

新型 Foxo-1 反义 RNA 两种给药方式的药效学、药动学 and 安全性观察

杨 倬^{1*}, 秦 文¹, 王晶波¹, 王丽媛¹, 卓 勤¹, 田 波²

(1. 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 北京 100050;

2. 中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101)

摘要: Foxo-1(Forkhead box O1) 在肌肉萎缩疾病的发生发展中起到了重要作用, 有可能成为肌肉萎缩疾病治疗中潜在的治疗靶点。本研究设计了特异性靶向 Foxo-1 的 2'-O-甲基和 3'-丁醇基联合修饰的新型反义 RNA 寡核苷酸(oligos), 并评价其在小鼠体内的药效学、药动学行为及安全性。所有实验方案均通过中国疾病预防控制中心营养与健康所动物伦理委员会批准。结果表明, 不同剂量的 RNA 寡核苷酸通过静脉注射和口服给药均能降低小鼠骨骼肌 Foxo-1 的表达, 有助于增加小鼠骨骼肌质量。药动学行为评价结果显示, 新型修饰的 Foxo-1 RNA 寡核苷酸单次静脉注射给药后在小鼠体内的动力学过程符合二室模型。安全性评价结果显示, 静脉注射或口服给药最高剂量为 30 mg·kg⁻¹ 的 RNA 寡核苷酸, 小鼠的肝功能和肾功能以及血液学各项指标正常, 未对小鼠产生明显的不良反应; 并且未导致小鼠明显的组织病理变化。总之新型修饰的 Foxo-1 反义 RNA 寡核苷酸作用在小鼠体内是安全且有效的, 为其临床应用提供了实验基础与指导意义。

关键词: Foxo-1; 反义 RNA 寡核苷酸; 药效学; 药动学行为; 安全性

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)07-1251-06

Observation on efficacy, pharmacokinetic behaviors and safety of new modified RNA oligonucleotide targeting Foxo-1 via two routes of administration

YANG Zhuo^{1*}, QIN Wen¹, WANG Jing-bo¹, WANG Li-yuan¹, ZHUO Qin¹, TIAN Bo²

(1. Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China;

2. Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Foxo-1 plays an important role in development of muscle atrophy, serving as a potential target for therapeutic treatment of the disease. In this study, the Foxo-1 mRNA was targeted by a Foxo-1 specific RNA oligonucleotide modified by 2'-O-methyl and with a butanol tag at the 3'-end. To understand the *in vivo* significance of new modified RNA oligos, efficacy, pharmacokinetic and safety profiles of the new modified RNA oligonucleotide targeting Foxo-1 were evaluated in mice. All experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee of Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention. The results showed that different doses of the RNA oligonucleotide can reduce the expression of Foxo-1 in mice by two routes of administration, leading to an increase in skeletal muscle mass of the mice. The results of pharmacokinetic evaluation showed that the plasma disappearance curve for the RNA oligonucleotide could be described by a two-compartmental model. The results of safety evaluation showed that no obvious adverse effects on renal and hepatic functions, nor on hematological parameters by intravenous or oral administration of the RNA oligo with a maximum dose of

收稿日期: 2019-03-11; 修回日期: 2019-04-25.

*通讯作者 Tel: 86-10-66237243, E-mail: yangzhuo@ninh.chinacdc.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0169

30 mg·kg⁻¹. Histopathology also did not reveal any significant changes in the morphology of the organs studied. In conclusion, the new modified RNA oligo is safe and effective in mice, providing experimental evidence supporting the significance for its clinical application.

