

## 反义寡核苷酸技术在遗传性视网膜变性治疗中的应用

李五一 综述 睢瑞芳 审校

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院眼科 100730

通信作者: 睢瑞芳, Email: hrf sui@163. com

**【摘要】** 遗传性视网膜变性在临床上缺乏有效的治疗手段, 基因治疗有望从根本上恢复遗传物质的功能, 为其提供新的治疗策略。反义寡核苷酸(AON)是一种小分子核酸类药物, 可以通过碱基互补配对原则与信使 RNA 特异性结合, 从而在转录和翻译水平干扰或恢复基因表达。AON 具有特异性高、微量高效、靶向范围广、免疫原性低、毒性及不良反应小等优势, 成为遗传性眼病治疗新手段。目前, 已有 3 种不同的 AON 药物进入了遗传性视网膜变性疾病的临床试验阶段。本文就近年来 AON 在其化学结构修饰、特性和作用机制等方面的进展及其目前在不同遗传性视网膜变性疾病中应用的治疗策略进行综述。

**【关键词】** 反义寡核苷酸; 基因治疗; 视网膜变性, 遗传性

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(82171086); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费项目(CIFMS#2021-I2M-1-003)

DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20210128-00074

### Application of antisense oligonucleotide in the treatment of inherited retinal dystrophy

Li Wuyi, Sui Ruifang

Department of Ophthalmology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Corresponding author: Sui Ruifang, Email: hrf sui@163. com

**[Abstract]** Gene therapy is expected to restore the function of genetic material fundamentally and it has become a new trend in inherited retinal dystrophy treatment. Antisense oligonucleotide (AON) is a kind of small molecule nucleic acid drug, which can specifically bind to messenger RNA through the base pairing principle, thus interfering or modifying gene expression at the transcription and translation level. Possessing the advantages of high specificity and efficiency, wide targeting range, low immunogenicity and limited adverse effect, AON has become a novel remedy for inherited retinal dystrophy. Currently, three different AON drugs have already been used in clinical trials for inherited retinal dystrophy. In this review, the chemical structure modification, properties and mechanism of AON, and the therapeutic strategies of AON in different inherited retinal dystrophy diseases in recent years were summarized.

**[Key words]** Oligonucleotides, antisense; Genetic therapy; Retinal dystrophies, inherited

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (82171086); CAMS Innovation Fund for Medical Science (CIFMS#2021-I2M-1-003)

DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20210128-00074

长期以来, 遗传性视网膜变性缺乏有效的临床治疗手段。近 20 年中, 以腺相关病毒( adeno-associated virus, AAV) 和慢病毒为载体的基因增补策略在遗传性视网膜变性治疗研究中已取得重大进展, 为遗传性视网膜变性治疗带来了希望, 但由于载体的负载基因长度存在局限性, 使其难以广泛应用。反义寡核苷酸( antisense oligonucleotide, AON) 是一种通过碱基互补配对原则结合并降解靶信使 RNA ( messenger RNA, mRNA) 以纠

正或抑制其转录与翻译的小分子化合物。AON 具有特异性高、微量高效、免疫原性低、毒性及不良反应小、应用范围广等优点, 可以有效地填补遗传性视网膜变性基因治疗的空白。AON 已在遗传性视网膜变性和视神经萎缩等眼部疾病治疗研究中取得了一定的进展, 本文就近年来 AON 在其化学结构修饰、特性和作用机制等方面的进展及其在不同遗传性视网膜变性疾病中应用的治疗策略进行综述。

### 1 AON 作用机制和结构修饰

#### 1.1 AON 作用机制

AON 通过碱基配对原理与靶 mRNA 上特定序列结合,活化核糖核酸酶 H (ribonuclease H, RNase H),使靶 mRNA 降解以抑制或调控其转录、剪切、翻译,从而调节其编码蛋白的表达<sup>[1]</sup>。人体细胞内包含有 2 种 RNase H 酶,即 RNase H1 和 RNase H2,其中 RNase H2 表达更为丰富,但仅 RNase H1 参与 AON 的作用机制<sup>[2-3]</sup>。当 DNA 与 RNA 形成异源双链体时, RNase H 酶被激活并诱导靶 mRNA 降解,而 AON 在诱导双链体中 mRNA 分解后,可以继续特异性结合其他靶 mRNA 以持续发挥作用<sup>[4]</sup>。AON 可以通过多种不同的机制作用于靶 mRNA 翻译为蛋白质的一系列过程,进而发展出了多种 AON 应用方式<sup>[5-6]</sup>(图 1),为其在遗传性疾病临床治疗中的应用奠定了基础。

