



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115851738 A

(43) 申请公布日 2023.03.28

(21) 申请号 202211707034.5

A61K 31/711 (2006.01)

(22) 申请日 2022.12.29

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 北京悦康科创医药科技股份有限公司

地址 100176 北京市大兴区北京经济技术开发区科创七街11号院3号楼1层101室

(72) 发明人 宋更申 郜金军 陈艾夫 黄泽傲  
吴尔重 杨硕 孔德洁 姚鹏

(74) 专利代理机构 北京植众德本知识产权代理有限公司 16083

专利代理师 张彦彦

(51) Int.Cl.

G12N 15/113 (2010.01)

C07H 21/04 (2006.01)

权利要求书7页 说明书36页  
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种修饰的寡核苷酸及其应用

(57) 摘要

本公开提供一种修饰的寡核苷酸及其应用,通过对所述的寡核苷酸,进行磷酸酯硫代、胞嘧啶甲基化、核糖上2'-O-MOE和2'-O-CET修饰、5'端缀合GalNAc基团等多种化学修饰,来提高寡核苷酸分子对目标基因的亲和力,提高生物学活性,同时降低细胞毒性,从而提供一种,更加安全、更有效的寡核苷酸及其应用。

1. 一种修饰的寡核苷酸、其酸式结构或其在药学上可以接受的盐,所述的寡核苷酸包含式(I)所示核苷酸序列的至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或20个连续核苷酸;其中式(I)所示的寡核苷酸序列为:

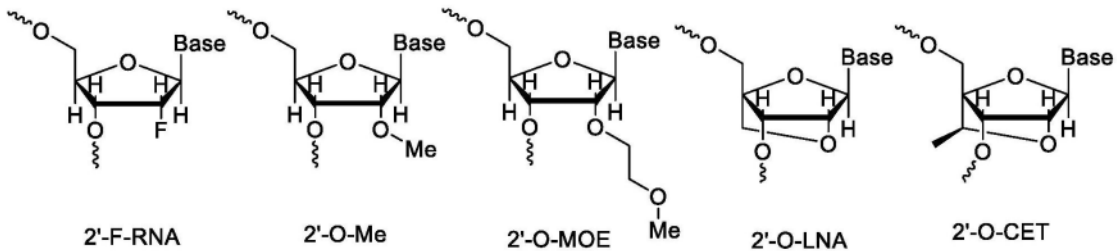


${}^m\text{U}$ 为,5甲基尿嘧啶修饰,

${}^m\text{C}$ 为,5甲基胞嘧啶修饰,

${}^{m/n}\text{C}$ 为,5甲基胞嘧啶修饰,或没有修饰的胞嘧啶,

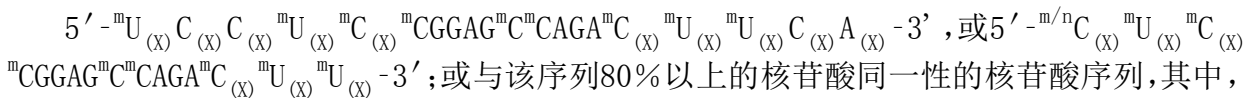
(X)为,2'位化学修饰的核糖,其中化学修饰的核糖选自下式所示的2'-F-RNA、2'-O-Me、2'-O-MOE、2'-O-LNA和2'-O-CET中的任意一种或者两种以上的组合,



所示序列中核苷酸单体之间连接的3',5'-磷酸二酯键,有硫代修饰;

优选地,所述盐为钠盐或钾盐,优选为钠盐。

2. 根据权利要求1所述的寡核苷酸、其酸式结构或其在药学上可以接受的盐,其中,所述的寡核苷酸为:



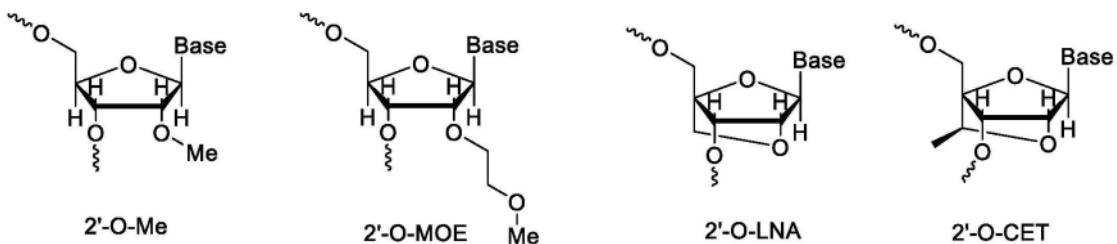
${}^m\text{U}$ 为,5甲基尿嘧啶修饰

${}^m\text{C}$ 为,5甲基胞嘧啶修饰

${}^{m/n}\text{C}$ 为,5甲基胞嘧啶修饰,或没有修饰的胞嘧啶

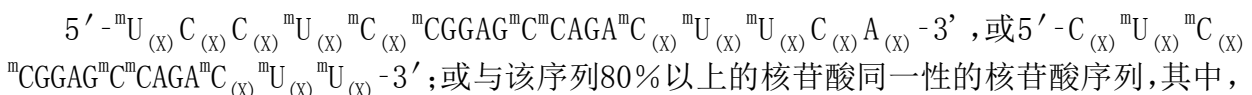
(X)为,2'位化学修饰的核糖,所述修饰的寡核苷酸中2'位化学修饰的核糖选自2'-O-Me、2'-O-MOE、2'-O-LNA和2'-O-CET中的任意一种或者两种以上的组合,

所示序列的正中间区域的10个核苷酸的核糖为脱氧核糖;



所示序列中核苷酸单体之间连接的3',5'-磷酸二酯键,为部分硫代修饰。

3. 根据权利要求2所述的寡核苷酸、其酸式结构或其在药学上可以接受的盐,其中,所述的寡核苷酸为:



${}^m\text{U}$ 为,5甲基尿嘧啶修饰,

$^m\text{C}$ 为,5甲基胞嘧啶修饰;

(X)为,2'位化学修饰的核糖,所述的2'位化学修饰的核糖选自2'-O-Me或2'-O-MOE,和选自2'-O-LNA或2'-O-CET的组合。

4.根据权利要求3所述的寡核苷酸、其酸式结构或其在药学上可以接受的盐,其中,所述的寡核苷酸为:

$5' - \text{C}_{(X)}^m \text{U}_{(X)}^m \text{C}_{(X)}^m \text{CGGAG}^m \text{C}^m \text{CAGA}^m \text{C}_{(X)}^m \text{U}_{(X)}^m \text{U}_{(X)}^m - 3'$ ;或与该序列80%以上的核苷酸同一性的核苷酸序列,其中,

$^m\text{U}$ 为,5甲基尿嘧啶修饰,

$^m\text{C}$ 为,5甲基胞嘧啶修饰;

(X)为,2'位化学修饰的核糖,所述的2'位化学修饰的核糖为2'-O-MOE和2'-O-CET的组合,

优选地,2'-O-CET修饰的数量不少于3个,其他的为2'-O-MOE修饰。

5.根据权利要求1-4所述的寡核苷酸、其酸式结构或其在药学上可以接受的盐,其中,所示序列中核苷酸单体之间连接的3',5'-磷酸二酯键,有硫代修饰,并形成3',5'-硫代磷酸二酯键,所修饰的数量为11-17个,优选的为12-15个。

6.根据权利要求5所述的寡核苷酸、其酸式结构或其在药学上可以接受的盐,其中,所示序列中核苷酸单体之间的连接,有12或13个是通过3',5'-硫代磷酸二酯键连接:

当序列为 $5' - ^m\text{U}_{(X)}^m \text{C}_{(X)}^m \text{C}_{(X)}^m \text{U}_{(X)}^m \text{C}_{(X)}^m \text{CGGAG}^m \text{C}^m \text{CAGA}^m \text{C}_{(X)}^m \text{U}_{(X)}^m \text{U}_{(X)}^m \text{C}_{(X)}^m \text{A}_{(X)}^m - 3'$ 时,核苷酸间的连接方式为soooooSSSSSSSSSSsooss,其中“s”代表硫代磷酸酯核苷连接,“o”代表磷酸二酯核苷连接;

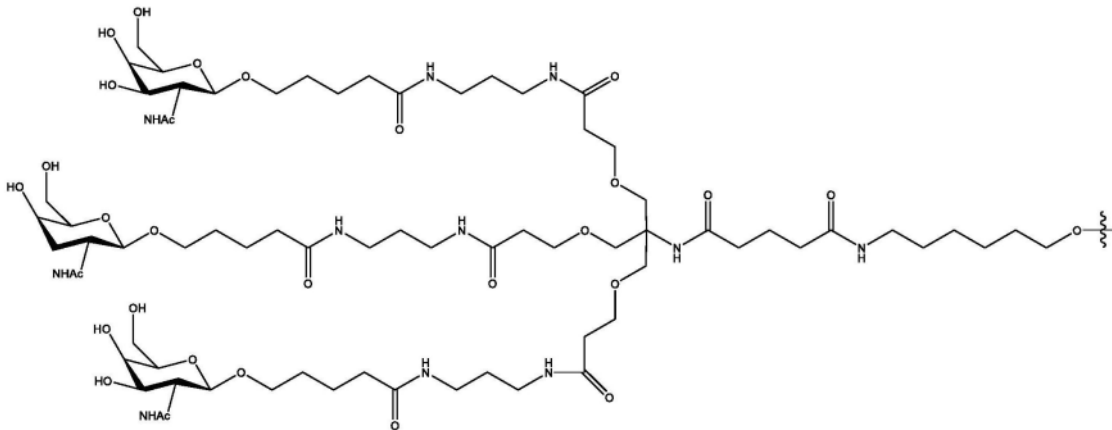
当序列为 $5' - \text{C}_{(X)}^m \text{U}_{(X)}^m \text{C}_{(X)}^m \text{CGGAG}^m \text{C}^m \text{CAGA}^m \text{C}_{(X)}^m \text{U}_{(X)}^m \text{U}_{(X)}^m - 3'$ 时,核苷酸间的连接方式为sooSSSSSSSSSSsos,其中“s”代表硫代磷酸酯核苷连接,“o”代表磷酸二酯核苷连接。

7.一种含有缀合基团的寡核苷酸,其包含前述权利要求所述的寡核苷酸、其酸式结构或其在药学上可以接受的盐,其中,所述寡核苷酸的5'末端或3'末端连接有缀合基团,所述缀合基团包含有N-乙酰化的半乳糖胺结构,

优选地,缀合基团包含有1-3个N-乙酰化的半乳糖胺配体的GalLNac簇。

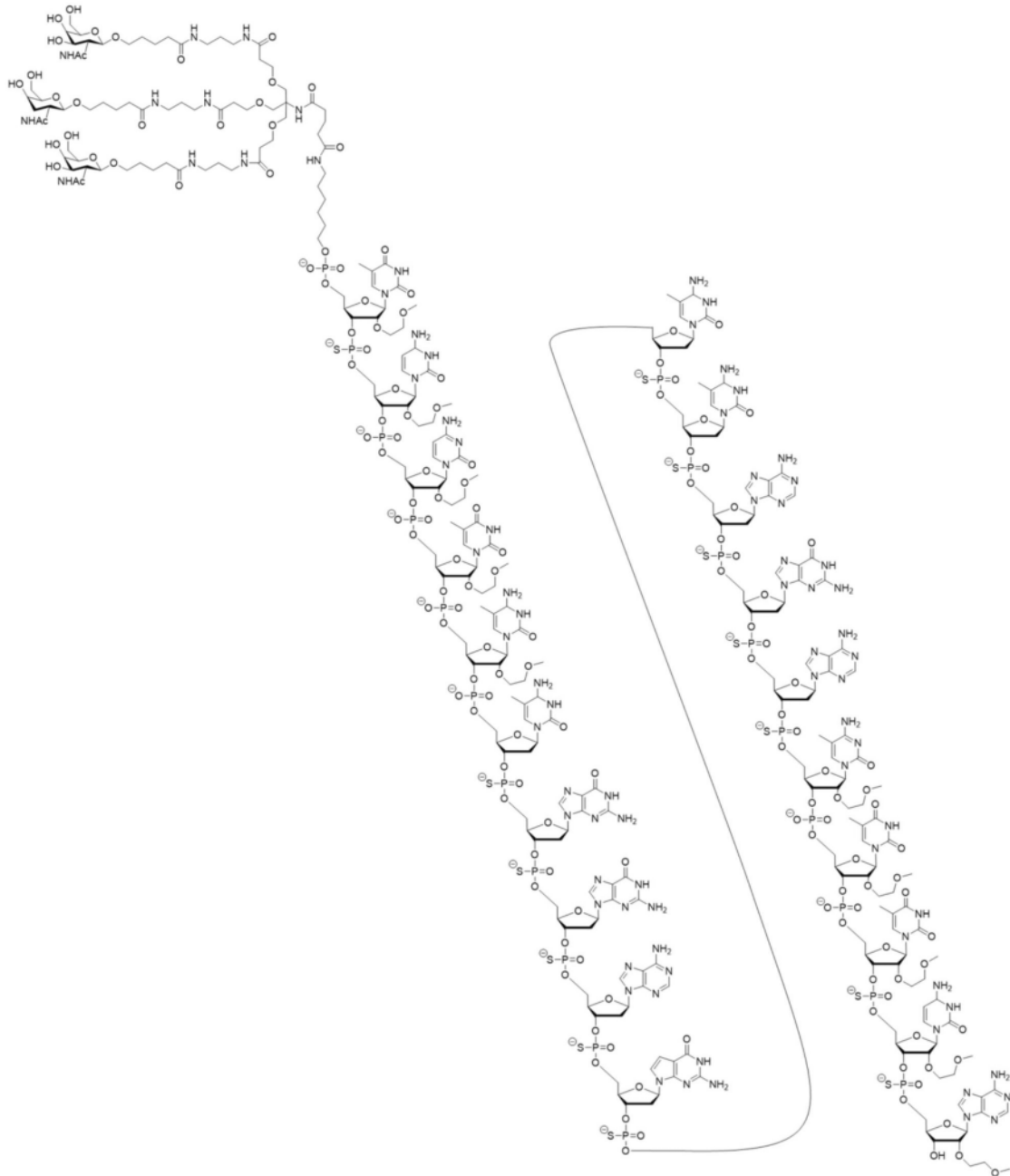
8.根据权利要求7所述的寡核苷酸,其中,所述寡核苷酸的5'末端连接有缀合基团,所述缀合基团包含有3个N-乙酰化的半乳糖胺配体的GalLNac簇。

9.根据权利要求8所述的寡核苷酸,其中,其中所述缀合基团的结构式如下式所示:



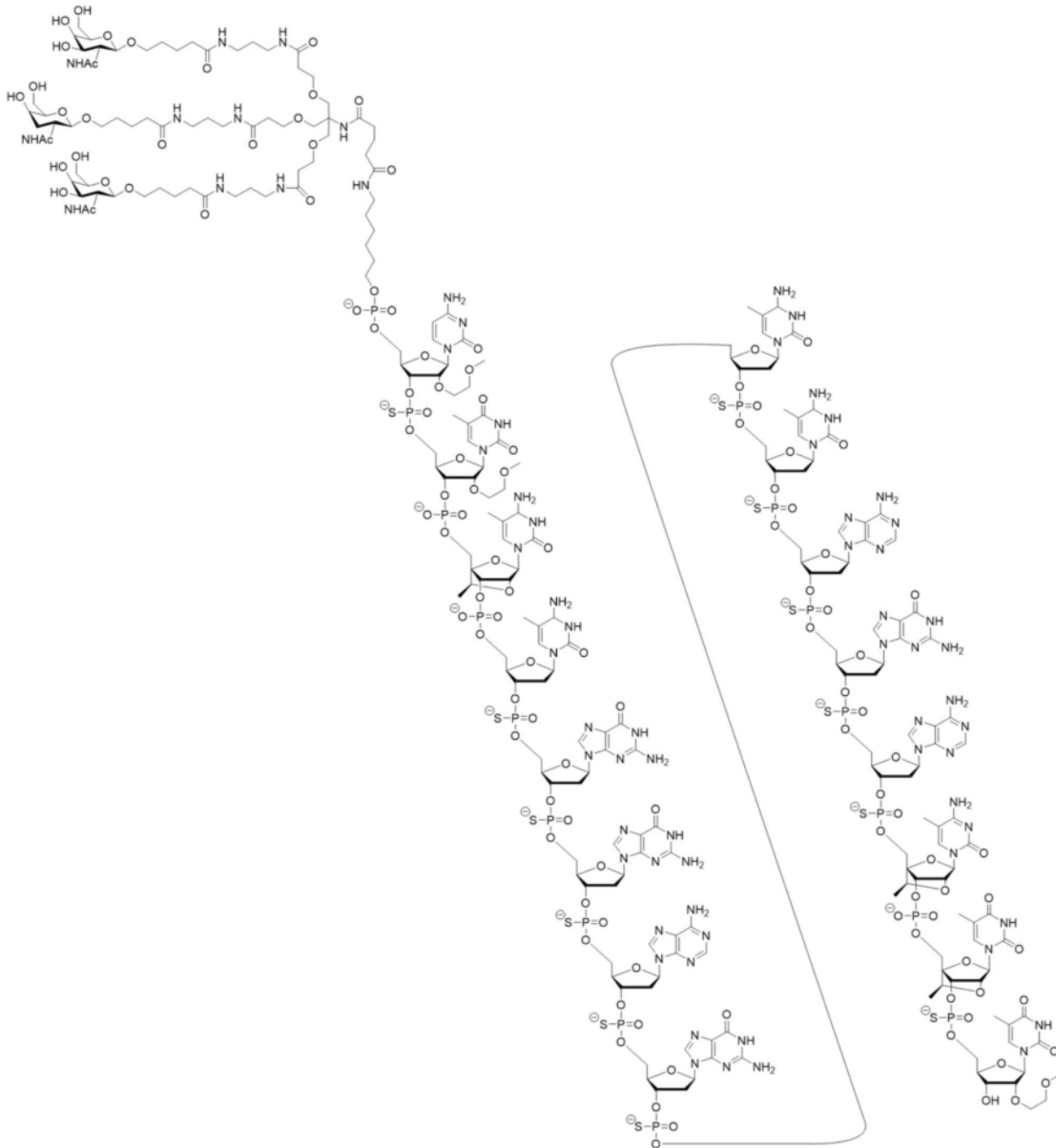
其中,连接点为5'末端核苷的5'-羟基的5'氧原子。

10. 根据权利要求1-9所述的寡核苷酸, 包括其酸式结构或其药学上可以接受的盐, 所述的寡核苷酸选自式 (II)、式 (III)、式 (IV)、式 (V) 和式 (VI) 中任意一种,



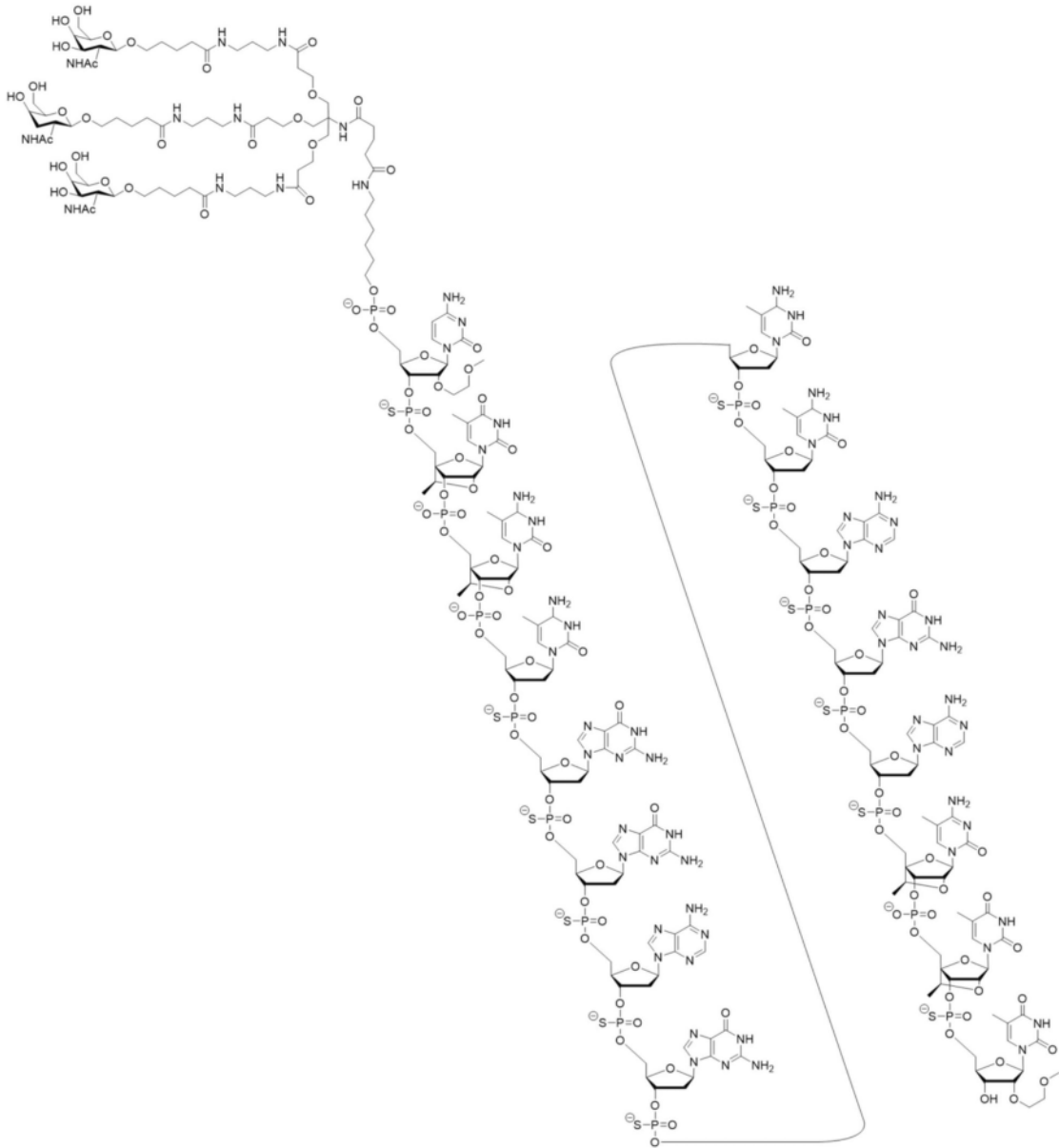
CT102-6-Z

式(II)