Key words: Foxo-1; antisense oligonucleotides; efficacy; pharmacokinetic behavior; safety

Foxo-1 (Forkhead box O1) 是 Fox forkhead 转录调控因子家族的成员之一, 是调控肌肉生长和代谢的重要转录因子, 它在能量消耗性疾病中高表达, 例如禁食、癌症和糖尿病^[1-3]。为了探索 Foxo-1 是否可以作为肌肉萎缩治疗的一个潜在分子靶点, 深入了解 Foxo-1 调节肌肉的发育和生长机制, 本研究设计使用了一种靶向 Foxo-1 mRNA 的修饰型反义 RNA 寡核苷酸。

由于合成的 RNA 寡核苷酸在生物体内血清环境中极易被核酸酶降解而不稳定, 且不易被组织吸收等特点, 因此有必要对合成的 RNA 寡核苷酸进行化学修饰, 增加其热稳定性和对核酸酶降解的抗性, 减少非特异性血液蛋白的吸附作用, 调节对靶组织的分布并改善药代动力学性质。包括硫代磷酸化 (PS) 修饰可增加 RNA 寡核苷酸半衰期^[4-6]。但是这种修饰增加了 RNA 寡核苷酸与其他蛋白产生非特异性相互作用的几率, 导致序列非依赖性表型效应或细胞毒性。高浓度的 PS 反义寡核苷酸 (ASOs) 也可以约束和抑制 DNA 聚合酶和 RNaseH 的作用。为了消除 PS ASOs 的脱靶效应, 采用其他类型的修饰应用于 ASOs 的改造, 如采用裂隙技术 (LNA/RNA gapmers) 增加结合亲和力, 更为重要的是提高稳定性; 烷基修饰, 如 2'-O-烷基修饰, 避免了 PS 修饰, 提高了 ASOs 的稳定性与有效性^[7-10]。

为探索更加稳定的 RNA 寡核苷酸和评估 RNA 寡核苷酸的有效性, 为临床应用提供更丰富可靠的信息, 本文对 RNA 寡核苷酸进行了 2'-O-甲基和 3'-丁醇基末端修饰, 以期增强 RNA 寡核苷酸对靶序列的亲合力和对核酸内切酶及 3'-外切酶的抗性。对修饰型 RNA 寡核苷酸的小鼠体内药效学、药动学行为及安全性进行了一系列分析。

材料与方法

RNA 寡核苷酸 靶向 Foxo-1 的 RNA 寡核苷酸由美国 Oligos 公司提供, 序列为 AUGGGGUGGGACAG AGGC (GGR7), 主要修饰为 2'-O-甲基和 3'-丁醇基末

端修饰, HPLC 纯化。

实验动物 SPF 级 BALB/c 小鼠雌雄各半, 6~8 周龄, 体重 15~18 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2012-0001, 饲养于中科院遗传与发育研究所实验动物中心, 室温 22~26 °C, 相对湿度 40%~60%, 12 h/12 h 明暗循环。动物实验已通过中国疾病预防控制中心营养与健康所动物伦理委员会批准。

试剂和仪器 总 RNA 提取 TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒、Real time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; MEK6318K 自动血液分析仪为日本光电公司产品; TECHNICON RA-1000 生化分析仪为美国拜耳公司产品; Real time PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品。

RNA 寡核苷酸的给药处理 小鼠实验中 RNA 寡核苷酸通过尾静脉注射和口服灌胃给药, 单次给药剂量为 10、20 和 30 mg·kg⁻¹, 两天给药一次, 持续 4 周。小鼠在给药期间每天进行称重。实验结束时, 解剖并称重腿部肌肉, 然后于液氮中保存待用, 其他新鲜组织用福尔马林溶液固定用于组织病理学分析。

Real Time PCR 检测肌肉生长调控因子的表达 取小鼠后腿肌肉, 迅速置于液氮中研磨后, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 然后进行 RT-PCR 反应, 用荧光定量 PCR 仪检测肌肉生长调控因子 Foxo-1、MyoD、GDF-8 和内参 β -actin mRNA 相对水平, 引物见表 1。PCR 反应参数为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 60 s, 40 个循环。结果中的 CT 值运用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算表达基因的相对变化。

血浆药代动力学测定 BALB/c 小鼠通过尾静脉注射剂量为 100 mg·kg⁻¹ RNA 寡核苷酸, 给药后 0、5、15、30 min 及 1、2、4、8、12、24 和 48 h 取血, 离心取上层血浆通过苯酚/氯仿抽提法提取分离 RNA 寡核苷酸。然后 RNA 寡核苷酸 5'末端通过 T₄ 多核苷酸激酶 (PNK) 被 [γ ³²P]-ATP 标记, 通过 19% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 电泳结束后凝胶置于磷屏中扫描观