AON 可以与前体 mRNA 5'-端非翻译区 (5'-untranslated region, 5'-UTR) 结合抑制其甲基化,或者结合 3'-端抑制其多聚腺苷化,从而导致 mRNA 不稳定而分解,达到等位基因特异性抑制的作用<sup>[2,7]</sup>。对于成熟的 mRNA, AON 可以通过结合起始密码子的方式形成 mRNA 的翻译阻滞,从而起到抑制蛋白表达的作用<sup>[7]</sup>。在前体 mRNA 内含子去除及外显子连接的过程中, AON 可以通过靶向内含子和外显子之间的剪接位点或其周围的增强子及沉默子位点,纠正前体 mRNA 的异常剪切,达到等位基因特异性修复的目的<sup>[4,8]</sup>。同时, AON 干预剪切的能力也可用于调控前体 mRNA 的治疗策略,这种方式被称为外显子跳跃,指当突变导致阅读框改变、异常剪切产生假外显子或所翻译的蛋白质功能受损时,通过 AON 靶向剪接位点以外显子跳跃的方式恢复全部或大部分蛋白功能<sup>[9]</sup>,这是其靶向治疗遗传性疾病中的常用治疗策略。Echevarría 等<sup>[10]</sup>在对欧美地区杜氏肌肉萎缩症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 患者的基因治疗研究中发现,突变导致的外显子 50 的跳跃造成阅读框提前结束并产生了截短的非功能性蛋白;通过设计 AON 结合外显子 51 的剪切元件并跳过外显子 51 的方式修复了 mRNA 的阅读框,并产生了较短的功能性蛋白,用于治疗突变导致外显子 50 跳跃的药物 Exondys51 (eteplirsen, 依特立生) 可惠及美国 13% 的 DMD 患者。

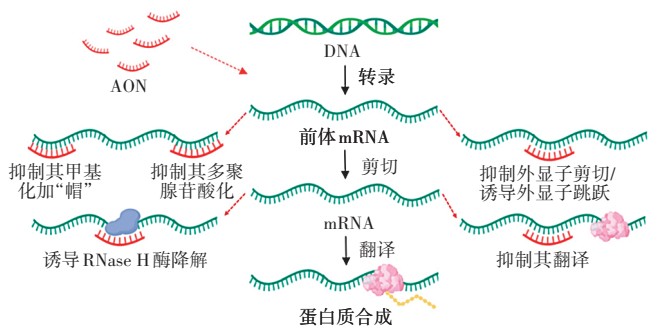


图 1 AON 的多种作用机制图 绿色双链代表 DNA; 蓝绿色单链代表由 DNA 转录的 RNA; 红色小片段代表 AON; AON: 反义寡核苷酸; mRNA: 信使 RNA

#### 1.2 AON 的结构修饰

AON 是由磷酸二酯键连接而成的线性核苷酸片段,长度为 13~25 bp。AON 在细胞内会因被核酸外切酶和内切酶迅速降解而无法发挥其药物作用,限制了其在遗传性疾病临床中的应用,因此需要对其结构进行化学修饰以改变其特性<sup>[11]</sup>。根据 AON 的分子结构,可以通过 3 个方面对其进行修饰,即碱基、核糖和磷酸二酯键(图 2,表 1)。

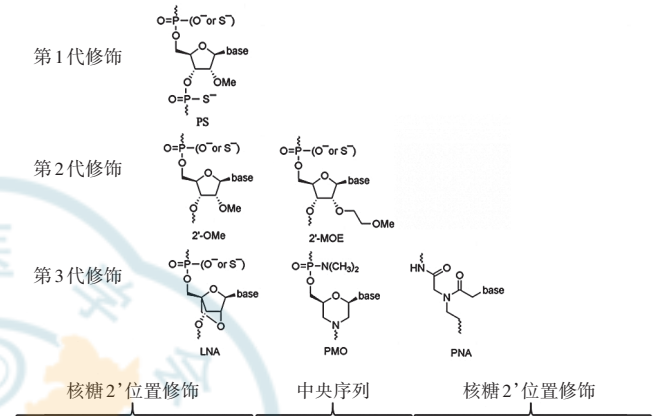


图 2 AON 的化学结构修饰示意图 核糖 2' 位置常用的第 1、2、3 代化学修饰 PS: 硫代磷酸酯; 2'-OMe: 2'-氧-甲氧基; 2'-MOE: 2'-氧-甲氧乙基; LNA: 锁核酸; PMO: 磷酰二胺吗啉代低聚物; PNA: 肽核酸

表 1 AON 化学修饰的优缺点

AON	修饰类型	优点	缺点
第 1 代	PS	磷酸酶抗性高	与血浆蛋白相互作用
第 2 代	2'-OMe	稳定性高	不能诱导 RNase H
	2'-MOE	稳定性高	不能诱导 RNase H
第 3 代	LNA	与 DNA 相同的磷酸二酯主链; 热稳定性高	具有肝脏毒性
	PNA	核酸酶抗性高; 热稳定性高	不易被细胞吸收
	PMO	核酸酶抗性高	不能聚集 RNase H

注: AON: 反义寡核苷酸; PS: 硫代磷酸酯; 2'-OMe: 2'-氧-甲氧基; 2'-MOE: 2'-氧-甲氧乙基; LNA: 锁核酸; PNA: 肽核酸; PMO: 磷酰二胺吗啉代低聚物; RNase H: 核糖核酸酶 H

