PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2019,46(3):313~322
www.pibb.ac.cn

首例RNA干扰药物问世及该领域技术演化历程*

黄渊余[1,2)**]

([1)]北京理工大学前沿交叉科学研究院、生命学院，分子医学与生物诊疗重点实验室，北京 100081；
[2)]湖南中医药大学药学院，长沙 410208）

摘要 近期，RNA干扰（RNAi）制药公司Alnylam开发的小干扰RNA（siRNA）药物ONPATTRO™（Patisiran）相继获得美国食品与药物管理局和欧盟委员会批准上市，用于治疗成人患者的遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性引起的多发性神经病变. 这是全球第一款RNAi药物，该事件标志着人类继小分子化合物、单克隆抗体蛋白类药物后，在前沿生物制药领域实现了新的突破，意味着RNAi疗法从基础研究到临床治疗的开发全过程首次贯通，具有里程碑式的意义. 本文概述了该药物及适应症的基本情况，介绍了RNAi发现历史、作用机理与药物特征，RNAi药物的研发历程，以及该领域关键技术的最新研究进展.

关键词 RNA干扰，小干扰RNA，ONPATTRO，药物递送，稳定化修饰
中图分类号 O629.7，R945，Q52 **DOI**：10.16476/j.pibb.2018.0249

RNA干扰（RNA interference，RNAi）是一种由双链RNA（double-stranded RNA，dsRNA）介导的对同源靶信使RNA（messenger RNA，mRNA）进行特异性降解的基因沉默现象[1]. 自该现象被发现和阐明，本领域研究者投入大量时间和精力基于该原理开发新型核酸药物[2]. 近期，美国Alnylam公司开发的ONPATTRO™（Patisiran）获得美国食品和药物管理局（Food and Drug Administration，FDA）及欧盟委员会（European Commission，EC）批准上市[3]，这是FDA批准的首个治疗hATTR（遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性引起的多发性神经病变）的药物，也是全球首例获批上市的小干扰RNA（small interfering RNA，siRNA）药物. 基于该事件，本文介绍了该药物和适应症的基本特征，并就其技术内涵和领域发展动态进行了系统总结和评述.

1 ONPATTRO的获批与临床试验结果

1.1 ONPATTRO的获批与意义

2018年8月，FDA及EC相继批准了Alnylam制药公司开发的RNAi药物ONPATTRO™（Patisiran）上市，用于治疗成人患者的遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性引起的多发性神经病变（polyneuropathy of hereditary transthyretin-mediated（hATTR）amyloidosis）[3-4]. 这是全球第一个获批上市的RNAi药物，该事件意味着人们已经建立起全流程的RNAi制药技术平台和管理制度，标志人类在疾病干预的前沿领域取得了新的里程碑式突破. 如果从1998年Fire等[1]第一次阐释RNAi作用机制、提出RNAi术语算起，为了这一历史性时刻，该领域已经整整耕耘了20年.

hATTR是由于人体内的甲状腺素转运蛋白（transthyretin，TTR）突变，导致蛋白质三级结构折叠出错，引起变性蛋白质在体内各脏器的细胞里异常积累，进而对细胞和组织造成损伤，其中就包括神经和心脏损伤[5-6]. 本次FDA、EC只批准ONPATTRO用于hATTR的神经损伤病，但欧洲药品管理局（EMA）人用医药产品委员会（CHMP）

* 国家自然科学基金（31871003），北京理工大学科技创新计划创新人才科技资助专项，北京理工大学青年教师研究基金资助，以及湖南省自然科学基金（2018JJ1019）和湖湘青年人才（2018RS3094）资助项目.
** 通讯联系人. Tel：010-68911089，E-mail：yyhuang@bit.edu.cn
收稿日期：2018-09-19，接受日期：2019-01-07

之前推荐批准的适应症同时包括神经和心脏损伤，Alnylam也将继续争取将适应症扩大到心脏损伤的hATTR病人. 另一方面，目前hATTR诊出率很低[6]，据估计只有不到1%患者被确诊，所以如果今后进一步研发出新型诊断技术，提高诊出率，将可能继续扩大该药物的适用人群规模.

hATTR虽然是一种罕见病，但市场竞争依然激烈. 2018年7月，欧洲监管机构批准Ionis公司和Akcea公司开发的反义核酸（antisense oligonucleotide，ASO）药物Tegsedi（Inotersen）用于治疗该疾病，成为全球第一个治疗该适应症的核酸药物. 从临床试验数据看，ONPATTRO可逆转疾病过程，Tegsedi则只减缓疾病恶化速度，安全性前者也占优[7-9]；ONPATTRO临床上需要静脉输液（每3周1次），Tegsedi则是皮下注射（每周一次），后者使用较便利. 此外，治疗该疾病的药物还包括辉瑞公司开发的口服小分子化合物Vyndaqel（Tafamidis）[10]，该药物于2011年、2013年先后获得欧盟和日本批准上市，但2012年FDA拒绝了其上市申请. 近期一项非直接对比的研究分析表明，ONPATTRO的疗效也优于Vyndaqel[11]，但Vyndaqel通过口服给药，使用便利性最高. 此外，辉瑞公司仍在继续开展临床实验，以期获得FDA批准. 2018年该药物对hATTR心肌症的Ⅲ期临床试验达到全因死亡率和心血管住院率的主要临床终点[12]，并先后获得了FDA突破性疗法认定、日本厚生劳动省SAKIGAKE资格（先驱资格），获批前景积极.