Table 1 Primers used in Real-time PCR assay

Gene name	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
Foxo-1	GTACGCCGACCTCATCACCA	TGCTGTCGCCCTTATCCTTG
MyoD	GCAAGACCACCAACGCTGAT	GGTTCGGGTTGCTGGACGTG
GDF-8	CAGACCCGTCAAGAC TCCTACA	CAGTGCCTGGGCTCATGTCAAG
β -Actin	GAACCCTAAGCCAACCGTGAA	CTCAGTAACAGTCCGCCTAGAA

察结果。利用 ImageQuant 图片处理软件分析 RNA 寡核苷酸含量并绘制血浆药物浓度 (C)-时间 (t) 曲线, 用 3P97 统计软件判断房室模型, 并计算相应参数。

安全性分析 小鼠给药 4 周后取血, 进行血液学和临床生化指标分析。另取肝、脾、肾用于组织病理学分析, 用福尔马林溶液固定组织后石蜡包埋, 石蜡切片 (2~4 μm) 用苏木精和伊红 (H&E) 染色在光学显微镜下观察并拍照。

统计学方法 数据采用 SPSS 软件进行处理和分析, 统计处理以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间的比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 或者两组间的比较采用 *t* 检验对数据进行统计分析, $P < 0.05$ 为显著差异。

结果

1 RNA 寡核苷酸药效学分析

在前期研究工作中, 小鼠经静脉注射给予剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 RNA 寡核苷酸, 4 周后肌肉称重, 并提取小鼠肌肉组织 RNA, 通过 Real Time PCR 分析 Foxo-1 的 mRNA 水平, 结果表明同未修饰的 RNA 寡核苷酸相比, 修饰型 RNA 寡核苷酸作用效果更为显著 (图 1)。在此基础上, 进一步分析不同给药途径和不同剂量的修饰型 RNA 寡核苷酸在小鼠体内的作用效果。结果显示同对照相比, 不同剂量的 RNA 寡核苷酸通过静脉注射和口服给药 4 周后均能降低小鼠骨骼肌 Foxo-1 的表达 (图 2B); 分离小鼠腿部的肌肉称重, 结果显示, Foxo-1 表达被抑制的实验组与正常对照组相比较, 肌肉重量都得到了增加 (图 2A); 此外检测了 GDF-8 和 MyoD 的 mRNA 表达水平, Foxo-1 表达被抑制的实验组与正常对照组相比较, GDF-8 表达下调, MyoD 表达

上调 (图 2C、D)。

2 RNA 寡核苷酸血浆药代动力学分析

小鼠尾静脉注射剂量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的修饰型 RNA 寡核苷酸后, 多个时间点取血检测 RNA 寡核苷酸血药浓度, 通过 ImageQuant 软件分析 RNA 寡核苷酸电泳的放射自显影结果, 绘制血浆药物浓度-时间曲线, 如图 3 所示; 用 3P97 软件分析, 单次静脉注射给药后 RNA 寡核苷酸在小鼠体内的动力学过程符合线性过程, 最佳房室模型为二室模型。主要的参数如表 2 所示。

3 RNA 寡核苷酸在小鼠体内的安全性分析

小鼠实验中靶向 Foxo-1 的修饰型 RNA 寡核苷酸通过尾静脉注射和口服灌胃给药, 单次给药剂量为 10、20 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 小鼠给药 4 周后取血, 进行血液学指标和肝肾功能等生化指标检测, 各项血液参数和生化指标均正常。组织病理学分析表明, 通过光学显微镜观察分析染色后的石蜡切片, 小鼠肝脏组织肝小叶结构清晰, 索窦比例正常, 汇管区未见纤维组织增生及炎症细胞浸润; 脾脏组织结构清晰, 红髓、白髓及边缘区清晰, 未见明显异常; 肾脏组织皮、髓质分界清晰, 肾小球、肾小管、集合管、间质及肾盂粘膜均未见明显异常 (图 4)。以上结果表明, 不同剂量的修饰型 RNA 寡核苷酸对小鼠安全无不良反应。

