

反义寡核苷酸的作用机制及其在运动系统中的研究进展

杨建乐^{1,2,3}, 吴南^{1,2,3,4}

中国医学科学院北京协和医院¹ 骨科² 骨骼畸形遗传学研究北京市重点实验室
³ 脊柱畸形大数据研究与应用重点实验室⁴ 疑难重症及罕见病国家重点实验室, 北京 100730

通信作者: 吴南, E-mail: dr.wunan@pumch.cn

【摘要】反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASOs) 是一类新型的小分子基因靶向药物, 可与目的 mRNA 结合, ASOs 以其与目标序列互补的碱基配对方式, 对基因进行靶向调控。随着基因测序技术和分子合成技术的不断发展, ASOs 在运动系统中的研究和应用进一步深入。本文阐述了 ASOs 在基因沉默和表达调控中的作用机制, 以及其在基因治疗方面的应用前景。此外, 还介绍了 ASOs 在运动系统疾病中的研究进展和应用情况, 并分析此类药物目前所面临的问题, 旨在深化医务人员对 ASOs 的认识, 并为其在生物医学研究和临床中的推广应用提供有益参考。

【关键词】反义寡核苷酸; 基因治疗; 临床应用; 运动系统

【中图分类号】R681; R746

【文献标志码】A

【文章编号】1674-9081(2024)04-0891-06

DOI: 10.12290/xhyxzz.2023-0656

Mechanism of Action of Antisense Oligonucleotides and Their Research Progress in the Musculoskeletal System

YANG Jianle^{1,2,3}, WU Nan^{1,2,3,4}

¹Department of Orthopaedic Surgery, ²Beijing Key Laboratory for Genetic Research of Skeletal Deformity,
³Key Laboratory of Big Data for Spinal Deformities, ⁴State Key Laboratory of Complex Severe and Rare Diseases,
Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College,
Beijing 100730, China

Corresponding author: WU Nan, E-mail: dr.wunan@pumch.cn

【Abstract】Antisense oligonucleotides (ASOs) are a novel class of small molecule gene-targeted drugs that can bind with target mRNA. Through complementary base pairing with the target sequence, antisense oligonucleotides achieve targeted regulation of genes. With the continuous development of gene sequencing technology and molecular synthesis techniques, research and applications of ASOs in the musculoskeletal system have further advanced. This article reviews the mechanisms of ASOs in gene silencing and expression regulation, as well as their prospects in gene therapy. It also evaluates the research progress and applications of ASOs in musculoskeletal diseases and analyzes the urgent issues currently faced by this class of drugs. This comprehensive study aims to deepen our understanding of ASOs and provide valuable reference for their widespread application in biomedical research and clinical settings.

【Key words】antisense oligonucleotides; gene therapy; clinical practice; musculoskeletal system

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-051); 中央高水平医院临床科研专项 (2022-PUMCH-C-033)

引用本文: 杨建乐, 吴南. 反义寡核苷酸的作用机制及其在运动系统中的研究进展 [J]. 协和医学杂志, 2024, 15 (4): 891-896. doi: 10.12290/xhyxzz.2023-0656.

Funding: CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (2021-I2M-1-051); National High Level Hospital Clinical Research Funding (2022-PUMCH-C-033)

Med J PUMCH, 2024,15(4):891-896

一个世纪以来,小分子靶向药物的发展为医学带来了翻天覆地的改变。从最早合成的药物阿司匹林到如今的分子靶向药物,小分子药物及以蛋白质为治疗靶点的药物开发与研究取得了一系列显著成绩。从对基因层面的调控和编辑技术^[1-2],到调节前体 mRNA (pre-mRNA) 或 mRNA^[3],再到对蛋白质的表达调控^[4],研究人员在精准医学领域靶向治疗方面取得了快速发展。

近年来,小分子药物研究进入了基因组学和蛋白质组学时代,高通量筛选、计算化学和结构生物学等技术的应用不断拓展了药物研发领域。个性化医疗和精准药物设计成为研究热点,旨在根据患者的遗传信息和分子特征,为其提供更精准的治疗方案。

