

综述



姜海, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心研究员, 博士生导师。实验室主要从事疾病靶点的发现和新型药物的筛选开发。研究聚焦于肿瘤等重大疾病中驱动蛋白的分子胶降解剂的开发, 发展了新型高通量筛选体系, 近期也针对RNA领域的小分子药物的筛选建立了新型高通量体系。

RNA领域的小分子药物筛选和应用

陈硕^{1#}, 杨曼^{1#}, 姜海^{1,2*}

(¹中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海生物化学与细胞生物学研究所, 核糖核酸功能与应用重点实验室, 中国科学院大学, 上海 200031; ²国科大杭州高等研究院生命与健康科学学院, 浙江省系统健康科学重点实验室, 中国科学院大学, 杭州 310024)

摘要: 随着对疾病机制的深入研究, RNA的表达、剪切、翻译、稳定性调控等过程已成为疾病干预的新型靶点, 为代谢疾病、遗传疾病、肿瘤患者提供了新的治疗模式, 并产生了数种创新药物。在RNA药物领域, 除了siRNA和反义寡核苷酸, 小分子药物也提供了越来越多的成功案例, 并且出现了RIBOTAC等新型药物模式。目前, RNA领域的小分子药物已实现了对于RNA的转录、剪切、转运、翻译、稳定性调控等多个生物学过程的靶向调控。本文综述了不同作用机制的RNA领域小分子药物的发展现状, 并介绍以RNA为目标的小分子药物的筛选方法。

关键词: 小分子药物; 遗传疾病; RNA稳定性; RNA剪切; RNA翻译; 药物筛选体系

Screening and application of small molecule drugs targeting RNA biology

CHEN Shuo^{1#}, YANG Man^{1#}, JIANG Hai^{1,2*}

(¹Key Laboratory of RNA Innovation, Science and Engineering, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ²Key Laboratory of Systems Health Science of Zhejiang Province, School of Life Science, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China)

Abstract: Deepening understanding of disease mechanisms has made RNA biology a promising field for drug development. By intervening with RNA expression, splicing, translation etc, new therapeutic modes have

收稿日期: 2024-06-25

基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFA050022)

#共同第一作者: 陈硕, E-mail: chenshuo2019@sibcb.ac.cn; 杨曼, E-mail: yangman2022@sibcb.ac.cn

*通信作者: E-mail: hai@sibcb.ac.cn

been established for metabolic diseases, inherited diseases and cancer, and several drugs have been approved for patients. In the RNA medicine field, aside from siRNA and antisense oligonucleotide, small molecule has yielded successful drugs, and new modules such as RIBOTAC are also emerging. Existing small molecules can modify many steps of RNA biology, including its transcription, splicing, transport, translation and stability control. In this review, we discuss small molecule drugs targeting these different aspects of RNA biology and introduce screen methods for discovering RNA-targeting small molecule drugs.

Key Words: small molecule drugs; inherited disease; RNA stability; RNA splicing; RNA translation; drug screen method

作为生命信息传递过程中的核心中间环节, RNA可为疾病治疗提供新的干预对象。RNA的转录、剪切、转运、翻译等多个过程中所涉及的重要生物学机制都有可能成为疾病治疗的切入点, 并已为一些疾病的治疗提供了多个新型靶向药物。

疾病靶向治疗的目的通常是抑制或恢复某些关键蛋白的活性, 以RNA为目标的药物类型也可实现目标基因的失活或激活。例如, 针对一系列代谢疾病关键基因的siRNA通过降解其目标基因的RNA, 已在高血脂、高血压等疾病的治疗中产生了较好的治疗效果。另一方面, 利用小分子药物或反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)可以通过改变目标RNA的剪切、翻译等过程, 实现对目标基因的激活, 从而治疗某些疾病。本文重点阐述以RNA为调控对象的小分子药物的研发过程和未来展望。

1 以RNA为靶点的核酸药物概述

以细胞中RNA为干预靶点的核酸药物包括siRNA^[1,2]、ASO^[3]等。siRNA在细胞内的主要治疗效应是促进目标基因RNA的降解。由于siRNA自主穿过细胞膜的能力较弱, 需要包裹入纳米脂质体颗粒^[4,5]或进行特定的修饰^[6], 使其获得进入细胞的能力。例如, 肝脏细胞高表达ASGPR1 (asialoglycoprotein receptor 1), 该受体可以结合N-乙酰半乳糖胺(N-acetylgalactosamine, GalNAC)修饰的蛋白质并将其内吞。因此, 将siRNA进行GalNAC修饰后, 可以通过ASGPR高效地进入肝脏细胞并对其中的目标基因进行敲减^[7]。由于某些疾病的关键调控因子在体内主要由肝脏表达, 通过