第 1 代 AON 的修饰主要针对寡聚脱氧核苷酸磷酸二酯键的分子骨架,利用硫原子取代磷酸骨架上的非成键氧原子,形成硫代磷酸酯 AON (phosphorothioate antisense oligonucleotides, PS-AONs),以增强其对核酸酶降解作用的抵抗能力<sup>[12]</sup>,提高 RNase H 对靶 mRNA 降解的活性<sup>[11]</sup>,并且增强了 AON 的结构稳定性。但是 PS-AONs 的键序和电荷定位显示硫代磷酸根中硫原子带有负电荷,会导致 PS-AONs 及其核酸降解物与蛋白受体非特异性结合<sup>[13]</sup>。Watanabe 等<sup>[14]</sup>研究结果表明,PS-AONs 表现出与血浆蛋白结合的特性,并提出了 AON 的毒性问题。

第 2 代 AON 在 PS-AONs 的基础上对核糖结构进行修饰。通过将其核糖 2' 位置修饰为 2'-氧-甲氧基 (2'-O-methyluridine,

2'-OMe)和 2'-氧-甲氧乙基(2'-O-methoxyethyl, 2'-MOE)的方式,解决了 AON 与蛋白非特异性结合的问题,减轻其毒性;同时进一步增强其核酸酶抗性,提高结构稳定性,并增加其与靶序列的亲合力<sup>[4,15]</sup>。RNase H 的激活需要 AON 中含有 5~7 个连续的脱氧核苷酸片段,然而 AON 核糖 2' 位置的结构改变影响了 RNase H 的降解作用,进而降低了 AON 的有效性<sup>[5]</sup>。Gapmer 是一种 AON 的嵌合形态,其中央序列纳入至少 5 个未修饰的脱氧核苷酸用于激活 RNase H,进而克服了核糖结构修饰后 AON 有效性降低的缺陷<sup>[16]</sup>。由于核糖环修饰部分的长度与 RNase H 有效激活相关<sup>[17]</sup>,最佳中央序列的长度取决于基序,但脱氧核苷酸序列过长会影响其与 mRNA 的结合力,因此建立 gapmer 结构时需要在序列长度和结合力之间保持平衡<sup>[16]</sup>。2'-MOE-PS gapmer AON 和 2'-OMe-PS gapmer AON 是第 2 代 AON 中常用的修饰组合<sup>[4]</sup>,也是目前遗传性疾病临床应用中常见的化学修饰类型。

第 3 代 AON 结合了磷酸酯骨架和核糖环的修饰,在提高核酸酶抗性、降低毒性及增加靶向结合力和有效性之间进行平衡和优化,增加了更多的结构变化。锁核酸(locked nucleic acid, LNA)、肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)和磷酰二胺吗啉代低聚物(phosphorodiamidate morpholino oligomers, PMO)为 3 种具有代表性的特殊修饰结构。这些特殊修饰同样会影响 AON 对 RNase H 的激活,其中 LNA 可以通过 gapmer 形式形成嵌合 AON,由中央序列保留的脱氧核苷酸序列激活 RNase H,在提高核酸酶抗性的同时,有效提高 RNase H 对靶向序列的降解能力<sup>[5]</sup>。但 LNA 修饰的 gapmer AON 在动物实验中显示出明显的肝脏毒性,限制了其临床应用的开发<sup>[18]</sup>。这类新型修饰可不依赖 RNase H 的机制,通过靶向 mRNA 的 5' 非翻译区,阻止核糖体的组装,形成翻译阻滞机制<sup>[5,19]</sup>。LNA、PNA 和 PMO 这 3 种 AON 修饰都具有很好的结构稳定性和靶向结合力,且均为不带电的分子,从而降低了其与蛋白非特异性反应的可能性,但呈电中性的骨架也降低了其溶解度和生物膜渗透性,影响了其递送和效能<sup>[4]</sup>,导致其在临床治疗中的应用并不广泛。

## 2 AON 在遗传性视网膜变性治疗中的应用

AON 在遗传性眼病的治疗中有许多优势。由于眼球是一个相对独立的器官并拥有血-眼屏障,体积相对较小,AON 的给药剂量较低,故可以在一定程度上减轻系统免疫反应。同时眼内注射给药安全性高、难度小,使 AON 在遗传性眼病的应用进展迅速。目前,已有 7 种针对遗传性眼病致病基因的 AON 药物,其中 3 种 AON 已进入临床试验阶段。迄今为止,

AON 治疗遗传性眼病的研究范围十分广泛,已应用 3 种不同化学修饰的 AON 对 5 种疾病的致病变异进行治疗,其中 4 种为遗传性视网膜变性疾病。根据不同的疾病类型和突变位点,可以应用 AON 的多种作用机制,如常染色体显性遗传的疾病可以通过等位基因特异性抑制的策略来减少其突变蛋白的表达,或者通过等位基因特异性修复的方法恢复其野生型蛋白的表达;常染色体隐性遗传的疾病则常通过外显子跳跃的方式跳过突变的位点以形成截短但具有功能性的蛋白,或者通过造成假外显子跳跃的策略恢复其正常蛋白的表达(表 2)。