目前,能够在 RNA 层面进行细胞调控的方法主要包括 RNA 干扰技术 (RNA interference, RNAi) 和合成的反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASOs) 技术^[5]。本文主要阐述 ASOs 的作用机制及其在运动系统疾病治疗中的应用,以深化医务人员对 ASOs 的认识,并为其在生物医学研究和临床中的推广应用提供有益参考。

1 反义寡核苷酸概述

ASOs 是一类化学合成的单链或双链核苷酸分子,通常被设计为 12~24 个碱基,可通过碱基互补配对方式与特定 RNA 序列结合,因此具有精准靶向特性,可起到调控靶基因的作用^[6]。

目前,ASOs 已发展至第三代。第一代以硫代磷酸酯寡聚脱氧核糖核酸为代表,在这一类寡聚核苷酸中,主要是将磷酸二酯键中的非桥氧原子置换成硫原子,这种修饰增加了 ASOs 对核酸酶降解的抵抗力,进而使寡核苷酸稳定性增加,但仍使机体产生一定的促炎反应和副作用。第二代以硫代 ASOs 序列为核心,将核苷酸中核糖的 2'羟基换成烷基修饰,进一步增加了 ASOs 对靶标结合的亲和力,抵抗了核酸酶降解,降低了促炎反应。第三代则是以吗啉代寡核苷酸 (morpholino oligonucleotide, PMO) 为代表,用吗啉环替换了常规核苷酸的核糖,在降低成本的同时,达到细胞内极高的活性和靶向性,抑制细胞的促炎反应^[7]。

近年来,ASOs 在人类疾病治疗中具有较为广泛的应用,如美国食品药品监督管理局 (Food and Drug

Administration, FDA) 已批准鞘内注射 ASOs 诺西那生钠 (Nusinersen) 治疗脊髓肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA)^[8],玻璃体内注射福米韦生 (Fomivirsen) 治疗巨细胞病毒性视网膜炎^[9],吸入性 ASOs 药物 IONIS-ENAC-2.5Rx 治疗肺囊性纤维化^[10]等。未来随着 ASOs 体内递送及副作用等问题的逐步解决,ASOs 将迎来更广泛的应用。

2 反义寡核苷酸的作用机制

ASOs 识别目标基因并与之结合,形成 ASOs-RNA 复合物,然后通过不同作用机制调节目标 mRNA 功能,最常见的作用机制包括:(1)核糖核酸酶 H1 依赖性降解 (RNase-H1-mediated degradation)^[11],即外源合成的 ASOs 通过与目标 mRNA 互补结合,形成 ASOs-mRNA 复合物,该复合物被内源性核酸酶 RNase H1 识别并降解,导致目标 mRNA 减少,该机制为基因表达抑制提供了有效手段。ASOs 至少需拥有 5 个连续脱氧核苷酸残基,所形成的 ASOs-RNA 复合物才能被 RNase H1 识别并成为酶底物,当 ASOs 具有 8~10 个连续脱氧核苷酸残基时,可达到最佳酶活性。因此,促进 RNase H1 介导的靶向 RNA 降解的 ASOs 通常有一个 8~10 个连续脱氧核苷酸的核心区域。(2)非核糖核酸酶 H1 依赖性降解 (Non-RNase-H1-mediated degradation)^[6]。实际上,ASOs 要实现 RNA 降解,除依赖 RNase H1 的介导外,还可通过另一种蛋白 AGO2 的介导,这种酶在 siRNA 调控细胞内 mRNA 降解中发挥至关重要的作用^[12],但此处不再详细介绍 ASOs 通过 AGO2 进行靶基因调控的机制。除此之外,调节目标 pre-mRNA 的剪接模式 (splicing modulation),从而改变目标 RNA 终极蛋白产物表达,其主要通过外显子跳跃 (exon skipping) 和外显子保留 (exon inclusion) 两种方式实现。此外,空间嵌段寡核苷酸 (steric block oligonucleotides) 可通过与靶基因结合阻断 mRNA 进一步翻译,干扰蛋白合成功能。