1.2　ONPATTRO达到主要和次要临床终点

hATTR是能导致受累器官功能逐渐衰竭的一种严重而致命的罕见病，该病症确诊后生存期中位数只有4.7年，目前仍缺少有效的针对性疗法. siRNA药物ONPATTRO能够特异性地靶向并降解TTR（transthyretin）基因，阻断TTR蛋白的合成，减少淀粉样蛋白的沉积，同时有助于外周组织淀粉样蛋白的清除，从而恢复组织功能.

ONPATTRO的获批是基于名为APOLLO的Ⅲ期临床试验结果做出[7]. 该随机、双盲的研究共包括225例淀粉样变性患者，其中安慰剂组77例，ONPATTRO治疗组148例. 该研究的主要临床终点采用神经病变损伤评分（mNIS+7）系统对患者的神经损伤程度进行评估，次要临床终点采用诺福克生活质量-糖尿病神经病变（Norfolk quality of life-diabetic neuropathy，Norfolk QOL-DN）调查方式进行评估. 结果显示，与安慰剂组相比，ONPATTRO的治疗能够有效阻止神经损伤，并一定程度上改善mNIS+7评分，而安慰剂组患者的神经损伤则进一步加剧（图1）；同时，ONPATTRO治疗组患者在运动强度、残疾程度、步行速度、营养状态和自主神经症状等方面均优于安慰剂组（图1）. 此外，ONPATTRO的不良反应和严重不良反应发生率与安慰剂组相当，表明ONPATTRO的总体安全性良好.

2　RNAi疗法

RNAi是指由外源性或内源性的双链RNA介导的一种基因沉默现象，它引起细胞内与dsRNA同

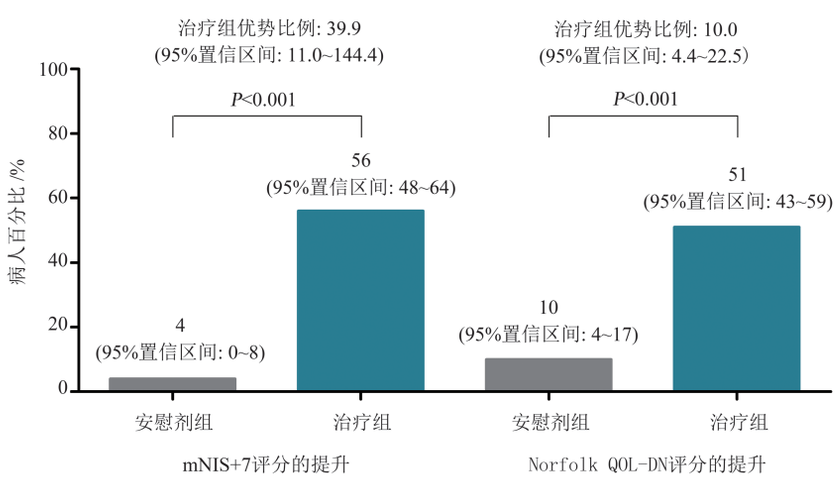

Fig. 1　Improvement in mNIS+7 or Norfolk QOL−DN Score achieved from ONPATTRO treatment

图1　ONPATTRO的Ⅲ临床期试验达到主要和次要临床终点[7]

主要和次要临床终点分别根据神经病变损伤（mNIS+7）评分和诺福克生活质量-糖尿病神经病变（Norfolk QOL-DN）评分判断.

源的mRNA特异性降解，从而导致其相应靶基因的表达沉默，产生相应的功能表型缺失. RNAi的两类主要分子为微小RNA（microRNA， miRNA）和小干扰RNA（siRNA）.

2.1　RNAi的发现

1990年，Jorgensen等[13]为加深矮牵牛花（penmias）的紫色，导入了一个强启动子控制的色素基因，可结果与预期相反，许多花瓣颜色并未加深，反而呈杂色甚至白色，作者将该现象命名为共抑制（cosuppression）. 1992年，Romano与Macino[14]也在粗糙链孢霉中发现了外源导入基因可以抑制具有同源序列的内源基因的表达，他们将此现象称为基因压制（quelling）. 1995年，康奈尔大学的Guo等[15]在利用反义核酸技术试图阻断秀丽新小杆线虫基因表达时意外地发现，对照实验中注射正义RNA（sense RNA）不但不增加该基因的表达，反而与反义RNA（antisense RNA）一样特异性地阻断该基因的表达，该结果令作者十分困惑. 直到1998年2月，Fire与Mello等[1]的研究证明，在正义RNA阻断了基因表达的试验中，真正起作用的是双链RNA，同时包含了正义链和反义链的双链RNA阻断基因表达的效率要比单独使用正义链或者反义链强很多，他们将这一现象称为RNAi. 至此，RNAi这套原先不为人所知但在自然界却一直存在的基因表达调控机制被阐明. 2006年，Fire和Mello因此获得了诺贝尔生理医学奖. 在后续的短时间内，研究者们发现此现象广泛存在于低等与高等生物中，说明该机制古老而意义重大. 2001年，Tuschl等[16]又证明人工合成的siRNA可特异性地抑制哺乳动物细胞中靶基因的表达，从而开启了RNAi应用于后基因组时代基因功能研究的大门，同时也促使其成为人类疾病治疗药物开发的热点.

2.2　RNAi的作用机制

在RNAi引起基因沉默的过程中，细胞内具有核糖核酸酶Ⅲ（ribonuclease Ⅲ，RNase Ⅲ）活性的核酸酶Dicer首先识别双链RNA（dsRNA）或发卡RNA（hairpin-RNA），将其切割成21~23 nt的siRNA，该siRNA产物在3'末端有2nt的突出，在5'末端有磷酸基团（图2）. 随后siRNA与无活性的RNA诱导沉默复合物（RNA induced silencing complex，RISC）结合，在解螺旋酶的作用下siRNA双链解开为单链. 由于siRNA与mRNA具有高度同源性，其反义链通过与靶基因mRNA进行特异性结合使RISC活化，最后RISC中的Argonaute蛋白将靶基因mRNA剪断、实现基因表达沉默. 由于siRNA的反义链在RNAi系统导致的序列特异性基因沉默中作为模板，这条链也被称为引导链或指导链（guide strand），相应的正义链被称为随从链（passenger strand）[17-18].