### 2.1 RHO 基因相关视网膜色素变性

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一种常见的遗传性视网膜变性,有高度的遗传及临床异质性。*RHO* 基因 P23H 是北美人群常染色体显性 RP (autosomal dominant RP, ADRP)的常见致病变异<sup>[28]</sup>。

*RHO* 基因编码的突变型蛋白 P23H 会导致视杆细胞丢失和感光细胞变性<sup>[29]</sup>。保留野生型 P23H 蛋白表达的同时减少突变型蛋白生成,可以在一定程度上改善 ADRP 的表型<sup>[30]</sup>。Murray 等<sup>[31]</sup>研究表明,向 *RHO* 基因 P23H 杂合突变模型小鼠玻璃体内注射靶向 2'-MOE-PS gapmer AON 能够成功抑制等位基因中突变蛋白的表达并保留野生型蛋白的正常表达,经 AON 治疗后小鼠感光细胞变性速度得到有效减缓,治疗过程中未观察到毒性及炎症反应。此 AON 药物已由 ProQR 公司开发并在 2019 年获得了美国孤儿药称号,目前正在进行 1/2 期安全和有效性临床试验。

### 2.2 NR2E3 基因相关 RP

1%~2%的常染色体显性遗传 RP 是由 *NR2E3* 基因突变引起。*NR2E3* 与转录因子视锥视杆同源盒 (cone-rod homeobox, CRX) 及神经视网膜亮氨酸拉链 (neural retina leucine zipper, NRL) 形成复合体,激活视杆细胞特异性基因表达,抑制视锥细胞特异性基因的表达<sup>[21]</sup>。*NR2E3* 的突变体 p. G56R 与 CRX 结合可破坏复合体的形成,影响光感受器分化和成熟,进而造成 RP。

Naessens 等<sup>[32]</sup>分别利用 2'-OMe-PS gapmer AON 和 LNA-PS gapmer AON 靶向利用突变 *NR2E3* 质粒转染的 RPE-1 细胞

表 2 AON 在遗传性眼病治疗中的应用

疾病	遗传类型	目的基因/ 外显子	治疗策略	AON 修饰类型	临床试验阶段	参考文献
ADRP	AD	<i>RHO</i> /exon 5	等位基因特异性抑制	2'-MOE-PS gapmer AON	I 期	[20]
			等位基因特异性抑制	2'-OMe-PS gapmer AON	-	[21]
USH	AR	<i>USH1C</i> /exon3 <i>USH2A</i> /pseudo exon 40 <i>USH2A</i> /exon 13	外显子跳跃	2'-MOE AON	-	[22]
			假外显子跳跃	2'-OMe-PS-AON	-	[23]
			外显子跳跃	/	I 期	[24]
STGD1	AR	<i>ABCA4</i> /pseudo exon 30	假外显子跳跃	2'-OMe-PS AON	-	[25]
LCA	AR	<i>CEP290</i> /pseudo exon 26	假外显子跳跃	2'-OMe-PS AON	I 期	[26]
ADOA	AD	<i>OPAI</i> /intron 4b	等位基因特异性修复	2'-OMe-PS AON	-	[27]

注:AON:反义寡核苷酸;ADRP:常染色体显性视网膜色素变性;USH:Usher 综合征;STGD1:Stargardt 病;LCA:Leber 先天性黑矇;ADOA:常染色体显性视神经萎缩;AD:常染色体显性遗传;AR:常染色体隐性遗传;PS:硫代磷酸酯;2'-OMe:2'-氧-甲氧基;2'-MOE:2'-氧-甲氧乙基;/:未知;-:无

系中产生显性负效应的 NR2E3 突变体 G56R,抑制 G56R 表达的同时保留了野生型 NR2E3 的正常表达,从而阻止了光感受器的变性;利用不同的 AON 策略治疗突变型 RPE-1 细胞,发现治疗后突变型 NR2E3 蛋白的表达量降低了 1.77%~36.2%,证明 AON 可以通过等位基因特异性沉默的方式改善由 NR2E3 基因突变引起的 RP,成为一种有潜力的 RP 治疗手段。

### 2.3 USH2A 基因相关 Usher 综合征

USH2A 基因突变是导致 Usher 综合征及 RP 常见原因之一<sup>[33]</sup>。USH2A 蛋白的缺失会导致视网膜光感受器细胞和耳蜗毛细胞静纤毛的变性<sup>[34]</sup>。

USH2A 基因内含子 40 突变导致剪切异常并产生假外显子 40 (pseudo exon 40, PE40),导致读码移框且翻译提前停止,产生截短的非功能性 USH2A 蛋白。Slijkerman 等<sup>[23]</sup>利用 2'-OMe-PS-AON 靶向患者成纤维细胞中 mRNA 突变的 PE40 剪切位点,在跳过 PE40 后成功恢复正确的 USH2A mRNA 剪切以及蛋白的表达,实验结果证明 AON 对于该基因型诱导的 Usher 综合征有潜在疗效。

