RNA干扰药物——下一代治疗药物?

颜炳学^{1,2*}, 米玉倩¹, 崔庆为¹, 仝舟^{1,3}, Anoliefo Ijeoma Jane Francis¹, 高山^{1,4*}

1. 山西高等创新研究院, 太原 030032;

2. MCTO Biopharma LLC, Frederick MD 21703, USA;

3. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101;

4. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 苏州 215163

* 联系人, E-mail: bxueyan@hotmail.com; gaos@sibet.ac.cn

药物是人类抵御疾病的基本手段, 千百年来人类通过不断的经验总结与技术进步, 从绞而食之的古典草药到救治千万生命的青蒿素的纯化结晶, 再到如今新型青蒿素的人工改造, 科学技术革命一次次推进与实现着药物研发的革命性飞跃。然而无论是活性物质还是人工合成的药物分子, 多是通过在蛋白水平抑制或纠正致病蛋白的相关功能, 这也导致了现今依然存在许多无药可医的疾病。遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样病变(hereditary transthyretin (TTR) amyloidosis, hATTR)是一种罕见的家族性、退行性、致命性遗传疾病, 其发病率和死亡率很高。全球大约有 5 万名患者, 平均寿命为 3~15 a^[1,2]。该病一直无有效治疗药物, 直到 2018 年下半年才先后诞生了两款治疗该遗传病的药物: Patisiran 和 Tegsedi^[3~7]。它们分别以 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)及反义核苷酸(antisense oligotides, ASOs)的分子机制特异性降解或抑制致病基因, 即 TTR 信使 RNA(mRNA)的表达, 从而减少 TTR 的产生。Patisiran 作为世界上第一款 RNAi 药物, 尤为引人注目, 并于 2018 年 8 月在美国和欧洲先后被批准正式上市^[3]。Patisiran 在临床上的使用代表着一种全新类型药物应用时代的开启。首款 RNAi 药物的获批将促进以及加速这种新型药物的研发及应用。但是 RNAi 药物在载体剂型上还有着一些技术上的缺陷与不足或者是技术瓶颈^[8,9]。因此我们对此持有谨慎乐观的态度, 期望首款 RNAi 药物获批所带来的历史机遇, 能够使 RNAi 药物载体系统在技术上有重大改进或突破, 在不久的将来 RNAi 药物可以成为真正的主流药物。

1 RNAi 以及 RNAi 药物

传统意义上的基因治疗是指在基因组 DNA 水平上通过引入/敲除完整或部分基因, 或者精确改变个别 DNA 序列以达到治疗疾病的目的。近些年发展起来非常热门的 CRISPR 就是目前最重要的基因治疗/基因编辑技术手段^[10]。该技术原则上可以应用于人类所有罕见遗传病。广义的基因治疗还包括在 RNA 水平上通过对致病基因的矫正来治疗疾病, 例如 RNAi 以及 ASOs 技术。在 DNA 水平上的基

颜炳学 山西高等创新研究院特聘研究员, 美国 MCTO Biopharma 及 Yanyan Bioscience LLC 公司创始人及首席执行官。先后在美国国立卫生研究院、西弗吉尼亚大学等开展博士后研究。主要从事癌症发病、癌症抗药性机理研究以及靶向药物、寡核苷酸等抗癌新药的研发。曾获美国国立卫生

研究院 NIH The Fellows Award for Research Excellence (FARE)奖。

高山 英国牛津大学医学肿瘤学博士, 山西高等创新研究院特聘研究员, 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所研究员。中国科学院“百人计划”、山西省“百人计划”和“三晋英才”。中国农工民主党第十六届中央科技工作委员会委员(2018~2022 年), 中国生物工程学会理事(2015~2020 年)。研究方向

聚焦在肿瘤分子基础和生物标志物、药物机理和生物标志物、肿瘤免疫治疗技术和分子机理等。

因治疗是永久性甚至是一次性的, 例如最近被批准的、史上最昂贵(治疗费用 210 万美元)的用于治疗脊髓性肌萎缩症(SMA)的 Zolgensma 疗法。DNA 水平的基因治疗范围相对较窄, 如其可以用于治疗遗传病、某些特定的癌症及传染病, 而无法应用于其他由于信使 RNA 水平异常升高而导致的癌症及传染病等^[8,11]。