GalNAC-siRNA系统可以实现相关疾病的治疗, 如以前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin/Kexin type 9, PCSK9)为靶标、治疗高胆固醇血症的siRNA药物Inclisiran^[8]和以血管紧张原素(angiotensinogen, AGT)为靶点、治疗高血压的siRNA药物Zilebesiran^[9]等。如何实现siRNA在肝脏以外的靶标器官的有效递送, 目前仍是技术难点和研究热点。

与siRNA药物类似, ASO药物可用于目标基因的敲减^[3]。此外, ASO也可与pre-mRNA结合, 改变其剪切过程, 在某些情况下可以实现目标基因的功能纠正和重新激活。与siRNA相比, ASO进入细胞的能力相对较强, 能驻留于靶标器官或组织, 可以实现疾病的治疗。通过定期鞘内注射的方法, 可以将ASO递送至中枢神经系统, 用于治疗脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)^[10]。然而, 这一治疗方式对于患者较不友好, 对于医疗条件的要求也较高, 一些欠发达地区的患者存在治疗方法可及性的问题。

2 以RNA为靶点的小分子药物

与siRNA和ASO不同, 小分子化学药物相对容易实现口服, 因此以RNA为靶点的小分子药物也越来越多地受到研发领域的关注。这些小分子药物的工作机制包括RNA剪切的干预、RNA翻译的干预以及RNA稳定性的干预等^[11-13]。

2.1 靶向RNA剪切的小分子药物

SMA是一种由于SMN1(survival of motor neuron 1)基因失活导致肌肉无力、萎缩的疾病, 发病率为1/10 000~1/6 000^[14]。SMN1基因的结构较为复杂, 存在多个重复序列, 因此较易发生重排和删除。

据估算,人群中携带该基因突变的比率约为1/40,因此存在产生*SMN1*基因突变纯合子后代的几率^[15]。

*SMN1*编码的蛋白质称为运动神经元存活蛋白。该基因失活后会造成脊髓前角运动神经元的退化,导致患者的肌肉无力和肌肉萎缩^[16]。人类基因组中存在一个与*SMN1*高度类似的基因*SMN2*^[17]。该基因与*SMN1*之间存在一个碱基差异,导致*SMN2*的第7号外显子难以被剪切入成熟mRNA。在这种情况下,*SMN2*蛋白的第8号外显子的阅读框被改变,产生了一个导致蛋白质迅速降解的氨基酸序列,因此,细胞中*SMN2*蛋白处于一个快速降解、功能较低的状态^[17,18]。

尽管*SMN2*是一个存在重大缺陷的基因,对于*SMN1*突变的患者,细胞中残存的*SMN2*蛋白所提供的功能补偿仍然至关重要。临床研究发现,*SMN2*拷贝数较多的SMA患者的临床表现相对较轻,多在30~50岁时发病,肌肉无力的进展较慢,整体不影响寿命。*SMN2*拷贝数较少甚至缺失的SMA患者中,其*SMN1*基因突变的恶性后果难以由*SMN2*进行补偿,患者难以存活至成年,甚至寿命小于两岁^[18,19]。

基于上述的疾病机制,通过纠正RNA剪切、

提高*SMN2*的功能,可以对SMA患者中*SMN1*的失活提供补偿,并实现治疗效果。诺西那生钠(Nusinersen)是Biogen研发的一种鞘内注射ASO药物,通过纠正*SMN2*的第7号外显子的剪切,可在细胞中生成全长且稳定的*SMN2*,从而治疗SMA患者^[10,20]。通过小分子化学药物对*SMN2*剪切的干预也已实现(图1)。PTC Therapeutics公司通过对近20万个化合物进行筛选,发现了能够纠正*SMN2*第7号外显子剪切的化合物^[21],后续经过药效、神经组织亲和性等多个层面的优化,成功开发了用于治疗SMN的口服小分子药物利司扑兰(Risdiplam)。该药物也是第一个患者可以自行使用的SMN药物,体现了靶向RNA的小分子药物的可行性和在治疗方式上与核酸药物的差异性^[22]。

在分子机制上,利司扑兰通过与剪切体相互作用,实现对*SMN2*基因剪切过程的调控。利司扑兰的化学基团一方面可以与*SMN2*第7号外显子的剪切位点选择性地结合;一方面又可以与剪切体复合物相互作用,形成稳定的三元剪切复合物,提高*SMN2*的第7号外显子被剪切入成熟mRNA的几率^[23]。这一分子机制为小分子剪切调节剂的研发提供了重要启示。作为一种药物,利司扑兰在患者体内的半衰期较短,因此仍存在发展不同化合