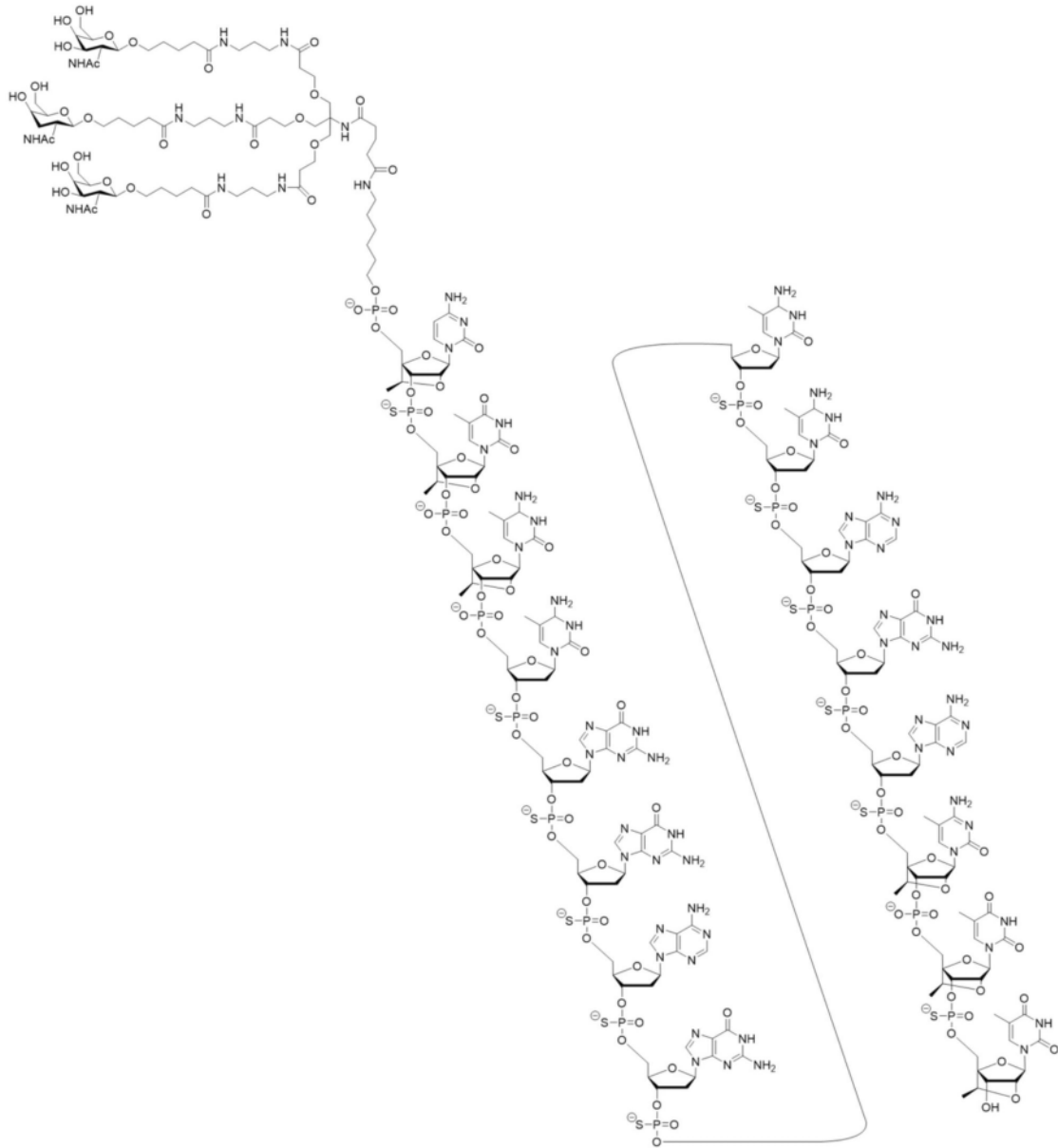
CT102-7-Z

式(III)

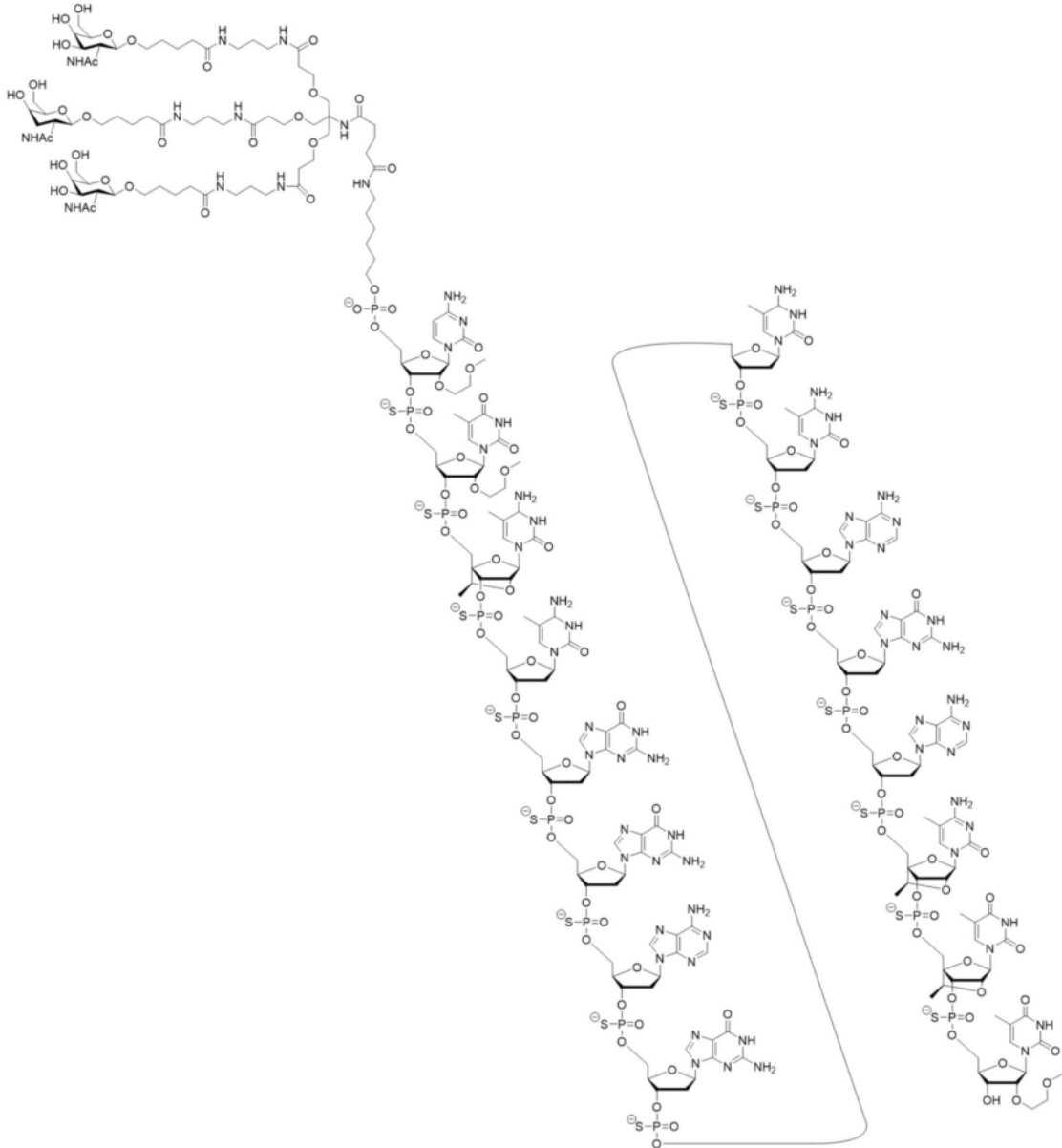


CT102-8-Z

式(IV)



式(V)



CT102-10-Z

式(VI)。

11. 一种药物组合物,其包括前述权利要求1-10任一项所述修饰的寡核苷酸、其酸式结构或其药学上可以接受的盐和药学上可接受的载体,

优选地,所述盐为钠盐或钾盐,优选为钠盐。

12. 根据权利要求11所述的组合物,在制备用于治疗的药物中的应用。

13. 根据权利要求1-10任一项所述寡核苷酸、权利要求11或12所述组合物在制备和IGF-1R基因的过度表达相关疾病治疗的药物中的应用。

14. 根据权利要求1-10任一项所述寡核苷酸、权利要求11或12所述组合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

15. 根据权利要求14所述的应用,其中,所述肿瘤选自肝癌、肺癌、肾癌、胰腺癌、胆管癌、脑癌、消化道肿瘤、血液肿瘤。



## 一种修饰的寡核苷酸及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及核酸修饰技术领域,具体地说,涉及一种采用多种化学方式修饰的寡核苷酸及其应用。

### 背景技术

[0002] 核酸药物可以主要分为小核酸药物和mRNA两大类,小核酸药物,即寡核苷酸药物(oligonucleotides drug,OND),包括反义核酸(antisense nucleotides,ASO)、小干扰核酸(small interfering,siRNA)、微小RNA(miRNA)、核酸适配体(Aptamer)及其他。mRNA产品可分为mRNA疫苗和mRNA药物。

[0003] 寡核苷酸(Oligonucleotides,ONs),是一类短的DNA或RNA分子、寡聚体,寡核苷酸很容易以序列特异性的方式与它们各自的互补寡核苷酸、DNA或RNA结合,形成双链体,或者更不常见的是更高阶的杂合体。这种基本特性是使寡核苷酸用于在基因检测、研究和医药学中具有广泛的应用。这些小片段的核酸可以制造为具有任何用户指定序列的单链分子,在自然界中,寡核苷酸通常是在基因表达调节中起作用的小RNA分子(例如microRNA),或者是源自较大核酸分子分解的降解中间体。

[0004] 反义寡核苷酸(Antisense Oligonucleotides,ASOs)是一段由15-25个核苷酸组成的,可以和特定的靶基因通过序列配对结合的,单链DNA或RNA序列;它通过特异性阻断靶基因的转录或者翻译过程,达到基因调控的目的。反义寡核苷酸因具备高度特异性、高效性和安全低毒等优势,在基因治疗等领域展现出了广阔的应用前景。

[0005] 天然的具有磷酸二酯键连接的寡核苷酸(oligonucleotides with phosphodiester backbone,)作为反义药物能序列特异性地与互补的RNA链结合,杂交后能够诱导RNase H(Ribonuclease H)裂解靶RNA,但在生理条件下,它们对核酸酶特别敏感,未经结构改造的天然的、未经修饰的寡核苷酸药物(oligonucleotides drug,OND),在体内容易被核酸酶快速降解,活性较低,成药性较差!而对寡核苷酸结构进行化学修饰是提高其反义活性的一种有效方式。核酸结构包括碱基、磷酸和糖环三部分,由于反义寡核苷酸的稳定性较差,在体内容易被核酸酶降解,因此通过对合成的反义寡核苷酸进行化学修饰,可以有效地抑制目的基因的表达。

[0006] 经过化学修饰改造后的寡核苷酸可以:提高对核酸酶的稳定性、增强和靶标RNA的亲性和、更好地促进细胞内吞和组织靶向,从而提高其活性。已经上市的寡核苷酸药物,都是经过化学修饰的,从1998年第一个核酸药物Fomivirsen(Vitravene)获批上市至今,核酸药物的化学修饰改造技术不断升级。

[0007] 依据寡核苷酸的基本结构:碱基、糖环、磷酸骨架和末端,可以分四个部分进行化学修饰:

[0008] 碱基的修饰:主要分为嘌呤修饰,嘧啶修饰以及碱基替换三种形式。嘌呤修饰包括:N6-甲基腺苷、N1-甲基腺苷、7-甲基鸟苷酸修饰;嘧啶修饰包括:3-甲基尿嘧啶核苷,5-甲基尿嘧啶核苷,5-甲基胞嘧啶核苷,N4-乙酰胞苷,假尿苷,硫尿核苷,丙炔尿嘧啶核苷,二

氢尿嘧啶核苷等修饰;碱基替换包括4,6-二氟苯并咪唑核糖核苷、2,4-二氟苯基核糖核苷,2,4-二氯苯基核糖核苷等修饰。

[0009] 糖环的修饰:主要分为糖环的修饰和替换。糖环的修饰,包括2'-修饰(2'-OMe,2'-F,2'-MOE,),4'-修饰(4'-S修饰,4'-S-FANA),5'-修饰(5'-OMe);异构修饰包括,锁核酸2'-O-LNA、锁核酸2'-O-CET、硫代核糖、硫代脱氧核糖等,以及这些修饰的组合修饰。2'-修饰中最为常见的是2'-OMe修饰,这种修饰是将糖环2'处的羟基换成甲氧基。相比天然的siRNA,用2'-OMe修饰后的siRNA具有更高的T<sub>m</sub>值,更强的血清稳定性和更好的活性,锁核酸LNA能够提高引物与靶标分子的稳定性,增加引物的熔解温度(T<sub>m</sub>值);糖环的替换,用吗啉环替换五碳糖环。

[0010] 磷酸骨架的修饰:由于体内核酸酶对寡核苷酸的磷酸二酯键的水解是其在体内迅速降解的主要原因,因此选择其它合适的类似物来取代磷酸二酯键骨架,以增加稳定性,主要的修饰方式有:硫代磷酸酯的修饰,是以一个硫原子取代磷酸二酯键连接区的非桥氧原子而得;经甲基磷酸酯、硒代磷酸酯、甲硼基磷酸酯、双硫代磷酸酯,以及用S原子取代磷酸二酯键连接区的桥氧原子修饰;将核苷之间的磷酸酯基整个替换为不含磷原子的基团,如将P原子替换成C、S以及N原子,形成胍基、S-甲基硫脲等。

[0011] 末端修饰:在寡核苷酸链的5'端或3'端的末端,首选5'末端,共价缀合/偶联特殊的基团,可以增加和细胞的亲和性,可以增加和组织的选择性,可以增强细胞的靶向性。末端修饰脂溶性小分子以提高其与细胞膜的相似相溶而提高入胞效率,用于修饰的脂质分子包括烷基链、胆固醇、生育酚等;去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)是肝细胞特异性表达的一种内吞型受体,近年来利用ASGPR的高亲和性配体N-乙酰半乳糖胺(N-acetylgalactosamine, GalNAc)作为靶向分子,实现寡核苷酸药物(siRNA, ASO, microRNA)的肝靶向递送,2019年Alnylam公司采用GalNAc技术修饰的siRNA药物获得FDA批准上市用于急性肝卟啉症治疗。

[0012] Gapmer修饰:gapmer是一种嵌合反义寡核苷酸,它包含一个中心块的脱氧核苷酸单体,其长度足以诱导RNase H切割。一般的gapmer设计包括一个5'-翼,然后是8到12个脱氧核苷酸单体的间隙,这些单体可以是天然核酸或在磷基(PS键)中含有硫离子,然后是3'-翼,这是一种RNA-DNA-RNA样配置片段。

[0013] 正是有了上述修饰技术的进步,核酸药物开发得到了较快的发展,迄今为止,全球已有16个核酸药物获批上市:

[0014] 表1获批上市的核酸药物

序号	通用名(商品名)	公司	核酸药物分类	适应症	批准日期
1	Fomivirsen(Vitravene)	"Ionis/ Novartis" Novartis	反义寡核苷酸	巨细胞病毒(CMV)视网膜炎	1998-08-01
2	Pegaptanib(Macugen)	NeXstar /Eyetechn	核酸适配体	新生血管性年龄相关性黄斑变性	2004-12-01
3	Mipomersen(Kynamro)	Ionis/Genzyme/Kastle	反义寡核苷酸	纯合子家族性高胆固醇血症	2013-01-01
4	Defibrotide(Defitelio)	Jazz	寡核苷酸混合物	肝静脉闭塞病	2016-03-01
5	Eteplirsen(Exondys 51)	Sarepta	反义寡核苷酸	杜氏肌营养不良症	2016-09-01
[0015]	Nusinersen (Spinraza)	Ionis/Biogen	反义寡核苷酸	脊髓性肌萎缩症	2016-12-01
7	Patisiran (Onpattro)	Alnylam	siRNA	遗传性甲状腺素转运蛋白淀粉样变性, 多发性神经病	2018-08-01
8	Inotersen (Tegsedi)	Ionis/Akcea	反义寡核苷酸	遗传性甲状腺素转运蛋白淀粉样变性, 多发性神经病	2018-10-01
9	Volanesorsen (Waylivra)	Ionis	反义寡核苷酸	家族性乳糜微粒血症综合征(FCS)	2019-05-03
10	Givosiran (Givlaari)	Alnylam	siRNA	肝卟啉症	2019-11-01
11	Golodirsen (Vyondys 53)	Sarepta	反义寡核苷酸	杜氏肌营养不良症	2019-12-01
12	viltolarsen(Viltepso)	Nippon Shinyaku	反义寡核苷酸	假肥大性肌营养不良	2020-03-25
13	lumasiran (Oxlumo)	Alnylam Pharmaceuticals,Dicerna Pharmaceuticals(Novo Nordisk)	siRNA	高草酸尿症	2020-11-24
14	casimersen (Amondys 45)	Sarepta Therapeutics, University of Western Australia,	反义寡核苷酸	假肥大性肌营养不良	2021-02-25
[0016]	inclisiran (Leqvio)	Alnylam Pharmaceuticals,The Medicines Company(Novartis)	siRNA	动脉粥样硬化,高胆固醇血症,混合型高脂血症	2021-12-22
16	Amvuttra(vutrisiran)	Alnylam	siRNA	淀粉样变性多发性神经病变	2022-06-13

[0017] 随着核酸药品的上市,安全性问题,受到的更大范围的考验,早期上市的两个药物,均在上市的后第七年,在美国退出市场,不再销售。

[0018] 目前,人们对反义寡核苷酸在血清中的降解过程和机制缺乏足够的认识,依靠经验随机地利用修饰核苷酸取代反义寡核苷酸分子中的多个核苷酸,有时能很好地提高反义寡核苷酸分子的血清稳定性。但是,反义寡核苷酸分子的血清稳定性、生物学活性和细胞毒性之间并不存在着直接的关系。

[0019] 为了提高反义寡核苷酸对核酶的稳定性,提高反义寡核苷酸的半衰期时间,需要通过化学手段来修饰和改善反义寡核苷酸的化学结构,但是任何的修饰,在提高半衰期的同时,一定会降低反义寡核苷酸和靶标RNA的特异性结合,降低和靶标RNA亲和力,并增加细胞毒性。

[0020] 在反义寡核苷酸分子中引入了过量的修饰,可能会增加修饰后的反义寡核苷酸的细胞毒性,并在很多情况下降低了反义寡核苷酸的生物学活性(CN103184222B)。尽管核酸药物的化学修饰技术花样繁多,但是通过修饰来提高反义寡核苷酸分子的血清稳定性和生物学活性,同时降低细胞毒性是很非常矛盾和困难的,同样的序列采用不同的修饰方式、或者同样的修饰方式用于不同的序列、或者多种修饰方式的自由组合,对于药物的安全性的和有效性的影响,无规律可循。

[0021] 虽然迄今为止,许多反义寡核苷酸药物的修饰方法被开发研究,但并没有一种修饰方法能够完美平衡反义寡核苷酸活性,血清稳定性,细胞毒性等各种要求。此外,许多修饰手段也都没有被系统地研究论证。由于许多实验室都是通过一两条反义寡核苷酸的结果就得出结论,所以在真正运用中,序列不同的反义寡核苷酸修饰后表现出来的现象可能会与预期的不一致。正因为这些问题的存在,反义寡核苷酸药物的合理修饰依然是一个经验为主的,需要通过反复实验来验证具体反义寡核苷酸序列的过程。