另外,在 USH2A 基因中,13 号外显子突变位点 (c. 2299delG) 是欧美国家 Usher 综合征常见的致病变异,导致阅读框移码并提前出现终止密码子,进而合成截短的非功能性 USH2A 蛋白。Dulla 等<sup>[35]</sup>通过患者成纤维细胞诱导的诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 衍生的光感受器细胞与突变的斑马鱼模型实验证明,利用 AON 跳跃外显子 13 后可以合成功能性的 USH2A 蛋白,并恢复感光细胞和视网膜的功能。

QR-421a 药物是经化学修饰的 21 个核苷酸长度的 AON,可以靶向 USH2A mRNA 并通过 13 号外显子跳跃的方式产生符合读框规则的转录本,产生略短但功能正常的 USH2A 蛋白<sup>[36]</sup>。目前 QR-421a 正在进行 1/2 期临床试验。有研究结果显示,8 例 Usher 综合征受试者单眼玻璃体内注射 QR-421a 后均表现出良好的安全性和耐受性,其中有 2 例患者显示出良好的治疗效果;应用低剂量和中剂量 QR-421a 治疗后,外显子 13 纯合突变和杂合突变的受试者治疗前全视野 ERG 暗适应敏感度和视野敏感度均有提升,中剂量组受试者最佳矫正视力有改善,改善作用可持续 ≥6 个月<sup>[24]</sup>。

### 2.4 ABCA4 基因相关 Stargardt 病

Stargardt 病是一种由于 ABCA4 基因突变引起的常染色体隐性遗传黄斑营养不良<sup>[37]</sup>。ABCA4 基因编码的三磷酸腺苷结合盒转运子 A4 蛋白在感光细胞中广泛表达,其基因突变可造成视网膜色素上皮细胞内脂褐质的异常沉积或感光细胞死亡<sup>[37-38]</sup>。

Albert 等<sup>[25]</sup>研究发现,ABCA4 基因中邻近内含子 30 的突变会造成假外显子 PE30 插入,并引起 ABCA4 蛋白截短。在 Stargardt 病患者 iPSCs 分化生成的感光前体细胞中,应用不同的 2'-OMe-PS AON 分别特异性靶向 ABCA4 mRNA 不同突变位点 (c. 4539+2001G>A; c. 4539+2028C>T) 可纠正 80% 的异常剪切,恢复 ABCA4 蛋白在感光细胞内的正常表达。Sangermano 等<sup>[39]</sup>同样应用 2'-OMe-PS AON 靶向纠正了 ABCA4 基因的 5 个假外显子的插入,全部成功纠正了剪切位点,恢复了

ABCA4 蛋白的部分功能。以上研究均表明,AON 可成为 Stargardt 病潜在治疗工具。

### 2.5 CEP290 基因相关先天性黑矇

CEP290 基因内含子 26 突变 (c. 2991+1655A>G) 是先天性黑矇 10 型常见的突变位点之一,会导致假外显子的插入并降低功能性 CEP290 蛋白的表达,造成光感受器纤毛缺陷,引发严重的视网膜变性<sup>[40-41]</sup>。

在猴眼玻璃体内注射实验以及先天性黑矇患者 iPSCs 分化的视网膜类器官模型研究中,2'-OMe-PS AON (QR-110) 靶向 CEP290 mRNA 上 c. 2991+1655A>G 位点进行剪切校正,避免了该突变引导的假外显子插入,恢复了 CEP290 mRNA 结构功能以及蛋白质的合成,有效提高了纤毛细胞的数量和纤毛长度,进而恢复了光感受器的功能<sup>[42]</sup>。QR-110 的 1/2 期临床试验已完成,目前正在进行 2/3 期临床试验,有望成为治疗 LCA10 的有效候选药物<sup>[43]</sup>。接受低剂量和中剂量 QR-110 治疗的受试者最佳矫正视力有改善,全视野 ERG 暗适应敏感度提高,瞳孔对光反应有所改善;但 11 例受试者中 8 例出现晶状体混浊,经白内障手术后恢复原有视力,2 例出现轻度黄斑囊样水肿,经局部治疗后消失,2 例出现视网膜变薄,在全部剂量注射结束后 2 个月逐渐恢复正常<sup>[26]</sup>。

## 3 AON 治疗遗传性眼病的安全性问题

### 3.1 AON 临床治疗的不良反应

AON 作为一种特异性较高的小分子靶向药物,具有较高的安全性。目前,AON 在眼部治疗引起的非特异性反应主要来自玻璃体内注射过程中产生的局部并发症和炎症反应,如眼内出血、眼内炎症反应和其他注射相关损伤等<sup>[44]</sup>。AON 本身及其化学修饰物有可能引起肝脏和肾脏的不良反应及与蛋白非特异性结合,但是血-眼屏障的存在可以有效减少全身不良反应的发生<sup>[45]</sup>。在安全性方面,可以进一步通过动物实验判断 AON 可能引起的各种体内的毒性反应,在临床试验前改善 AON 的修饰以减少其临床治疗中可能出现的安全性问题。