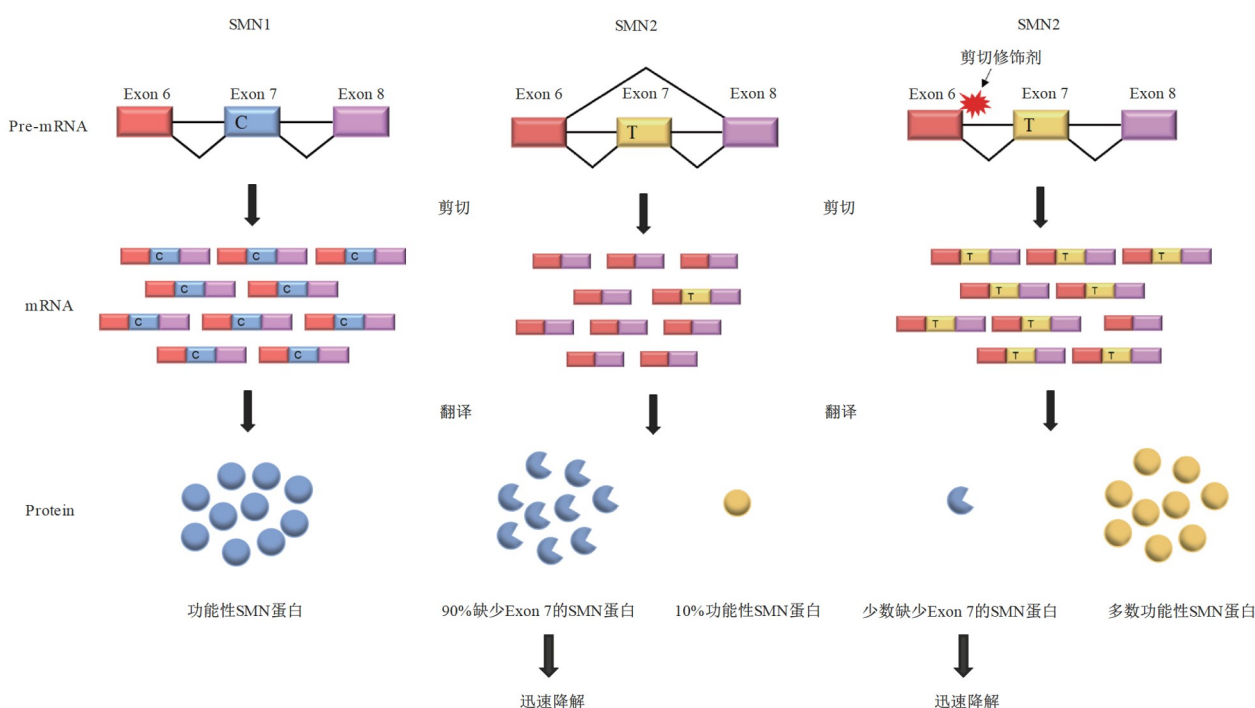


图1 SMA的疾病机理以及药物治疗机制

物骨架、不同机制的SMN2剪切干扰剂,与利司扑兰联用以进一步提高治疗效果的可能。另一方面,如果能够发展小分子药物,减缓缺乏第7号外显子的SMN2蛋白的降解,也有可能为SMA患者提供额外的治疗机会。

2.2 靶向RNA翻译的小分子药物

依据疾病机制的不同,靶向mRNA的小分子药物可实现抑制或激活目标基因翻译的效果。首先,很多遗传疾病是由于关键基因的突变,干扰其所编码的蛋白质的表达或功能,从而导致某些重要生理功能的丧失。据估算,约11%的遗传疾病是由于目标基因上出现无义突变,导致基因中提前出现了终止密码子(premature stop codon)^[24,25]。通过特定的小分子药物干扰mRNA翻译过程中对这些提前出现的终止密码子的响应机制,有可能使这些无义突变的位点被通读,并在细胞中重新产生全长蛋白。这一治疗理念是目前遗传疾病的重要研究方向。

杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种由于X染色体上DMD(Dystrophin)基因失活导致的伴性遗传疾病,发病率为1/5 000~1/3 000。DMD基因编码的蛋白质能够与微丝蛋白结合,在连接细胞骨架与细胞外基质过程中起重要作用。DMD患者中,肌肉功能随年龄增长逐渐丧失,在婴幼儿时期表现为进行性肌肉萎缩导致频繁跌倒,逐渐进展到晚期阶段(20~30岁)时的呼吸肌无力,严重影响患者生存质量,并最终导致患者死于心衰或呼吸衰竭^[26]。