[0022] 胰岛素样生长因子1受体(Insulin-like growth factor 1receptor,IGF-1R),是在人细胞表面发现的蛋白质,它是一种跨膜受体,IGF-1R的基因定位于染色体15q25-26,IGF-1R是由 $\alpha$ 、 $\beta$ 两个亚单位组成的具有四聚体结构的跨膜酪氨酸激酶蛋白,细胞外的 $\alpha$ 亚基(130kDa)通过二硫键结合IGF-1R配体(IGF-1、IGF-2)导致磷酸化;而细胞内的 $\beta$ 亚基(97kDa)通过自身酪氨酸残基的磷酸化传递下游信号。

[0023] 它介导胰岛素样生长因子1(IGF-1)和绝大部分胰岛素样生长因子2(IGF-2)的生物学活性,目前主要认为IGF-1R有以下功能:(1)促进细胞分裂、增殖;(2)诱导与维持细胞表型的转化和肿瘤发生;(3)抗细胞凋亡。

[0024] IGF-1R表达于各型细胞的表面,且具有酪氨酸酶活性,当IGF-1与IGF-1R结合后,IGF-1R的酪氨酸酶活性增强,胰岛素系统被激活,从而促进细胞的有丝分裂,发挥抗凋亡作用,正常细胞即出现恶性转化。IGF-1R介导的第1条下游信号通路即为磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路,能够促进细胞分裂、增殖,细胞周期控制及抑制细胞凋亡;第2条即为丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)信号通路,主要诱导细胞分化。同时,细胞外基质的破坏是肿瘤发生侵袭及远处转移的关键步骤,基质金属蛋白酶类是参与破坏细胞外基质的重要蛋白水解酶,用IGF-1R抑制剂作用于肝癌细胞发现,能下调部分基质金属蛋白酶的表达,阻止肝癌细胞的转移。IGF-1R在肝癌、肺癌、脑癌、肾癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌及鼻咽癌等多种恶性肿瘤中均有明显高表达,IGF-1R及其信号通路与恶性肿瘤的生长、浸润、转移等密切相关,反义寡核苷酸CT102正是可以抑制IGF-1R的基因表达,用于抗肿瘤的治疗

[0025] 在中国专利CN114246829A中公开了一种的抗肝癌的反义寡核苷酸CT102,其中提到:CT102给药浓度及给药频次较高(小鼠水平给药为10mg/kg,隔日给药,累计给药10次尾静脉注射),所以其对CT102序列5'-UCCUCCGGAGCCAGACUUCA-3'(SEQ ID NO.1)进行了化学修饰,其采用了多种的修饰方式:胞嘧啶和尿嘧啶进行了甲基化修饰、采用硫代磷酸酯修饰

磷酸骨架、采用2'-O-MOE修饰核糖结构,即使采用了这么多的修饰方式,但修饰后的结构缺少组织靶向性,仍然需要制成靶向的脂质纳米粒制剂,进行给药,来降低给药剂量,提高肝脏组织的靶向性。我们在详细研究CT102的化学修饰的研究中发现,发现现有的公开报道的修饰方案,所产生的效果仍存在着很多的不足,如何通过化学修饰方式来提高CT102对于肝脏组织的靶向性,提高药效,降低细胞毒性;从而达到降低给药剂量,使得药物更安全可靠,仍然是一个需要探索的课题。

## 发明内容

[0026] 本公开的目的是通过对反义寡核苷酸CT102的序列5'-UCCUCCGAGCCAGACUUCA-3' (SEQ ID NO.1) 进行化学修饰,来提高反义寡核苷酸分子的生物学活性,同时降低细胞毒性,从而提供一种,更加安全、更有效的寡核苷酸及其应用。

[0027] 发明人在筛选和调整CT102的化学修饰时发现,不同的修饰方式对CT102的活性及细胞毒性,会产生比较大的影响,新的修饰技术层出不穷、不断翻新,可采用的修饰手段纷繁复杂,不同修饰方式的组合会对药物活性及毒性产生比较大的影响,并且无通用的法则可以遵循,发明人通过大量的试验,筛选出更适合CT102序列的组合修饰方式,所形成的化合物有更高的生物学活性和更低细胞毒性,本发明是通过以下方式实现的:

[0028] 本公开提供一种修饰的寡核苷酸、其酸式结构或其药学上可以接受的盐,所述的寡核苷酸包含式(I)所示核苷酸序列的至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或20个连续核苷酸;其中式(I)所示的寡核苷酸序列为:

[0029]  $5' - {}^m\text{U}_{(X)} \text{C}_{(X)} {}^{m/n}\text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{CGGAG}^m\text{C}^m\text{CAGA}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} \text{C}_{(X)} \text{A}_{(X)} - 3'$  式(I)

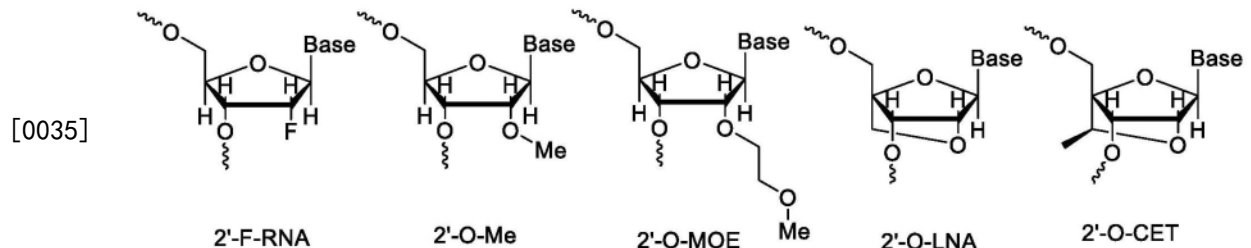
[0030] 其中,

[0031]  ${}^m\text{U}$ 为,5甲基尿嘧啶修饰,

[0032]  ${}^m\text{C}$ 为,5甲基胞嘧啶修饰,

[0033]  ${}^{m/n}\text{C}$ 为,5甲基胞嘧啶修饰,或没有修饰的胞嘧啶,

[0034] (X)为,2'位化学修饰的核糖,其中化学修饰的核糖选自下式所示的2'-F-RNA、2'-O-Me、2'-O-MOE、2'-O-LNA和2'-O-CET中的任意一种或者两种以上的组合,



[0036] 所示序列中核苷酸单体之间连接的3',5'-磷酸二酯键,有硫代修饰。

[0037] 在一些实施方案中,所述的寡核苷酸为:

[0038]  $5' - {}^m\text{U}_{(X)} \text{C}_{(X)} \text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{CGGAG}^m\text{C}^m\text{CAGA}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} \text{C}_{(X)} \text{A}_{(X)} - 3'$ , 或  $5' - {}^{m/n}\text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{CGGAG}^m\text{C}^m\text{CAGA}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} - 3'$ ; 或与该序列80%以上的核苷酸同一性的核苷酸序列, 其中,

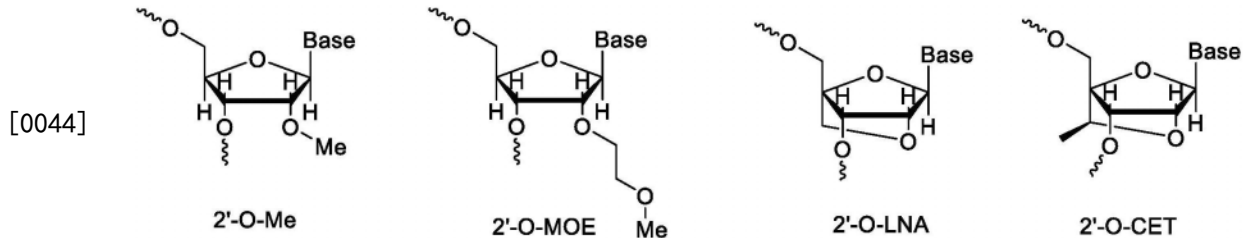
[0039]  ${}^m\text{U}$ 为,5甲基尿嘧啶修饰

[0040]  ${}^m\text{C}$ 为,5甲基胞嘧啶修饰

[0041]  ${}^{m/n}\text{C}$ 为,5甲基胞嘧啶修饰,或没有修饰的胞嘧啶

[0042] (X)为,2'位化学修饰的核糖,所述修饰的寡核苷酸中2'位化学修饰的核糖选自2'-O-Me、2'-O-MOE、2'-O-LNA和2'-O-CET中的任意一种或者两种以上的组合,

[0043] 所示序列的正中间区域的10个核苷酸的核糖为脱氧核糖;



[0045] 所示序列中核苷酸单体之间连接的3',5'-磷酸二酯键,为部分硫代修饰。

[0046] 在一些实施方案中,所述的寡核苷酸为:

[0047]  $5' - {}^m\text{U}_{(X)} \text{C}_{(X)} \text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{CGGAG} {}^m\text{C} {}^m\text{CAGA} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} \text{C}_{(X)} \text{A}_{(X)} - 3'$ , 或  $5' - \text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{CGGAG} {}^m\text{C} {}^m\text{CAGA} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} - 3'$ ; 或与该序列80%以上的核苷酸同一性的核苷酸序列, 其中,

[0048]  ${}^m\text{U}$ 为,5甲基尿嘧啶修饰,

[0049]  ${}^m\text{C}$ 为,5甲基胞嘧啶修饰;

[0050] (X)为,2'位化学修饰的核糖,所述的2'位化学修饰的核糖选自2'-O-Me或2'-O-MOE,和选自2'-O-LNA或2'-O-CET的组合。

[0051] 在一些实施方案中,所述的寡核苷酸为:

[0052]  $5' - \text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{CGGAG} {}^m\text{C} {}^m\text{CAGA} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} - 3'$ ; 或与该序列80%以上的核苷酸同一性的核苷酸序列, 其中,

[0053]  ${}^m\text{U}$ 为,5甲基尿嘧啶修饰,

[0054]  ${}^m\text{C}$ 为,5甲基胞嘧啶修饰;

[0055] (X)为,2'位化学修饰的核糖,所述的2'位化学修饰的核糖为2'-O-MOE和2'-O-CET的组合,

[0056] 优选地,2'-O-CET修饰的数量不少于3个,其他的为2'-O-MOE修饰。

[0057] 在一些实施方案中,前述的寡核苷酸,其中,所示序列中核苷酸单体之间连接的3',5'-磷酸二酯键,有硫代修饰,并形成3',5'-硫代磷酸二酯键,所修饰的数量为11-17个,优选的为12-15个。

[0058] 在一些实施方案中,所述的寡核苷酸,其中,所示序列中核苷酸单体之间的连接,有12或13个是通过3',5'-硫代磷酸二酯键连接:

[0059] 当序列为  $5' - {}^m\text{U}_{(X)} \text{C}_{(X)} \text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{CGGAG} {}^m\text{C} {}^m\text{CAGA} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} \text{C}_{(X)} \text{A}_{(X)} - 3'$  时,核苷酸间的连接方式为soooooSSSSSSSSsooss,其中“s”代表硫代磷酸酯核苷连接,“o”代表磷酸二酯核苷连接;

[0060] 当序列为  $5' - \text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{CGGAG} {}^m\text{C} {}^m\text{CAGA} {}^m\text{C}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} {}^m\text{U}_{(X)} - 3'$  时,核苷酸间的连接方式为sooSSSSSSSSSSos,其中“s”代表硫代磷酸酯核苷连接,“o”代表磷酸二酯核苷连接。

[0061] 在一些实施方案中,所述的寡核苷酸,其包含前述的寡核苷酸、其酸式结构或其药学上可以接受的盐,优选地,所述盐为钠盐或钾盐,优选为钠盐

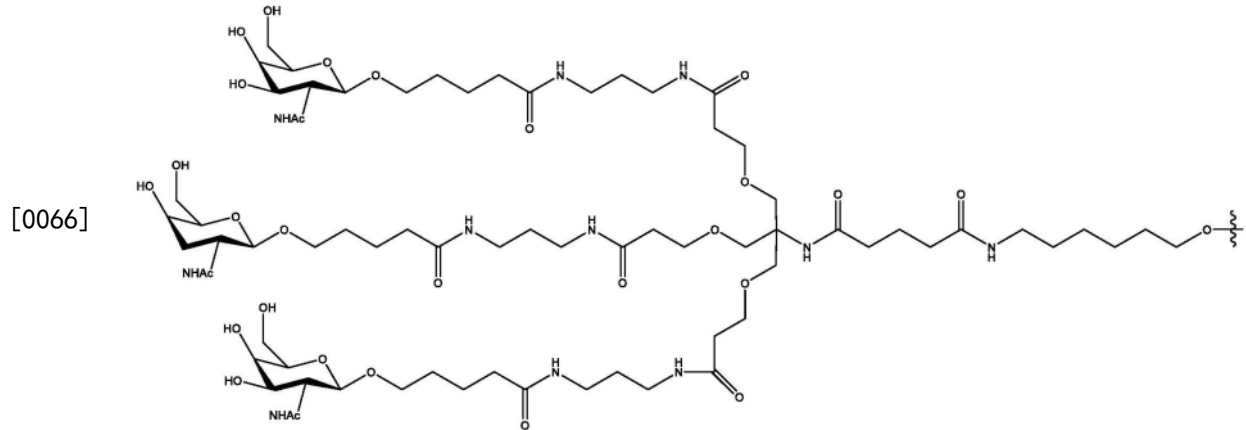
[0062] 在一些实施方案中,所述的寡核苷酸是一种含有缀合基团的寡核苷酸,其包含前

述权利要求所述的寡核苷酸、其酸式结构或其在药学上可以接受的盐,其中,所述寡核苷酸的5'末端或3'末端连接有缀合基团,所述缀合基团包含有N-乙酰化的半乳糖胺结构,

[0063] 优选地,缀合基团包含有1-3个N-乙酰化的半乳糖胺配体的GalNAc簇。

[0064] 在一些实施方案中,所述的寡核苷酸,其中,所述寡核苷酸的5'末端连接有缀合基团,所述缀合基团包含有3个N-乙酰化的半乳糖胺配体的GalNAc簇。

[0065] 在一些实施方案中,所述的寡核苷酸,其中,所述缀合物基团的结构式如下式所示:

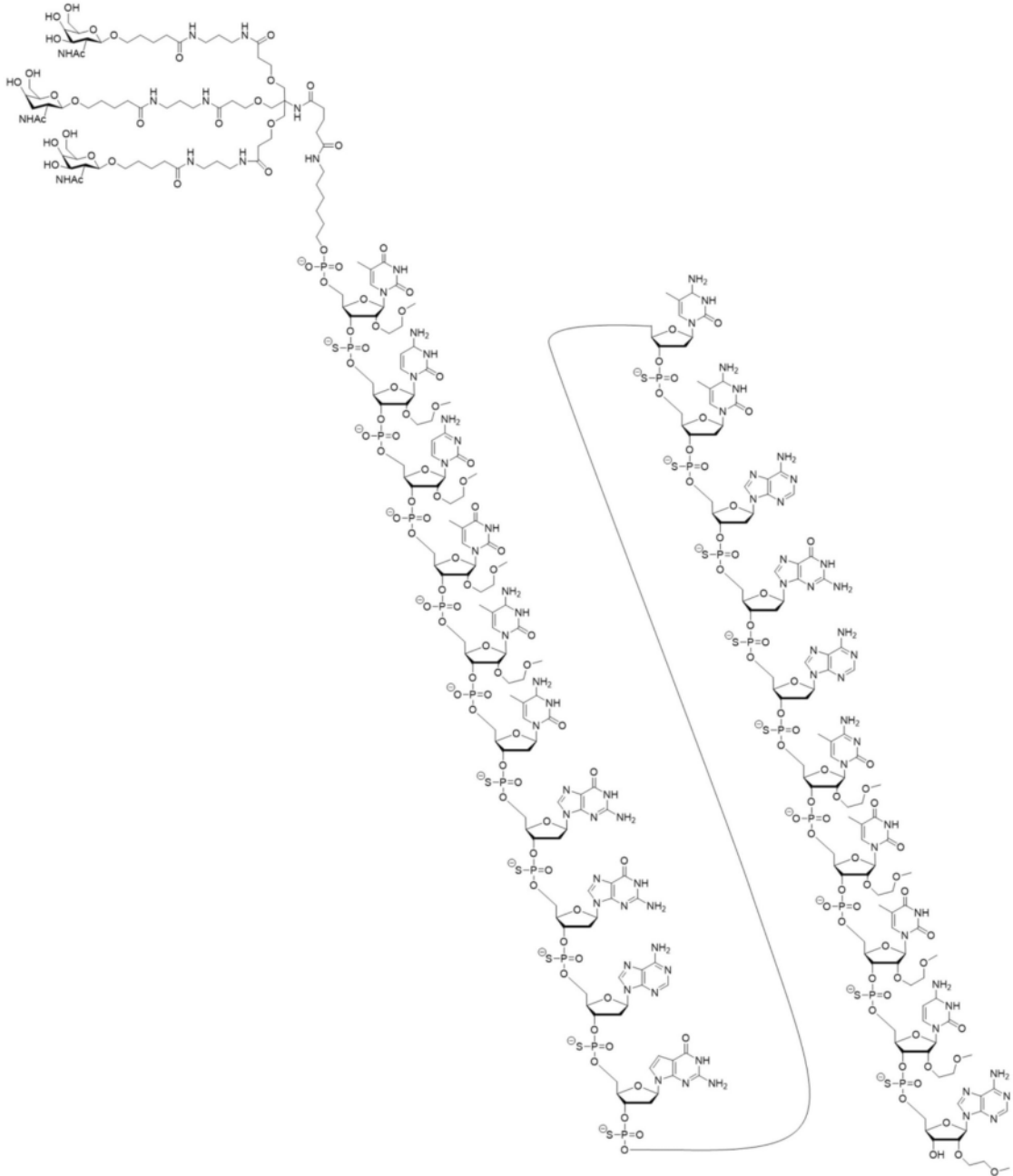


[0067] 其中,连接点为5'末端核苷的5'-羟基的5'氧原子。

[0068] 在一些实施方案中,所述的寡核苷酸,为本说明书中具体实施方案中的CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102-6、CT102-7、CT102-8、CT102-9或CT102-10

[0069] 在一些实施方案中,所述的寡核苷酸,为说明书中具体实施方案中的CT102-1-Z、CT102-2-Z、CT102-4-Z、CT102-5-Z、CT102-6-Z、CT102-7-Z、CT102-8-Z、CT102-9-Z或CT102-10-Z;

[0070] 在一种实施方案中,所述的寡核苷酸,包括其酸式结构或其在药学上可以接受的盐,所述的寡核苷酸选自式(II)、式(III)、式(IV)、式(式V)和式(VI)中任意一种,

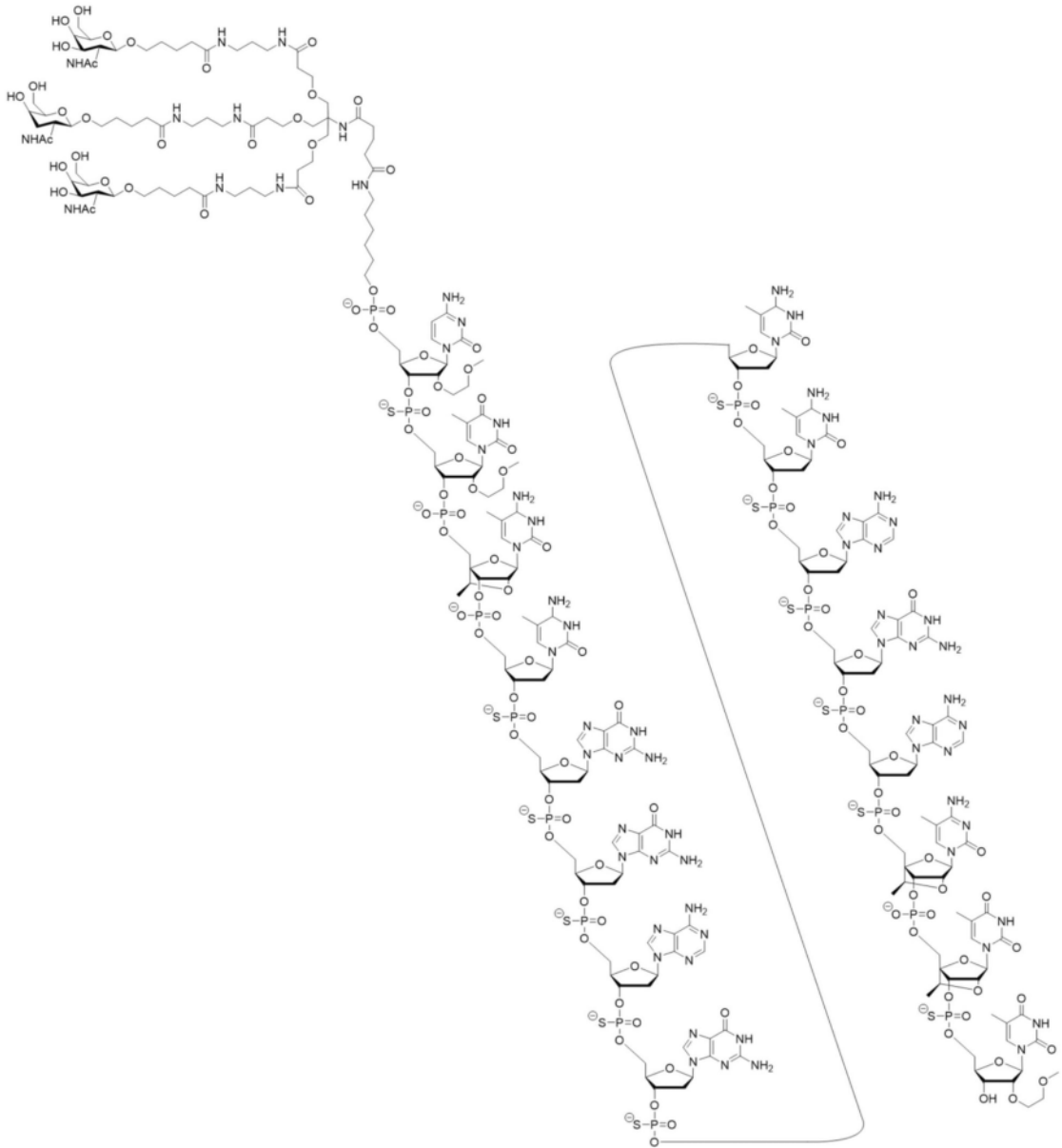


[0071]