RNAi 是指 Andrew Fire 及 Craig Mello 发现的双链 RNA 可以靶向降解特定基因的 mRNA, 从而使该基因的蛋白表达量减少^[12]。而触发 RNAi 现象的 20~25 个核苷酸的

双链 RNA 被称为小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA), 是由 Elbashir 等人^[13]报道的. siRNA 既可以是人工合成的外源双链 RNA, 也可以是生物体自身 siRNA 前体加工而成的内源 RNA (图 1). 广义上的 RNAi 机制还包括微小 RNA (microRNA, miRNA)^[12-14]. miRNA 与 siRNA 的区别主要是 miRNA 是单链 RNA 分子, 而 siRNA 是双链 RNA 分子; miRNA 与其调控的 mRNA 序列可以不完全互补配对, 而 siRNA 的序列要与其调控的 mRNA 序列完全互补; miRNA 的调控区域多位于 mRNA 的 3'端非翻译区, 而 siRNA 的调控区域主要在 mRNA 的外显子区域. 另外, miRNA 的作用机制与 siRNA 也有些差异. siRNA 直接介入 mRNA 的降解, 而 miRNA 可以通过使 mRNA 剪切成两段、降低 mRNA 的稳定性或抑制 mRNA 翻译成蛋白的效率 3

条途径来调控基因表达^[13,15]. 通常来讲, siRNA 特异性较高, 只特异性调节某一个基因的表达. 而 miRNA 可以同时调节 1 个或多个基因或者具有共同相似序列的基因家族^[15]. 内源性的 siRNA 较少(外源性的 siRNA 几乎可以对应于每一个已知的基因), 而内源性的 miRNA 较多. 第一个 miRNA 的发现是在 20 世纪 90 年代初, 早于 siRNA 的报道^[16,17]. 但直到 21 世纪初, miRNA 才真正被人们所重视. siRNA 以及 miRNA 是目前最重要的生物学实验工具之一. 它们都可以应用在细胞以及活体动物上. 而且最重要的是它们都可以作为未来的靶向基因药物, 具有广阔的应用前景^[15,18].

人类的很多重大疾病都是由一些基因表达异常所引起的, 例如癌症、阿尔兹海默病、肝炎等. 目前的常规药

图 1 (网络版彩色) RNAi 作用机制示意图. RNAi 机制包括 siRNA 以及 miRNA 两条途径. siRNA 或 miRNA 前体在细胞核内生成后, 被输出蛋白(Exportin)转移到细胞质中. 随后这些前体分子在 RNA 诱导沉默复合体等多种功能分子的协助下被加工成 20 个左右碱基对的双链 RNA 分子. 这些双链 RNA 分子的一条链被称之为互补链, 随后被降解; 而另外一条功能链(也称为引导链)发挥基因调控功能: siRNA 主要通过降解信使 RNA 途径; miRNA 则通过剪切信使 RNA, 降低信使 RNA 稳定性以及直接抑制蛋白翻译等途径

Figure 1 (Color online) Schematic illustration of mechanisms of RNAi. RNAi mechanism includes siRNA and miRNA pathways. After produced in the nucleus, the siRNA or miRNA precursor is transferred to the cytoplasm by the export protein (Exportin). These precursor molecules are then processed into about 20 base pair double-stranded RNA molecules in the presence of related functional proteins such as RNA-induced silencing complexes. One strand of these double-stranded RNAs is called a complementary strand and is subsequently degraded. Another strand named functional strand (also known as a leader sequences) that has gene regulator roles: siRNA functions mainly through the degradation of the messenger RNA pathway; while miRNA has three different mechanisms include cutting messenger RNA; reducing stability of messenger RNA and directly inhibiting protein translation

物多数是从致病基因的蛋白水平上来治疗疾病,如蛋白抑制剂或蛋白抗体.首先RNAi药物通过RNAi机制在mRNA水平上抑制或矫正致病基因的表达而达到治疗或缓解疾病的目的^[19].RNAi技术可以调控几乎所有已知基因的表达,因此RNAi药物的应用范围非常广,可以靶向人类几乎所有重大疾病^[15].其次,RNAi药物的特异性非常强.RNAi药物是针对特定的1个或几个基因,靶向性明确、毒副作用小^[12,15].再次,RNAi药物实际上是一种在mRNA水平上的基因治疗药物.相较于在DNA水平上的基因治疗(转基因),RNAi药物属于瞬时治疗药物.因此在不需要治疗的时候可以随时停止用药^[15];而转基因治疗是在基因组DNA水平上的“永久性”治疗^[20].最后,由于RNAi药物是在mRNA水平上抑制致病基因表达,所以其可以使相应的致病蛋白无法产生或以极低水平表达^[12].RNAi药物包括靶向特定基因的siRNA以及针对特定miRNA的miRNA抑制剂^[15].目前在研发的RNAi药物主要集中于siRNA,有多达几十种处于临床试验阶段;而miRNA在研发的药物则相对较少,尤其是进入临床试验阶段的miRNA药物^[13,21].