讨论

Forkhead 转录因子家族处在调控细胞不同功能的信号通路上, 例如生长、分化和新陈代谢过程。高表达有活性的 Foxo 因子能显著诱导肌管乃至整个肌肉组织的萎缩。作者前期的研究显示通过新型修饰的 RNA 寡核苷酸抑制 Foxo-1 表达能促进正常小鼠和恶

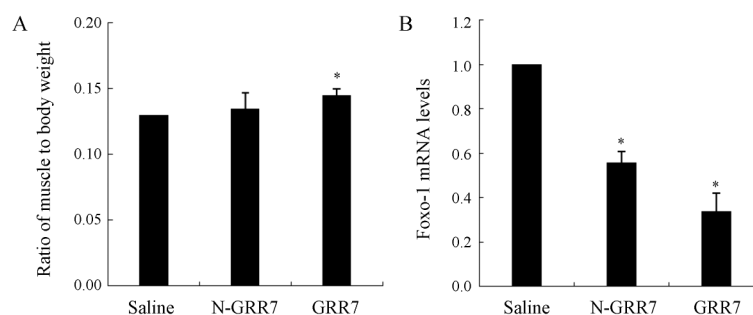


Figure 1 Effect of Foxo-1 RNA oligonucleotide on mice four weeks postadministration. A: The ratio of muscle to body weight in normal mice treated with Foxo-1 targeted RNA oligonucleotides. B: Quantitative reverse transcription-PCR analysis of Foxo-1 at mRNA level in mice. GRR7: AUGGGGUGGGACAGAGGC; N-GRR7: Non-modified GRR7. $n = 8, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs Saline

Table 2 Plasma pharmacokinetic parameters of Foxo-1 RNA oligonucleotide in mice. C_{\max} : Peak plasma concentration; $t_{1/2\alpha}$: Plasma distribution half-life; $t_{1/2\beta}$: Elimination half-life; AUC: The area under the curve; CL: Total body clearance; V_d : Volume of distribution. $n = 6, \bar{x} \pm s$

Species	$C_{\max}/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$t_{1/2\alpha}/\text{h}$	$t_{1/2\beta}/\text{h}$	$\text{AUC}/\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{CL}/\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$V_d/\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$
Balb/c	24.13 ± 2.6	0.18 ± 0.03	2.55 ± 1.0	54.17 ± 9.1	1.85 ± 0.3	6.79 ± 0.8