CT102-6-Z

式(II)

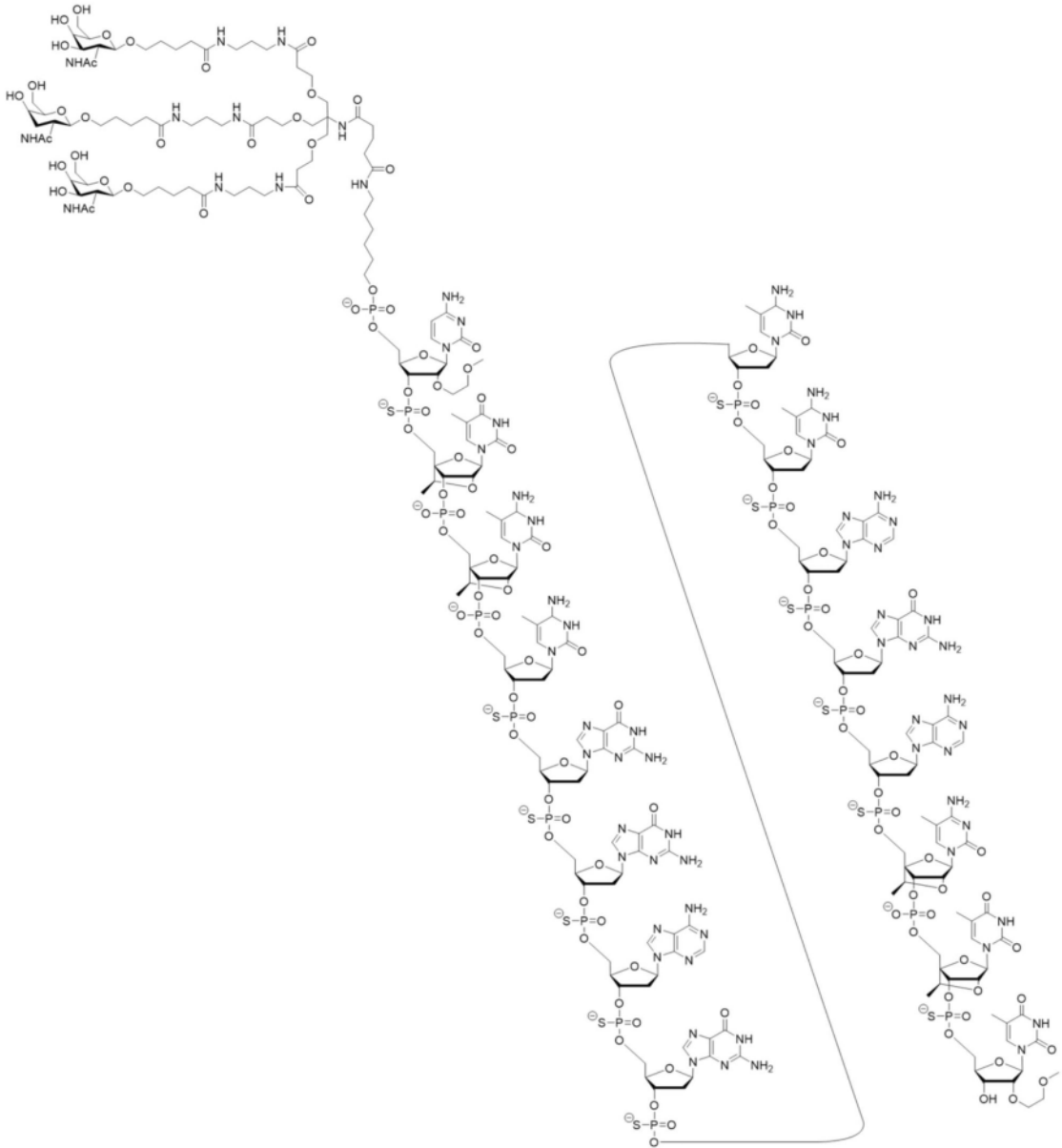




[0072]

CT102-7-Z

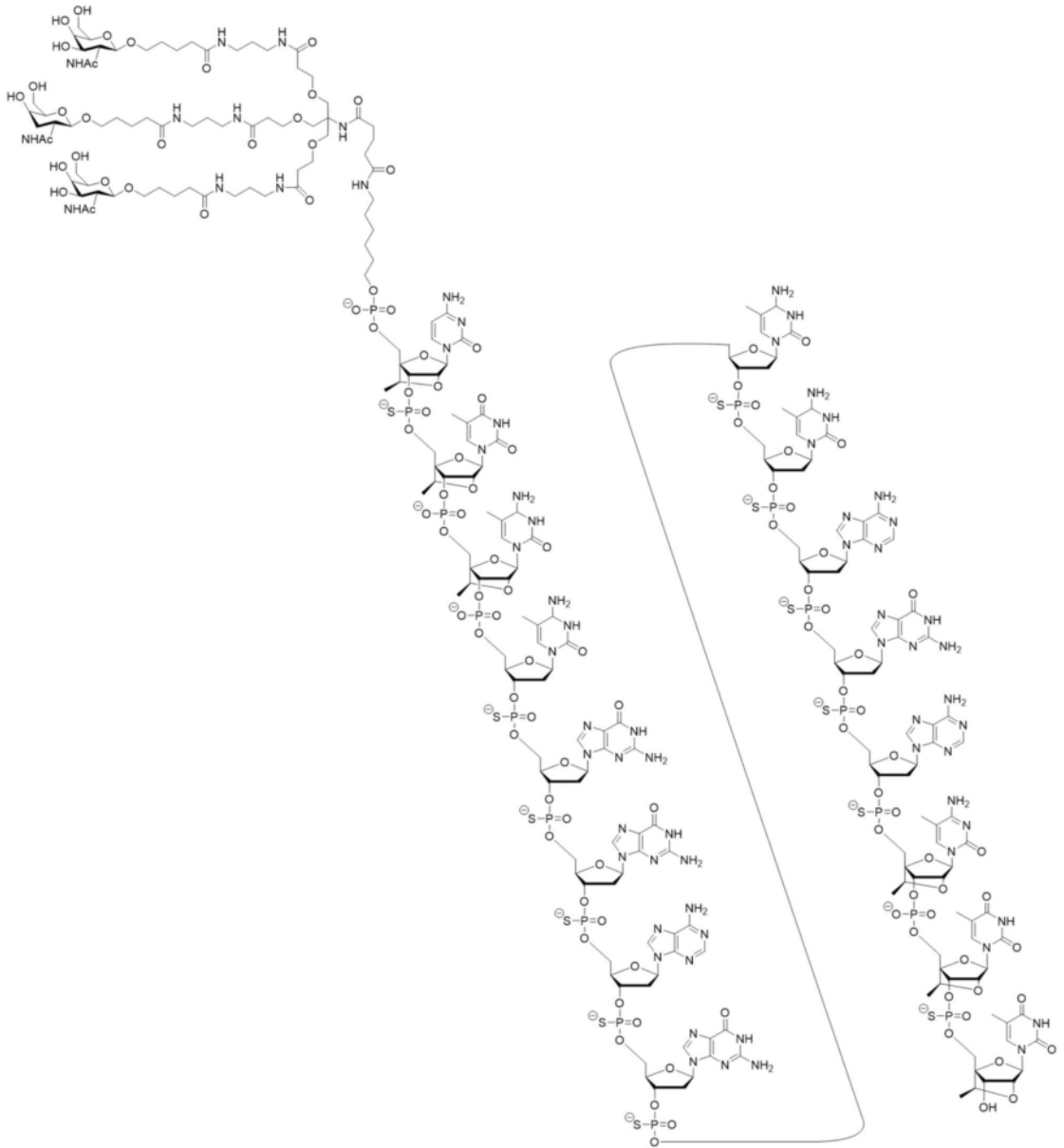
式(III)



[0073]

CT102-8-Z

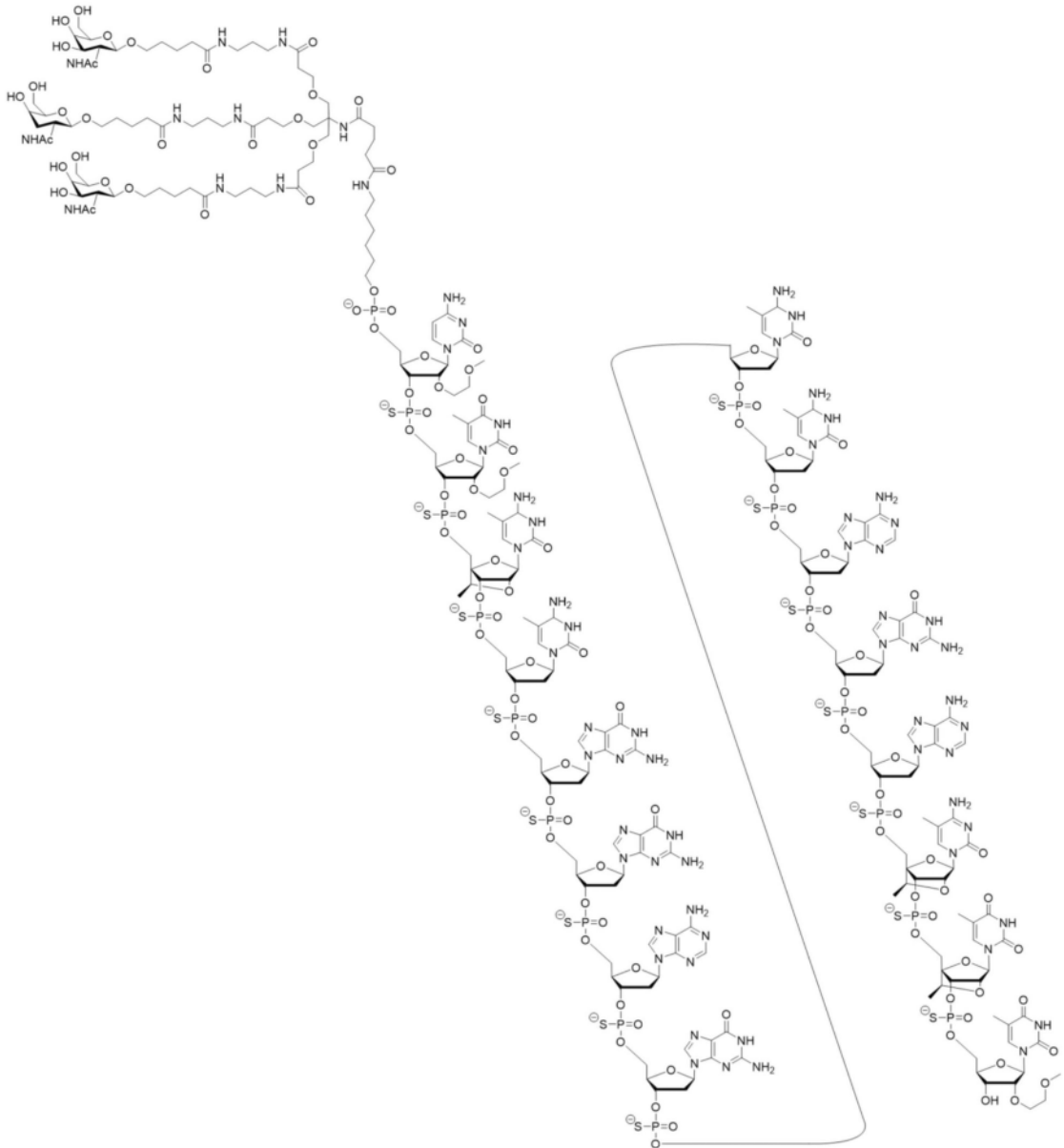
[0074] 式(IV)



[0075]

CT102-9-Z

式(V)



[0076]

CT102-10-Z

式(VI)

[0077] 在一种实施方案中,所述寡核苷酸的盐,为上述结构式中的钠盐或钾盐,优选为钠盐。

[0078] 本公开还提供一种药物组合物,其包括前述所要求的任一项所述修饰的寡核苷酸、其酸式结构或其在药学上可以接受的盐和药学上可接受的载体;

[0079] 优选地,所述盐为钠盐或钾盐,优选为钠盐。

[0080] 本公开的组合物可用于治疗或预防多种疾病或病症,特别是和IGF-1R基因的过度表达相关疾病的治疗,或者其他和类似此类基因沉默相关的疾病,如Graves眼病(Graves' ophthalmopathy, GO)等。

[0081] 在一种实施方案中,本公开的组合物可用于对与IGF-1R基因的表达相关的肿瘤的治疗,例如:实体肿瘤、血液肿瘤。

[0082] 在一种实施方案中,本公开的组合物可用于对实体肿瘤的治疗,例如,对于肝癌、

肺癌、脑癌、肾癌、胰腺癌、胆管癌、脑部肿瘤、前列腺癌、消化道肿瘤、血液肿瘤、结肠癌、乳腺癌及鼻咽癌等多种恶性肿瘤的治疗

[0083] 在一种实施方案中,本公开的组合物可用于对,肝癌、肺癌、肾癌、胰腺癌、胆管癌、脑癌、消化道肿瘤、血液肿瘤,特别是肝癌的治疗。

### 附图说明

[0084] 为了更清楚地说明本公开实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中需要使用的附图作简单介绍,显而易见,下面描述中的附图仅仅是本公开的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0085] 图1显示对CT102寡核苷酸序列采取不同化学修饰方式,形成7种不同化学结构的修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>)对人肝癌细胞(HepG2)的表达抑制率-体外活性。

[0086] 图2显示对CT102寡核苷酸序列采取不同化学修饰方式,形成7种不同化学结构的修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>)对人正常肝细胞(L-02)的细胞存活率-细胞毒性。

[0087] 图3显示对CT102寡核苷酸序列采取不同化学修饰方式,形成7种不同化学结构的修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>)对人正常肺上皮细胞BEAS-2B的细胞存活率-细胞毒性。

[0088] 图4显示对CT102寡核苷酸序列,采取不同方式化学修饰,并共价偶联包含有N-乙酰化的半乳糖胺GalNAc缀合基团的结构后,形成12种不同化学结构的修饰寡核苷酸(CT102-1-Z、CT102-2-Z、CT102-4-Z、CT102-5-Z、CT102-6-Z、CT102-7-Z、CT102-8-Z、CT102-9-Z、CT102-10-Z、CT102-7-D、CT102-9-D、CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z),对人肝癌裸鼠原位移植瘤的小鼠体重影响-体内安全性。

[0089] 图5显示对CT102寡核苷酸序列,采取不同方式化学修饰,并共价偶联包含有N-乙酰化的半乳糖胺GalNAc缀合基团的结构后,形成12种不同化学结构的修饰寡核苷酸(CT102-1-Z、CT102-2-Z、CT102-4-Z、CT102-5-Z、CT102-6-Z、CT102-7-Z、CT102-8-Z、CT102-9-Z、CT102-10-Z、CT102-7-D、CT102-9-D、CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z),对人肝癌裸鼠原位移植瘤的瘤重影响-抑瘤率。

[0090] 图6显示对CT102寡核苷酸序列,采取不同方式化学修饰,并共价偶联包含有N-乙酰化的半乳糖胺GalNAc缀合基团的结构后,形成12种不同化学结构的修饰寡核苷酸(CT102-1-Z、CT102-2-Z、CT102-4-Z、CT102-5-Z、CT102-6-Z、CT102-7-Z、CT102-8-Z、CT102-9-Z、CT102-10-Z、CT102-7-D、CT102-9-D、CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z),对人肝癌原位移植瘤裸鼠的血清甲胎蛋白浓度的影响。

### 具体实施方式

[0091] 本公开提供一种修饰的寡核苷酸,通过对所述寡核苷酸,进行磷酸酯硫代、胞嘧啶甲基化、核糖上2'-O-MOE和2'-O-CET修饰、5'端缀合GalNAc结构等多种化学修饰,来提高寡核苷酸分子的稳定性、对目标基因的亲和力和生物学活性,同时降低细胞毒性,从而提供一

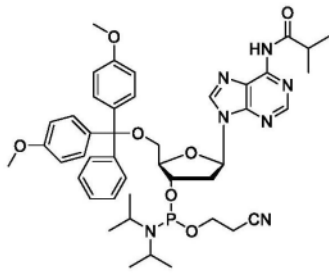
种,更加安全、更有效的寡核苷酸及其应用。

[0092] 以下实施例用于说明本公开,但不用来限制本公开的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

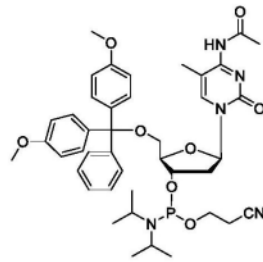
[0093] 实施例1修饰的寡核苷酸的合成

[0094] 1、用到的碱基单体

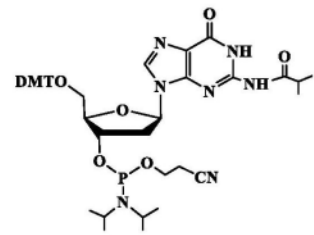
[0095] DMT-dA (ibu) 亚磷酰胺单体 (式1)、DMT-d<sup>m</sup>C (Ac) 亚磷酰胺单体 (式2)、DMT-dG (ibu) 亚磷酰胺单体 (式3) 和 DMT-<sup>m</sup>C-MOE 亚磷酰胺单体 (式4)、DMT-<sup>m</sup>U-MOE 亚磷酰胺单体 (式5)、DMT-C-MOE 亚磷酰胺单体 (式6) 和 DMT-A-MOE 亚磷酰胺单体 (式7),其他的单体 DMT-<sup>m</sup>U-CET 亚磷酰胺单体 (式8)、DMT-C-CET 亚磷酰胺单体 (式9) 和 DMT-<sup>m</sup>C-CET 亚磷酰胺单体 (式10)、DMT-A-CET 亚磷酰胺单体 (式11),依照单体浓度为0.15M,用乙腈分别配制所需要的碱基单体溶液。



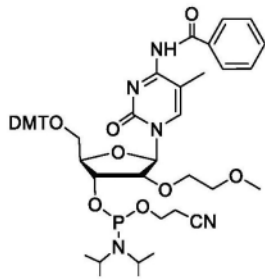
式 1



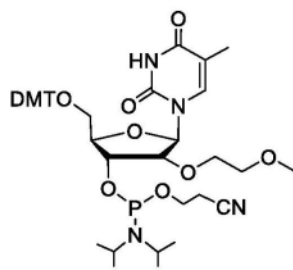
式 2



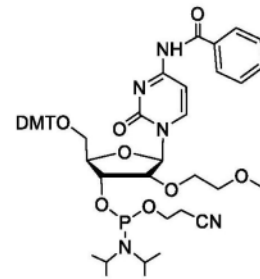
式 3



式 4

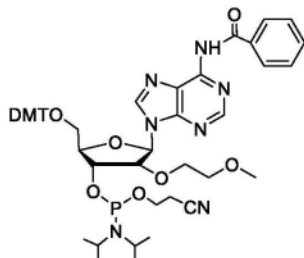


式 5

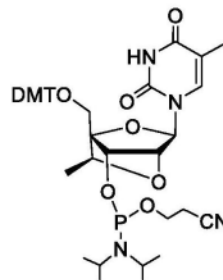


式 6

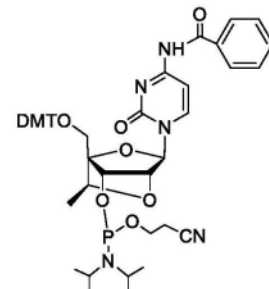
[0096]



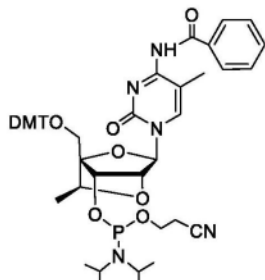
式 7



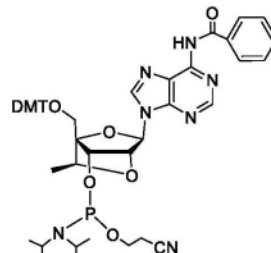
式 8



式 9



式 10



式 11

[0097] 2、仪器:

[0098] 美国GE公司OligoPilot 100合成仪,其固相载体为交联聚苯乙烯珠 (cross-

linked polystyrene bead) 的通用载体, 型号为Primer support 5G Unylinker 350 (cytiva厂家)。

[0099] 3、合成步骤如下:

[0100] 1) 脱保护

[0101] 使用3%的二氯乙酸的甲苯溶液作为脱保护试剂, 脱掉5'-DMT保护基(第一个是先脱去载体上的保护基), 游离出5'-羟基, 之后使用乙腈进行冲洗。

[0102] 2) 偶联

[0103] 使用0.25M的5-乙硫基四氮唑的乙腈溶液作为活化剂, 对碱基单体进行活化, 形成活性中间体, 再与5'-羟基发生缩合反应, 进行偶联, 之后使用乙腈进行冲洗。

[0104] 3) 氧化-硫代

[0105] 使用3%的氢化黄原素的吡啶溶液作为氧化剂, 进行氧化(非硫代的用碘和吡啶溶液, 0.05M的吡啶/水中90:10, 进行氧化), 之后使用乙腈进行冲洗。

[0106] 4) 羟基保护

[0107] 使用10%的乙酸酐四氢呋喃溶液(CAP A) 四氢呋喃/吡啶/N-甲基咪唑74/10/16 (v/v/v) (CAP B) 为羟基保护试剂, 对未发生偶联反应的核苷的5'-羟基进行羟基保护, 之后使用乙腈进行冲洗。

[0108] 重复以上操作1)-4), 按照设定的序列循环进行, 直至序列偶联完成, 得到全保护的产物。

[0109] 5) 使用3%的二氯乙酸的甲苯溶液为脱保护试剂, 脱去最后一个碱基单体的5'-DMT保护基, 之后使用乙腈进行清洗。

[0110] 6) 氨解及纯化

[0111] 将固相载体转移至反应器中, 加入浓氨水(25-28%), 在60°C保持氨解12h, 水解载体与核苷酸之间的酯键, 脱掉磷酸、腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶上的保护基, 将体系降至室温, 并将混合物转移至压滤罐中, 用纯化水与乙醇的混合溶液进行淋洗, 合并滤液, 过反相层析柱, 浓缩, 冻干, 得产品。

[0112] 4、依照上述方法, 分别制得如下表2序列所示的修饰的寡核苷酸

[0113] 表2中, CT102-1、CT102-6、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>的裸核苷酸序列为:

[0114] UCCUCCGAGCCAGACUUCA (SEQ ID NO.1)。

[0115] CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102-7、CT102-8、CT102-9和CT102-10的裸核苷酸序列为:

[0116] CUCCGAGCCAGACUU (SEQ ID NO.2)。

[0117] 表2: 修饰的寡核苷酸

编号	修饰的序列
[0118] CT102-1	5'- ${}^m\text{U}_{(\text{MOE})}\text{C}_{(\text{MOE})}\text{C}_{(\text{MOE})}{}^m\text{U}_{(\text{MOE})}{}^m\text{C}_{(\text{MOE})}{}^m\text{CGGAG}{}^m\text{C}{}^m\text{CAGA}{}^m\text{C}_{(\text{MOE})}{}^m\text{U}_{(\text{MOE})}{}^m\text{U}_{(\text{MOE})}\text{C}_{(\text{MOE})}\text{A}_{(\text{MOE})}$ -3'
CT102-2	5'- $\text{C}_{(\text{MOE})}{}^m\text{U}_{(\text{CET})}{}^m\text{C}_{(\text{CET})}{}^m\text{CGGAG}{}^m\text{C}{}^m\text{CAGA}{}^m\text{C}_{(\text{CET})}{}^m\text{U}_{(\text{CET})}{}^m\text{U}_{(\text{MOE})}$ -3'

[0119]

CT102-3	$5' \text{-}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{CGGAG} \text{}^m\text{C} \text{}^m\text{CAGA} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{-}3'$
CT102-4	$5' \text{-C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{CGGAG} \text{}^m\text{C} \text{}^m\text{CAGA} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{-}3'$
CT102-5	$5' \text{-}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{CGGAG} \text{}^m\text{C} \text{}^m\text{CAGAC}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{-}3'$
CT102-6	$5' \text{-}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{CGGAG} \text{}^m\text{C} \text{}^m\text{CAGA} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{A}_{(\text{MOE})} \text{-}3'$
CT102-7	$5' \text{-C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{CGGAG} \text{}^m\text{C} \text{}^m\text{CAGA} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{-}3'$
CT102-8	$5' \text{-C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{CGGAG} \text{}^m\text{C} \text{}^m\text{CAGA} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{-}3'$
CT102-9	$5' \text{-C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{CGGAG} \text{}^m\text{C} \text{}^m\text{CAGA} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{-}3'$
CT102-10	$5' \text{-C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{CGGAG} \text{}^m\text{C} \text{}^m\text{CAGA} \text{}^m\text{C}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{CET})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{-}3'$
CT102 <sub>MOE5</sub>	$5' \text{-}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{CGGAG} \text{}^m\text{C} \text{}^m\text{CAGA} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{A}_{(\text{MOE})} \text{-}3'$
CT102 <sub>MOE5-1</sub>	$5' \text{-}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{CGGAGCCAGA} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{U}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{C}_{(\text{MOE})} \text{}^m\text{A}_{(\text{MOE})} \text{-}3'$

[0120] 备注：

[0121] (1) \*号,表示核苷酸之间的连接为磷酸二酯键连接;其他的为硫代磷酸二酯键连接。

[0122] (2) <sup>m</sup>C,表示5'甲基胞嘧啶修饰。

[0123] (3) <sup>m</sup>U,表示5'甲基尿嘧啶修饰。

[0124] (4) (MOE)为2'-O-MOE修饰,(CET)为2'-O-CET修饰。

[0125] (5) 缀合寡核苷酸的制备

[0126] 在以上固相合成的寡核苷酸序列完成后,使用3%的二氯乙酸的甲苯溶液为脱保护试剂,脱去最后一个核苷酸的5'-二甲氧基三苯甲基(DMT)保护基,以提供游离的5'羟基。将在Am-Is-C6-GalNAc3上带有亚磷酰胺及保护基的缀合物(1.75当量,0.2M乙腈中的溶液)在分子筛上干燥24小时后,使用1M的4,5-二氧基咪唑的乙腈溶液作为活化剂,对缀合物进行活化,形成活性中间体,并使用对应体积的0.1M的N-甲基咪唑作为缚酸剂,再与寡核苷酸5'端上裸露的5'-羟基发生缩合反应,进行偶联,将偶联溶液再循环10分钟,之后使用乙腈进行冲洗。

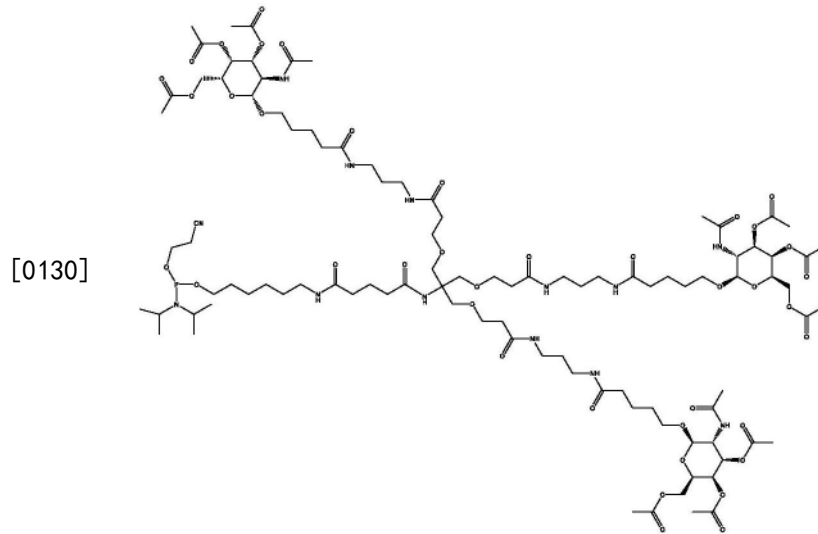
[0127] 用0.05M的碘的吡啶溶液(吡啶/水=90:10)作为氧化剂,进行氧化,之后使用乙腈进行冲洗。

[0128] 将所得缀合的低聚寡核苷酸用30%的二乙胺的乙腈溶液处理45分钟,以除去氰乙氧基保护基团,然后用浓氨水(25-30wt%)处理以除去保护基团,并将产品从固体载体上裂解,将裂解的缀合低聚寡核苷酸用水稀释,并通过AKTA pilot600全自动中试层析系统在强



阴离子交换柱 (GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30 $\mu$ m, 2.54x 8cm, A溶液=100mM 的乙酸铵溶液 (30%的乙腈/水), B溶液=1.5M的NaBr水溶液) 上进行纯化, 并通过超滤仪进行脱盐处理, 得到5'-Am-Is-C6-GalNAc3缀合的低聚寡核苷酸, 制得的产品见表2。

[0129] 在Am-Is-C6-GalNAc3上带有亚磷酸胺及保护基的缀合物如下式所示:

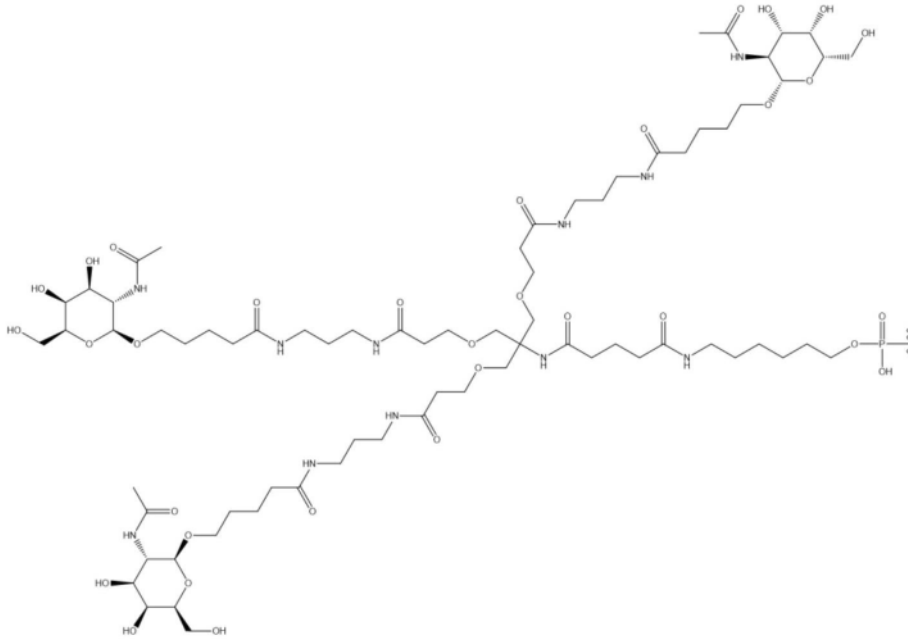


[0131] 表3: 缀合的寡核苷酸

编号	缀合修饰的序列
CT102-1-Z	5'- <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> C <sub>(MOE)</sub> C <sub>(MOE)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> <sup>m</sup> C <sub>(MOE)</sub> <sup>m</sup> CGGAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGA <sup>m</sup> C <sub>(MOE)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> C <sub>(MOE)</sub> A <sub>(MOE)</sub> -3'
CT102-2-Z	5'-C <sub>(MOE)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> CGGAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGA <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> -3'
CT102-4-Z	5'-C <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> CGGAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGA <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> -3'
CT102-5-Z	5'- <sup>m</sup> C <sub>(MOE)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> CGGAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGAC <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> -3'
CT102-6-Z	5'- <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> C <sub>(MOE)</sub> *C <sub>(MOE)</sub> * <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> * <sup>m</sup> C <sub>(MOE)</sub> * <sup>m</sup> CGGAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGA <sup>m</sup> C <sub>(MOE)</sub> * <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> * <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> C <sub>(MOE)</sub> A <sub>(MOE)</sub> -3'
CT102-7-Z	5'-C <sub>(MOE)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> * <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> CGGAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGA <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> -3'
CT102-8-Z	5'-C <sub>(MOE)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> CGGAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGA <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> -3'
CT102-9-Z	5'-C <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> CGGAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGA <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> -3'
CT102-10-Z	5'-C <sub>(MOE)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> CGGAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGA <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> -3'

[0134] 备注: 在序列的5' 末端缀合以下式所示基团 (简称为5'-Am-Is-C6-GalNAc3磷酸酯):

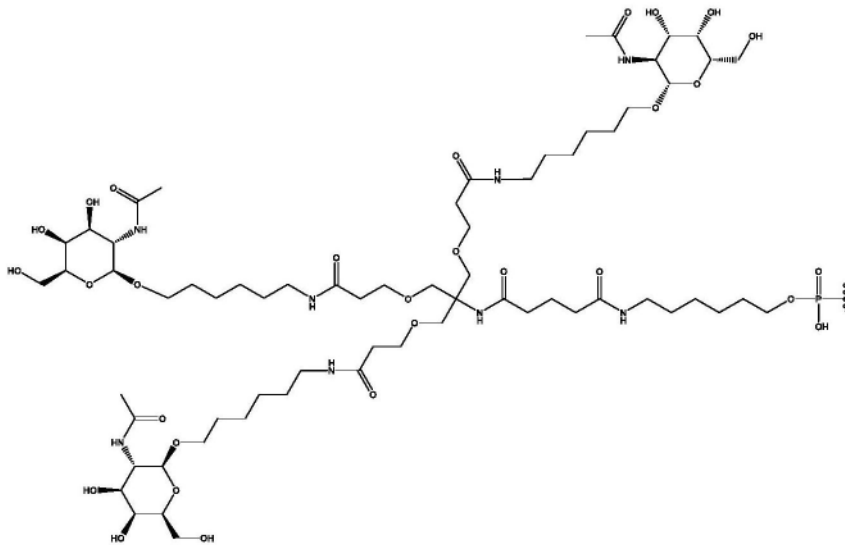
[0135]



[0136] 6、缀合基团的选择一对比例的制备

[0137] 选择序列编号为：CT102-7和CT102-9，依照和上述5中相同的方法，分别制得CT102-7-D和CT102-9-D，与CT102-7-Z和CT102-9-Z区别在于，在序列的5' 末端，更换的缀合基团如下：

[0138]



[0139] 表4

[0140]

编号	缀合修饰的序列
CT102-7-D	5' - C <sub>(MOE)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> * <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> CGGAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGA <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(MOE)</sub> - 3'
CT102-9-D	5' - C <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> CGGAG <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CAGA <sup>m</sup> C <sub>(CET)</sub> * <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> <sup>m</sup> U <sub>(CET)</sub> - 3'

[0141] 实施例2活性测定-细胞增殖抑制实验-1

[0142] 2.1实验材料

[0143] 受试样品：实施例1中制备的修饰的寡核苷酸：CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>；其中CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>是在中国专利公开文献CN114246829A中报道的结构，以此作为对照的修饰序列。

[0144] 细胞种类:人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299。

[0145] 阳性对照药:紫杉醇

[0146] 2.2实验方法

[0147] 采用MTT比色法检测受试样品对人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299的生长抑制情况,紫杉醇为阳性对照。

[0148] 2.2.1细胞培养

[0149] 将人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299细胞复苏,于培养皿中培养传代至所需的细胞数量,取传代培养的人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299细胞,使用10%胎牛血清的RPMI 1640培养基(补充青霉素、链霉素各100 $\mu$ L/mL),置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱中培养,每天更换新的培养基一次、并检查细胞密度。用胰蛋白酶(0.25%Trypsin-0.53mM EDTA)消化传代,至细胞大部分变圆并脱落,收集细胞,在1000RPM条件下离心5分钟,弃去上清液,补加入新鲜培养基,制成细胞悬液,细胞计数调整细胞浓度至4 $\times$ 10<sup>4</sup>/ml的细胞悬液。

[0150] 2.2.2细胞转染

[0151] 按每孔100 $\mu$ L加入到96孔细胞培养板中,每孔4000个细胞。在确保细胞贴壁的情况下,吸去培养基,用PBS磷酸缓冲盐溶液清洗一次后,更换成无血清(Opti-MEM)培养基;

[0152] 按脂质体转染试剂Lipofectamine 3000的指导方案进行转染试剂的配制:A液,向5 $\mu$ L Opti-MEM培养基加入0.2 $\mu$ L的Lipo3000转染试剂,震荡混匀,并瞬时离心,静置5min;B液,另向5 $\mu$ L的Opti-MEM培养基分别加入对应浓度待转染样品(终浓度分别为:75nmol/L、150nmol/L、300nmol/L),然后添加0.4 $\mu$ L P3000试剂,震荡混匀,并瞬时离心,静置5min;吸取B液加入至A液中,轻轻混匀,并瞬时离心,室温孵育15分钟;

[0153] 将孵育好的转染试剂加入到准备好的细胞中,并设置三个平行孔;另外设置空白对照组(不添加任何试剂,只包含细胞)和阳性对照组(紫杉醇,给药浓度为7.5 $\mu$ g/mL)。

[0154] 转染6小时后,吸除各孔培养基,每孔重新加入100 $\mu$ L含血清的正常培养基,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养,并观测培养情况。

[0155] 2.2.3细胞增殖检测

[0156] 培养72h后,每孔加入10 $\mu$ L的0.5%的MTT液,置于37 $^{\circ}$ C、5%的CO<sub>2</sub>培养箱中,继续培养4小时后,去除上清液,每孔加入150 $\mu$ L的二甲基亚砜,置摇床上低速振荡10min,使结晶物充分溶解。用多功能酶标仪(美国Wallac公司)测定490nm波长下的吸光度OD值。

[0157] 2.2.4数据处理

[0158] 表达抑制率计算公式:

[0159] 抑制率(%)=[(空白对照组OD值-试验组OD值)/空白对照组OD值] $\times$ 100%。

[0160] 2.3实验结果

[0161] 见表5

[0162] 表5:修饰寡核苷酸对人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299的表达抑制率

浓度 (nmol/L)	抑制率(%)							阳性对照
	CT102-1	CT102-2	CT102-3	CT102-4	CT102-5	CT102 <sub>MOE5</sub>	CT102 <sub>MOE5-1</sub>	
75	36.37	50.64	53.93	50.62	50.49	41.61	33.51	57.85
150	45.87	62.66	59.60	71.70	52.43	49.10	41.18	
300	51.68	63.20	66.50	73.31	60.92	50.05	46.86	

[0164] 从表5可以看出,7种修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-

5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>)对人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299都有增殖抑制作用。在75nmol/L时即显示出一定的抑制活性,且随着浓度的增加,抑制作用增强。此外,不同给药浓度的CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>对NCI-H1299细胞的抑制率分别为:

[0165] 在给药浓度为75nmol/L时,抑制率分别为:36.37%、50.64%、53.93%、50.62%、50.49%、41.61%和33.51%。

[0166] 在给药浓度为300nmol/L时,抑制率分别为:51.68%、63.20%、66.50%、73.31%、60.92%、50.05%和43.86%;抑制强度从大到小的顺序为:CT102-4、CT102-3、CT102-2、CT102-5、CT102-1、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>。

[0167] 实施例3活性测定-细胞增殖抑制实验-2

[0168] 3.1实验材料

[0169] 受试样品:

[0170] 实施例1中合成的修饰的寡核苷酸:CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>。

[0171] 细胞种类:人胰腺癌细胞PANC-1。

[0172] 阳性对照药:紫杉醇

[0173] 3.2实验方法

[0174] 采用MTT比色法检测受试样品对人胰腺癌细胞PANC-1的生长抑制情况,紫杉醇为阳性对照。

[0175] 实验过程同实施例2,区别仅在于:

[0176] 更换了培养基,用10%胎牛血清DMEM培养基,替换实施例2中的10%胎牛血清RPMI 1640培养基。

[0177] 3.3实验结果

[0178] 见表6

[0179] 表6:修饰寡核苷酸对人胰腺癌细胞PANC-1的表达抑制率

浓度 (nmol/L)	抑制率 (%)							阳性对照
	CT102-1	CT102-2	CT102-3	CT102-4	CT102-5	CT102 <sub>MOE5</sub>	CT102 <sub>MOE5-1</sub>	
75	42.86	53.94	55.92	45.60	55.30	44.17	32.16	60.08
150	44.30	60.77	58.73	71.91	63.94	50.45	37.32	
300	50.79	64.85	63.88	76.37	65.02	51.42	46.66	

[0181] 从表6可以看出,7种修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>)对人胰腺癌细胞PANC-1都有增殖抑制作用。在75nmol/L时即显示出一定的抑制活性,且随着浓度的增加,抑制作用增强。

[0182] 7种修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>)在给药浓度为300nmol/L时,抑制率分别为:50.79%、64.85%、63.88%、76.37%、65.02%、51.42%和46.66%;抑制强度从大到小的顺序为:CT102-4、CT102-5、CT102-2、CT102-3、CT102<sub>MOE5</sub>、CT102-1和CT102<sub>MOE5-1</sub>。