与此同时，内源性微小RNA（或miRNA）也可以通过RNAi系统导致基因沉默. miRNA生物起源最初是在细胞核内启动[19]，miRNA利用RNA聚合酶Ⅱ或Ⅲ被转录形成初始miRNA（primary miRNA，pri-miRNA），pri-miRNA转录本含有5'帽子结构和3'-poly A尾序列（图2）. 典型的pri-miRNA带有一个含33 nt碱基的茎环结构. 随后Drosha-DGCR8复合物将pri-miRNA加工成约70 nt的前体miRNA（precursor miRNA，pre-miRNA）. Drosha是一种细胞核RNase Ⅲ，可以与DGCR8（DiGeorge syndrome critical region gene-8）形成复合物，加工底物形成5'含磷酸基团、3'有2个悬挂碱基（2-nt overhang）的RNA产物[20]. 接着，pre-miRNA被核转运受体复合物（exportin-5-RanGTP complex）转运进细胞质[21-24]，随后这些70 nt的pre-miRNA进一步被Dicer加工成约22 nt的成熟miRNA. 成熟miRNA随后被装载入RISC以产生基因沉默作用. miRNA通过部分匹配的方式与其靶mRNA识别，并结合在靶mRNA的3'非翻译区（3'-UTR），最后在P-body中miRISC切割其靶mRNA或抑制蛋白质翻译，从而完成RNAi过程[25].

2.3　RNAi疗法的特点

小分子化合物与抗体蛋白类药物作用时，通常是依赖于空间结构的特异性亲和，实现对靶蛋白的功能阻断或激活. RNAi疗法则针对遗传学“中心法则”的“中间环节”——信使RNA，通过碱基互补配对原则确定靶分子，之后RISC中的效应蛋白攻击靶信使RNA，从而阻断靶基因表达[2, 26]，实现疾病治疗. 当今生物医学已发展到后基因组时代，遵从序列特征发挥作用的小核酸药物可根据人类基因组或转录组信息直接设计获得，可理解为一种“信息”药物，作为一类全新的前沿制药技术平台，必将对未来药物的开发模式和疾病的治疗管理模式形成重大影响，尤其在小分子化合物、蛋白质

