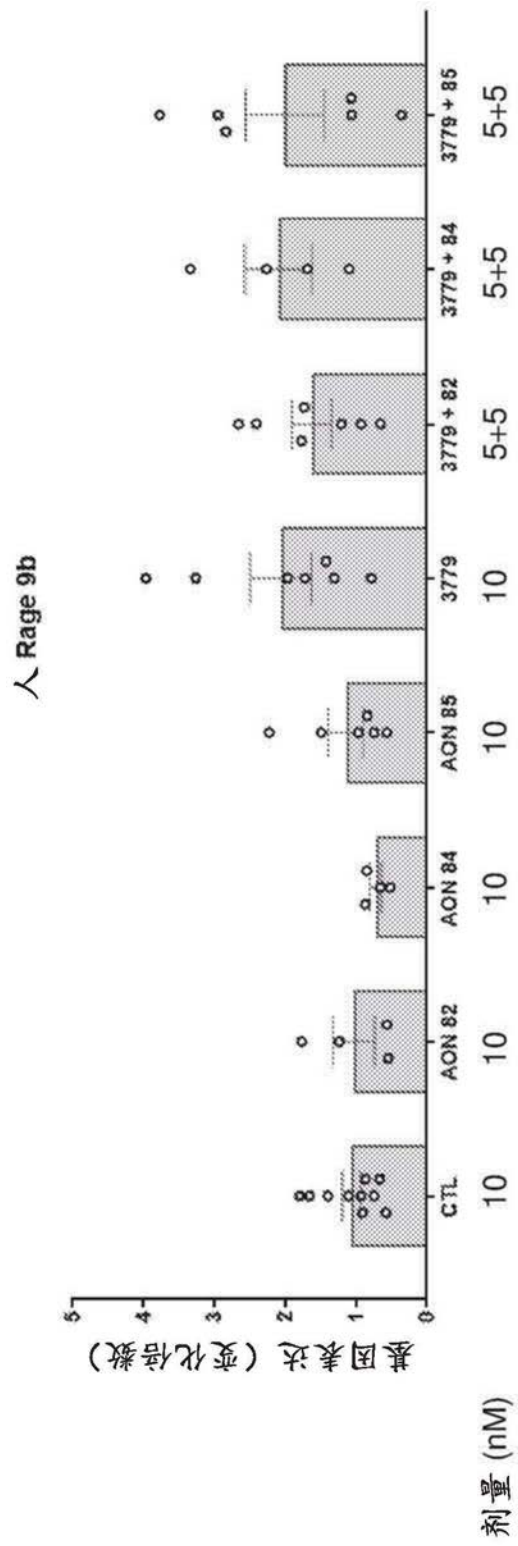


图5d

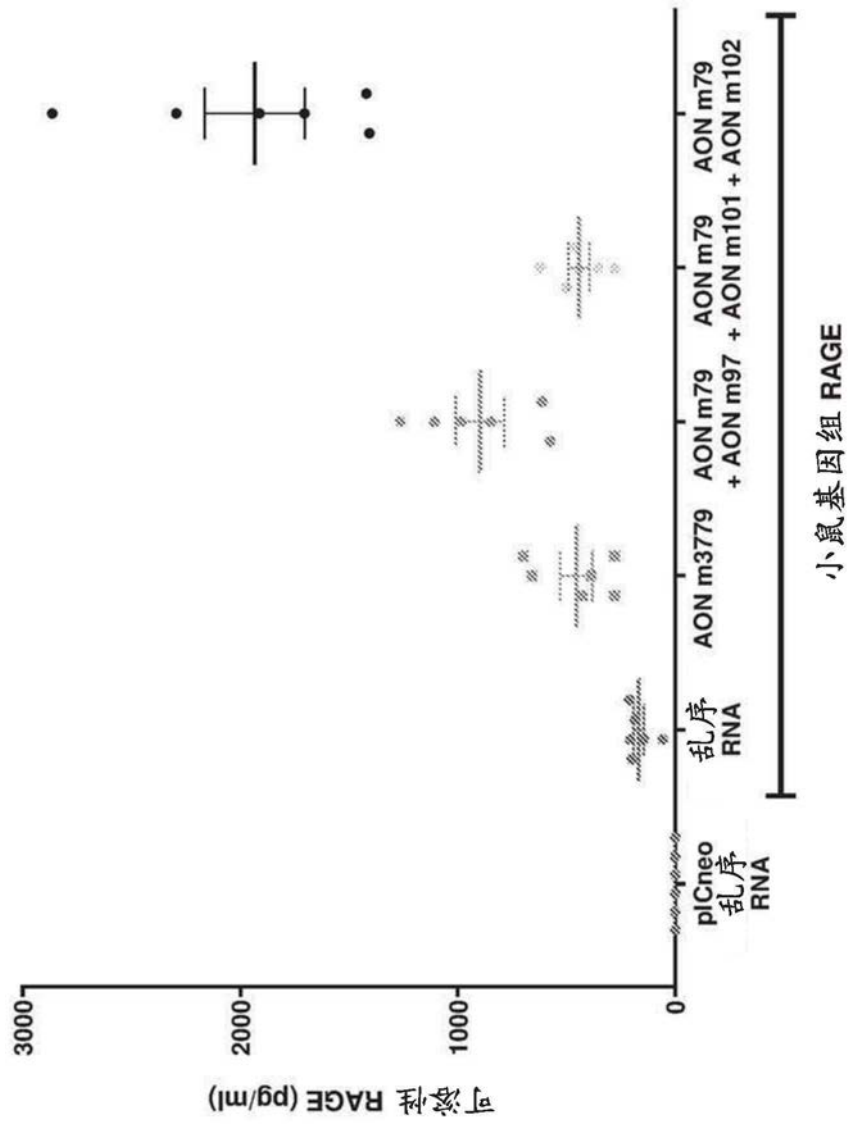


图5e