[0183] 实施例4活性测定-细胞增殖抑制实验-3

[0184] 4.1实验材料

[0185] 受试样品:

[0186] 实施例1中合成的修饰的寡核苷酸:CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>。

[0187] 细胞种类:人肝癌细胞Hep3B

[0188] 阳性对照药:紫杉醇

[0189] 4.2实验方法

[0190] 采用MTT法检测受试样品对人肝癌细胞Hep3B的生长抑制情况,紫杉醇为阳性对照。

[0191] 实验过程同实施例2,区别仅在于:

[0192] 更换了培养基,用10%胎牛血清DMEM培养基,替换实施例2中的10%胎牛血清RPMI 1640培养基。

[0193] 4.3实验结果

[0194] 见表7

[0195] 表7:修饰寡核苷酸对人肝癌细胞Hep3B的表达抑制率

浓度 (nmol/L)	抑制率 (%)							阳性 对照
	CT102-1	CT102-2	CT102-3	CT102-4	CT102-5	CT102 <sub>MOE5</sub>	CT102 <sub>MOE5-1</sub>	
75	35.10	46.19	44.57	41.40	43.38	41.94	33.61	63.12
150	43.84	61.59	62.67	64.90	48.92	45.73	40.61	
300	54.74	63.92	63.13	74.23	59.23	55.32	51.67	

[0197] 从表7可以看出,7种修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>)对人肝癌细胞Hep3B都有增殖抑制作用。在75nmol/L时即显示出一定的抑制活性,且随着浓度的增加,抑制作用增强。

[0198] 7种修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>)在给药浓度为300nmol/L时,抑制率分别为:54.74%、63.92%、63.13%、74.23%、59.23%、55.32%和51.67%;抑制强度从大到小的顺序为:CT102-4、CT102-2、CT102-3、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>、CT102-1和CT102<sub>MOE5-1</sub>。

[0199] 4.4实施例2-4的总结

[0200] 4.4.1实验总结

[0201] 7种修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>),在最高浓度时,对三种不同癌细胞的抑制率,抑制的强度顺序存在少许差别,但整体的抑制强度从大到小的顺序为:CT102-4为最强;CT102-2、CT102-3和CT102-5介于中间,对于不同的细胞,这三者之间的强弱顺序并不完全一致;再则,CT102-1和CT102<sub>MOE5</sub>,对于不同的细胞,这两者之间的强弱顺序并不完全一致;CT102<sub>MOE5-1</sub>为最弱。

[0202] 具体的:

[0203] 和CT102<sub>MOE5-1</sub>相比,CT102-1对人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299的表达抑制率提高了4.82%,CT102-1有更好的生物学活性;

[0204] 和CT102<sub>MOE5-1</sub>相比,CT102-1对人胰腺癌细胞PANC-1的表达抑制率提高了4.13%,CT102-1有更好的生物学活性;

[0205] 和CT102<sub>MOE5-1</sub>相比,CT102-1对人肝癌细胞Hep3B的表达抑制率提高了3.07%,

CT102-1有更好的生物学活性；

[0206] CT102<sub>MOE5</sub>和CT102-1,对人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299的表达抑制率,分别为50.05%和51.68%,无显著差异。

[0207] CT102<sub>MOE5</sub>和CT102-1,对人胰腺癌细胞PANC-1的表达抑制率,分别为51.42%和50.79%,无显著差异。

[0208] CT102<sub>MOE5</sub>和CT102-1,对人肝癌细胞Hep3B的表达抑制率,分别为55.32%和54.74%,无显著差异。

[0209] CT102<sub>MOE5-1</sub>和CT102-1相比,其化学结构的区别在于,序列中的甲基化修饰的胞嘧啶的数量同为5个,数量相同,只是两者在序列中甲基化修饰的位置不同:CT102<sub>MOE5-1</sub>的胞嘧啶的甲基化修饰的位置为5'-<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>CCGAGCCAGA<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>CA-3',CT102-1的胞嘧啶甲基化修饰的位置为5'-<sup>m</sup>UCC<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGGAG<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CAGA<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>UCA-3'。

[0210] CT102<sub>MOE5</sub>和CT102-1相比,其化学结构的区别在于:CT102<sub>MOE5</sub>的胞嘧啶的甲基化修饰的位置为5'-<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGGAG<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CAGA<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>CA-3',CT102-1的胞嘧啶甲基化修饰的位置为5'-<sup>m</sup>UCC<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGGAG<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CAGA<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>UCA-3';和CT102<sub>MOE5</sub>相比,CT102-1序列中的甲基化修饰的胞嘧啶的数量为5个,而CT102<sub>MOE5</sub>序列中的甲基化修饰的胞嘧啶的数量为8个。

[0211] 和CT102-1相比,CT102-2、CT102-3、CT102-4和CT102-5对人肝癌细胞Hep3B的表达抑制率有较好的作用,后四个和CT102-1相比,序列中碱基的数量由20个降低到16个,减少了4个碱基,缩短了20%;同时,后者四个序列中,核糖2'位部分增加了CET的修饰方式。

[0212] 4.4.2实验结论:

[0213] 选择对胞嘧啶甲基化修饰的数量和甲基化修饰的位置,对于寡核苷酸的修饰是至关重要的,相对于甲基化修饰的位置为5'-<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>CCGAGCCAGA<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>CA-3',选择甲基化修饰的位置为5'-<sup>m</sup>UCC<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGGAG<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CAGA<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>UCA-3'时,有更好的生物学活性。

[0214] 通过采用在核糖2'位采用CET方式修饰后,可以将碱基序列从20个缩短至16个碱基序列,并且保持同样或者更优的生物学活性。

[0215] 修饰的寡核苷酸,可以更有效地抑制肺癌、胰腺癌、肝癌细胞的增殖,可更好的用于治疗肺癌、胰腺癌、肝癌。

[0216] 实施例5活性测定-细胞增殖抑制实验-4

[0217] 5.1实验材料

[0218] 受试样品:实施例1中制备的修饰的寡核苷酸:CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>。

[0219] 细胞种类:人肝癌细胞(HepG2)

[0220] 阳性对照:紫杉醇

[0221] 5.2实验方法

[0222] 采用MTT法检测受试样品对人肝癌细胞(HepG2)的生长抑制情况,紫杉醇为阳性对照。

[0223] 实验过程同实施例2,区别仅在于:

[0224] 更换了培养基,用10%胎牛血清DMEM培养基,替换实施例2中的10%胎牛血清RPMI 1640培养基。

[0225] 将待转染样品终浓度调整为一个最大浓度300nmol/L,替换原来的三种浓度(分别

为:75nmol/L、150nmol/L、300nmol/L),

[0226] 调整每个样品的平行复孔的数量,调整成同一浓度设置6个复孔,以替代实施例2中的每个浓度3个平行孔;另外调整空白对照组和阳性对照组的平行复孔数量也为6个,以替代实施例2中的3个平行孔;并重复实验2次。

[0227] 进行统计学分析。

[0228] 5.3实验结果

[0229] 见表8和图1

[0230] 表8:修饰寡核苷酸对人肝癌细胞(HepG2)的表达抑制率

组别	表达抑制率(%)
CT102-1	60.43±4.14
CT102-2	68.75±4.50
CT102-3	69.06±4.66
CT102-4	75.26±4.79
CT102-5	63.64±4.08
CT102 <sub>MOE5</sub>	61.78±4.17
CT102 <sub>MOE5-1</sub>	53.08±3.73
阳性对照	64.08±4.24

[0232] 从表8可以看出,7种修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>)对人肝癌细胞(HepG2)都有增殖抑制作用:

[0233] 7种修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>)在给药浓度为300nmol/L时,抑制率分别为:60.43%、68.75%、69.06%、75.26%、63.64%、61.78%和53.08%;

[0234] 抑制强度从大到小的顺序为:CT102-4、CT102-3、CT102-2、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>、CT102-1和CT102<sub>MOE5-1</sub>;

[0235] CT102-4的表达抑制率最高,作用最强,而CT102<sub>MOE5-1</sub>最弱;

[0236] CT102-3和CT102-2的表达抑制率,分别为69.06%和68.75%,无显著性差异;

[0237] CT102-2和CT102-5的表达抑制率,相差5.11%;

[0238] CT102<sub>MOE5</sub>和CT102-1,对人肝癌(HepG2)细胞的表达抑制率,分别为61.78%和60.43%,相差1.35%,无显著性差异;

[0239] 和CT102<sub>MOE5-1</sub>相比,CT102-1的对人肝癌(HepG2)细胞的表达抑制率显著提高了7.35%(P<0.05)。

[0240] 5.4实验总结

[0241] 由表8可知,修饰的CT102序列的寡核苷酸,在人肝癌(HepG2)细胞中,和靶标基因IGF-1R,有很好的亲和力,可以很好抑制靶标基因的表达,从而抑制肝癌细胞的增殖,和现有技术中的修饰方式相比,采用本公开的修饰方式对CT102序列的寡核苷酸进行修饰后,有更好的抑制细胞增殖的作用,具体的:

[0242] 和CT102<sub>MOE5-1</sub>相比,CT102-1的对人肝癌(HepG2)细胞的表达抑制率显著提高了7.35%(P<0.05);

[0243] CT102<sub>MOE5-1</sub>和CT102-1相比,化学结构基本相同,其化学结构的区别在于:

CT102<sub>MOE5-1</sub>的胞嘧啶的甲基化修饰的位置为5'-<sup>14</sup>C<sup>15</sup>C<sup>16</sup>U<sup>17</sup>CCGAGCCAGA<sup>18</sup>C<sup>19</sup>U<sup>20</sup>CA-3',CT102-1的胞嘧啶甲基化修饰的位置为5'-<sup>14</sup>UCC<sup>15</sup>U<sup>16</sup>C<sup>17</sup>CGGAG<sup>18</sup>C<sup>19</sup>CAGA<sup>20</sup>C<sup>21</sup>U<sup>22</sup>UCA-3';CT102-1和CT102<sub>MOE5-1</sub>序列中的甲基化修饰的胞嘧啶的数量同为5个,数量相同,只是两者在序列中修饰的位置不同。

[0244] 相比CT102<sub>MOE5-1</sub>,CT102-1对人肝癌(HepG2)细胞的表达抑制率提高了7.35%,CT102-1有更好的生物学活性;

[0245] 和CT102<sub>MOE5</sub>相比,CT102-1的对人肝癌(HepG2)细胞的表达抑制率,基本相同;

[0246] 和CT102-1相比,CT102-2、CT102-3、CT102-4和CT102-5对人肝癌(HepG2)细胞的表达抑制率有好的作用,后者和CT102-1相比,序列中碱基的数量由20个降低到16个,减少了4个碱基,缩短了20%;同时,后者四个序列中,核糖2'位部分采用了CET的修饰方式。

[0247] 5.5结论

[0248] 选择对胞嘧啶甲基化修饰的数量和甲基化修饰的位置,对于寡核苷酸的修饰是至关重要的,相对于甲基化修饰的位置为5'-<sup>14</sup>UCC<sup>15</sup>U<sup>16</sup>C<sup>17</sup>CGGAGCCAGA<sup>18</sup>C<sup>19</sup>U<sup>20</sup>CA-3',选择甲基化修饰的位置为5'-<sup>14</sup>UCC<sup>15</sup>U<sup>16</sup>C<sup>17</sup>CGGAG<sup>18</sup>C<sup>19</sup>CAGA<sup>20</sup>C<sup>21</sup>U<sup>22</sup>UCA-3'时,有更好的生物学活性。

[0249] 通过采用在核糖2'位采用CET方式修饰后,可以将碱基序列从20个缩短至16个碱基序列,并且保持同样或者更优的生物学活性。

[0250] 实施例6细胞毒性检测-1

[0251] 6.1实验材料

[0252] 受试样品:实施例1中制备的修饰的寡核苷酸:CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>。

[0253] 细胞种类:人正常肝细胞(L-02)。

[0254] 阳性对照:紫杉醇

[0255] 6.2实验方法

[0256] 采用类MTT比色法检测受试样品对人正常肝细胞(L-02)的生长抑制情况,紫杉醇为阳性对照。

[0257] 6.2.1细胞培养

[0258] 取传代培养的人正常肝细胞(L-02),使用10%胎牛血清的DMEM培养基(补充青霉素、链霉素各100μL/mL),置于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱中培养,每天更换新的培养基一次、并检查细胞密度。用消化液(0.25%Trypsin-0.53mM EDTA)消化传代,至细胞大部分变圆并脱落,收集细胞,在1000RPM条件下离心5分钟,弃去上清液,补加入新鲜培养基,制成细胞悬液,细胞计数调整细胞浓度至8×10<sup>4</sup>/ml的细胞悬液。

[0259] 6.2.2细胞转染

[0260] 按每孔100μL加入到96孔细胞培养板中,每孔8000个细胞。在确保细胞贴壁的情况下,吸去培养基,用PBS磷酸缓冲盐溶液清洗一次后,更换成无血清(Opti-MEM)培养基;

[0261] 按脂质体转染试剂Lipofectamine 3000进行转染试剂的配制:A液,向5μL Opti-MEM培养基加入0.3μL的Lipo3000转染试剂,震荡混匀,并瞬时离心,静置5min;B液,另向5μL的Opti-MEM培养基分别加入对应浓度待转染样品(终浓度为:1200nmol/L),然后添加0.6μL LP3000试剂,震荡混匀,并瞬时离心,静置5min;吸取B液加入至A液中,轻轻混匀,并瞬时离心,室温孵育15分钟;



[0262] 将孵育好的转染试剂加入到准备好的细胞中,并设置6个平行复孔;另外设置空白对照组(没有载药的脂质体转染试剂)和阳性对照组(紫杉醇,给药浓度为7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ );重复实验2次。

[0263] 转染6小时后,吸弃各孔培养基,每孔重新加入100 $\mu\text{L}$ 含血清的正常培养基,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱中继续培养,并观测培养情况。

[0264] 6.2.3细胞增殖检测

[0265] 培养72h后,每孔加入10 $\mu\text{L}$ 的0.5%的MTT液,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%的 $\text{CO}_2$ 培养箱中,继续培养4小时后,去除上清液,每孔加入150 $\mu\text{L}$ 的二甲基亚砜,置摇床上低速振荡10min,使结晶物充分溶解。用多功能酶标仪(美国Wallac公司)测定490nm波长下的吸光度OD值。

[0266] 6.2.4数据处理

[0267] 细胞存活率计算公式:

[0268] 细胞存活率(%) = (试验组OD值/空白对照组OD值)  $\times$  100%。

[0269] 6.3实验结果

[0270] 见表9和图2。

[0271] 表9:修饰的寡核苷酸的细胞存活率-1

组别	细胞存活率(%)
CT102-1	80.79 $\pm$ 4.19
CT102-2	88.04 $\pm$ 5.29
CT102-3	82.90 $\pm$ 4.71
CT102-4	71.44 $\pm$ 4.55
CT102-5	81.46 $\pm$ 4.63
CT102 <sub>MOE5</sub>	73.06 $\pm$ 4.05
CT102 <sub>MOE5-1</sub>	79.85 $\pm$ 4.31
阳性对照	65.08 $\pm$ 4.82

[0273] 从表9的细胞毒性检测结果看,7种修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>),在达到一定的给药浓度时,会对人正常肝细胞(L-02)的生长产生细胞毒性,抑制了正常肝细胞的生长,但相互之间有比较大的差别:

[0274] 7种修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>)在给药浓度为1200nmol/L时,细胞存活率(和细胞毒性成反比)分别为:80.79%、88.04%、82.90%、71.44%、81.46%、73.06%和79.85%;

[0275] 细胞毒性从小到大的顺序为:CT102-2、CT102-3、CT102-5、CT102-1、CT102<sub>MOE5-1</sub>、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102-4;

[0276] CT102-2对人肝癌(HepG2)细胞的细胞毒性最低;

[0277] 和CT102-2相比,CT102-5对人肝癌(HepG2)细胞的细胞毒性,明显升高了6.58%;

[0278] 和CT102-2相比,CT102-3对人肝癌(HepG2)细胞的细胞毒性,明显升高了5.14%;

[0279] 和CT102<sub>MOE5</sub>相比,CT102-1对人肝癌(HepG2)细胞的细胞毒性,显著降低了7.73%( $P < 0.05$ ),具有显著差异,细胞毒性显著降低;

[0280] 和CT102<sub>MOE5-1</sub>相比,CT102-1对人肝癌(HepG2)细胞的细胞毒性,相差0.94%,无明显差异。

[0281] 6.4实验总结

[0282] 结合表8和表9可知,修饰的CT102序列的寡核苷酸,在对人肝癌细胞(HepG2)起作用的同时,对人正常肝细胞(L-02)的生长会产生一定的细胞毒性,抑制了正常肝细胞的生长,但每个化学结构不同的样品相互之间的药效和细胞毒性有比较大的差别,对于人肝癌细胞(HepG2)的药物活性明显提高,并且对人正常肝细胞(L-02)的细胞毒性有一定的改善作用,具体的:

[0283] 和已经公开的现有技术中的CT102<sub>MOE5</sub>相比,CT102-1对人肝癌(HepG2)细胞的药物活性(表达抑制率)略低1.35%,无显著性差异,CT102-1对人正常肝细胞(L-02)的细胞毒性(与细胞存活率成反比),显著降低了7.73%( $P < 0.05$ );

[0284] CT102<sub>MOE5</sub>和CT102-1相比,其化学结构的区别在于:CT102<sub>MOE5</sub>的胞嘧啶的甲基化修饰的位置为5'-<sup>18</sup>U<sup>18</sup>C<sup>18</sup>C<sup>18</sup>U<sup>18</sup>C<sup>18</sup>CGGAG<sup>18</sup>C<sup>18</sup>CAGA<sup>18</sup>C<sup>18</sup>U<sup>18</sup>CA-3',CT102-1的胞嘧啶甲基化修饰的位置为5'-<sup>18</sup>UCC<sup>18</sup>U<sup>18</sup>C<sup>18</sup>CGGAG<sup>18</sup>C<sup>18</sup>CAGA<sup>18</sup>C<sup>18</sup>U<sup>18</sup>UCA-3';和CT102<sub>MOE5</sub>相比,CT102-1序列中的甲基化修饰的胞嘧啶的数量为5个,而CT102<sub>MOE5</sub>序列中的甲基化修饰的胞嘧啶的数量为8个,说明,适当减少甲基化修饰的胞嘧啶的修饰数量,可以提高安全性;

[0285] 相对于CT102<sub>MOE5</sub>,采用CT102-1的修饰方式,即将胞嘧啶的甲基化修饰数量降低至5个,并选择的甲基化修饰的位置为5'-<sup>18</sup>UCC<sup>18</sup>U<sup>18</sup>C<sup>18</sup>CGGAG<sup>18</sup>C<sup>18</sup>CAGA<sup>18</sup>C<sup>18</sup>U<sup>18</sup>UCA-3'时,可以在保证生物学活性的同时,显著降低细胞毒性。

[0286] 和已经公开的现有技术中的CT102<sub>MOE5-1</sub>相比,CT102-1的对人肝癌(HepG2)细胞的药物活性(表达抑制率)显著提高了7.35%( $P < 0.05$ );,CT102-1对对人肝癌(HepG2)细胞的细胞毒性(与细胞存活率成反比),相差0.94%,无显著性差异;

[0287] CT102<sub>MOE5-1</sub>和CT102-1相比,化学结构基本相同,其化学结构的区别在于:CT102<sub>MOE5-1</sub>的胞嘧啶的甲基化修饰的位置为5'-<sup>18</sup>U<sup>18</sup>C<sup>18</sup>C<sup>18</sup>U<sup>18</sup>CCGGAGCCAGA<sup>18</sup>C<sup>18</sup>U<sup>18</sup>U<sup>18</sup>C A-3',CT102-1的胞嘧啶甲基化修饰的位置为5'-<sup>18</sup>UCC<sup>18</sup>U<sup>18</sup>C<sup>18</sup>CGGAG<sup>18</sup>C<sup>18</sup>CAGA<sup>18</sup>C<sup>18</sup>U<sup>18</sup>UCA-3';CT102-1和CT102<sub>MOE5-1</sub>序列中的甲基化修饰的胞嘧啶的数量同为5个,数量相同,只是两者在序列中修饰的位置不同;

[0288] 相比CT102<sub>MOE5-1</sub>,CT102-1对人肝癌(HepG2)细胞的药物活性显著提高了显著提高了7.35%( $P < 0.05$ ),CT102-1有更好的生物学活性;而对人肝癌(HepG2)细胞的细胞毒性基本相同;

[0289] 说明选择对胞嘧啶甲基化修饰的数量和甲基化修饰的位置,对于寡核苷酸的修饰是至关重要的。

[0290] 和CT102-5相比,CT102-2对于人肝癌(HepG2)细胞的药物活性(表达抑制率)明显提高了5.11%,CT102-2对于人正常肝细胞(L-02)的细胞毒性(与细胞存活率成反比),明显降低了6.58%;