2 ASOs 药物

ASOs药物是由12~25个核苷酸的单链DNA或RNA类似物构成的药物.ASOs药物也在mRNA水平抑制、降低特定致病基因的表达,从而阻止或减少异常表达致病蛋白的产生^[22].ASOs药物和RNAi药物都是利用基因沉默(gene silencing)机制调控基因表达的寡核苷酸药物^[23].它们也有一定区别.首先,RNAi药物是指与特定基因mRNA序列互补的双链RNA或者特定的miRNA.而ASOs药物是指与特定基因mRNA或者DNA调控序列互补的单链DNA或RNA类似物^[23].其次,ASOs药物的作用机制与RNAi药物也有所不同.ASOs药物有以下几种作用机制:(1)短的单链DNA与特定mRNA序列互补结合,激活细胞内RNA酶H(RNAase H)的活性,降解DNA/RNA杂交链中RNA,从而降低蛋白表达;(2)单链DNA与基因的5'调控序列互补结合从而阻止RNA的转录;(3)单链DNA或RNA分子结合在内含子与外显子交界处或mRNA的3'翻译调控区,从而调控mRNA的剪接或降低mRNA的翻译效率^[22,23].ASOs药物作用机制主要是以第一种RNA酶H作用方式的单链DNA为主.从以上描述可以看出RNAi药物与ASOs药物都是在基因的转录及转录后水平降低基因表达,或统称为基因沉默药物.但它们在作用机制上又有较大的区别,同时它们的发展历史和现状也不同.第一款ASOs,即基因沉默药物是用于治疗巨细胞病毒视网膜炎的Fomivirsen.它早在1998年就被美国食品药品监督管理局批准应用于临床^[24,25],比第一款RNAi药物Patisiran获批整整早了20年.在Patisiran获批的时候,Nature报道的一

篇新闻宣称Patisiran是经20年等待后的首款基因沉默技术药物^[26].实际上这是一个概念上的错误:Patisiran是首款RNAi药物,而Fomivirsen才是首款基因沉默技术ASOs药物^[25].

3 RNAi 药物的研发历程及目前面临的技术瓶颈

RNAi于1998年被发现,其仅过了8个年头,即在2006年就获得了诺贝尔生理学或医学奖,可见该技术的重要性^[27].RNAi技术不仅在实验室研究中被广泛应用,而且在细胞及实验动物上的转化应用也比较顺利.这就使人们对RNAi药物在人类疾病治疗的临床应用上产生了极大的热情,且持有过于乐观的态度.很多投资机构以及大型药物研发生产企业都对RNAi药物寄予厚望,大量的资金及研发资源涌入该领域,使RNAi药物的临床研究在大约10年前达到了顶峰^[28].但随着RNAi药物在临床应用上所遇到的,如RNAi的个别脱靶现象、RNAi药物的稳定性、组织细胞特异性、过膜性、免疫原性、安全性等技术障碍陆续出现^[21],使人们意识到RNAi药物在攻克临床应用技术难题方面还有较长的路要走.因此,一些规模较大的制药企业,如罗氏、诺华等退出或部分退出了RNAi药物领域.RNAi药物的转化也陷入低谷^[29].但历史上从来不缺乏对新技术、新科技的执着追求者.以美国Alnylam公司为首的一批RNAi药物研发企业就是其中的优秀代表.值得一提的是,Alnylam公司于2002年成立,也是首款RNAi药物Patisiran的研发及生产企业.这些RNAi药物研发企业在技术上进行革新,使RNAi药物在临床应用上的技术障碍陆续得到部分解决,逐渐使RNAi药物更接近于临床应用^[30].终于在2018年8月第一款RNAi药物Patisiran获准上市^[3].在过去的几年里,部分RNAi药物进入后期临床试验就已经极大鼓舞,而且重新燃起了人们对RNAi药物的关注及热情.不少siRNA,miRNA药物企业高调出现,使RNAi药物又逐渐成为人们关注的热点,而且其成为下一类主流药物的条件已逐渐具备^[18].因此未来10年很可能迎来RNAi药物的黄金发展期.