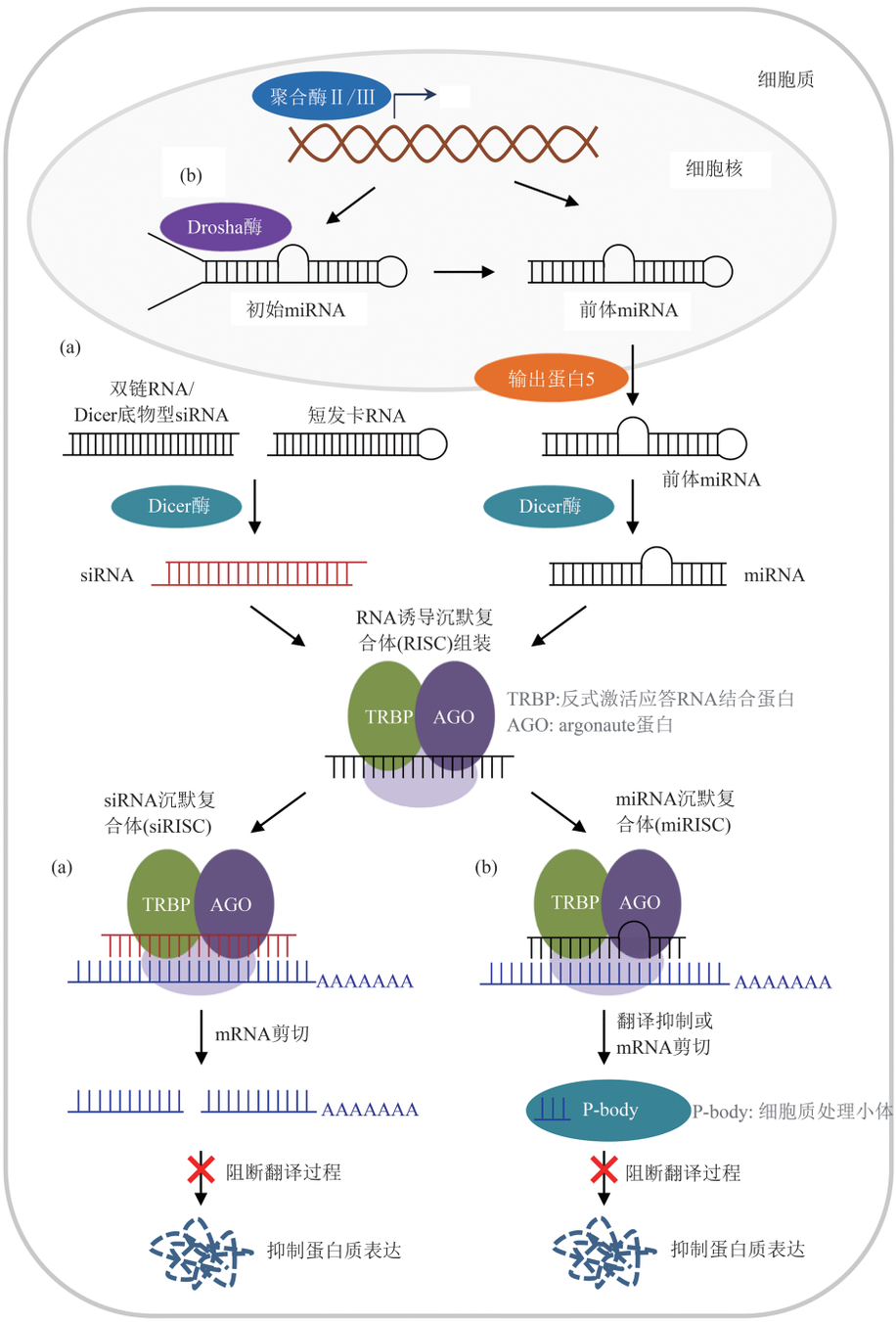

Fig. 2　RNAi working pathway

图2　RNAi原理示意图

（a）小干扰RNA（siRNA）加工及作用通路.（b）微小RNA（miRNA）生成及作用通路.

类药物不可靶向（untargetable）或不可成药（undruggable）的疾病领域，核酸药物的潜力巨大.

3　RNAi药物的发展历程

尽管ONPATTRO成功获批上市，但RNAi疗法的发展却历尽波折. 1998年Mello、Fire等[1]研究人员首次揭示线虫中RNA干扰现象；2001年Tuschl等[16]首次利用体外合成的siRNA实现了哺乳动物细胞中的基因表达调控，标志着RNAi拥有了从研究走向制药的潜力. 2004年，第一个RNAi

药物Bevasiranib进入临床试验[27]，之后便迎来该领域的蓬勃发展期，大型制药企业罗氏、默克、辉瑞、赛诺菲、雅培等纷纷进入这一领域. 2006年，RNAi发现者Andrew Fire和Craig Mello获得诺贝尔生理医学奖. 但2008年，Kleinman等[28]的研究证明，用于治疗老年性黄斑变性（age-related macular degeneration，AMD）病人的脉络膜血管新生（choroidal neovascularization，CNV）的两个siRNA药物，即靶向VEGFA（vascular endothelial growth factor A）的Bevasiranib和靶向VEGFR1（vascular endothelial growth factor receptor 1）的AGN211745（或siRNA-027），发挥治疗作用并不依赖于RNAi机制，而是通过刺激Toll样受体3（toll-like receptor 3，TLR3），诱导产生γ干扰素、白介素12，而实现对新生血管的抑制. 2009年，Bevasiranib终止了Ⅲ期临床研究. 同时，愈加深入的研究发现，siRNA稳定性不理想、存在潜在的免疫原性[29]，尤其在如何实现安全高效的体内递送问题上一直难以取得实质突破[30]，人们开始对该制药技术产生怀疑和失望. 结合当时的全球经济环境，RNAi药物研发开始跌入低谷，大药企纷纷退出[31]. 2010年，罗氏制药公司停止了RNAi药物的内部研发；2011年，辉瑞与雅培相继撤出了RNAi领域；同在2011年，默克公司亦将其基于2006年收购的Sirna公司建立的RNAi实验室卖予了Alnylam公司.

与此同时，2010年、2011年，两个进入临床研究阶段的siRNA药物CALAA01（治疗实体瘤）和ALN-TTR01（治疗转甲状腺素蛋白淀粉样变性引起的神经病变）相继证明，siRNA在人体中可通过RNAi机制特异性地降解靶mRNA序列，实现基因沉默[32-33]. 更重要的是，该领域以Alnylam为代表的创新生物技术企业一直在潜心探索新技术，在如何提升RNAi药物稳定性、特异性，降低脱靶效应及肝毒性，以及如何实现更安全高效的体内递送等方面，推陈出新并精雕细琢. 其中，以GalNAc（N-acetylgalactosamine，N'-乙酰半乳糖胺）缀合技术[34]和增强的稳定化修饰技术[35]为代表，极大地促进和推动了RNAi制药的快速复苏[36-38].

然而，2016年，Alnylam公司用于治疗转甲状腺素蛋白淀粉样变性引起的心肌损伤的siRNA药物Revusiran[39]，Arrowhead公司基于DPC（Dynamic PolyConjugate™）静脉给药技术开发的治疗乙型肝炎和α-1抗胰蛋白酶缺乏症（alpha-1 antitrypsin deficiency，AATD）的siRNA药物ARC-520、ARC-521、ARC-AAT[40]，以及Mirna公司基于脂质体递送系统开发的治疗实体瘤的miRNA药物MRX34[41]，均因为药物安全性不理想相继终止了临床试验研究. 这一系列事件再次动摇了人们对RNAi疗法的信心，使得药物开发公司价值暴跌、公司裁员、甚至变卖. 然而，本领域的科研工作者更应注意到的是，该系列RNAi药物所使用的技术，是本领域早期开发的递送和修饰技术，并非近年发展起来的成熟技术. 更准确地说，Arrowhead公司决定停止基于DPC静脉给药技术开发siRNA药物，转向基于缀合给药技术开展研究，一定程度上正是看到新技术的先进性与优越性.

由此可见，RNAi疗法与历史上其他前沿技术（如单克隆抗体）类似，经历了跌宕起伏的坎坷历程，但以Alnylam为代表的生物技术企业及该领域科研人员，展现了坚守者的理想与精神、执着与韧力、专业与素养，一步步解决了RNAi药物走向临床应用的各个障碍，带领该领域走到了新的阶段，开始了新的纪元.