[0291] 而CT102-2和CT102-5的化学结构相比,基本相似,仅有的区别在于:CT102-5的胞嘧啶的甲基化修饰的位置为5'-<sup>18</sup>C<sup>18</sup>U<sup>18</sup>C<sup>18</sup>CGGAG<sup>18</sup>C<sup>18</sup>CAGAC<sup>18</sup>U<sup>18</sup>U-3',CT102-2的胞嘧啶甲基化修饰的位置为5'-<sup>18</sup>C<sup>18</sup>U<sup>18</sup>C<sup>18</sup>CGGAG<sup>18</sup>C<sup>18</sup>CAGA<sup>18</sup>C<sup>18</sup>U<sup>18</sup>U-3';CT102-1和CT102<sub>MOE5-1</sub>序列中的甲基化修饰的胞嘧啶的数量同为5个,数量相同,只是两者在序列中修饰的位置不同,前者选择对3'端的五个胞嘧啶进行甲基化修饰,而后者对于5'端的五个胞嘧啶进行甲基化修饰,说明选择修饰的位置是非常关键的。

[0292] 6.5结论:

[0293] 在对肝癌的治疗中,相对于现有技术中的CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>,采用CT102-1的修饰方式,即将胞嘧啶的甲基化修饰数量降低至5个,并选择的甲基化修饰的位置为5'-<sup>m</sup>UCC<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGGAG<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CAGA<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>UCA-3'时,可以在保证生物学活性的同时,显著降低细胞毒性;

[0294] 通过在核糖2'位采用CET方式修饰后,可以将碱基序列从20个缩短至16个碱基序列,并且保持同样或者更好的生物学活性,再结合对胞嘧啶甲基化修饰的位置的合理选择,选择对胞嘧啶采取甲基化修饰的位置为5'-C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGGAG<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CAGA<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>U-3'时,可以在保证生物学活性的同时,明显降低细胞毒性。

[0295] 实施例7细胞毒性检测-2

[0296] 7.1实验材料

[0297] 受试样品:实施例1中制备的修饰的寡核苷酸:CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>;

[0298] 细胞种类:人正常肺上皮细胞BEAS-2B;

[0299] 阳性对照:紫杉醇

[0300] 7.2实验方法

[0301] 采用MTT法检测受试样品对人正常肺上皮细胞BEAS-2B的生长抑制情况,紫杉醇为阳性对照药。

[0302] 实验过程同实施例6,区别仅在于:

[0303] 更换了培养基,用10%胎牛血清RPMI 1640培养基,替换实施例6中的10%胎牛血清DMEM培养基。

[0304] 7.3实验结果

[0305] 见表10和图3。

[0306] 表10:修饰的寡核苷酸的细胞存活率-2

[0307]

编号	细胞存活率 (%)
CT102-1	81.44±4.54
CT102-2	86.97±5.06
CT102-3	83.06±4.86
CT102-4	68.56±4.27
CT102-5	78.11±4.38
CT102 <sub>MOE5</sub>	71.89±4.35
CT102 <sub>MOE5-1</sub>	75.95±4.44
阳性对照	62.16±4.37

[0308]

[0309] 从表10的细胞毒性检测结果看,7种修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>),在达到一定的给药浓度时,会对人正常肺上皮细胞BEAS-2B的生长产生一定的细胞毒性,抑制了正常肝细胞的生长,但相互之间有比较大

的差别：

[0310] 7种修饰寡核苷酸(CT102-1、CT102-2、CT102-3、CT102-4、CT102-5、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>) 在给药浓度为1200nmol/L时,细胞存活率(和细胞毒性成反比)分别为:81.44%、86.97%、83.06%、68.56%、78.11%、71.89%、75.95%、62.16%;

[0311] 细胞毒性从小到大的顺序为:CT102-2、CT102-3、CT102-1、CT102-5、CT102<sub>MOE5-1</sub>、CT102<sub>MOE5</sub>和CT102-4;

[0312] CT102-2对人正常肺上皮细胞BEAS-2B的细胞毒性最低;

[0313] 和CT102-2相比,CT102-3对人正常肺上皮细胞BEAS-2B的细胞毒性,升高了3.91%;

[0314] 和CT102-2相比,CT102-5对人正常肺上皮细胞BEAS-2B的细胞毒性,升高了8.86%( $P<0.05$ ),具有显著差异,细胞毒性显著升高;

[0315] 和CT102<sub>MOE5</sub>相比,CT102-1对人正常肺上皮细胞BEAS-2B的细胞毒性,降低了9.55%( $P<0.05$ ),具有显著差异,细胞毒性显著降低;

[0316] 和CT102<sub>MOE5-1</sub>相比,CT102-1对人正常肺上皮细胞BEAS-2B的细胞毒性,明显降低了5.49%。

[0317] 7.4实验总结

[0318] 结合表4和表9可知,修饰的CT102序列的寡核苷酸,在对人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299起作用的同时,对人正常肺上皮细胞BEAS-2B的生长会产生一定的细胞毒性,抑制了正常肺细胞的生长,但每个化学结构不同的样品相互之间的药效和细胞毒性有比较大的差别,采用本公开的修饰方式对CT102序列的寡核苷酸进行修饰后,对于人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299的药物活性明显提高,并且对人正常肺上皮细胞BEAS-2B的细胞毒性有一定的改善作用,具体的:

[0319] 和CT102<sub>MOE5</sub>相比,CT102-1对人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299的药物活性(表达抑制率)低1.63%,CT102-1对人正常肺上皮细胞BEAS-2B的细胞毒性(与细胞存活率成反比),显著降低了9.55%( $P<0.05$ );

[0320] CT102<sub>MOE5</sub>和CT102-1相比,其化学结构的区别在于:CT102<sub>MOE5</sub>的胞嘧啶的甲基化修饰的位置为5'-<sup>13</sup>C<sup>13</sup>U<sup>13</sup>C<sup>13</sup>CGGAG<sup>13</sup>C<sup>13</sup>CAGA<sup>13</sup>C<sup>13</sup>U<sup>13</sup>CA-3',CT102-1的胞嘧啶甲基化修饰的位置为5'-<sup>13</sup>UCC<sup>13</sup>U<sup>13</sup>C<sup>13</sup>CGGAG<sup>13</sup>C<sup>13</sup>CAGA<sup>13</sup>C<sup>13</sup>U<sup>13</sup>UCA-3';和CT102<sub>MOE5</sub>相比,CT102-1序列中的甲基化修饰的胞嘧啶的数量为5个,而CT102<sub>MOE5</sub>序列中的甲基化修饰的胞嘧啶的数量为8个,说明适当减少甲基化修饰的胞嘧啶的修饰数量,可以提高安全性;

[0321] 相比CT102<sub>MOE5-1</sub>,CT102-1对人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299的药物活性提高了4.82%;而对人正常肺上皮细胞BEAS-2B的细胞毒性,明显降低了5.49%。

[0322] 选择对胞嘧啶甲基化修饰的数量和甲基化修饰的位置,对于寡核苷酸的结构改造是至关重要的;

[0323] 和CT102-5相比,CT102-2对于人非小细胞肺癌细胞NCI-H1299的的药物活性(表达抑制率)作用提高了2.28%,CT102-2对于人正常肺上皮细胞BEAS-2B的细胞毒性,降低了8.86%( $P<0.05$ );

[0324] 而CT102-2和CT102-5相比,化学结构基本相同,仅有的区别在于:CT102-5的胞嘧啶的甲基化修饰的位置为5'-<sup>13</sup>C<sup>13</sup>U<sup>13</sup>C<sup>13</sup>GGAG<sup>13</sup>C<sup>13</sup>CAGAC<sup>13</sup>U<sup>13</sup>U-3',CT102-2的胞嘧啶甲基化修饰

的位置为5'-C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGGAG<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CAGA<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>U-3';CT102-1和CT102<sub>MOE5-1</sub>序列中的甲基化修饰的胞嘧啶的数量同为5个,数量相同,只是两者在序列中修饰的位置不同,前者选择对3'端的五个胞嘧啶进行甲基化修饰,而后者对于5'端的五个胞嘧啶进行甲基化修饰,说明选择修饰的位置是非常关键的。

[0325] 6.5结论:

[0326] 在对肺癌的治疗中,相对于现有技术中的CT102<sub>MOE5</sub>和CT102<sub>MOE5-1</sub>,采用CT102-1的修饰方式,即将胞嘧啶的甲基化修饰数量降低至5个,并选择的甲基化修饰的位置为5'-UCC<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGGAG<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CAGA<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>UCA-3'时,可以在保证生物学活性的同时,显著降低细胞毒性。

[0327] 通过在核糖2'位采用CET方式修饰后,可以将碱基序列从20个缩短至16个碱基序列,并且保持同样或者更好的生物学活性,再结合对胞嘧啶甲基化位置的合理选择,选择对胞嘧啶采取甲基化修饰的位置为5'-C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGGAG<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CAGA<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>U-3'时,可以在保证生物学活性的同时,更好的降低细胞毒性。

[0328] 实施例8缀合的寡核苷酸的体内活性测定

[0329] 8.1小鼠原位移植肝癌模型

[0330] 8.1-1实验材料

[0331] 受试样品:实施例1中制备的缀合的寡核苷酸:CT102-1-Z、CT102-2-Z、CT102-4-Z、CT102-5-Z、CT102-6-Z、CT102-7-Z、CT102-8-Z、CT102-9-Z、CT102-10-Z、CT102-7-D、CT102-9-D、CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z;

[0332] 阳性对照药:索拉非尼;

[0333] 细胞种类:人肝癌细胞HepG2;

[0334] 实验动物:BALB/c裸小鼠;4-5周,16-18g;

[0335] 8.1-2实验方法

[0336] 将处于对数生长期的人肝癌细胞HepG2,用0.25%胰蛋白酶消化后,离心,用磷酸盐缓冲液PBS制成细胞悬液,调整细胞计数,制得浓度约为 $5 \times 10^7$ 个/ml的细胞液混悬液,待用。

[0337] BALB/c裸小鼠适应性饲养1周,实验前禁食12h;使用5%水合氯醛麻醉BALB/c小鼠,待麻醉生效后,平卧位固定于鼠板上,用酒精消毒后在左腹腔做一长约1cm横断面小切口,开腹暴露肝脏,用生理盐水润湿过的棉签将肝左叶轻轻拉出,使其充分暴露,,用25 $\mu$ l的微量注射器取细胞悬液,以每只小鼠25 $\mu$ l的剂量,在肝左叶边缘贴肝被膜进针,与肝脏平面呈20°进针约1.5cm(压迫进针口),缓慢注射入肝左叶中,注射成功后,用棉签按压止血2-3min,以防止肿瘤细胞溢漏,然后将肝脏放回体内原位,逐层用丝线缝合切口,涂抹抗生素消毒伤口,置于37℃保暖箱中,术后所有荷瘤小鼠暂时分笼,37℃保温饲养直至完全苏醒,待清醒后正常饮食饲养。

[0338] 注射器并缓慢注射25 $\mu$ l肿瘤细胞

[0339] 一周后,使用5%水合氯醛麻醉小鼠,以150mg/kg荧光素的浓度,通过腹腔注射底物荧光素(Luciferin),底物注射10分钟后进行荧光活体成像检测,监控原位肿瘤的生长情况;对死亡的和没有成瘤的小鼠进行踢除。

[0340] 8.2分组和给药

[0341] 挑选造模成功的小鼠,依照每组8只,平均分成以下几组:CT102-1-Z组、CT102-2-Z

组、CT102-4-Z组、CT102-5-Z组、CT102-6-Z组、CT102-7-Z组、CT102-8-Z组、CT102-9-Z组、CT102-10-Z组、CT102-7-D组、CT102-9-D组、CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z组、阳性对照组和空白对照组；通过尾静脉，分别给予实施例1制成的CT102-1-Z、CT102-2-Z、CT102-4-Z、CT102-5-Z、CT102-6-Z、CT102-7-Z、CT102-8-Z、CT102-9-Z、CT102-10-Z、CT102-7-D、CT102-9-D、CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z，给药剂量为0.45mg/kg；空白对照组给予磷酸盐缓冲液；给药时间为间隔48小时采用尾静脉注射给药一次，连续给药30天，共给药15次；阳性对照组给予索拉非尼，给药剂量为30mg/kg，间隔48h灌胃给药一次，连续给药30天，共给药15次。

[0342] 每周定时称量荷瘤小鼠体重，并记录荷瘤小鼠体重的变化，来衡量各给药组的毒副作用。

[0343] 停药后第三天，对荷瘤裸鼠行眼静脉丛采血，用放射免疫法，检测荷瘤裸鼠甲胎蛋白(AFP)水平，处死荷瘤小鼠，称小鼠体重，剥离肿瘤组织，进行肿瘤重量的测量，计算肿瘤生长的抑瘤率，来评价各给药组的体内药效。

[0344] 抑瘤率(%)

[0345]  $= (\text{空白对照组肿瘤重量均数} - \text{实验组均数}) / \text{空白对照组均数} \times 100\%$

[0346] 8.3实验结果1-荷瘤小鼠体重变化情况

[0347] 每隔7天定时称量荷瘤小鼠体重(Body Weight)，记录小鼠生存情况，实验小鼠体重变化测定结果见表11和图4：

[0348] 表11:缀合的寡核苷酸对人肝癌裸鼠原位移植模型动物体重的影响

[0349]

分组	动物数		平均体重 (g, X±S)		初始体重 变化 (g)
	开始	结束	开始	结束	
CT102-1-Z 组	8.00	6.00	19.85±2.04	22.10±3.66	2.25
CT102-2-Z 组	8.00	7.00	19.59±3.01	22.16±3.52	2.57
CT102-4-Z 组	8.00	6.00	20.57±2.84	22.74±3.28	2.17
CT102-5-Z 组	8.00	6.00	20.40±1.99	22.52±3.04	2.12
CT102-6-Z 组	8.00	7.00	19.89±2.23	23.08±3.89	3.19

	CT102-7-Z 组	8.00	8.00	20.08±2.56	23.45±3.67	3.37
	CT102-8-Z 组	8.00	7.00	19.97±1.95	23.23±3.53	3.26
	CT102-9-Z 组	8.00	7.00	19.16±2.40	22.40±3.72	3.24
	CT102-10-Z 组	8.00	6.00	19.53±2.74	21.91±3.43	2.38
[0350]	CT102-7-D 组	8.00	6.00	19.97±2.59	22.16±3.31	2.19
	CT102-9-D 组	8.00	6.00	19.18±2.44	21.79±3.53	2.61
	CT102 <sub>MOE5-1</sub> -Z 组	8.00	6.00	19.51±1.98	21.46±3.07	1.95
	阳性对照组	8.00	5.00	19.59±2.79	21.05±4.05	1.46
	空白对照组	8.00	5.00	19.48±2.15	19.92±3.69	0.44

[0351] 从表11和图4的结果显示：

[0352] 各治疗组、阳性对照组和空白对照组在给药期间：

[0353] 体重变化情况：在给药后的第一周，各组小鼠体重均出现不同程度的体重减轻，在第二周各组小鼠体重下降减缓，进入第三周，各组小鼠体重开始增长缓慢，进入第四周，各组小鼠体重变化开始出现区别，有些组小鼠体重增加比较明显，有些组基本不变；以结束后的体重相对于开始给药后的体重，增加值来排序为：CT102-7-Z组、CT102-8-Z组、CT102-9-Z组、CT102-6-Z组、CT102-9-D组、CT102-2-Z组、CT102-10-Z组、CT102-1-Z组、CT102-7-D组、CT102-4-Z组、CT102-5-Z组、CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z组、阳性对照组、空白对照组。

[0354] 小鼠存活情况：空白对照组，在第12天动物死亡1只，第20天死亡1只，第24天死亡1只，合计死亡3只；阳性对照组，给药第16天动物死亡1只，在第18天死亡1只，第28天死亡1只，合计死亡3只；CT102-1-Z组、CT102-4-Z组、CT102-5-Z组、CT102-10-Z组、CT102-7-D组、CT102-9-D组和CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z组，这几组都各有2只小鼠死亡；死亡1只小鼠的给药组为：CT102-2-Z组、CT102-6-Z组、CT102-8-Z组和CT102-9-Z组；没有小鼠死亡的给药组为：CT102-7-Z组。

[0355] 8.3.1实验结论

[0356] 从荷瘤小鼠存活情况来看，各治疗组相对于阳性对照组，有更高的安全性；各治疗组相对于空白对照组和阳性对照组，有更好的治疗效果；

[0357] 具体的各给药组在给药期间：

[0358] CT102-6-Z组、CT102-7-Z组、CT102-8-Z组和CT102-9-Z组，发生动物死亡的数量相对较少，相比其他组，它们在化学结构上的主要的共同的特征在于，减少了对于磷酸二酯键的硫代修饰的数量，说明，合理的减少对于磷酸二酯键的硫代修饰的数量，可以降低药物毒性；

[0359] CT102-2-Z组出现动物死亡的数量为1只，而CT102-5-Z组的动物死亡为2只，两者在化学结构上的主要区别在于甲基化修饰的位置不同，和CT102-5-Z相比，两者对于胞嘧啶甲基化修饰的数量是相等的，惟一的区别在于，后者选择对5'端的五个胞嘧啶进行甲基化

修饰,而前者对于3'端的五个胞嘧啶进行甲基化修饰,说明选择修饰的位置会影响药物在体内的毒性的,即选择对胞嘧啶甲基化修饰的位置为5'-C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGGAG<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CAGA<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>-3'时,可以在保证生物学活性的同时,降低对体内的相关毒性;

[0360] CT102-7-Z组出现动物死亡的数量为1只,CT102-7-D组出现动物死亡的数量为2只;CT102-7-Z和CT102-7-D的化学结构的区别在于,两者所采用的缀合基团不同,CT102-7-Z所采用的缀合基团为5'-Am-Is-C6-GalNAc3,相比后者的缀合基团,5'-Am-Is-C6-GalNAc3有更好的安全性;同样的,CT102-9-Z组出现动物死亡的数量为1只,CT102-9-D组出现动物死亡的数量为2只,CT102-9-Z和CT102-9-D的化学结构的区别在于,两者所采用的缀合基团不同,CT102-9-Z所采用的缀合基团为5'-Am-Is-C6-GalNAc3,相比后者的缀合基团有更好的安全性。

[0361] 从荷瘤小鼠体重变化情况来看,各治疗组在结药期间,没有出现明显的体重下降的情况,各治疗组相对于阳性对照组,有更高的安全性;各治疗组相对于空白对照组和阳性对照组,有更好的治疗效果;

[0362] 8.4缀合的寡核苷酸对人肝癌裸鼠原位移植瘤的瘤重影响

[0363] 处死裸鼠后,称肿瘤体积和肿瘤重量,计算肿瘤生长的抑制率

[0364] 实验结果见表12和图5

[0365] 抑瘤率(%)

[0366] = (空白对照组肿瘤重量均数-实验组均数)/空白对照组均数×100%

[0367] 表12:缀合的寡核苷酸对人肝癌裸鼠原位移植瘤的瘤重影响

分组	肿瘤重量(mg)	抑瘤率(%)
[0368] CT102-1-Z 组	258±103	56.6
CT102-2-Z 组	233±63	60.8
CT102-4-Z 组	208±100	65.0



	CT102-5-Z 组	239±134	59.8
	CT102-6-Z 组	233±84	60.8
	CT102-7-Z 组	163±56	72.6
	CT102-8-Z 组	145±59	75.6
	CT102-9-Z 组	114±38	80.8
[0369]	CT102-10-Z 组	255±147	57.1
	CT102-7-D 组	242±110	59.3
	CT102-9-D 组	178±51	70.0
	CT102 <sub>MOE5-1</sub> -Z 组	372±98	37.4
	阳性对照组	283±191	52.4
	空白对照组	594±362	/

[0370] 从表12和图5的结果显示：

[0371] 缀合的寡核苷酸对人肝癌裸鼠原位移植瘤的肿瘤有很好的抑制作用，相对于空白对照组，各治疗组的抑瘤率均大于37.4%；相对于阳性对照组，除CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z组外，其他各组的抑瘤率，均大于阳性对照组的52.4%的抑瘤率。

[0372] 依照对肿瘤的抑制作用，各给药组，从强到弱的顺序为CT102-9-Z组、CT102-8-Z组、CT102-7-Z组、CT102-9-D组、CT102-4-Z组、CT102-2-Z组、CT102-6-Z组、CT102-5-Z组、CT102-7-D组、CT102-10-Z组、CT102-1-Z组、CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z组。

[0373] 其中，CT102-9-Z组对肿瘤的抑瘤率为80.8%，作用最强；而CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z组对肿瘤的抑瘤率为37.4%，作用最弱；

[0374] 8.4.1实验结论

[0375] 从表12和图5的结果，可以看出：

[0376] 相对于公开文献报道的-CT102<sub>MOE5-1</sub>，并在此基础之上，进行缀合的靶向基团形成的CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z，本公开制备的缀合寡核苷酸CT102-9-Z、CT102-8-Z、CT102-7-Z、CT102-9-D、CT102-4-Z、CT102-2-Z、CT102-6-Z、CT102-5-Z、CT102-7-D、CT102-10-Z和CT102-1-Z，从对肿瘤的抑瘤率来比较，对于肿瘤治疗有明显的治疗作用；