3 反义寡核苷酸研究进展与应用

3.1 ASOs 在骨质疏松症中的研究进展

骨质疏松症是一种由多种原因导致的骨密度和骨

质量下降,骨微结构破坏,造成骨质疏松增加,从而易发生骨折的全身性骨病^[13]。Notch 通路在决定细胞命运及骨骼发育和骨重塑的调节中发挥关键作用,Notch2 功能获得性突变可导致 Hajdu-Cheney 综合征,其特征为手脚肢端骨溶解,骨骼、牙齿和关节发育缺陷,引起明显的颅面和颅骨改变,并伴有严重的骨质疏松。研究人员成功构建出 Notch2 点突变的小鼠模型,并发现由于骨吸收增加,杂合的 Notch2 突变小鼠表现出严重的松质骨和皮质骨减少。将针对 Notch2 基因的 ASOs 经皮下注射入小鼠体内,发现这种 ASOs 可改善 Notch2 突变小鼠的松质性骨质减少症状,且经过 ASOs 处理的小鼠体内破骨细胞数量也显著减少^[14]。因此,这种针对 Notch2 基因的 ASOs 成功改善了 Hajdu-Cheney 综合征小鼠模型中的骨质减少表型,为 ASOs 治疗骨质疏松症提供了可能性。

3.2 ASOs 在骨关节炎中的研究进展

骨关节炎是严重困扰我国中老年人的关节疾病,以关节软骨损害为主,最终发生关节软骨退变、纤维化、断裂、缺损及整个关节面损害,是老年人致残的主要原因^[15]。研究人员应用包括人类样本和动物模型在内的各种实验模型,测试 microRNA-181a-5p (miR-181a-5p) ASOs 对关节软骨退化的影响,发现 miR-181a-5p 是参与腰椎小关节软骨破坏的关键介质,这种 ASOs 降低了软骨分解代谢和软骨细胞凋亡/细胞死亡标志物的表达。在小鼠膝骨关节炎模型中,关节内注射 ASOs 可减弱软骨破坏,并减少分解代谢标志物的表达。此外,针对人膝骨关节炎软骨细胞(体外)和软骨移植体(体外)的培养,进一步证明了 ASOs 对软骨的保护作用^[16]。因此,该研究证实关节内注射 ASOs 可能成为未来骨关节炎治疗的一种全新选择。

3.3 ASOs 在 1 型神经纤维瘤病中的研究进展

神经纤维瘤病是一种良性的周围神经疾病,属于常染色体显性遗传病,临床上将其分为 1 型神经纤维瘤病 (type 1 neurofibromatosis, NF1) 和 NF2。其中, NF1 的临床表现包括多发性神经纤维瘤、皮肤牛奶咖啡斑及脊柱侧凸等。该病是由于 NF1 基因发生致病性突变,导致 Ras 通路过度激活,进而引起下游 PI3K/AKT/mTOR 和 RAF/MEK/ERK 通路激活,最终造成细胞过度生长和增殖^[17]。

针对 NF1 基因突变,研究人员拟应用 ASOs 引起外显子跳跃的机制,探索 ASOs 治疗该疾病的可能性。将基因组学和生物信息学联合进行分析,研究人员最终锁定了 NF1 基因的第 17 号外显子,并在体外

实验证明了这种 PMO 类的 ASOs 能够恢复功能性神经纤维蛋白的表达。且体内实验研究发现,这种 ASOs 能够有效减少神经纤维瘤的生长。然而,在目前的研究中,仍出现小鼠行为改变和淋巴细胞过度增殖等并发症^[18]。该研究虽未明确此种 ASOs 对小鼠脊柱侧凸表型的治疗效果,但仍为 ASOs 治疗脊柱侧凸等运动系统疾病提供了一定研究思路。