DMD基因的失活方式包括移码突变、无义突变等。对于移码突变的患者,可以通过ASO药物使mRNA剪切时跳过发生移码突变的外显子,在细胞中产生删除了一些氨基酸序列、仍保持原有阅读框架的DMD蛋白,从而改善肌肉细胞功能^[27]。约13%的DMD患者中DMD的失活原因是由于无义突变,对于此类患者,无义突变的通读剂是治疗的可行途径之一^[28]。Welch等^[29]筛选了约80万个低相对分子质量化合物,从中发现了能够通读无义突变的苗头化合物,并进一步发展成为药物PTC124(Ataluren),目前该药物在欧洲已获批用于治疗DMD患者^[27,28]。

在分子机制上,mRNA翻译过程中对于提前出

现的终止密码子具有内在的响应机制。PTC124通过干扰这一机制,使细胞能够通读异常的终止密码子,促进DMD的表达。在mRNA的翻译过程中,终止密码子UAA、UAG、UGA被eRF1/ETF1(eukaryotic translation termination factor 1)-eRF3(eukaryotic peptide chain release factor subunit 3)复合体识别,导致核糖体翻译的终止。这一复合物还会进一步招募UPF1(up-frameshift 1)蛋白,从而启动无义突变介导的mRNA降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD),对mRNA进行质量检测^[30-32]。如果发现该终止密码子属于提前出现的异常终止密码子,mRNA将通过NMD机制被降解,从而进一步降低异常的蛋白截短体的产量。对于发生了无义突变的遗传病患者而言,上述的mRNA质量监控机制导致突变基因无法表达,可以作为治疗的切入点。PTC124可能是通过干扰eRF1-eRF3复合物中的蛋白相互作用使细胞能够通读提前出现的终止密码子(PTC),在细胞中重新表达目标蛋白(图2)。至于基因中正常位置的终止密码子,由于其后3'UTR的PolyA等结构具有额外的识别响应机制,PTC124对正常的终止密码子的影响较少,因此不会广泛干扰正常基因的翻译终止过程。其中的机制可能是由于核糖体在PTC处的停顿时间比正常终止密码子的停顿时间更长,从而使得PTC124能偏好性地通读PTC处的终止密码子^[28]。

PTC124作为第一个获批用于治疗遗传疾病的小分子通读药物,为多种遗传疾病的治疗提供了新的可行方向^[33]。然而,PTC124对于终止密码子的通读效率仍然较低^[34,35],其临床效果未能得到美国FDA的认可,这一领域仍有产生更高效药物或不同机制药物的可能。在一些研究中,eRF3的靶向降解剂被证明能够促进带有无义突变的基因表达^[31]。然而,eRF3作为靶点可能具有血液毒性等问题,其在遗传疾病治疗中的可行性仍然有待验证。此外,氨基糖苷类药物如庆大霉素、G418等可与核糖体相互作用,在细胞水平实验中能够产生远优于PTC124的终止密码子通读活性^[34],然而这类药物的耳毒性、肾毒性限制了它们在遗传病治疗中的应用。新发展的氨基糖苷类衍生物如Exaluren的毒性较低^[36],目前正在一些遗传疾病中