4　RNAi药物的关键技术演化历程

4.1　ONPATTRO的递送和修饰技术

RNAi药物发展至今，最关键的技术瓶颈是如何实现安全高效的体内递送. 本次获批的ONPATTRO（ALN-TTR02）所使用的递送系统是一种脂质体体系（第二代脂质体技术）[42]，该体系由DLin-MC3-DMA（（6*Z*、9*Z*、28*Z*、31*Z*）-Heptatriaconta-6，9，28，31-tetraen-19-yl-4-（dimethylamino）butanoate）、二硬脂酰磷脂酰胆碱（1，2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine，DSPC）、胆固醇（cholesterol）、聚乙二醇脂质（（*R*）-2，3-bis（octadecyloxy）propyl-1-（methoxy polyethylene glycol 2000）carbamate，PEG-DMG）组成，优选的四者之间的相对摩尔比为50%∶10%∶38.5%∶1.5%. DLin-MC3-DMA脂质分子的解离常数（p*K*a）为6.44，在pH中性环境下（如血液循环系统），基于该分子制备的脂质体只有约10%的分子离子化，整体基本呈现电中性，而当pH降低到5.5时，该脂质体约有90%分子离子化，整体呈正电荷. 这使得ONPATTRO进入血液循环系统后，不会产生高电荷性带来的体内毒性，也避免了快速被机体免疫细胞清除. 进一步，当该脂质体进入细胞后，DLin-MC3-DMA分子又能响

应内涵体、溶酶体的酸性pH环境而离子化，并与细胞膜成分中天然存在的阴离子脂质相互作用，从而破坏内涵体和/或溶酶体的膜，将siRNA释放到细胞质中完成基因沉默作用.

另一方面，有研究表明阳离子脂质体递送siRNA到肝实质细胞不依赖于载脂蛋白E（apolipoprotein E，ApoE）和低密度脂蛋白受体（low-density lipoprotein receptor，LDLR），可离子化的脂质体则可能同时依赖于这两种蛋白[43]. 该研究使用的阳离子脂质体和可离子化脂质体中的关键脂质分别为$98N_{12}$-5（I）[44]和DLin-KC2-DMA（2，2-dilinoleyl-4-（2-dimethylaminoethyl）-［1，3］-dioxolane）[45]. DLin-MC3-DMA与DLin-KC2-DMA一样是一种可离子化的脂质分子，但目前未见研究阐述其肝靶向递送siRNA的明确机理. 作者本人的研究（数据未显示）则表明，DLin-MC3-DMA脂质体依赖于ApoE，但不依赖于LDLR，该特点与后来报道的类脂质分子cKK-E12[46]相同，但具体为何依赖ApoE（配体）而不依赖LDLR（ApoE的主要受体），目前机理不明，作者推测可能有其他受体参与其中.

ONPATTRO的临床Ⅰ期试验开始于2012年3月. 在此之前，Alnylam公司基于DLin-DMA（1，2-dilinoleyloxy-3-dimethylaminopropane，1，2-二油酰氧基-3-二甲基氨基丙烷）的第一代脂质体技术（SNALP）[47]开发了ALN-TTR01，并于2010年6月开始临床Ⅰ期试验，二者使用的siRNA药物活性分子则完全相同. 2013年8月，二者的临床Ⅰ期数据一起发表于《新英格兰医学杂志》*(N Engl J Med)*[33]. 数据显示，ALN-TTR02的安全性和有效性均好于ALN-TTR01，Alnylam公司之后便停止了ALN-TTR01的开发.

siRNA制药的另一核心技术是，如何对siRNA进行精确的化学修饰，以显著提高其抵抗酶降解的能力，并降低或避免脱靶效应、避免促发免疫反应. ALN-TTR01、ONPATTRO的开发时间早，从新近发表的临床Ⅲ期数据资料分析[7]，ONPATTRO的siRNA分子在其正义链（随从链）的所有嘧啶核苷酸（C、U）进行了糖环2'-甲氧基修饰，反义链（向导链）则仅有两处尿嘧啶核苷酸（U）进行了糖环2'-甲氧基修饰，正义链与反义链的3'各有2个脱氧胸苷酸（dT）的悬挂，其他核苷酸及磷酸骨架均无修饰. 这是比较轻的修饰类型，带上了早期修饰技术的烙印，但得益于脂质体包裹的制剂形式，一定程度上保护了siRNA，阻止了酶的攻击.

4.2 递送与修饰技术的最新进展

ONPATTRO使用的脂质体递送技术为RNAi药物实现了零的突破，与此同时，RNAi制药领域的生物技术公司以及该领域的科研工作者从未停止新的递送技术探索，其中最为突出的当属GalNAc（N'-乙酰半乳糖胺）缀合的肝靶向递送技术. GalNAc最早于20世纪70、80年代被发现可用于小分子、寡核苷酸等分子的肝靶向递送，Alnylam则较早将该技术在siRNA递送上发展成熟[34，48-49]. 去唾液酸糖蛋白受体（asialoglycoprotein receptor，ASGPR）是肝实质细胞特异性表达的内吞型受体，在物种间保守性高，去唾液酸糖蛋白、半乳糖、半乳糖胺、半乳聚糖、GalNAc等糖分子及其衍生物对该受体有高亲和性. 早期研究证明，多簇的（例如3簇或4簇）GalNAc分子在间距约为2 nm时对ASGPR有高亲和性[49]. 基于此，Alnylam将3簇GalNAc分子通过连接子（linker）直接缀合在siRNA药物上，经皮下注射可高效安全地将siRNA递送到肝实质细胞，且皮下注射的效果显著优于静脉注射[34，50]（图3a）.