3.4 ASOs 在杜氏肌营养不良症中的应用

抗肌萎缩蛋白 Dystrophin 是稳定肌肉细胞膜的重要部分,其重要功能是维持肌肉细胞的稳定性,使其在肌肉收缩过程中不被破坏。而杜氏肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 患者由于编码抗肌萎缩蛋白的基因发生突变,从而导致抗肌萎缩蛋白缺失^[19]。针对这种基因突变,ASOs 药物可在转录过程中诱导突变位点邻近的外显子被跳跃,从而恢复 mRNA 的阅读框和后续的翻译过程。虽然这样产生的抗肌萎缩蛋白相较于正常蛋白短,但仍可保持部分功能,因此可恢复患者部分肌肉功能,减轻其症状和痛苦,并延缓疾病进展^[20]。

目前,已被 FDA 批准用于治疗 DMD 的 4 种 ASOs 药物包括依特立生 (Eteplirsen)、戈洛迪森 (Golodirsen)、维特塞普索 (Viltolarsen) 和卡西莫森 (Casimersen),均为 PMO 类 ASOs 药物。Eteplirsen 针对 Dystrophin 基因 79 个外显子里的第 51 号外显子,并在 mRNA 合成的过程中跳过了 51 号外显子转录,从而在骨骼肌中生成较短但仍具有功能的抗肌萎缩蛋白;而 Golodirsen 和 Viltolarsen 主要针对第 53 号外显子;Casimersen 则针对第 45 号外显子^[21]。这些药物均可部分恢复抗肌萎缩蛋白的功能,且具有较好的临床疗效和安全性。在 Eteplirsen 药物的临床试验研究中,19 例入组患者经治疗后,其中 7 例抗肌萎缩蛋白表达显著增加,肌肉样本的抗肌萎缩蛋白免疫荧光强度从 8.9% 增至 16.4% ($P = 0.029$)^[22]。另一项关于 Golodirsen 药物的临床试验研究显示,采用 Golodirsen 治疗 (30 mg/kg, 每周 1 次) 可使 DMD 患者的平均抗肌萎缩蛋白表达从 0.095% 上升至 1.019% ($P < 0.001$),用药至第 48 周时,抗肌萎缩蛋白表达比基线增加约 16 倍^[23]。

3.5 ASOs 在脊髓性肌萎缩症中的应用

脊髓性肌萎缩症 (spinal muscular atrophy, SMA) 是由于运动神经元存活基因 (SMN1) 突变引起的 SMN 蛋白缺乏所致。该蛋白缺乏可引起脊髓前角细胞变性,出现进行性、对称性、肢体近端为主的弛缓性麻痹和肌萎缩,若累及呼吸肌,可导致患者死亡。

在人类细胞中,还存在一个额外的 SMN 基因,被称为 SMN2。高度同源的 SMN1 与 SMN2 各自含有 9 个外显子,二者仅有 5 个碱基的差别,然而由于 SMN1 与 SMN2 的 7 号外显子存在差异,导致后者 7 号外显子无法被有效翻译,且形成的蛋白大多数为无功能的 SMN 蛋白^[24]。因此,增加 SMN2 表达具有功能的 SMN 蛋白,成为该疾病治疗的突破口。

Nusinersen 是全球首个 SMA 精准靶向治疗药物,可增强 7 号外显子的剪接能力,以增加 SMN 蛋白的合成,使 SMN2 基因的 SMN 蛋白完全翻译。针对 SMA ($n=110$) 的临床试验研究证实,在 73 例接受 Nusinersen 治疗的患者中,该药物显著改善了 37 例患者的运动系统功能,而对照组 ($n=37$) 均无明显改善^[8]。2016 年, FDA 批准 Nusinersen 用于治疗 SMA,随后在全球多个国家获批上市。