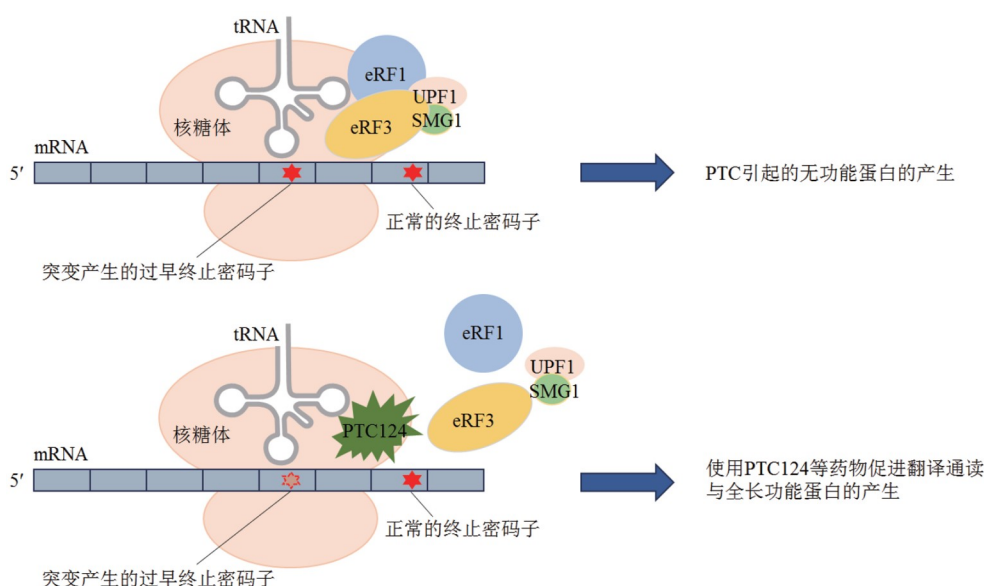


图2 终止密码子通读剂对遗传疾病的治疗机制

开展临床试验。

如前所述,提前出现的终止密码子之所以导致蛋白质无法合成,是由eRF1-eRF3复合物的识别导致核糖体翻译终止,以及其后激活的NMD机制对mRNA的降解共同实现的。因此,各种终止密码子的通读剂在研发过程中也可以考虑与NMD的抑制剂联用,从而增加mRNA浓度、进一步提高蛋白质表达效果。NMD抑制剂领域目前已有一些小分子药物,但它们在遗传疾病治疗过程中的安全性和有效性有待临床验证。

一些研究发现,mRNA的翻译过程也可作为药物干预的位点。例如,PCSK9蛋白可以与低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)结合,减少其在肝脏细胞表面的数量,从而限制肝脏从血液中吸收低密度脂蛋白的能力^[37,38]。通过干预PCSK9可以增加肝细胞表面的LDLR,降低血液中低密度脂蛋白的浓度,从而治疗动脉粥样硬化及其相关的心脑血管疾病。目前,PCSK9的治疗药物包括PCSK9单抗^[39]和PCSK9 siRNA^[37-41],干扰PCSK9-LDLR相互作用的小分子药物和环肽药物也已进入后期临床实验。有趣的是,Lintner等^[42]在一个以PCSK9表达为干预靶点的小分子化合物筛选过程中,发现一个小分子PF-06446846能够特异地阻断PCSK9的翻译。后期的机制研究表明,当PCSK9翻译至第34位氨基酸时,该小分子能够阻

断核糖体的翻译,并且这一过程具有高度选择性。尽管PCSK9已有多个较为成熟的治疗方法,这一研究仍然指出了一种全新的治疗干预模式,即在化学上有可能在mRNA翻译过程中实现相对特异的翻译抑制,这一方法有可能在未来被用于攻克其他疾病靶点。

上述研究实现了特异性的mRNA翻译抑制。此外,mRNA翻译过程中的重要公用蛋白也可以作为肿瘤等疾病的治疗靶点。例如,mTOR抑制剂可以大幅降低细胞中依赖于cap的mRNA的翻译效率,从而减少myc、cyclinD1等蛋白质的丰度,实现抑制肿瘤的效果^[43,44]。mRNA翻译过程中的其余一些核心蛋白如4EBP1、eIF4A等也是肿瘤治疗领域的研究热点^[43]。临床用于治疗白血病的高三尖杉酯碱也被认为通过干扰蛋白合成,实现其抗癌效应^[45,46]。

2.3 干扰mRNA稳定性的小分子

RNA的一级序列和二级、三级结构使其具有被小分子化合物特异性识别的可能性。有研究证明,小分子可以实现对于RNA的相对特异性结合^[13]。然而,目前认为,RNA与小分子的结合力并不足以干扰核糖体对mRNA的翻译,因此RNA结合分子需要与其余的效应基团联合,实现对RNA功能的干预。例如,RIBOTAC(ribonuclease-targeting chimeras)分子中,一侧是能与目标RNA结

合的小分子, 另一侧是结合Ribonuclease的小分子。在这一杂合分子的作用下, 可将目标RNA招募至Ribonuclease附近, 引发目标RNA的降解, 从而在细胞水平上实现基因的功能性失活(图3)^[47,48]。是否能够通过这一方法, 实现体内的基因失活, 需要进一步的探索和优化。

2.4 干预RNA转录的药物

许多基因的mRNA转录涉及信号通路、转录因子和RNA聚合酶的激活。上述过程中的蛋白质等大分子也可成为疾病治疗的切入点。如雷公藤甲素可以促进RNA聚合酶 II 中的Rpb1亚基的磷酸化和降解, 从而抑制基因的转录^[49]。通过广谱抑制基因表达, 雷公藤甲素可以抑制免疫细胞的增殖, 目前被用于治疗风湿性关节炎、强制性脊柱炎等^[49,50]。此外, 以前述的PF-06446846为参照, 基因转录过程中是否也存在一些小分子化合物可以通过特异性地靶向目标基因上的某些碱基序列, 实现更为特异的基因表达抑制, 是一个非常有趣的问题。如果在化学空间上能够实现这一可能性, 将可能为疾病的靶向治疗提供一个全新的切入点。

