

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※
※計畫名稱： 肝細胞傳送及靶向性反意寡核酸組成物 ※
※ — 製備、體外試驗及初步動物試驗 ※
※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號： NSC 90-2320-B-002-193
執行期間： 90年08月01日至91年07月31日

計畫主持人：林淑萍 台灣大學 醫事技術學系
計畫參與人員：陳水田 中央研究院 生物化學研究所
 余秀瑛 台灣大學 藥學系

- 本成果報告包括以下應繳交之附件：
- 赴國外出差或研習心得報告一份
 - 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
 - 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
 - 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：台灣大學 醫事技術學系

中華民國九十一年十月十一日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：肝細胞傳送及靶向性反意寡核酸組成物－製備、體外試驗及初步動物試驗

計畫編號：NSC 90-2320-B-002-193

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：林淑萍 台灣大學 醫事技術學系

計畫參與人員：陳水田 中央研究院 生物化學研究所

余秀瑛 台灣大學 藥學系

一、中文摘要

針對肝癌細胞過度表現的 Protein kinase C- α (PKC- α) 研發反意寡核酸，在體外誘導癌細胞凋亡以抑制肝癌細胞的生長，並設計肝正位腫瘤的實驗模式，在大白鼠活體以 PKC- α 的反意寡核酸抑制肝腫瘤的生成。另外利用肝細胞表面存在的 Asialoglycoprotein Receptor 發展靶向性寡核酸，合成了能與此受體結合的醣胜月太 [Y(EGalNAc)₃]-Lysine)₂₀ 來攜帶 PKC- α 的反意寡核酸，可以更有效的抑制肝細胞中 PKC- α 的產生。這些結果將裨益於肝癌的治療及診斷。針對癌細胞對化療藥物 5-fluorouracil 或 5-fluorodeoxyuridine 反應不一的問題探究其原因，發現是受細胞內 thymidine kinase (TK) 的影響，上述化療藥物對於 TK 活性高的細胞很有效，對活性低的細胞則否。然而我們發現對於後者利用 Thymidylate synthase (TS) 的反意寡核酸就可以很有效的抑制癌細胞生長，TS 的反意寡核酸和化療藥物並用更有加成的效果。這些結果顯示發展反意寡核酸成為癌症治療劑及佐劑的可行性。

關鍵詞：反意寡核酸、藥物傳送及靶向性、癌症治療

二、英文摘要

Antisense oligonucleotides (ATON) against protein kinase C- α (PKC- α) were demonstrated to suppress the growth of rat liver cancer cells *in vitro* and *in vivo*, an orthotopic rat liver cancer model. Glycopeptides [Y(EGalNAc)₃]-Lysine)₂₀, capable of specific binding to asialoglycoprotein receptors on liver cells were synthesized. Using this novel glycopeptide as targeting vehicle, the efficacy of the ATON to inhibit PKC- α was improved. In another study, ATONs of thymidylate synthase (TS) were developed for cancer treatment. Aiming to the unsolved problem that some cancer cells are resistant towards 5-fluorouracil or 5-fluorodeoxyuridine, which are common chemotherapeutic drugs. We found that low thymidine kinase (TK) activity in these cells accounting for the drug-resistance and the problem can be overcome by combined use of TS-ATON with the drug. These results indicate the potentials of ATON as chemotherapeutic agents or drug adjuvant

Keywords: Antisense oligonucleotide, drug delivery and targeting, cancer therapy

三、結果與討論

針對寡核酸及寡核酸類似物的應用發展，已達成的成果包括：發展反意寡核酸(ATON)在細胞內研究特定蛋白質的生理角色，作為藥物（包括在體外及動物體內誘發細胞凋亡機制以抑制癌細胞的生長）以及在試管內發展基因診斷劑。以 ATON 在活細胞內研究特定蛋白質的生理角色對象包括：protein kinase C (PKC) 的各同功酶、thymidylate synthase (TS)、phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGP) 等蛋白質。利用 ATON 證明這些蛋白質的生理角色、以 ATON 抑制蛋白質並達到抑制癌細胞的生長(PKC- α)，或加加強抗癌藥物的抑癌效果(TS)。在多年的努力之下，對於癌細胞內的訊息傳遞與核苷酸生合成的生化路徑有深入的瞭解。