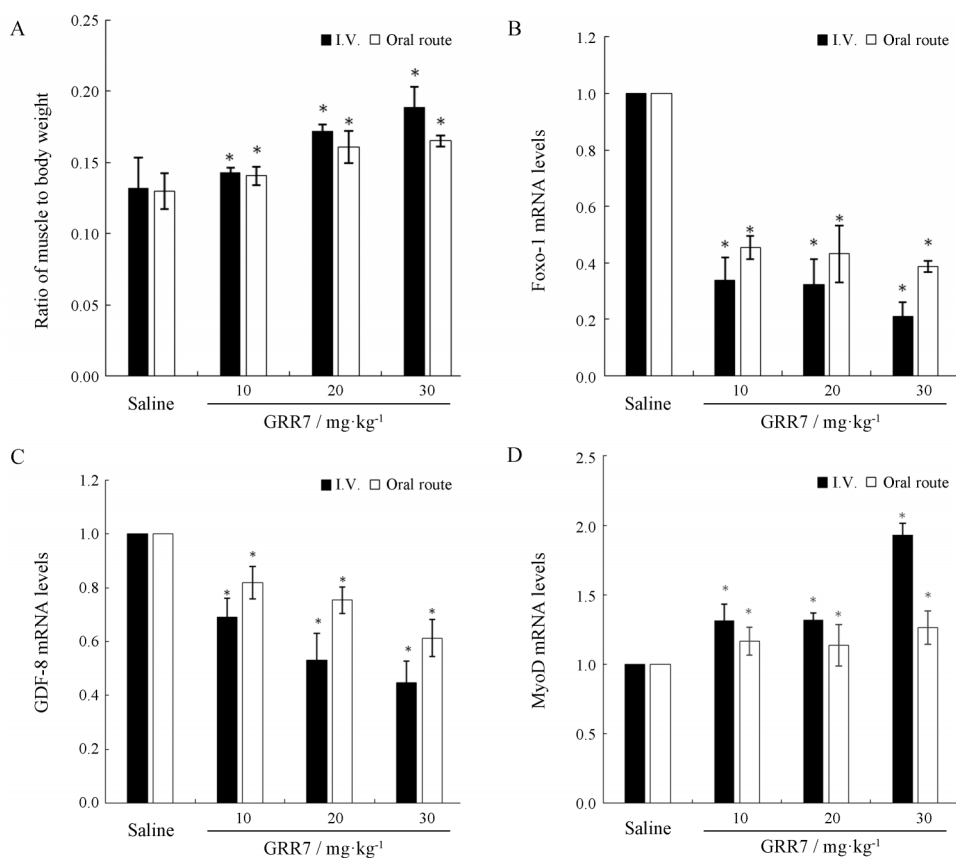


Figure 2 Effect of Foxo-1 RNA oligonucleotide on mice four weeks postadministration. A: The ratio of muscle to body weight in normal mice treated with Foxo-1 targeted RNA oligonucleotides. B: Quantitative reverse transcription-PCR analysis of Foxo-1 at mRNA level in mice. C: Quantitative reverse transcription-PCR analysis of GDF-8 at mRNA level in mice. D: Quantitative reverse transcription-PCR analysis of MyoD at mRNA level in mice. $n = 8, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs Saline

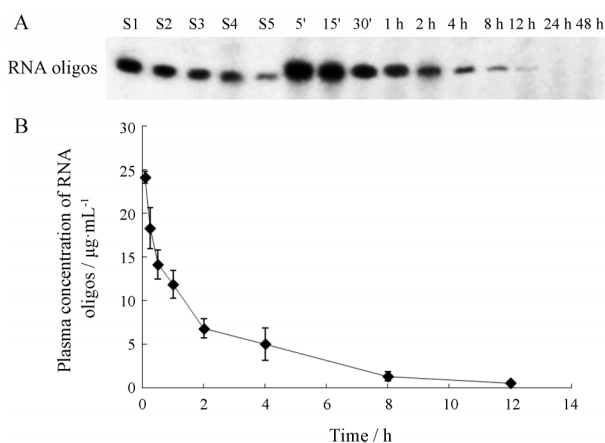


Figure 3 Plasma concentration vs time after single dose of RNA oligos. A: Representative autoradiograph showing intact in plasma at various time points after dose. S1-S5 represent 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 μg RNA oligos, respectively. B: Plasma concentration-time curve of RNA oligos. $n = 6, \bar{x} \pm s$

病理模型小鼠肌肉的增长。进一步的研究表明,抑制 Foxo-1 能够引起 GDF-8 表达下调的同时引起 MyoD 表达上调^[11,12]。

小分子 RNA 基因疗法的效果取决于它的稳定性、靶向性、转染效率和药物安全性等。为增强 RNA 寡核苷酸药物的生物稳定性,已研究探索出很多的 RNA 寡核苷酸药物的修饰方式,例如硫代核苷酸修饰 (phosphorothioated backbones, PS oligos)、2'-O 修饰、2'-甲基化修饰、2'-O-烷基、2'-C-烯丙位取代、肽核酸、*P*-己氧基、磷酸三脂、马林代、甲基磷酸脂连接等。在抗病毒和抗肿瘤的应用模型中还用到了包含 2'碱基修饰或联合修饰从而形成混合修饰骨架的寡核苷酸^[13,14]。实验还表明, 2'-OH 用甲基烯丙基、氨基、脱氧、氟代, 或 *O*-甲基基团取代都可以提高合成的寡核苷酸的稳定性和药理性质。在细胞培养和动物实验中,人们还把多个衍生物联合应用,包括 3'倒置、PS 骨架及在寡核苷酸的不同位置上的 2'-氟代-2'-脱氧嘧啶, 2'-O-甲基, 或 2'-烯丙基核酸修饰等来加强寡核苷酸的稳定性^[15-20]。