2.5 干预mRNA转运的药物

mRNA剪切完成后, 需要被转运出细胞核, 并在细胞质中完成蛋白质的翻译。核转运蛋白如XPO1等被发现参与了MYC、CCND1等基因的mRNA的出核转运。XPO1的抑制剂selinexor已获批用于骨髓瘤、淋巴瘤等的治疗^[51,52]。这一药物同时也干扰蛋白质等生物大分子的核转运过程。目前尚不清楚其对于mRNA转运的干扰对selinexor疾病治疗效果的贡献程度。

2.6 干扰非编码RNA功能的小分子

前述的几种药物类型通过干扰RNA的生命周

期中的各个节点, 最终改变RNA编码的蛋白质的表达情况, 实现疾病的治疗。除此之外, 一些在疾病中起到核心作用的非编码RNA也可作为小分子的调控对象, 用于疾病治疗的探索。Xist是一个X染色体失活过程中的重要长链非编码RNA, 是一些疾病的潜在治疗靶点。Xist上的RepA结构域负责招募表观遗传调控酶, 导致X染色体上的基因发生沉默。一项研究发现了一个能够与RepA结合的小分子化合物, 可以阻止Xist对相关表观遗传调控酶的招募, 并在胚胎干细胞模型中抑制X染色体失活^[53]。另外, 一些研究以microRNA(miRNA)为靶点, 通过RIBOTAC方式也可以实现miRNA的靶向降解^[48]。

3 以RNA为靶点的小分子药物的研发方法

与蛋白质领域相比, RNA领域的小分子药物调控是一个相对较新的研究方向。上述的几种药物模式中, 如何发现相应的苗头化合物是研究过程的关键。目前常用的方法包括细胞表型筛选和生化实验筛选。

首先, 对于目标基因RNA的功能状态是否被小分子化合物调控, 可以通过对该基因编码的蛋白质的检测, 转化为细胞表型实现筛选。例如, 在终止密码子通读剂PTC124的筛选过程中, 研究者将提前出现的终止密码子内置于luciferase的基因框架中, 通过检测luciferase活性, 可以筛查哪些化合物能够促进终止密码子的通读^[29]。类似的, 在SMN2剪切调控剂的筛选过程中, 研究者设立了一个筛选体系, 仅当SMN2的第7号外显子被成功剪切入mRNA时, 细胞才能表达luciferase^[21]。通过这一筛选体系, 在20万个化合物中得到了近2 000个hit, 并最终筛选出了药物利司扑兰。在PCSK9翻

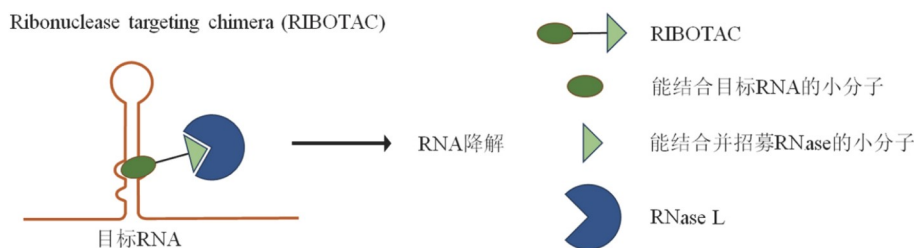


图3 通过RIBOTAC降解目标RNA的机制

译抑制剂PF-06446846的筛选过程中,研究者通过对化合物处理后的细胞上清中的PCSK9进行ELISA检测,发现了哪些化合物能够干扰PCSK9的表达^[42]。上述的基于细胞表型的筛选产生了成功的案例,但也存在操作繁琐、特异性不足的问题。例如,PTC124的后续研究发现,该化合物能够被筛选出来,除了其对于终止密码子的通读效应外,这一化合物本身就可以与luciferase报告基因作用从而稳定luciferase^[54],因此,筛选的阳性表型可能不只源于该化合物对终止密码子的通读能力。ELISA检测涉及多个抗体的结合、洗脱过程,较难进行超大规模文库的筛选。如果能够开发更为简便、有效且表型明确的细胞表型筛选体系,可能有助于发现更好的RNA靶向药物,提高治疗效果。

对于以RNA分子为直接结合目标的小分子,如RIBOTAC和Xist结合分子,通常的筛选方法是在细胞外将RNA与小分子的结合能力通过荧光染料标记或质谱等方法进行分析测定。例如,在RIBOTAC的研究过程中,研究者基于二维组合筛选高通量地进行RNA和小分子间相互作用的检测,成功将非活性RNA结合小分子改造为靶向RNA的高效降解剂,并将其成功应用于JUN mRNA和MYC mRNA的选择性降解,同时研究者也发现了大约2 000种能够结合药物样小分子的新RNA结构^[47]。在Xist结合分子的研究过程中,研究者将Xist的RepA序列与小分子药物库混合,通过色谱排除未结合的小分子化合物,最后通过热变性低pH等条件借助反相色谱技术将与RNA结合的小分子分离出来,最后通过质谱方法确定结合小分子的化学结构^[53]。此外,DNA编码文库也可促进RNA结合分子的发现。