RNAi药物所面临的技术障碍主要在于它需要特殊的药物载体或剂型^[30].与传统药物载体不同,RNAi药物对其载体有一些更严格的要求.例如,需要能够很好地保护双链RNA分子在进入细胞过程中免受RNA酶降解;需要能够较易穿透细胞膜,甚至血脑屏障;需要对细胞有较小的伤害,同时可以对组织细胞特异性地给药;需要避免引起机体的免疫反应以及生物安全性等问题^[19,28,30].目前在临床试验中应用较多的是改进型的类脂复合物以及N-乙酰半乳糖胺连接物(GalNAc conjugate)^[29].Patisiran的药物载体就是改进型的类脂复合物.该类药物载体的缺点是细胞组织间的通透性、扩散性以及细胞的接受性、药效的持续

性还有待提高,难以突破血脑屏障,需要静脉而非皮下注射^[5]。N-乙酰半乳糖胺连接物可以提高小 RNA 进入细胞的能力,但不能从本质上提高 RNA 的稳定性及组织细胞给药的特异性;而且 RNA 药效时间较短以及安全性有待提高^[32,33]。其他类型的 RNAi 药物载体也同样面临着一些亟须克服的缺点或不足。例如,利用类病毒颗粒(virus like particle, VLP)、氨基酸或糖基多聚物修饰物、外泌体(exosomes),以及自主转运 sd-rxRNA 系统等作为 RNAi 药物载体^[34-37]。这些较常见的 RNAi 药物载体优缺点的比较见表 1。如外泌体由于它的低融性以及优先与脂性膜作用,从而降低了其生物可用性。另外,外泌体由于其本身特性还含有其他物质,例如一些蛋白和核酸,这些内容物有些已被证实具有促进癌细胞生长发育的作用。因此,外泌体的潜在致癌性也是其作为 RNAi 药物载体的一个重大障碍。最后,目前高纯度外泌体的制备技术只可用于小量纯化,大量制备所需费用极其昂贵^[36]。自主转运(self-delivery) sd-rxRNA 载体系统是美国制药企业 Phio Pharmaceuticals (RXi Pharmaceuticals)公司正在研发的一款 RNAi 药物载体。该系统是将双链小 RNA 进行一些修饰,例如连入一小段单链磷酸化的核酸分子以及一些化学修饰,以增加其稳定性、细胞扩散性等。但其同样无法进行组织细胞特异性的给药。同时在小 RNA 分子上所做的化学修饰可能对 RNA 的药效产生较大影响^[35]。综上所述, RNAi 药物载体在技术上还需要有重大改进或突破。

4 首款 RNAi 药物获批的意义

Patisiran 是世界上第一个被批准应用于临床的 RNAi 药物,可用于治疗 hATTR 的罕见遗传病^[3]。同时美国食品药品监督管理局 2018 年 8 月也批准了另外一款基于反义核苷酸的、用于治疗该疾病的基因沉默药物 Tegsedi^[4]。Tegsedi 的给药方式是皮下注射,优于 Patisiran 的静脉注射给药方式。全球该病患者大约有 5 万人, Patisiran 年度治疗

费用大约 45 万美元。因此从市场及经济效益上讲, Patisiran 很可能不是一款成功的药物^[3,5]。同时 Patisiran 的药物载体是改进型的脂质体剂型。这是早期的一项常用技术,缺点较多。目前很多制药公司或研发企业已经转向其他载体剂型,如 N-乙酰半乳糖胺连接物等。因此, Patisiran 很可能是最后一个或为数不多的几个脂质体载体 RNAi 药物。