### 3.2 AON 的药物毒性问题

由欧美国家核酸安全性工作组开展的遗传毒性试验证明多种化学修饰的 AON 并未表现出遗传毒性。但是由于第 3 代 AON 尚未开展遗传毒性试验,并且在理论上存在其与基因组 DNA 形成 3 股螺旋导致遗传毒性的可能性,应用前需进一步验证<sup>[45]</sup>。在使用新型 AON 的遗传毒性问题上可以通过遗传毒性试验的方式验证,确保 AON 的高度安全性。

## 4 小结及展望

随着遗传性眼病发病机制和致病基因研究的不断开展,基因-蛋白-疾病之间的关系不断被揭示,为基因治疗提供了更多新的靶标,同时展示出了基因药物在遗传性眼病临床应用上的巨大潜力。随着递送策略的不断发展,AON 的缺陷被不断弥补,逐渐成为基因领域中较为成熟的治疗方式。尤其对于较长基因引起的遗传性眼病,AAV 等载体无法实现基因增补,而 AON 可以弥补这一部分应用的空缺。尽管遗传性眼病的 AON

在临床试验阶段上刚刚起步,但其安全性及有效性已得到了初步验证。随着基因治疗相关领域的不断探索和 AON 的进一步优化,AON 必将为遗传性眼病的治疗带来更多的可能性。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Skoblov MY. Prospects of antisense therapy technologies[J]. Mol Biol, 2009, 43(6): 917-929. DOI: 10.1134/s0026893309060028.
- [2] Crooke ST. Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides[J]. Nucleic Acid Ther, 2017, 27(2): 70-77. DOI: 10.1089/nat.2016.0656.
- [3] Wu H, Lima WF, Zhang H, et al. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs[J/OL]. J Biol Chem, 2004, 279(17): 17181-17189 [2021-01-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14960586>. DOI: 10.1074/jbc.M311683200.
- [4] Mansoor M, Melendez AJ. Advances in antisense oligonucleotide development for target identification, validation, and as novel therapeutics[J]. Gene Regul Syst Bio, 2008, 2: 275-295. DOI: 10.4137/grsb.s418.
- [5] Dean NM, Bennett CF. Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(56): 9087-9096. DOI: 10.1038/sj.onc.1207231.
- [6] Opalinska JB, Gewirtz AM. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications[J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(7): 503-514. DOI: 10.1038/nrd837.
- [7] Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1489(1): 31-44. DOI: 10.1016/s0167-4781(99)00148-7.
- [8] Lee Y, Rio DC. Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing[J]. Annu Rev Biochem, 2015, 84: 291-323. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034316.
- [9] Li D, Mastaglia FL, Fletcher S, et al. Precision medicine through antisense oligonucleotide-mediated exon skipping[J]. Trends Pharmacol Sci, 2018, 39(11): 982-994. DOI: 10.1016/j.tips.2018.09.001.
- [10] Echevarría L, Aupy P, Goyenvallé A. Exon-skipping advances for Duchenne muscular dystrophy[J]. Hum Mol Genet, 2018, 27(R2): R163-R172. DOI: 10.1093/hmg/ddy171.
- [11] Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(5): 347-355.
- [12] Rahman SM, Baba T, Kodama T, et al. Hybridizing ability and nuclease resistance profile of backbone modified cationic phosphorothioate oligonucleotides[J]. Bioorg Med Chem, 2012, 20(13): 4098-4102. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.05.009.
- [13] Frey PA, Sammons RD. Bond order and charge localization in nucleoside phosphorothioates[J]. Science, 1985, 228(4699): 541-545. DOI: 10.1126/science.2984773.
- [14] Watanabe TA, Geary RS, Levin AA. Plasma protein binding of an antisense oligonucleotide targeting human ICAM-1 (ISIS 2302)[J]. Oligonucleotides, 2006, 16(2): 169-180. DOI: 10.1089/oli.2006.16.169.
- [15] Juliano RL, Ming X, Nakagawa O. The chemistry and biology of oligonucleotide conjugates[J]. Acc Chem Res, 2012, 45(7): 1067-1076. DOI: 10.1021/ar2002123.
- [16] Frieden M, Christensen SM, Mikkelsen ND, et al. Expanding the design horizon of antisense oligonucleotides with alpha-L-LNA[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(21): 6365-6372. DOI: 10.1093/nar/gkg820.
- [17] Monia BP, Lesnik EA, Gonzalez C, et al. Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression[J/OL]. J of Biol Chem, 1993, 268(19): 14514-14522 [2021-01-16]. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)85268-7/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)85268-7/pdf). DOI: 10.1016/s0021-9258(19)85268-7.
- [18] Swayze EE, Sirkowski AM, Wanciewicz EV, et al. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(2): 687-700. DOI: 10.1093/nar/gkl1071.
- [19] Baker BF, Lot SS, Condon TP, et al. 2'-O-(2-methoxy) ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells[J/OL]. J Biol Chem, 1997, 272(18): 11994-12000 [2021-01-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9115264>. DOI: 10.1074/jbc.272.18.11994.
- [20] ProQR announces first patient dosed in phase 1/2 Aurora trial of QR-1123 for autosomal dominant retinitis pigmentosa[EB/OL]. 2020-12-11 [2021-01-16]. <https://www.proqr.com/press-releases/proqr-announces-first-patient-dosed-in-phase-12-aurora-trial-of-qr-1123-for>.
- [21] Roduit R, Escher P, Schorderet DF. Mutations in the DNA-binding domain of NR2E3 affect *in vivo* dimerization and interaction with CRX[J/OL]. PLoS One, 2009, 4(10): e7379 [2021-01-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19823680>. DOI: 10.1371/journal.pone.0007379.
- [22] Wang L, Kempton JB, Jiang H, et al. Fetal antisense oligonucleotide therapy for congenital deafness and vestibular dysfunction[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(9): 5065-5080. DOI: 10.1093/nar/gkaa194.
- [23] Slijkerman RW, Vaché C, Dona M, et al. Antisense oligonucleotide-based splice correction for *USH2A*-associated retinal degeneration caused by a frequent deep-intronic mutation[J/OL]. Mol Ther Nucleic Acids, 2016, 5(10): e381 [2021-01-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802265>. DOI: 10.1038/mtna.2016.89.
- [24] ProQR announces positive findings from an interim analysis in the phase 1/2 trial of QR-421a for Usher syndrome and provides business update[EB/OL]. 2020-03-31 [2021-02-20]. <https://www.proqr.com/press-releases/proqr-announces-positive-findings-from-an-interim-analysis-in-the-phase-12-trial-of>.
- [25] Albert S, Garanto A, Sangermano R, et al. Identification and rescue of splice defects caused by two neighboring deep-intronic *ABCA4* mutations underlying stargardt disease[J]. Am J Hum Genet, 2018, 102(4): 517-527. DOI: 10.1016/j.ajhg.2018.02.008.
- [26] ProQR announces positive top-line results from the phase 1/2 study of sepfarsen in LCA10 patients[EB/OL]. 2019-10-10 [2021-02-20]. <https://www.proqr.com/press-releases/proqr-announces-first-patient-dosed-in-phase-12-aurora-trial-of-qr-1123-for>.
- [27] Bonifert T, Gonzalez Menendez I, Batke F, et al. Antisense oligonucleotide mediated splice correction of a deep intronic mutation in *OPAI1*[J/OL]. Mol Ther Nucleic Acids, 2016, 5(11): e390 [2021-02-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27874857>. DOI: 10.1038/mtna.2016.93.
- [28] Sullivan LS, Bowne SJ, Birch DG, et al. Prevalence of disease-causing mutations in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a screen of known genes in 200 families[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(7): 3052-3064. DOI: 10.1167/iovs.05-1443.
- [29] Orland HO, Barnard AR, MacLaren RE. Dynamic *in vivo* quantification of rod photoreceptor degeneration using fluorescent reporter mouse models of retinitis pigmentosa[J/OL]. Exp Eye Res, 2020, 190: 107895 [2021-02-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31816293>. DOI: 10.1016/j.exer.2019.107895.
- [30] Gorbatyuk M, Justilien V, Liu J, et al. Suppression of mouse rhodopsin expression *in vivo* by AAV mediated siRNA delivery[J]. Vision Res, 2007, 47(9): 1202-1208. DOI: 10.1016/j.visres.2006.11.026.
- [31] Murray SF, Jazayeri A, Matthes MT, et al. Allele-specific inhibition of rhodopsin with an antisense oligonucleotide slows photoreceptor cell degeneration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(11): 6362-6375. DOI: 10.1167/iovs.15-16400.
- [32] Naessens S, Ruyschaert L, Lefever S, et al. Antisense oligonucleotide-based downregulation of the G56R pathogenic variant causing *NR2E3*-associated autosomal dominant retinitis pigmentosa[J/OL]. Genes (Basel), 2019, 10(5): 363 [2021-02-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31083481>. DOI: 10.3390/genes10050363.
- [33] Zhu T, Chen DF, Wang L, et al. *USH2A* variants in Chinese patients