作者对寡核苷酸做了联合修饰,这种修饰增加了寡核苷酸的稳定性;并且 2'-O-甲基修饰增强了它与靶 RNA 的结合力; 3'-丁醇基修饰增强其对 3'-核酸外切酶的抵抗力。本研究在前期工作的基础上确定了靶向

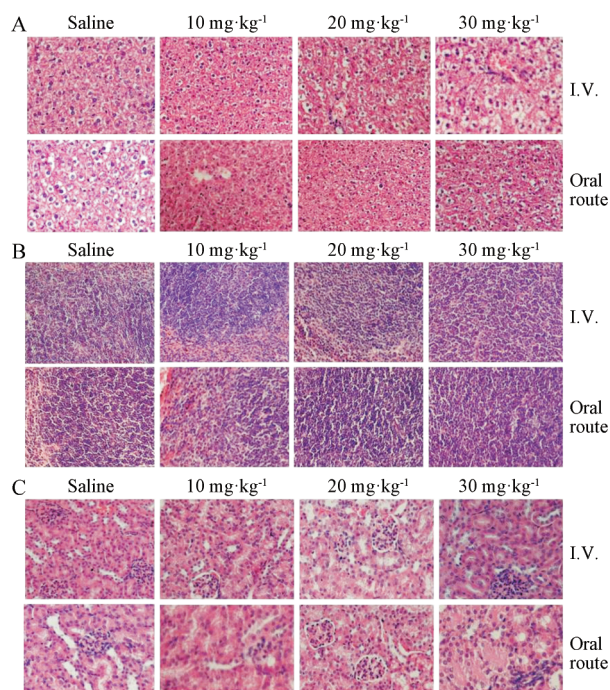


Figure 4 Histopathology of tissues from mice four weeks postadministration. These included tissues from the liver (A), spleen (B) and kidney (C). Original magnification: 200×

Foxo-1 的序列特异的 RNA 寡核苷酸。药效学研究表明,不同剂量和不同给药途径 RNA 寡核苷酸均能有效抑制小鼠肌肉 Foxo-1 的表达进而促进肌肉质量的增加。新型修饰的 Foxo-1 RNA 寡核苷酸单次静脉注射给药后在小鼠体内的动力学过程符合二室模型。安全性研究结果表明小鼠完全能耐受剂量为 10.0、20.0 和 30.0 mg·kg⁻¹ RNA 寡核苷酸。未发现小鼠的临床化学指标和组织病理分析异常,说明这种 RNA 寡核苷酸对小鼠无不良反应。

RNA 寡核苷酸已经迅速广泛地应用到基因功能研究、基因表达调控机制和抗肿瘤、抗病毒感染等热门领域,并为基因治疗开辟了全新的途径。尽管反义核酸药物的研究经历了一些坎坷,但得益于近年来化学修饰、载体递送、靶标筛选等技术的不断进步,反义核酸作为核酸药物治疗领域中开发最早、成熟度最高的一个种类,具有广阔的药物研发和应用前景。为加速 RNA 寡核苷酸的临床应用,使小 RNA 分子成功应用于生物体内,发展可被临床接受的制剂、能方便使用、高细胞转染效率、半衰期合适、细胞特异性和靶向性强的给药系统是今后研究的重要领域。