虽然 Patisiran 的实际应用及经济效益意义不大。但作为首款 RNAi 药物,它的诞生代表着一种全新类型药物应用时代的开启,标志着在经历了 20 年的发展之后, RNAi 药物成为下一类主流药物的条件已经开始具备并将逐步走向成熟,这无疑具有划时代的意义。因此首款 RNAi 药物的正式临床应用被称为 2018 年的十大科学突破之一。尤其是 RNAi 药物在经历了前些年的低谷^[29],被很多人认为在可预见的未来其不会成为主流药物,甚至被一些业内人士“抛弃”。因此, Patisiran 被批准应用于临床必将重新燃起人们对 RNAi 药物的热情。大量的资金、研发等资源进入 RNAi 药物领域,预计该领域将很快进入一个“黄金发展期”,药物载体剂型将有所突破:在现有的载体技术上有重大改进,或者有新的载体剂型出现。将使 RNAi 药物在整个行业水平上有质的飞跃。

5 RNAi 药物的前景

美国 Alnylam 制药公司是目前 RNAi 药物领域的佼佼者。该公司还有 5 款 RNAi 药物已经进入临床 III 期试验,加上其他公司的一些进入临床 III 期试验的 RNAi 药物^[18],预计未来几年还将会有几款 RNAi 药物陆续获准应用于临床治疗。因此 RNAi 药物的发展前景比较乐观^[8]。虽然如此,如前所述, RNAi 药物成为主流药物的最主要障碍是 RNA 分子的载体剂型。目前获批以及进入临床末期的 RNAi 药物的载体主要是改进型的类脂复合物或者是 N-乙酰半乳糖胺连接物,以它们作为载体的 RNAi 药物在临床上会有一些比较好的治疗效果。但它们在技术上还有较大的缺陷,

表 1 几种 RNAi 药物剂型优缺点的比较

Table 1 Listing of shortcomings and advantages of RNAi drug delivery vehicles

载体类别	改进型类脂载体	病毒类似颗粒 VLP	外泌体(exosome)	自主转运 sd-rxRNA 系统
转染 siRNA 效率	20%~80%	20%~90%	20%~80%	50%~80%
基因调控的时效性	短	较长	较长	短
组织细胞特异性	无	有	无	无
生物安全性	高	低	中	高
免疫应激性	无	有	无	无
价格及成本	较高	低	高	较高
组织细胞间扩散, 通透性	低	高	较高	较高
转运、转染对象	DNA, RNA	DNA, RNA 或蛋白	RNA, 蛋白	RNA

例如缺乏组织细胞特异性、药效不稳定、一次用药药效时间短等。另外,其他在研发的几种载体剂型如类病毒颗粒VLP、氨基酸或糖基多聚物修饰物、外泌体以及自主转运sd-rxRNA等也都存在这样或那样的不足^[8,15,19]。因此, RNAi药物的前景主要取决于未来5~10年内是否能在载体剂型上有技术上的突破。如果在中短期内能够解决目前所用载体剂型的缺陷或者有新的更好的剂型出现, RNAi药物则会成为主流药物;反之, RNAi药物将仅限于治疗没有有效治疗药物的罕见遗传病等小众疾病上, RNAi药物的命运就会如同今天的ASOs药物。首款ASOs药物Fomivirsen在1998年获批至今已经超过20年^[24]。这期间虽然陆续有一些ASOs药物被批准应用于临床,但ASOs药物没有也不可能成为主流药物,且ASOs药物目前已经不再是生物制药领域的热点。所以RNAi药物如果在未来中短期内不能解决载体剂型的技术问题,人们在这个领域的热情就会逐渐减弱, RNAi药物的未来很可能就如同ASOs药物目前的状况。

综上所述, RNAi药物的未来在很大程度上取决于今

后中短期内是否在剂型的技术问题上有所发现。一旦RNAi药物的载体剂型有所突破,则RNAi药物就会迅速应用于癌症、艾滋病、阿尔兹海默病、肝炎等几乎人类所有重大疾病上。使RNAi药物在整体行业的水平上实现突飞猛进的发展,那时RNAi药物才会真正成为主流药物。因此希望借助首款RNAi药物获批所带来的巨大热情,以及由此带来的有利条件(很多制药企业、研发单位以及投资机构目前对RNAi药物都抱有极大的希望),使RNAi药物的载体有突破性的改进或发现。另外,目前美国在RNAi药物领域处于绝对领先地位。我国在该领域的投资、研发也逐渐受到重视,如苏州瑞博生物技术有限公司是我国在RNA干扰领域的主要开拓者。最后,我们认为RNAi药物的研发,尤其是载体剂型,应该与ASOs药物相联系。这两类药物本质属于同一类,即基因沉默的靶向基因治疗药物。它们可以利用相同或相似的载体。目前的ASOs药物不需要特殊的载体,但如果有合适的载体应该可以弥补目前ASOs药物的缺陷。希望在不久的将来, RNAi及ASOs药物能够成为常规主流药物,共同造福人类。