- with Usher syndrome type II and non-syndromic retinitis pigmentosa [J]. Br J Ophthalmol, 2021, 105 (5) : 694-703. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2019-315786.
- [34] Cosgrove D, Zallocchi M. Usher protein functions in hair cells and photoreceptors [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 46 : 80-89. DOI: 10.1016/j.biocel. 2013. 11. 001.
- [35] Dulla K, Slijkerman R, van Diepen HC, et al. Antisense oligonucleotide-based treatment of retinitis pigmentosa caused by USH2A exon 13 mutations [J]. Mol Ther, 2021, 29 (8) : 2441-2455. DOI: 10.1016/j.ymthe. 2021. 04. 024.
- [36] van Diepen H, Dulla K, Lam CH, et al. QR-421a, an antisense oligonucleotide, for the treatment of retinitis pigmentosa due to USH2A exon 13 mutations [J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019, 60 (9) : 3250 [2021-02-28]. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2743135>.
- [37] Lenis TL, Hu J, Ng SY, et al. Expression of ABCA4 in the retinal pigment epithelium and its implications for Stargardt macular degeneration [J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115 (47) : E11120-E11127 [2021-02-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30397118>. DOI: 10.1073/pnas.1802519115.
- [38] Braun TA, Mullins RF, Wagner AH, et al. Non-exonic and synonymous variants in ABCA4 are an important cause of Stargardt disease [J]. Hum Mol Genet, 2013, 22 (25) : 5136-5145. DOI: 10.1093/hmg/ddt367.
- [39] Sangermano R, Garanto A, Khan M, et al. Deep-intronic ABCA4 variants explain missing heritability in Stargardt disease and allow correction of splice defects by antisense oligonucleotides [J]. Genet Med, 2019, 21 (8) : 1751-1760. DOI: 10.1038/s41436-018-0414-9.
- [40] den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, et al. Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis [J]. Am J Hum Genet, 2006, 79 (3) : 556-561. DOI: 10.1086/507318.
- [41] Whewey G, Parry DA, Johnson CA. The role of primary cilia in the development and disease of the retina [J]. Organogenesis, 2014, 10 (1) : 69-85. DOI: 10.4161/org.26710.
- [42] Dulla K, Aguila M, Lane A, et al. Splice-modulating oligonucleotide QR-110 restores CEP290 mRNA and function in human c. 2991+1655A>G LCA10 models [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2018, 12 : 730-740. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.07.010.
- [43] ProQR announces virtual presentation of phase 1/2 seprofarsen data through the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) [EB/OL]. 2020-06-08 [2021-04-26]. <https://www.proqr.com/press-releases/proqr-announces-virtual-presentation-of-phase-12-seprofarsen-data-through-the-association-for-research-in-vision-and-ophthalmology-arvo>.
- [44] Artunay O, Yuzbasioglu E, Rasier R, et al. Incidence and management of acute endophthalmitis after intravitreal bevacizumab (Avastin) injection [J]. Eye (Lond), 2009, 23 (12) : 2187-2193. DOI: 10.1038/eye.2009.7.
- [45] Chi X, Gatti P, Papoian T. Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics [J]. Drug Discov Today, 2017, 22 (5) : 823-833. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.01.013.