与此同时，siRNA双链几乎所有核苷酸均进行精细的化学修饰[35，50-54]. 例如，Alnylam在新近发表的研究[35]中，针对正义链为21 nt、反义链为23 nt的siRNA的一种优选修饰方案（图3b，c，DV18）是，其正义链的第7、9、10、11位（从5'端计算），以及反义链的第2、6、8、9、14、16位（从5'端计算）核苷酸用2'-氟代（2'-F）修饰，两条链的其余核苷酸均用2'-甲氧基（2'-OMe）修饰，此外，正义链5'端两个磷酸基团以及反义链5'、3'各两个磷酸基团用硫代磷酸修饰. 这些化学修饰单元的结构式见图3c. 得益于这种增强的稳定化修饰，siRNA可有效抵抗血液中和溶酶体中各种酶（包括核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、磷酸酶、磷酸二酯酶、焦磷酸酶等[55]）的攻击，极大地提升了siRNA的稳定性和成药性. 同时，最近的研究证明，GalNAc-siRNA的肝毒性很大程度来自于siRNA序列以类miRNA的种子区匹配方式抑制了非靶基因的表达（即类miRNA的脱靶效应），而在反义链的第7位（从5'端计算），用乙二醇核苷酸（glycol nucleic acid，GNA）修饰（图3b，c，ESC+修饰方案），可显著降低siRNA的脱靶效应，提高GalNAc-siRNA药物的安全性[50].

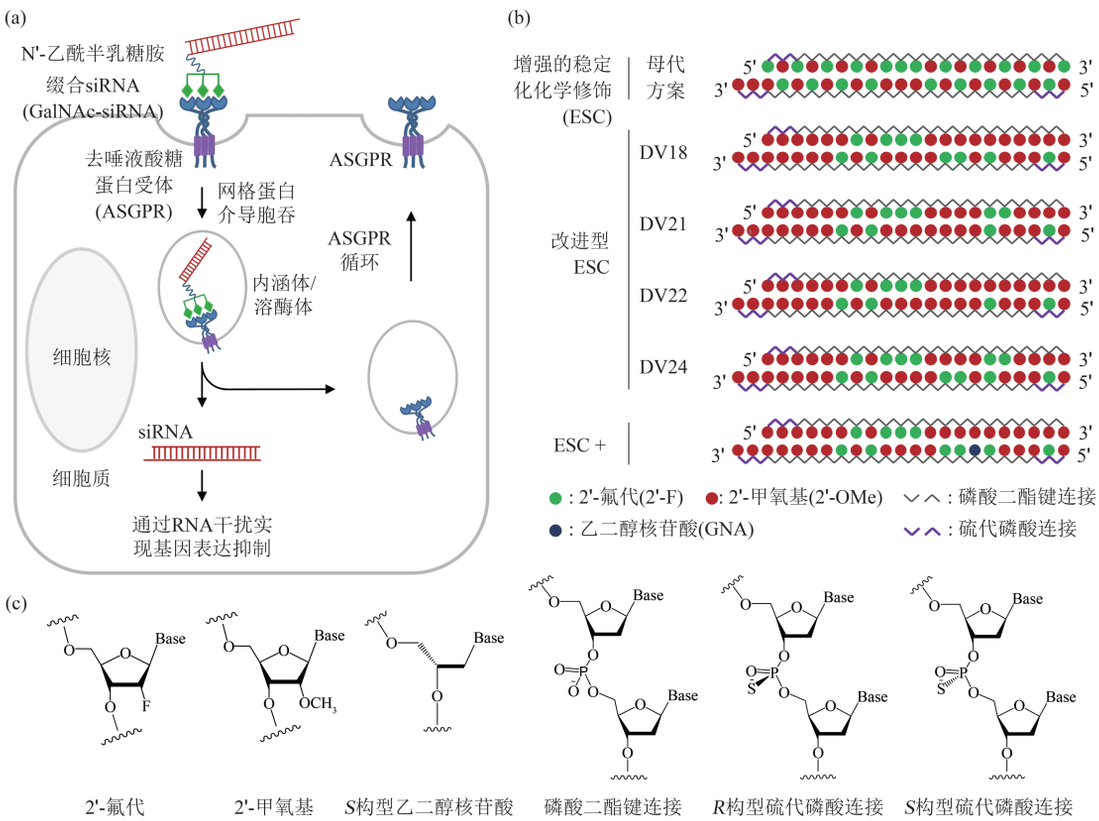

Fig. 3　GalNAc−siRNA conjugate delivery platform and siRNA modification chemistry

图3　最近发展的GalNAc−siRNA缀合递送技术和siRNA修饰技术

（a）GalNAc/ASGPR介导的肝靶向siRNA递送.（b）代表性的siRNA增强化学修饰模式.（c）常见siRNA化学修饰基团的结构式. GalNAc，N'-乙酰半乳糖胺；ASGPR，去唾液酸糖蛋白受体；2'-F，2'-氟代修饰；2'-OMe，2'-甲氧基修饰；GNA，乙二醇核苷酸.

正是GalNAc缀合与增强稳定化修饰的珠联璧合，使得GalNAc-siRNA药物已可实现单次给药后药效维持半年、甚至一年[56]，可支持至少一个季度给药一次，且是通过皮下注射完成给药，病人依从性将较静脉给药好. GalNAc-siRNA超长作用时程、高效、安全、皮下给药等技术特征[57]，预计将颠覆很多慢性肝源性疾病的管理和治疗模式，形成革命性的新疗法，给人类健康带来巨大福祉. 目前，以Alnylam公司为先驱及代表，其他国际核酸制药领域的Arrowhead、Dicerna、Silence、Arbutus、Ionis、Wave Life、Regulus等公司，以及中国的苏州瑞博生物技术有限公司，均研发了各自的GalNAc递送和修饰技术，基于此孵化了丰富的RNAi药物产品线[48]，并已有多项产品进入到临床Ⅱ-Ⅲ期研究阶段[2]，展示出RNAi制药步入快轨道的强劲发展趋势.