致谢

感谢山西转型综合改革示范区科技创新项目(2017KJCX01)、山西“百人计划”、国家自然科学基金(81773023)、国家重点研发计划(2016YFC302100)、中国科学院B类战略性先导科技专项(XDB29040103)、中国科学院前沿科学重点研究计划(QYZDB-SSW-SMC038)和中国科学院科研仪器设备研制项目(YJKYYQ20180032)资助。

推荐阅读文献

- 1 Wang A K. Amyloid neuropathy: A peculiar form of peripheral neuropathy. *Arch Neurol*, 2001, 58: 822–823
- 2 Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy; familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain*, 1952, 75: 408–427
- 3 Hoy S M. Patisiran: First global approval. *Drugs*, 2018, 78: 1625–1631
- 4 Keam S J. Inotersen: First global approval. *Drugs*, 2018, 78: 1371–1376
- 5 Adams D, Gonzalez-Duarte A, O’Riordan W D, et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*, 2018, 379: 11–21
- 6 Benson M D, Waddington-Cruz M, Berk J L, et al. Inotersen treatment for patients with hereditary transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*, 2018, 379: 22–31
- 7 Wood H. FDA approves patisiran to treat hereditary transthyretin amyloidosis. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14: 570
- 8 Setten R L, Rossi J J, Han S P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 421–446
- 9 Zhang C, Wang X W, Wang L, et al. The mystery of “junk” DNA (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2016, 61: 3079–3084 [张常, 王新文, 王亮, 等. “垃圾”DNA的奥秘. *科学通报*, 2016, 61: 3079–3084]
- 10 Maeder M L, Gersbach C A. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol Ther*, 2016, 24: 430–446
- 11 Keeler A M, ElMallah M K, Flotte T R. Gene therapy 2017: Progress and future directions. *Clin Transl Sci*, 2017, 10: 242–248
- 12 Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806–811
- 13 Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, 15: 188–200
- 14 Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281–297
- 15 Chakraborty C, Sharma A R, Sharma G, et al. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from bench to clinic as next generation medicine. *Mol Ther Nucl Acids*, 2017, 8: 132–143

- 16 Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75: 843–854
- 17 Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 75: 855–862
- 18 Titze-de-Almeida R, David C, Titze-de-Almeida S S. The race of 10 synthetic RNAi-based drugs to the pharmaceutical market. *Pharm Res*, 2017, 34: 1339–1363
- 19 Haussecker D. Current issues of RNAi therapeutics delivery and development. *J Control Release*, 2014, 195: 49–54
- 20 Kaufmann K B, Büning H, Galy A, et al. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med*, 2013, 5: 1642–1661
- 21 Rupaimoole R, Slack F J. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 203–222
- 22 Chan J H, Lim S, Wong W S. Antisense oligonucleotides: From design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33: 533–540
- 23 Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc J*, 2016, 4: 35–50
- 24 Fomivirsen approved for CMV retinitis: First antisense drug. *AIDS Treat News*, 1998, 302: 7
- 25 Roehr B. Fomivirsen approved for CMV retinitis. *J Int Assoc Phys AIDS Care*, 1998, 4: 14–16
- 26 Ledford H. Gene-silencing technology gets first drug approval after 20-year wait. *Nature*, 2018, 560: 291–292
- 27 Couzin J. Method to silence genes earns loud praise. *Science*, 2006, 314: 34
- 28 Lares M R, Rossi J J, Ouellet D L. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. *Trends Biotechnol*, 2010, 28: 570–579
- 29 Couzin-Frankel J. Roche exits RNAi field, cuts 4800 jobs. *Science*, 2010, 330: 1163
- 30 Roberts T C, Ezzat K, Andaloussi S E L, et al. Synthetic SiRNA delivery: Progress and prospects. *Methods Mol Biol*, 2016, 1364: 291–310
- 31 Foster D J, Brown C R, Shaikh S, et al. Advanced siRNA designs further improve *in vivo* performance of GalNAc-siRNA conjugates. *Mol Ther*, 2018, 26: 708–717
- 32 Whitehead K A, Langer R, Anderson D G. Knocking down barriers: Advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8: 129–138
- 33 Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: A progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet*, 2015, 16: 543–552
- 34 Gao Y H, Tang Y G, Huang Y H, et al. Exosome: A rising star in the era of precision oncology (in Chinese) *Chin Sci Bull*, 2018, 63: 57–64 [高弈航, 唐玉国, 黄映辉, 等. 外泌体: 精准肿瘤学的明星. *科学通报*, 2018, 63: 57–64]
- 35 Ly S, Navaroli D M, Didiot M C, et al. Visualization of self-delivering hydrophobically modified siRNA cellular internalization. *Nucl Acids Res*, 2017, 45: 15–25
- 36 Shahabipour F, Barati N, Johnston T P, et al. Exosomes: Nanoparticulate tools for RNA interference and drug delivery. *J Cell Physiol*, 2017, 232: 1660–1668
- 37 Byrne M, Tzekov R, Wang Y, et al. Novel hydrophobically modified asymmetric RNAi compounds (sd-rxRNA) demonstrate robust efficacy in the eye. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2013, 29: 855–864