4 总结与展望

作为生命信息传递过程中的核心环节,RNA可为多种疾病提供治疗切入点。RNA的转录、剪切、转运、翻译等多个过程都可以提供靶点,实现药物治疗。RIBOTAC等新发展的技术有望通过小分子的模式特异性地降解目标基因的RNA。目前,对于RNA的靶向药物的筛选已存在可用的筛选开发方法,但这些研究方法在通量和特异性上

仍存在提高空间。最后,随着RNA结构预测、小分子-RNA结合数据的积累和人工智能方法的发展,未来基于计算的RNA结合分子的预测也有可能加速RNA靶向药物的发现。

参考文献

- [1] Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75(1): 280-284
- [2] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498
- [3] Crooke ST, Baker BF, Crooke RM, et al. Antisense technology: an overview and prospectus. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(6): 427-453
- [4] Jayaraman M, Ansell SM, Mui BL, et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing *in vivo*. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51(34): 8529-8533
- [5] Kulkarni JA, Darjuan MM, Mercer JE, et al. On the formation and morphology of lipid nanoparticles containing ionizable cationic lipids and siRNA. *ACS Nano*, 2018, 12(5): 4787-4795
- [6] Setten RL, Rossi JJ, Han S. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(6): 421-446
- [7] Springer AD, Dowdy SF. GalNAc-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNAi therapeutics. *Nucleic Acid Ther*, 2018, 28(3): 109-118
- [8] Zhang Y, Chen H, Hong L, et al. Inclisiran: a new generation of lipid-lowering siRNA therapeutic. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1260921
- [9] Desai AS, Webb DJ, Taubel J, et al. Zilebesiran, an RNA interference therapeutic agent for hypertension. *N Engl J Med*, 2023, 389(3): 228-238
- [10] Paton DM. Nusinersen: antisense oligonucleotide to increase SMN protein production in spinal muscular atrophy. *Drugs Today*, 2017, 53(6): 327-337
- [11] Townshend RJL, Eismann S, Watkins AM, et al. Geometric deep learning of RNA structure. *Science*, 2021, 373(6558): 1047-1051
- [12] Garber K. Drugging RNA. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(6): 745-749
- [13] Childs-Disney JL, Yang X, Gibaut QMR, et al. Targeting RNA structures with small molecules. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(10): 736-762
- [14] Lunn MR, Wang CH. Spinal muscular atrophy. *Lancet*,