(收稿日期:2021-05-03 修回日期:2021-11-24)

(本文编辑:张宇)

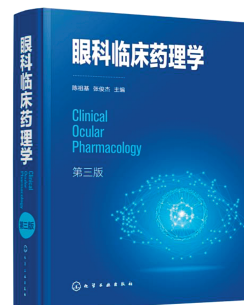
## 消息

## 《眼科临床药理学》(第三版)出版发行

由眼科药理学专家陈祖基教授和河南省眼科研究所张俊杰教授共同主编的《眼科临床药理学》(第三版)于2021年10月由化学工业出版社正式出版发行。《眼科临床药理学》初版于2002年,该书内容是陈祖基教授及国内知名专家几十年从事眼科药物学研究的丰富学识和研究经验的积累,初版发行后受到读者的广泛好评。应广大读者的需求,陈祖基教授分别于2010年和2021年在《眼科临床药理学》基础上2次修订再版,第2版和第3版再版期间均结合眼科药物研究的最新进展补充了新的概念、研究方法和结果。《眼科临床药理学》(第三版)由近50位眼科临床及药物专业研究人员编写,依据生物医学和眼科学、药理学研究的新进展和新认识,删除了原版中的陈旧内容,补充了新的眼科疾病药物治疗方法、部分眼科疾病治疗的新药物及其新用法、与眼科疾病治疗相关的新药物及其应用等内容,融入丰富的临床药物治疗经验,提供了眼科疾病药物治疗的最新信息。

《眼科临床药理学》(第三版)编写过程中本着务实准确和系统前沿的目标,紧密结合临床实际,以翔实的理论基础指导临床实践。本书除了对整体内容进行了更新、补充及对应用较少的内容进行精简外,还做了如下更新:第1篇总论中增加了“眼的解剖生理概要”和“特殊人群眼局部用药”章节,原第7章拓展为“眼科新药研究”;第2篇眼科常用药物中增加了“Rho激酶抑制剂”和“抗血管生成药物”章节;第3篇常见眼病的治疗中新增了“变应性结膜炎的药物疗法”、“糖尿病黄斑水肿和视网膜病变的药物疗法”、“甲状腺相关性眼病的药物疗法”和“遗传性视网膜疾病的基因治疗”4个章节,均由我国眼科学界各专业领域深有造诣的专家学者撰写;第4篇药源性眼病部分删除了某些陈旧内容,更新补充了部分新内容,对我们的临床医疗用药方法极有参考价值。与原版专著相比,《眼科临床药理学》(第三版)的内容更加丰富和全面,在眼科疾病的临床药物治疗方面更具参考价值 and 实用性,适于眼科临床医师、药师以及从事眼科药物研究人员的阅读参考。

本书为中16开精装本,全书共850页150万字,彩色印刷,定价298.00元。全国各大新华书店、天猫商城、当当网、京东商城均有销售,也可扫描二维码直接购买。



(本刊编辑部)