[0377] 相对于阳性对照药-索拉非尼，本公开制备的缀合寡核苷酸CT102-9-Z、CT102-8-Z、CT102-7-Z、CT102-4-Z、CT102-2-Z、CT102-6-Z、CT102-5-Z、CT102-10-Z和CT102-1-Z，从对肿瘤的抑瘤率来比较，对于肿瘤治疗有更好的治疗效果；

[0378] 其中，CT102-9-Z组对肿瘤的抑制作用为最强，抑瘤率为80.8%；CT102-9-D组对肿瘤的抑瘤率为70.0%，CT102-9-Z的抑瘤率提高了10.8%；CT102-9-Z和CT102-9-D的化学结构的区别在于，两者所采用的缀合基团不同，CT102-9-Z所采用的缀合基团为5'-Am-Is-C6-GalNAc3，相比后者的缀合基团有更好的药效。同样的，CT102-7-Z组对肿瘤的抑瘤率为72.6%，CT102-7-D组对肿瘤的抑瘤率为59.3%，CT102-7-Z的抑瘤率提高了13.3%；CT102-7-Z和CT102-7-D的化学结构的区别在于，两者所采用的缀合基团不同，CT102-7-Z所采用的

缀合基团为5'-Am-Is-C6-GalNAc3,相比后者的缀合基团,5'-Am-Is-C6-GalNAc3有更好的药效。

[0379] 其中,CT102-1-Z组的抑瘤率为56.6%,CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z组的抑瘤率为37.4%,CT102-1-Z的抑瘤率提高了19.2%;CT102-1-Z和CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z的化学结构的区别在于,两者对胞嘧啶甲基化修饰的位置不同,CT102-1-Z的胞嘧啶甲基化修饰的位置选择,比后者更有利,更好的提高了对肿瘤的抑制作用。

[0380] CT102-6-Z组的抑瘤率为60.8%,CT102-1-Z组的抑瘤率为56.6%,前者提高了4.2%,CT102-6-Z和CT102-1-Z的化学结构的区别在于,前者减少了6个硫代修饰,说明,对于靶向缀合修饰的寡核苷酸,合理的减少对于磷酸二酯键的硫代修饰的数量,并不一定会降低药物在体内的药效。

[0381] 同样的,CT102-2-Z组的抑瘤率为60.8%,CT102-8-Z组的抑瘤率为75.6%,相对,CT102-2-Z,CT102-8-Z对肿瘤的抑瘤率提高了14.8%;同样的,CT102-4-Z组的抑瘤率为65.0%,CT102-9-Z组的抑瘤率为80.8%,CT102-9-Z对肿瘤的抑瘤率提高了15.8%;CT102-9-Z对肿瘤的抑制作用明显优于CT102-4-Z;

[0382] 同样的,CT102-10-Z组的抑瘤率为57.1%,CT102-7-Z组的抑瘤率为72.6%,CT102-7-Z对肿瘤的抑制作用抑瘤率提高了15.5%;说明经过靶向缀合修饰的寡核苷酸,在合理减少硫代修饰的同时,并没有降低其在体内的对肿瘤的抑制作用,反而,部分的会提高药效。

[0383] 缀合的寡核苷酸对人肝癌原位移植裸鼠的血清甲胎蛋白浓度的影响

[0384] 甲胎蛋白(alpha fetoprotein,AFP)是一种酸性糖蛋白,存在胎儿发育的早期肝脏和卵黄囊中,胎儿出生后不久,逐渐消失,甲胎蛋白水平在婴儿中逐渐降低,到8-12个月达到成人水平。正常成人的AFP水平较低,但可检测到,甲胎蛋白在正常成人中没有已知的功能,在成人中的甲胎蛋白表达通常与肿瘤的产生(如肝癌、睾丸癌、卵巢癌和恶性畸胎瘤等)相关,甲胎蛋白的血清水平往往与肿瘤大小关联,在患有AFP分泌肿瘤的患者中,血清水平可用于评估对于治疗的反应。目前,检测血清甲胎蛋白的浓度,常用于原发性肝癌的普查和早期诊断,也可用于提示肝癌手术切除的疗效(即是否彻底或复发),通常情况下,如果AFP水平在治疗后下降,则肿瘤没有增长。。甲胎蛋白成为诊断原发性肝癌的重要检验指标,甲胎蛋白是用于监测肿瘤存在和治疗的主要标志物,可用于评价肝癌的治疗效果

[0385] 对荷瘤裸鼠治疗结束后,检测荷瘤裸鼠甲胎蛋白(AFP)水平,血清甲胎蛋白(AFP)的浓度(浓度以ng/ml计),实验结果见表13和图6

[0386] 表13:缀合的寡核苷酸对人肝癌原位移植瘤裸鼠的血清甲胎蛋白浓度的影响

[0387]

分组	甲胎蛋白 (ng/ml)
CT102-1-Z组	471.93±75.51
CT102-2-Z组	453.89±72.62
CT102-4-Z组	410.35±61.55
CT102-5-Z组	466.71±88.68
CT102-6-Z组	439.69±87.94
CT102-7-Z组	358.15±60.89
CT102-8-Z组	327.74±72.1

CT102-9-Z组	235.97±49.55
CT102-10-Z组	485.38±87.37
CT102-7-D组	463.61±64.91
CT102-9-D组	387.16±69.69
CT102 <sub>MOE5-1</sub> -Z组	573.91±74.61
阳性对照组	503.75±120.9
空白对照组	1223.17±330.26

[0388] 从表13和图6的结果显示:

[0389] 甲胎蛋白阳性可以作为药物对肝癌抑制作用的动态观察指标,检测实验动物或者肿瘤患者体内AFP浓度大小,可以用于评价肿瘤药物的治疗作用,甲胎蛋白浓度越低,说明药物对肿瘤的抑制作用越强,药效越好;缀合的寡核苷酸对人肝癌原位移植瘤裸鼠的甲胎蛋白(AFP)的分泌有很好的抑制作用,即对肿瘤有很好的抑制作用;

[0390] 依照对甲胎蛋白的抑制作用(即肿瘤的抑制作用),各给药组,从强到弱的顺序为CT102-9-Z组、CT102-8-Z组、CT102-7-Z组、CT102-9-D组、CT102-4-Z组、CT102-6-Z组、CT102-2-Z组、CT102-7-D组、CT102-5-Z组、CT102-1-Z组、CT102-10-Z组、CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z组。

[0391] 其中,CT102-9-Z组对肿瘤的抑制作用最强;而CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z组对肿瘤的抑制作用最弱;

[0392] 8.5.1实验结论

[0393] 从表13和图6的结果,可以看出:

[0394] 相对于公开文献报道的CT102<sub>MOE5-1</sub>,并在此基础之上,缀合靶向基团形成的CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z,本公开制备的缀合寡核苷酸CT102-9-Z、CT102-8-Z、CT102-7-Z、CT102-9-D、CT102-4-Z、CT102-2-Z、CT102-7-Z、CT102-5-Z、CT102-1-D和CT102-1-Z,对甲胎蛋白的分泌有显著抑制作用,即对于肿瘤生长有显著的抑制作用, $P < 0.05$ ;

[0395] 相对于阳性对照药-索拉非尼,本公开制备的缀合寡核苷酸CT102-9-Z、CT102-8-Z、CT102-7-Z、CT102-4-Z、CT102-2-Z、CT102-6-Z、CT102-5-Z、CT102-10-Z和CT102-1-Z,对甲胎蛋白的分泌有明显的抑制作用,即对于肿瘤生长有明显的抑制作用,

[0396] 其中,CT102-9-Z组对甲胎蛋白的分泌抑制作用为最强,甲胎蛋白浓度为235.97ng/ml;CT102-9-D组的甲胎蛋白浓度为387.16ng/ml,两组对甲胎蛋白的分泌抑制作用存在显著区别, $P < 0.05$ ;CT102-9-Z和CT102-9-D的化学结构的区别在于,两者所采用的缀合基团不同,CT102-9-Z所采用的缀合基团为5'-Am-Is-C6-GalNAc3,相比后者的缀合基团对肿瘤有显著的抑制作用。同样的,CT102-7-Z组的甲胎蛋白浓度为358.15ng/ml,CT102-7-D组的甲胎蛋白浓度为463.61ng/ml,两组的对甲胎蛋白的分泌抑制作用存在显著区别, $P < 0.05$ ;CT102-7-Z和CT102-7-D的化学结构的区别在于,两者所采用的缀合基团不同,CT102-7-Z所采用的缀合基团为5'-Am-Is-C6-GalNAc3,相比后者的缀合基团,当缀合基团为5'-Am-Is-C6-GalNAc3时,所形成的寡核苷酸对肿瘤有显著的抑制作用。

[0397] 其中,CT102-1-Z组的抑瘤率为56.6%,CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z组的抑瘤率为37.4%,两组的抑瘤作用存在明显区别, $P < 0.05$ ;CT102-1-Z和CT102<sub>MOE5-1</sub>-Z的化学结构的区别在于,两者对胞嘧啶甲基化修饰的位置不同,CT102-1-Z的胞嘧啶甲基化修饰的位置选择,比后者更有利,更好的提高了对甲胎蛋白的分泌抑制作用。

[0398] CT102-6-Z组的甲胎蛋白浓度为439.69ng/ml,CT102-1-Z组的甲胎蛋白浓度为471.93ng/ml,两者没有显著区别,CT102-6-Z和CT102-1-Z的化学结构的区别在于,前者减少了6个硫代修饰,说明,对于靶向缀合修饰的寡核苷酸,合理的减少对于磷酸二酯键的硫代修饰的数量,并不一定会降低药物在体内的药效。

[0399] 同样的,CT102-2-Z组的甲胎蛋白浓度为453.89ng/ml,CT102-8-Z组的甲胎蛋白浓度为327.74ng/ml,CT102-8-Z对甲胎蛋白的分泌抑制作用显著优于CT102-2-Z, $P<0.05$ ,CT102-2-Z和CT102-8-Z的化学结构的区别在于,后者对于磷酸二酯键减少了3个硫代修饰;同样的,CT102-4-Z组的甲胎蛋白浓度为410.35ng/ml,CT102-9-Z组的甲胎蛋白浓度为235.97ng/ml,CT102-9-Z对甲胎蛋白的分泌抑制作用显著优于CT102-4-Z, $P<0.05$ ;CT102-4-Z和CT102-9-Z的化学结构的区别在于,后者对于磷酸二酯键减少了3个硫代修饰;

[0400] 同样的,CT102-10-Z组的甲胎蛋白浓度为485.38ng/ml,CT102-7-Z组的甲胎蛋白浓度为358.15ng/ml,CT102-7-Z对甲胎蛋白的分泌抑制作用显著优于CT102-10-Z, $P<0.05$ ;CT102-10-Z和CT102-7-Z的化学结构的区别在于,后者对于磷酸二酯键减少了3个硫代修饰,说明,对于靶向缀合修饰的寡核苷酸,合理的减少对于磷酸二酯键的硫代修饰的数量,并没有降低其在体内的对甲胎蛋白的分泌抑制作用,反而,部分的会提高药效。

[0401] CT102-7-Z组、CT102-8-Z组和CT102-9-Z组的血清甲胎蛋白浓度,较CT102-1-Z组和CT102-6-Z组血清甲胎蛋白浓度明显下降;说明经过CET修饰的短序列,和没有CET修饰的长序列相比,在体内的对肝癌的抑制作用,从血清学的指标来看,可以达到或者超过没有CET修饰的长序列寡核苷酸;

[0402] CT102-9-Z组的血清甲胎蛋白浓度较CT102-7-Z组、CT102-8-Z和CT102-10-Z组明显下降,说明在两端对CET修饰的数量合理增加,对肝癌的抑制作用,从血清学的指标来看越明显。

[0403] 综上,修饰的寡核苷酸分子对胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)基因有很好的沉默作用,抑制了肝癌细胞的生长、迁移与侵袭的,增加了药物的血清稳定性、生物学活性,同时降低了细胞毒性,特别是缀和靶向基团的CT102-6-Z、CT102-7-Z、CT102-8-Z、CT102-9-Z和CT102-10-Z相较其他的修饰,大大提高了寡核苷酸分子的在体内对肝脏肿瘤细胞的生物学活性(抑制肿瘤相关基因细胞增殖受体IGF1R基因的表达),同时降低了细胞毒性(或与未修饰的活性相当),可以作为药物优化的方向。

[0404] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本公开作了详尽的描述,但在本公开基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本公开精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本公开要求保护的范围。

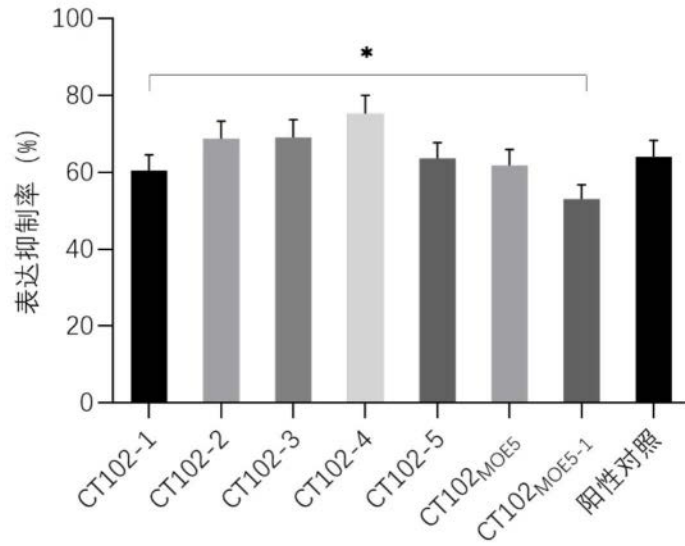


图1

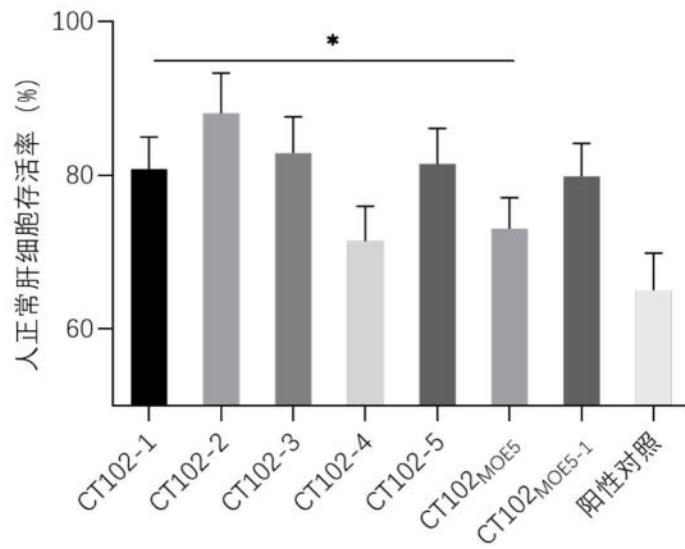


图2

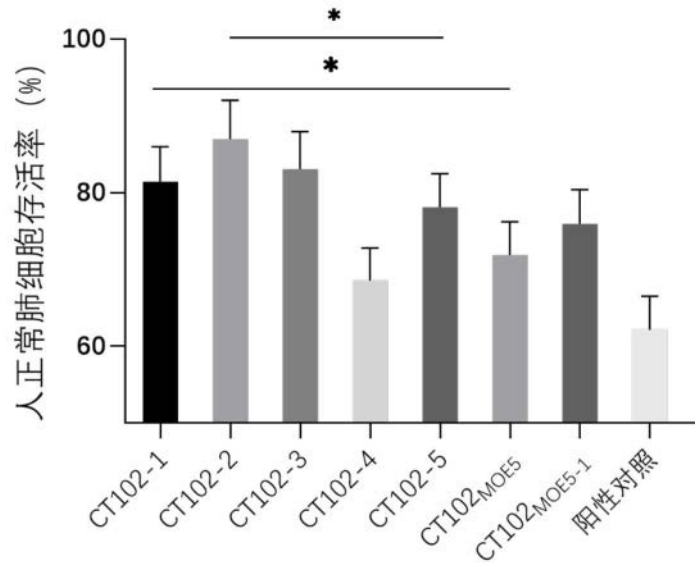


图3

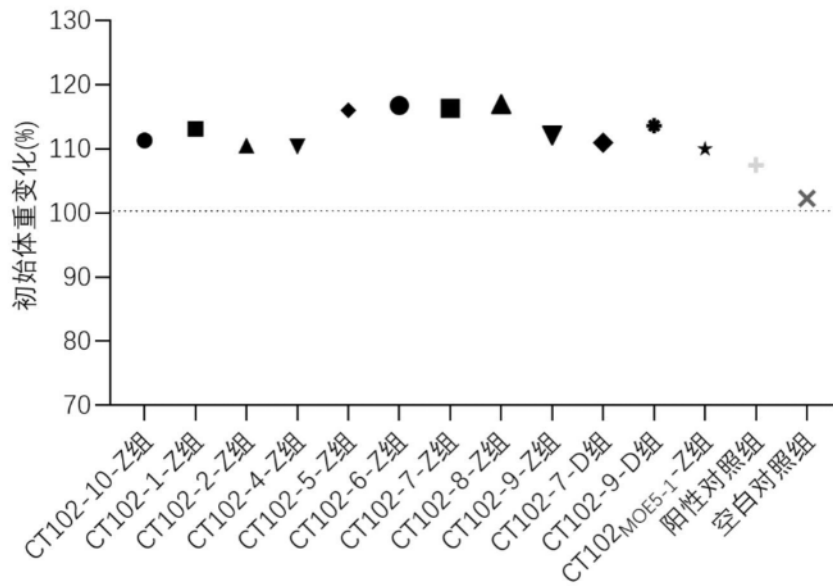


图4

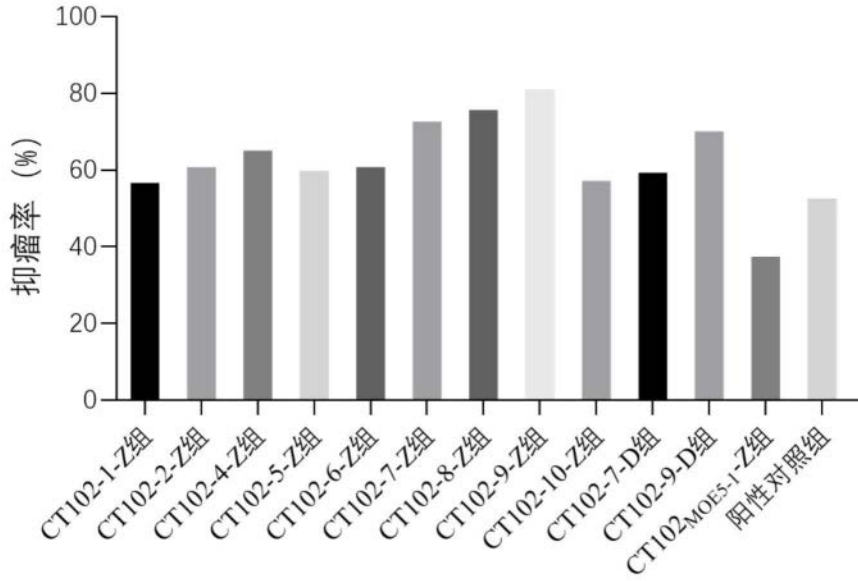


图5

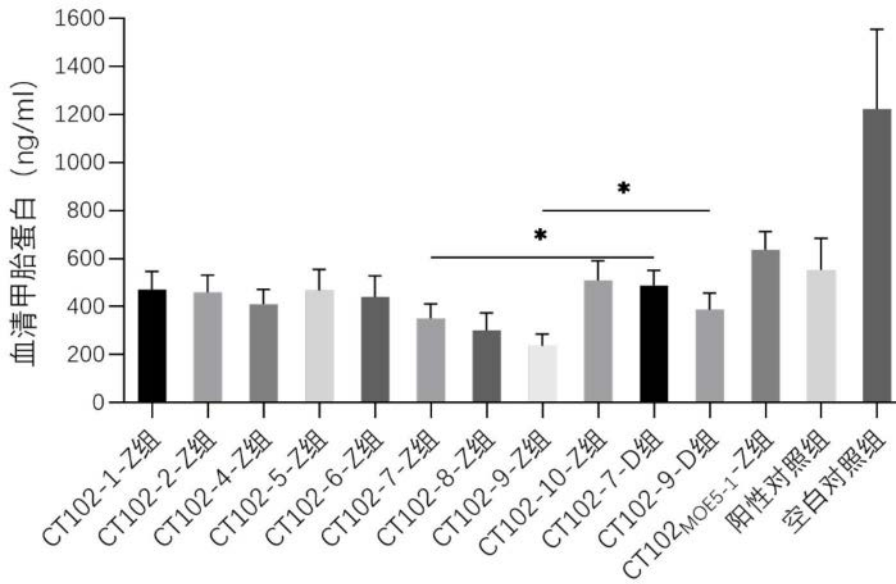


图6