更进一步，Alnylam公司平行开发了可快速拮抗siRNA抑制作用的“解药”技术REVERSIR[58]，该技术使用化学修饰的长为9 nt的寡核苷酸，同样缀合GalNAc后经皮下给药，可在RISC中与原siRNA的反义链结合，终止siRNA的抑制作用. 该技术将可根据临床需要调整siRNA的药效，避免长时程基因抑制中的潜在风险. 此外，在肝靶向的GalNAc-siRNA缀合技术之外，Alnylam公司已进一步研究了中枢神经系统和眼部组织的靶向递送技术[59]，Arrowhead公司也已拓展到了肾脏、肺脏、肌肉等组织的靶向递送[60]，且预计很快将有新药物进入临床研究阶段.

5　总结与展望

综上所述，RNAi制药经历了2005~2008年的高潮、2008~2012年的低谷之后，近些年技术上的显著进步与成熟已推动该领域渐入佳境. 在ONPATTRO走出了第一步之后，伴随着核心技术的不断革新和突破，RNAi药物的研发将步入快轨

道. 接下来，RNAi制药技术研究的重点将转到开发肝组织以外的靶向递送技术上. 相信在不远的将来，国际、国内RNAi制药均将迎来快速且稳健的发展期，且因技术和综合环境的快速改进，国内也将表现出与国际基本同步的节奏，让我们拭目以待.

参 考 文 献

[1] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998, **391**(6669): 806-811

[2] Crooke S T, Witztum J L, Bennett C F, *et al*. RNA-targeted therapeutics. Cell Metab, 2018, **27**(4): 714-739.

[3] Hoy S M. Patisiran: first global approval. Drugs, 2018, **78**(15): 1625-1631

[4] Garber K. Alnylam launches era of RNAi drugs. Nat Biotechnol, 2018, **36**(9): 777-778

[5] Ando Y, Coelho T, Berk J L, *et al*. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. Orphanet J Rare Dis, 2013, **8**:31

[6] Gertz M A. Hereditary ATTR amyloidosis: burden of illness and diagnostic challenges. Am J Manag Care, 2017, **23**(7Suppl): S107-S112

[7] 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**(1): 11-21

[8] 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**(1): 22-31

[9] Keam S J. Inotersen: first global approval. Drugs, 2018, **78**(13): 1371-1376

[10] Scott L J. Tafamidis: a review of its use in familial amyloid polyneuropathy. Drugs, 2014, **74**(12): 1371-1378

[11] Plante-Bordeneuve V, Lin H, Gollob J, *et al*. An indirect treatment comparison of the efficacy of patisiran and tafamidis for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis with polyneuropathy. Expert Opin Pharmacother, 2018, doi: 10.1080/14656566.14652018.11554648

[12] Maurer M S, Schwartz J H, Gundapaneni B, *et al*. Tafamidis treatment for patients with transthyretin amyloid cardiomyopathy. N Engl J Med, 2018, **379**(11): 1007-1016

[13] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell, 1990, **2**(4): 279-289

[14] Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences. Molecular Microbiology, 1992, **6**(22): 3343-3353

[15] Guo S, Kemphues K J. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell, 1995, **81**(4): 611-620

[16] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al*. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 2001, **411**(6836): 494-498

[17] Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, *et al*. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. Cell, 2002, **110**(5): 563-574

[18] Mcmanus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nature Reviews Genetics, 2002, **3**(10): 737-747

[19] Lee Y, Ahn C, Han J, *et al*. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature, 2003, **425**(6956): 415-419.

[20] Kim V N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, **6**(5): 376-385

[21] Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature, 2004, **431**(7006): 343-349

[22] Lund E, Guttinger S, Calado A, *et al*. Nuclear export of microRNA precursors. Science, 2004, **303**(5654): 95-98

[23] Bohnsack M T, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA, 2004, **10**(2): 185-191

[24] Yi R, Qin Y, Macara I G, *et al*. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes & Development, 2003, **17**(24): 3011-3016

[25] Rana T M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, **8**(1): 23-36

[26] 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**(3): 203-222

[27] Garba A O, Mousa S A. Bevasiranib for the treatment of wet, age-related macular degeneration. Ophthalmol Eye Dis, 2010, **2**:75-83

[28] Kleinman M E, Yamada K, Takeda A, *et al*. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA *via* TLR3. Nature, 2008, **452**(7187): 591-597

[29] Robbins M, Judge A, Maclachlan I. siRNA and innate immunity. Oligonucleotides, 2009, **19**(2): 89-102

[30] Whitehead K A, Langer R, Anderson D G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nat Rev Drug Discov, 2009, **8**(2): 129-138

[31] Krieg A M. Is RNAi dead? Mol Ther,2011, **19**(6): 1001-1002

[32] Davis M E, Zuckerman J E, Choi C H, *et al*. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA *via* targeted nanoparticles. Nature, 2010, **464**(7291): 1067-1070

[33] Coelho T, Adams D, Silva A, *et al*. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. N Engl J Med, 2013, **369**(9): 819-829

[34] Nair J K, Willoughby J L, Chan A, *et al*. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. J Am Chem Soc, 2014, **136**(49): 16958-16961

[35] 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**(3): 708-717

[36] Hayden E C. RNA interference rebooted. Nature, 2014, **508**(7497): 443

[37] Wu S Y, Lopez-Berestein G, Calin G A, *et al*. RNAi therapies: drugging the undruggable. Sci Transl Med, 2014, **6**(240): 240ps247

[38] Lieberman J, Sharp P A. Harnessing RNA interference for therapy the silent treatment. Jama-Journal of the American Medical Association, 2015, **313**(12): 1207-1208

[39] Garber K. Alnylam terminates revusiran program, stock plunges. Nature Biotechnology, 2016, **34**(12): 1213-1214

[40] Arrowhead. Arrowhead Pharmaceuticals Focuses Resources on Subcutaneous and Extra-Hepatic RNAi Therapeutics. http://ir. arrowheadpharma. com / static-files / c0ce7c76-51a9-41a6-9a5d-4cc8d6a94dc8. 2016, 1-2.