References

- [1] Liu Y, Wang X, Leng W, et al. Aspartate inhibits LPS-induced MAFbx and MuRF1 expression in skeletal muscle in weaned pigs by regulating Akt, AMPK α and FOXO1 [J]. *Innate Immun*, 2017, 23: 34-43.
- [2] Chacon Cabrera A, Fermoselle C, Urtreger AJ, et al. Pharmacological strategies in lung cancer-induced cachexia: effects on muscle proteolysis, autophagy, structure, and weakness [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229: 1660-1672.
- [3] Awad H, Nolette N, Hinton M, et al. AMPK and FoxO1 regulate catalase expression in hypoxic pulmonary arterial smooth muscle [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2014, 49: 885-897.
- [4] Iannitti T, Morales Medina JC, Palmieri B. Phosphorothioate oligonucleotides: effectiveness and toxicity [J]. *Curr Drug Targets*, 2014, 15: 663-673.
- [5] Flierl U, Nero TL, Lim B, et al. Phosphorothioate backbone modifications of nucleotide-based drugs are potent platelet activators [J]. *J Exp Med*, 2015, 212: 129-137.
- [6] Banks WA. Measurement of phosphorothioate oligodeoxynucleotide antisense transport across the blood-brain barrier [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 789: 337-342.
- [7] Lee JJA, Maruyama R, Duddy W, et al. Identification of novel antisense-mediated exon skipping targets in DYSF for therapeutic treatment of dysferlinopathy [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 13: 596-604.
- [8] Prakash TP, Yu J, Kinberger GA, et al. Evaluation of the effect of 2'-O-methyl, fluoro hexitol, bicyclo and morpholino nucleic acid modifications on potency of GalNAc conjugated antisense oligonucleotides in mice [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28: 3774-3779.
- [9] Chery J, Petri A, Wagschal A, et al. Development of locked nucleic acid antisense oligonucleotides targeting Ebola viral proteins and host factor Niemann-Pick C1 [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2018, 28: 273-284.
- [10] Osawa T, Sawamura M, Wada F, et al. Synthesis, duplex-forming ability, enzymatic stability, and *in vitro* antisense potency of oligonucleotides including 2'-C, 4'-C-ethyleneoxy-bridged thymidine derivatives [J]. *Org Biomol Chem*, 2017, 15: 3955-3963.
- [11] Liu CM, Yang Z, Liu CW, et al. Effect of RNA oligonucleotide targeting Foxo-1 on muscle growth in normal and cancer cachexia mice [J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14: 945-952.
- [12] Liu CM, Yang Z, Liu CW, et al. Myostatin antisense RNA-mediated muscle growth in normal and cancer cachexia mice [J]. *Gene Ther*, 2008, 15: 155-160.
- [13] Javanbakht H, Mueller H, Walther J, et al. Liver-targeted anti-HBV single-stranded oligonucleotides with locked nucleic acid potentially reduce HBV gene expression *in vivo* [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 11: 441-454.
- [14] Harada T, Matsumoto S, Hirota S, et al. Chemically modified antisense oligonucleotide against ARL4C inhibits primary and metastatic liver tumor growth [J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18: 602-612.

- [15] Le BT, Adams AM, Fletcher S, et al. Rational design of short locked nucleic acid-modified 2'-*O*-methyl antisense oligonucleotides for efficient exon-skipping *in vitro* [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 9: 155-161.
- [16] Toonen LJA, Casaca-Carreira J, Pellisé-Tintoré M, et al. Intracerebroventricular administration of a 2'-*O*-methyl phosphorothioate antisense oligonucleotide results in activation of the innate immune system in mouse brain [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2018, 28: 63-73.
- [17] Donner AJ, Bell TA, Greenlee S, et al. Characterization of the activity and distribution of a 2'-*O*-methoxyethyl-modified antisense oligonucleotide in models of acute and chronic kidney disease [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2018, 28: 297-306.
- [18] Yamada K, Abe Y, Murase H, et al. Synthesis and properties of 2'- OMe-RNAs modified with cross-linkable 7-deazaguanosine derivatives [J]. *J Org Chem*, 2018, 83: 8851-8862.
- [19] Shen W, De Hoyos CL, Sun H, et al. Acute hepatotoxicity of 2' fluoro-modified 5-10-5 gapmer phosphorothioate oligonucleotides in mice correlates with intracellular protein binding and the loss of DBHS proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: 2204-2217.
- [20] Istrate A, Katolik A, Istrate A, et al. 2' β -Fluoro-tricyclo nucleic acids (2'F-tc-ANA): thermal duplex stability, structural studies, and RNase H activation [J]. *Chemistry*, 2017, 23: 10310-10318.