- 2008, 371(9630): 2120-2133
- [15] Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy – a literature review. *Orphanet J Rare Dis*, 2017, 12(1): 124
- [16] Singh RN, Singh NN. Mechanism of splicing regulation of spinal muscular atrophy genes. *Adv Neurobiol*, 2018, 20: 31-61
- [17] Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 1995, 80(1): 155-165
- [18] Cho S, Dreyfuss G. A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev*, 2010, 24(5): 438-442
- [19] Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, et al. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time light-cycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(2): 358-368
- [20] Hua Y, Sahashi K, Hung G, et al. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev*, 2010, 24(15): 1634-1644
- [21] Naryshkin NA, Weetall M, Dakka A, et al. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science*, 2014, 345(6197): 688-693
- [22] Kokaliaris C, Evans R, Hawkins N, et al. Long-term comparative efficacy and safety of risdiplam and nusinersen in children with type 1 spinal muscular atrophy. *Adv Ther*, 2024, 41(6): 2414-2434
- [23] Darras BT, Masson R, Mazurkiewicz-Beldzińska M, et al. Risdiplam-treated infants with type 1 spinal muscular atrophy versus historical controls. *N Engl J Med*, 2021, 385(5): 427-435
- [24] Mort M, Ivanov D, Cooper DN, et al. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum Mutat*, 2008, 29(8): 1037-1047
- [25] Albers S, Allen EC, Bharti N, et al. Engineered tRNAs suppress nonsense mutations in cells and *in vivo*. *Nature*, 2023, 618(7966): 842-848
- [26] Duan D, Goemans N, Takeda S, et al. Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 13
- [27] Łoboda A, Dulak J. Muscle and cardiac therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: past, present, and future. *Pharmacol Rep*, 2020, 72(5): 1227-1263
- [28] Karijohil J, Yu YT. Therapeutic suppression of premature termination codons: mechanisms and clinical considerations (review). *Int J Mol Med*, 2014, 34(2): 355-362
- [29] Welch EM, Barton ER, Zhuo J, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, 2007, 447(7140): 87-91
- [30] Aliouat A, Hatin I, Bertin P, et al. Divergent effects of translation termination factor eRF3A and nonsense-mediated mRNA decay factor UPF1 on the expression of uORF carrying mRNAs and ribosome protein genes. *RNA Biol*, 2020, 17(2): 227-239
- [31] Baradaran-Heravi A, Balgi AD, Hosseini-Farahabadi S, et al. Effect of small molecule eRF3 degraders on premature termination codon readthrough. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(7): 3692-3708
- [32] Kim YK, Maquat LE. UPF1 and center in RNA decay: UPF1 in nonsense-mediated mRNA decay and beyond. *RNA*, 2019, 25(4): 407-422
- [33] Michorowska S. Ataluren-promising therapeutic premature termination codon readthrough frontrunner. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(8): 785
- [34] Bolze F, Mocek S, Zimmermann A, et al. Aminoglycosides, but not PTC124 (Ataluren), rescue nonsense mutations in the leptin receptor and in luciferase reporter genes. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1020
- [35] Zomer-van Ommen DD, Vijftigschild LAW, Kruisselbrink E, et al. Limited premature termination codon suppression by read-through agents in cystic fibrosis intestinal organoids. *J Cystic Fibrosis*, 2016, 15(2): 158-162
- [36] Leroy C, Spelier S, Essonghe NC, et al. Use of 2,6-diaminopurine as a potent suppressor of UGA premature stop codons in cystic fibrosis. *Mol Ther*, 2023, 31(4): 970-985
- [37] Bao X, Liang Y, Chang H, et al. Targeting proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): from bench to bedside. *Sig Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 13
- [38] Cameron J, Holla ØL, Ranheim T, et al. Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(9): 1551-1558
- [39] Barale C, Bonomo K, Frascaroli C, et al. Platelet function and activation markers in primary hypercholesterolemia treated with anti-PCSK9 monoclonal antibody: a 12-month follow-up. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2020, 30(2): 282-291
- [40] Tang Z, Jiang LU, Peng J, et al. PCSK9 siRNA suppresses the inflammatory response induced by oxLDL through inhibition of NF-κB activation in THP-1-derived macrophages. *Int J Mol Med*, 2012, 30(4): 931-938
- [41] Guo W, Gao H, Li H, et al. Self-assembly of a multifunction DNA tetrahedron for effective delivery of aptamer PL1 and Pcsk9 siRNA potentiate immune checkpoint therapy for colorectal cancer. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(28): 31634-31644
- [42] Lintner NG, McClure KF, Petersen D, et al. Selective stalling of human translation through small-molecule engagement of the ribosome nascent chain. *PLoS Biol*,

- 2017, 15(3): e2001882
- [43] Leibowitz BJ, Zhao G, Xia W, et al. mTOR inhibition suppresses Myc-driven polyposis by inducing immunogenic cell death. *Oncogene*, 2023, 42(24): 2007-2016
- [44] Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, et al. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(8): 558-572
- [45] Huang MT. Harringtonine, an inhibitor of initiation of protein biosynthesis. *Mol Pharmacol*, 1975, 11(5): 511-519
- [46] Howard TP, Oberlick EM, Rees MG, et al. Rhabdoid tumors are sensitive to the protein-translation inhibitor homoharringtonine. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(18): 4995-5006
- [47] Tong Y, Lee Y, Liu X, et al. Programming inactive RNA-binding small molecules into bioactive degraders. *Nature*, 2023, 618(7963): 169-179
- [48] Costales MG, Matsumoto Y, Velagapudi SP, et al. Small molecule targeted recruitment of a nuclease to RNA. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(22): 6741-6744
- [49] Wang Y, Lu J, He L, et al. Triptolide (TPL) inhibits global transcription by inducing proteasome-dependent degradation of RNA polymerase II (Pol II). *PLoS One*, 2011, 6(9): e23993
- [50] Han R, Rostami-Yazdi M, Gerdes S, et al. Triptolide in the treatment of psoriasis and other immune-mediated inflammatory diseases. *Brit J Clin Pharma*, 2012, 74(3): 424-436
- [51] Syed YY. Selinexor: first global approval. *Drugs*, 2019, 79(13): 1485-1494
- [52] Liu Y, Yang R, Feng H, et al. Adverse events reporting of XPO1 inhibitor-selinexor: a real-world analysis from FAERS database. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 12231
- [53] Aguilar R, Spencer KB, Kesner B, et al. Targeting Xist with compounds that disrupt RNA structure and X inactivation. *Nature*, 2022, 604(7904): 160-166
- [54] Auld DS, Thorne N, Maguire WF, et al. Mechanism of PTC124 activity in cell-based luciferase assays of nonsense codon suppression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(9): 3585-3590