Summary for “RNA 干扰药物——下一代治疗药物?”

RNAi drugs: Next generation drugs?

Bingxue Yan^{1,2*}, Yuqian Mi¹, Qingwei Cui¹, Zhou Tong^{1,3}, Anoliefo Ijeoma Jane Francis¹ & Shan Gao^{1,4*}

¹ Shanxi Academy of Advanced Research and Innovation, Taiyuan 030032, China;

² MCTO Biopharma LLC, Frederick MD 21703, USA;

³ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁴ Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China

* Corresponding authors, E-mail: bxueyan@hotmail.com; gaos@sibet.ac.cn

Gene therapy aims to apply biotechnological techniques to correct a defective gene through administering therapeutic nucleic acids or editing a defective gene. The approaches used in gene therapy include traditional transgene, genome editing, such as CRISPR/CAS9, RNA interference (RNAi) and antisense oligonucleotides (ASOs), etc. Gene therapy is promising as a main approach of disease treatment in the future. Particularly, RNAi is a potential rising-star in this field.

RNAi is a biological phenomenon in which small RNA molecules inhibit gene expression at post-transcriptional level. There are two categories of RNA molecules, which include small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs). Both RNA types can induce gene silencing through distinct mechanisms, such as degrading mRNA, decreasing mRNA stability, or preventing protein translation. The major difference between siRNAs and miRNAs is that siRNAs are double stranded RNAs with completely paired sequences and high specificity for its targeted mRNA, whereas miRNAs are single stranded RNAs with incomplete complementary sequences and multiple targets on mRNAs. When compared with traditional therapeutic drugs which target defective proteins, siRNA and miRNA drugs offer advantages, such as higher specificity, lower toxicity, and easy manipulation of the defective genes of interest, etc. ASOs technique is another approach to silence a gene at the post-transcriptional level by several mechanisms including recruiting RNase H to cleave and degrade the targeted mRNA, alternative splicing, blocking translation, or binding to miRNA to regulate gene expression.

The first-ever RNAi drug was approved in the United States and Europe in 2018, a significant milestone in pharmacology which represents an era of a new type of drug. This event has been nominated as one of the top ten 2018 scientific breakthroughs. Apparently, it is expected that several other RNAi drugs will be approved for marketing in the near future. The first siRNA drug was used on a rare genetic disease that only affected about 50000 people worldwide. The major obstacle to widely-spread use RNAi drugs is the low delivery efficiency of small RNA molecules into cells or tissues. Various approaches have been developed for RNAi drug delivery *in vivo* including nanoparticles, cationic lipids, viruses, and polymers. However, they all have limitations for therapeutic applications. The first ASO drug was approved in 1998. Several other ASO drugs were approved in the following twenty years. However, the ASOs drugs have not become a mainstream drug yet due to some limitations other than delivery vehicle, such as adverse side effects from both on-target and off-target toxicities. The RNAi drugs and ASOs drugs may face similar problems in wide clinical applications.

The approval of the first RNAi drug will greatly pave a way for the development of more RNAi drugs. We expect current technical hurdles in RNAi delivery will be resolved in the near future and RNAi drugs will become mainstream as next generation drugs.

RNAi, gene silence, delivery vehicle, gene editing, antisense oligonucleotide

doi: 10.1360/TB-2019-0211