3.6 ASOs 在肌萎缩侧索硬化中的应用

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种神经系统退行性疾病,其特征为上运动神经元和脊髓前角下运动神经元进行性退化,导致肌肉萎缩、无力和运动障碍。ALS 可能与多种因素有关,包括遗传因素,其中最常见的遗传突变与超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1) 基因相关。该突变导致 SOD1 蛋白质功能异常,引发神经细胞的氧化应激和毒性聚集,最终导致神经元损伤和死亡。除 SOD1 基因外, 9 号染色体开放阅读框 72 (chromosome 9 open reading frame 72, C9ORF72)、肉瘤融合基因 (fused in sarcoma, FUS)、反式激活反应-DNA-结合蛋白 (transactive response DNA binding protein, TARDBP) 等的突变是 ALS 常见的其他基因突变^[25]。目前,针对上述各致病基因的 ASOs 治疗临床试验均已有序开展,其中靶向 SOD1 基因的 ASOs 研究进展比较迅速, FDA 已同意加速批准用于治疗 SOD1 突变所致 ALS 的 ASOs 疗法 Qalsody (Tofersen) 上市。根据 II 期临床试验结果,与安慰剂对照组相比,使用 100 mg Tofersen 可显著降低脑脊液中 SOD1 和血浆中神经元损伤标志物“神经丝轻链” (neurofilament light, NfL) 的浓度。然而,经 28 周治疗后,患者的 ALS 功能评分 (ALS functional rating scale-revised, ALSFRS-R)、运动功能和肺功能均未见改善^[26]。目前针对 SOD1 的 ASOs 主要作用于 SOD1 基因,而无法准确地选择性作用于 SOD1 突变基因,这可能导致整体 SOD1 水平下降,引发功能丧失 (loss-of-function, LOF) 突变,从而可能诱发其他疾病的发生。目前,针对 ALS 的 ASOs 研究尚处

于初始阶段,未来仍需关注该领域的研究进展。

根据上述 ASOs 在骨骼肌肉系统疾病中的研究进展和应用可见,目前该领域 ASOs 的治疗研究主要集中于肌肉疾病,造成该现象的原因可能为:(1) 肌肉疾病的遗传基础。许多肌肉疾病,包括上文提及的 DMD 和 SMA,均有明确的遗传基础。这些病症通常是由特定的基因突变所致,导致功能蛋白缺失或功能不全,进而引发疾病,而这些明确的基因突变则是 ASOs 发挥靶向作用的基础。(2) 肌肉组织的可及性。相较于其他组织 (如中枢神经系统),骨骼肌肉组织对于药物的可及性更高,通过系统性或局部给药方式, ASOs 更易到达并在肌肉组织中发挥作用。这也意味着针对肌肉疾病的药物具有更广泛的应用。(3) 高需求与研究潜力。肌肉疾病通常缺乏有效的治疗方法,且对患者的生活质量影响极大。ASOs 提供了一种潜在的治疗策略,可针对性地调节疾病相关基因的表达,为这些患者带来希望。因此,在肌肉疾病领域,相信未来 ASOs 将发挥更大作用,并产生巨大的社会价值。而在其他疾病领域,目前关于 ASOs 的治疗尚处于初始阶段,但 ASOs 对于治疗其他骨骼肌肉系统疾病仍具有潜在价值。

4 反义寡核苷酸面临的挑战

虽然在过去几年, ASOs 药物取得了快速发展,但在不同疾病中的应用仍存在问题亟待解决。尽管 ASOs 具有精准靶向的特性,但其应用仍可能引发一些副作用。其中,免疫反应和细胞毒性是目前需重点关注和解决的问题。如 2019 年 FDA 批准用于治疗 DMD 的 PMO 类药物戈迪洛森 (Golodirsen),据文献报道,患者用药后可出现超敏反应和肾毒性^[23]。一些寡核苷酸可诱发患者注射部位及全身出现炎症反应,包括注射部位皮肤炎症反应,以及发热、寒战和僵直等^[27]。针对这些副作用,需进一步开展深入的安全性评估和研究。