[41] Mirna. Mirna Therapeutics Halts Phase 1 Clinical Study of MRX34. https://www. businesswire. com / news / home / 20160920006814 / en / Mirna-Therapeutics-Halts-Phase-1-Clinical-Study. 2016, 1-2.

[42] Jayaraman M, Ansell S M, Mui B L, *et al*. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing *in vivo*. Angew Chem Int Ed Engl, 2012, **51**(34): 8529-8533

[43] Akinc A, Querbes W, De S, *et al*. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. Mol Ther, 2010, **18**(7): 1357-1364

[44] Akinc A, Zumbuehl A, Goldberg M, *et al*. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. Nat Biotechnol, 2008, **26**(5): 561-569

[45] Semple S C, Akinc A, Chen J, *et al*. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. Nat Biotechnol, 2010, **28**(2): 172-176

[46] Dong Y, Love K T, Dorkin J R, *et al*. Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, **111**(11): 3955-3960

[47] Morrissey D V, Lockridge J A, Shaw L, *et al*. Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. Nat Biotechnol, 2005, **23**(8): 1002-1007

[48] Huang Y. Preclinical and clinical advances of GalNAc-decorated nucleic acid therapeutics. Mol Ther Nucleic Acids, 2017, **6**:116-132

[49] Huang Y Y, Liang Z C. Asialoglycoprotein receptor and its application in liver-targeted drug delivery. Prog Biochem Biophys, 2015, **42**(6): 501-510

[50] Janas M M, Schlegel M K, Harbison C E, *et al*. Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity. Nat Commun, 2018, **9**(1): 723

[51] Arrowhead. Compositions and Methods for Inhibiting Gene Expression of Factor XII: World Intellectual Property Organization, WO**2016149331**: 1-137. 2016-09-22

[52] Khvorova A, Watts J K. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nat Biotechnol, 2017, **35**(3): 238-248

[53] Craig K, Abrams M, Amiji M. Recent preclinical and clinical advances in oligonucleotide conjugates. Expert Opin Drug Deliv, 2018, **15**(6): 629-640

[54] Chen C, Yang Z, Tang X. Chemical modifications of nucleic acid drugs and their delivery systems for gene-based therapy. Med Res Rev, 2018, **38**(3): 829-869

[55] Hudson A J, Lee W, Porter J, *et al*. Stability of antisense oligonucleotides during incubation with a mixture of isolated lysosomal enzymes. International Journal of Pharmaceutics, 1996, **133**(1-2): 257-263

[56] Alnylam. Phase 1 study of ALN-TTRsc02, a subcutaneously administered investigational RNAi therapeutic for the treatment of transthyretin-mediated amyloidosis. http://www. alnylam. com / wp-content/uploads/2018/03/10.-TTR-SCO2_FINAL.pdf. 2018, **1**-1

[57] Janas M M, Harbison C E, Perry V K, *et al*. The nonclinical safety profile of GalNAc-conjugated RNAi therapeutics in subacute studies. Toxicol Pathol, 2018, **46**(7): 735-745

[58] Zlatev I, Castoreno A, Brown C R, *et al*. Reversal of siRNA-mediated gene silencing *in vivo*. Nat Biotechnol, 2018, **36**(6): 509-511

[59] Alnylam. Alnylam R&D Day 2018. https://www. alnylam. com / wp-content / uploads / 2018 / 12 / RD_Day2018_FINAL_Capella. pdf. 2018, **1**-236

[60] Arrowhead. Investor and Analyst R&D Day 2018. http://ir. arrowheadpharma. com / static-files / b671502e-ce6a-4346-9b83-00a366789816. 2018, 1-122

Approval of The First-Ever RNAi Therapeutics and Its Technological Development History*

HUANG Yuan-Yu[1,2)**]

([1)]*Advanced Research Institute of Multidisciplinary Science, School of Life Science, Key Laboratory of Molecular Medicine and Biotherapy*; *Beijing Institute of Technology, Beijing* 100081, China;

[2)]*School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410208, China)

Abstract Recently, the United States Food and Drug Administration (FDA) and the European Commission (EC) approved ONPATTRO™ (Patisiran) lipid complex injection, an RNA interference (RNAi) therapeutic developed by Alnylam Pharmaceuticals, Inc., for the treatment of the polyneuropathy of hereditary transthyretin-mediated (hATTR) amyloidosis in adults. ONPATTRO is the first approved RNAi therapeutics all over the world, indicating the whole development processes have been well established. It also means a novel form of drug molecule comes to beside from bench, following the small molecules and monoclonal antibodies. Based on this milestone achievement, the basic information of the drug and indication, the mechanism and properties of RNAi therapeutics, its complicated development history, as well as the latest advances of delivery and modification technologies, were thoroughly reviewed and discussed in this paper, which provides a rough picture for ONPATTRO and RNAi therapy.

Key words RNA interference, small interfering RNA, ONPATTRO, siRNA delivery, stabilization modification

DOI：10.16476/j.pibb.2018.0249

---

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China（31871003）, the Beijing Institute of Technology Research Fund Program for Young Scholars and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China，the Hunan Provincial Natural Science Foundation of China（2018JJ1019）and the Hu-Xiang Young Talent Program（2018RS3094）.

** Corresponding author.

Tel：+86-10-68911089，E-mail：yyhuang@bit.edu.cn

Received：September 19，2018 Accepted：January 7，2019