以 PKC- α 的 ATON 在 cell culture 及老鼠體內抑制肝癌細胞的生長，並探討其抑制生長及引發細胞凋亡的分子機制，發現當 PKC- α 被抑制後，細胞週期被停滯於 S-phase 初期，抗凋亡分子 Bcl-2 及轉錄相關的核因子 NF- κ B 明顯下降，並導致腫瘤細胞嚴重死亡。進一步正位肝腫瘤動物實驗結果與體外的結果相當一致(1)。利用肝細胞表面存在的 ASGPr 發展靶向性寡核酸，合成了能與其結合的醣基月太 [Y(EGalNAc)₃]-Lysine)₂₀ 來攜帶 PKC- α 的反意寡核酸可以更有效的抑制肝細胞中 PKC- α 的產生。對疾病的體內治療及診斷將有所助益，這部分的實驗已告一段落，論文已投稿。

又研發核苷酸生合成路徑中重要酵素 TS 的 ATON，利用 thymidylate synthase (TS) 的 ATON，發現 TS-ATON 可以使細胞內 TS 的量降低。在 HEK 細胞會因缺乏 dTMP 使 DNA 合成受阻而引發細胞的凋亡，然而對於 HeLa 細胞的存活影響不大。化療藥物 5-F-pyrimidines [經由 thymidine kinase (TK) 催化轉變成 FdUMP 去抑制 TS] 對於這兩株細胞的影響則正好相反。我們發現細胞內主要生合成 dTMP 的路徑不同；HEK 主要是經由 TS，而 HeLa 是經由 TK 催化，所以兩種細胞對不同的 TS 抑制劑反應有所差別。對於 HEK 細胞使用 TS-ATON 才

能有效抑制 TS 的功能，ATON 和 5-F-pyrimidines 並用有加成的效果，低劑量就可有效抑制其生長，顯示 TS-ATON 是具潛力的藥物(2)。這些結果顯示發展 ATON 成為癌症治療劑及佐劑的可行性。針對 phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase，則利用 ATON 證明此蛋白質的生理角色(3)。

此外我們也建立了含多種特殊鹼基以及螢光標識寡核酸的製備系統，這些含特殊鹼基的寡核酸與核酸之間的雜合反應除了 Watson-Crick 配對之外還可以以 Hoogsteen 配對增加寡核酸的結合對象可供發展髮夾形、迴紋形等核酸三股的藥物策略，螢光標識的寡核酸可以發展成為檢驗試劑(4-7)，綜合以上我們的研究有紮實的理論基礎並深具臨床參考價值。

四、參考文獻

1. Lin SB, Wu LC, Huang SL, Hsu HL, Hsieh SH, Tsai MJ, Chi CW, Au LC, *In Vitro and In Vivo* suppression of growth of rat liver epithelial tumor cells by antisense oligonucleotide against protein kinase C- *Journal of Hepatology*. 2000;**33**:601-608.
2. Lin SB, Ts'o POP, Sun SK, Choo KB, Yang FY, Lim YP, Tsai SL and Au LC, Inhibition of thymidylate synthase activity by antisense oligodeoxynucleotide and possible role in thymineless treatment. *Molecular Pharmacology*, 2001;**60**:474-479.
3. Chen CJ , Huang HS, Lin SB, Chang WC, : Regulation of cyclooxygenase and 12-lipoxygenase catalysis by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in A431 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2000 ;**62**:261-268.
4. Hwu JR, Tsai FY, Tsay SC, Chuang SH, Su TR, Lin SB, Lin WC, Hsieh CL, and Kan LS. Interaction between

- 3-(p-tolylamino)-1,5-azulenequinone and the Deoxyguanosine Residue in Various Oligonucleotides upon Photolysis. *Photochem. Photobiol.* 2001;**74**: 686-693.
5. Tsai FY, Lin SB, Tsay SC, Lin WC, Hsieh, CL, Chuang SH, Kan LS, and Hwu JR. Photochemical cleavage of single- and double-stranded oligonucleotide by 3-(p-tolylamino)-1,5-azulenequinone. *Tetrahedron Letter.* 2001;**425**:5733-5736.
 6. Chin TM, Tseng MH, Chung KY, Hung FS, Lin SB, Kan LS. Formation of DNA triple helix containing N(4)-(6-aminopyridin-2-yl)-2'-deoxycytidine. *J Biomol Struct Dyn.* 2001;19:543-53.
 7. Chin TM, Lin SB, Lee SY Lee, Chang ML, Chang AYY, Chang FC, and Kan LS, "Paper-clip" type triple helix formation by 5'-d-(TC)₃T_a(CT)₃C_b(AG)₃ (a and b = 0 - 4) as a function of loop size with and without pseudoisocytosine base in the Hoogsteen strand, *Biochemistry*, 2000;39:12457-1246