ASOs 在体内的稳定性和持久性直接关系其治疗效果的长期维持。研究人员需探索新的材料和技术,以提高 ASOs 在体内的稳定性,确保药物浓度能够在目标组织中维持足够的时间。在运动系统中,实现 ASOs 的精确递送是一个极具挑战性的问题。有效的递送系统对于 ASOs 在治疗运动系统疾病中的成功应用至关重要。当前的研究重点之一,即是如何实现对骨骼、关节等特定组织的精准递送。Nusinersen 之所以能够获得巨大成功,是因为其可通过反复鞘内注射

给药,维持中枢神经系统的血药浓度,发挥持续疗效。而对于采用静脉输注方式给药治疗 DMD 的 Golodirsen 等药物,在进入人体后,其迅速被肾脏代谢排出,最终仅有少部分药物作用于肌肉,这是治疗 DMD 的 ASOs 药物临床效果无法达到 Nusinersen 等药物水平的重要原因之一。

目前,以 N-乙酰化的半乳糖胺 (GalNAc)、脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticle, LNP) 和外泌体等为代表的递送系统应用较为广泛^[28]。其中, GalNAc 是当前最常用的小核酸药物递送系统,其可结合抗去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR),通过内吞作用进入细胞,递送效果较好^[29]。但如何为 ASOs 药物开发新型、高效的药物递送系统,目前仍面临巨大挑战。ASOs 需进入细胞内,并到达细胞核才能发挥作用,但 ASOs 的大分子量和负电荷特性使其穿透细胞膜非常困难,因此导致细胞内递送效率低。此外,由于组织分布和渗透性差异,将 ASOs 有效递送至疾病相关特定组织或细胞是一个重大挑战,尤其对于一些难以渗透的组织,如大脑等。针对这些挑战,科学家们正在研究多种策略,包括开发新型化学修饰方法以提高稳定性,设计靶向递送系统以增强细胞内递送效率和组织特异性,以及利用纳米技术和病毒载体等创新途径提高递送效率和降低免疫原性^[30]。尽管存在挑战,但 ASOs 作为一种新型治疗手段的潜力巨大,未来有望逐步克服障碍,并最终应用于临床。

5 小结与展望

随着分子遗传学、药理学、生物信息学研究的不断深入,以及化学合成、加工技术的不断成熟,ASOs 药物已在神经肌肉疾病、肺囊性纤维化和肿瘤等多种疾病中广泛应用,是目前最具应用前景的基因靶向治疗药物之一。深入探讨 ASOs 的作用机制、应用及面临的挑战,有助于更清晰地认识其在运动系统疾病治疗中的应用前景。增加 ASOs 的靶向结合效率,提高 ASOs 对细胞内核酸酶降解作用的抵抗性,改善 ASOs 药物动力学特性,降低其在人体内的副作用和促炎症反应,以及增强其对靶器官的特异性递送,仍是目前亟待解决的问题。未来研究人员需共同努力,充分发挥生物信息学的优势,进一步解决递送 ASOs 面临的各方面问题,以更好地实现 ASOs 的临床应用,为患者提供更精准、有效的治疗方案。随着科技的不断发展,ASOs 有

望成为运动系统疾病治疗的创新性工具,为医学领域带来更多希望与突破。

作者贡献: 杨建乐负责论文初稿撰写;吴南负责论文构思与审校。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Doudna J A, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346 (6213): 1258096.
- [2] Happi Mbakam C, Lamothe G, Tremblay G, et al. CRISPR-Cas9 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Neurotherapeutics*, 2022, 19 (3): 931-941.
- [3] Fujita K I, Ishizuka T, Mitsukawa M, et al. Regulating divergent transcriptomes through mRNA splicing and its modulation using various small compounds [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (6): 2026.
- [4] Li X Y, Pu W C, Zheng Q Q, et al. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21 (1): 99.
- [5] Goga A, Stoffel M. Therapeutic RNA-silencing oligonucleotides in metabolic diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21 (6): 417-439.
- [6] Crooke S T, Baker B F, Crooke R M, et al. Antisense technology: an overview and prospectus [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20 (6): 427-453.
- [7] Bennett C F. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age [J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 307-321.
- [8] Finkel R S, Mercuri E, Darras B T, et al. Nusinersen versus sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377 (18): 1723-1732.
- [9] De Smet M D, Meenken C J, Van Den Horn G J. Fomivirsen-a phosphorothioate oligonucleotide for the treatment of CMV retinitis [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 1999, 7 (3/4): 189-198.
- [10] Ionis Pharmaceuticals, Inc. A phase 1/2a study to assess the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of single and multiple doses of IONIS-ENACRx in healthy volunteers and patients with cystic fibrosis [EB/OL]. (2021-02-04) [2023-12-27]. <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03647228>.
- [11] Liang X H, Sun H, Nichols J G, et al. RNase H1-dependent antisense oligonucleotides are robustly active in directing RNA cleavage in both the cytoplasm and the nucleus [J]. *Mol Ther*, 2017, 25 (9): 2075-2092.

- [12] Crooke S T. Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2017, 27 (2): 70-77.
- [13] Reid I R, Billington E O. Drug therapy for osteoporosis in older adults [J]. *Lancet*, 2022, 399 (10329): 1080-1092.
- [14] Canalis E, Grossman T R, Carrer M, et al. Antisense oligonucleotides targeting Notch2 ameliorate the osteopenic phenotype in a mouse model of Hajdu-Cheney syndrome [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295 (12): 3952-3964.
- [15] Sharma L. Osteoarthritis of the knee [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384 (1): 51-59.
- [16] Nakamura A, Rampersaud Y R, Nakamura S, et al. MicroRNA-181a-5p antisense oligonucleotides attenuate osteoarthritis in facet and knee joints [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78 (1): 111-121.
- [17] Tamura R. Current understanding of neurofibromatosis type 1, 2, and schwannomatosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (11): 5850.
- [18] Leier A, Moore M, Liu H, et al. Targeted exon skipping of NF1 exon 17 as a therapeutic for neurofibromatosis type I [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 28: 261-278.
- [19] Aartsma-Rus A, Ginjaar I B, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy [J]. *J Med Genet*, 2016, 53 (3): 145-151.
- [20] Verhaart I E C, Aartsma-Rus A. Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15 (7): 373-386.
- [21] Patterson G, Conner H, Groneman M, et al. Duchenne muscular dystrophy: current treatment and emerging exon skipping and gene therapy approach [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 947: 175675.
- [22] Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study [J]. *Lancet*, 2011, 378 (9791): 595-605.
- [23] Frank D E, Schnell F J, Akana C, et al. Increased dystrophin production with golodirsen in patients with Duchenne muscular dystrophy [J]. *Neurology*, 2020, 94 (21): e2270-e2282.
- [24] Mercuri E, Sumner C J, Muntoni F, et al. Spinal muscular atrophy [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 8 (1): 52.
- [25] Fang T, Je G, Pacut P, et al. Gene therapy in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Cells*, 2022, 11 (13): 2066.
- [26] Miller T M, Cudkowicz M E, Genge A, et al. Trial of antisense oligonucleotide tofersen for SOD1 ALS [J]. *N Engl J Med*, 2022, 387 (12): 1099-1110.
- [27] Chi X, Gatti P, Papoian T. Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics [J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22 (5): 823-833.
- [28] Ramasamy T, Ruttala H B, Munusamy S, et al. Nano drug delivery systems for antisense oligonucleotides (ASO) therapeutics [J]. *J Control Release*, 2022, 352: 861-878.
- [29] Debacker A J, Voutila J, Catley M, et al. Delivery of oligonucleotides to the liver with GalNAc: from research to registered therapeutic drug [J]. *Mol Ther*, 2020, 28 (8): 1759-1771.
- [30] Roberts T C, Langer R, Wood M J A. Advances in oligonucleotide drug delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19 (10): 673-694.

(收稿: 2023-12-27 录用: 2024-01-15 在线: 2024-03-02)

(本文编辑: 李玉乐)