

N-乙酰半乳糖胺及其衍生物作为小干扰核糖核酸和反义寡核苷酸递送载体的研究进展

李大伟^{1,2,3}, 毛楷凡^{1,3}, 杨雪华^{1,3}, 薛松^{1,3}, 刘正平^{1,3}

(1 山东省药学科学院, 济南 250101; 2 国家药品监督管理局药物制剂技术与评价重点实验室, 济南 250101; 3 山东省皮肤与黏膜给药工程技术研究中心, 济南 250101)

[摘要] 近年来,使用 *N*-乙酰半乳糖胺(GalNAc)缀合物靶向去唾液酸糖蛋白受体来递送寡核苷酸至肝细胞已成为治疗性寡核苷酸领域的突破方法。与传统的寡核苷酸递送方法相比,GalNAc 偶联技术是一种更简单的肝脏递送方法,表现出肝靶向特异性、高效性、安全性以及可规模化制备等优势,具有深入开发的研究价值和临床应用的广阔前景。利用 GalNAc 偶联技术开发的 givosiran 已被美国 FDA 批准用于治疗急性肝卟啉症,此外还有 7 种缀合物处于注册审评或 III 期临床试验中,另外至少还有 21 种 GalNAc 核酸缀合物处于临床开发的早期阶段。但国内 GalNAc 偶联技术相关研究基础比较薄弱,也无相关产品上市,属于“卡脖子”技术,因此本综述重点介绍了 GalNAc 及其衍生物作为小干扰核糖核酸(siRNA)和反义寡核苷酸(ASO)这 2 种寡核苷酸递送载体的研究进展,以为国内 GalNAc 缀合物的开发提供参考。

[关键词] *N*-乙酰半乳糖胺;小干扰核糖核酸;反义寡核苷酸;临床前研究;临床研究;上市情况

[中图分类号] R966 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)13-1336-09

Advances in *N*-acetylgalactosamine and its derivatives as delivery vehicles of small interfering RNA and antisense oligonucleotides

LI Da-wei^{1,2,3}, MAO Kai-fan^{1,3}, YANG Xue-hua^{1,3}, XUE Song^{1,3}, LIU Zheng-ping^{1,3}

(1 Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250101, China; 2 NMPA Key Laboratory for Technology Research and Evaluation of Drug Products, Jinan 250101, China; 3 Shandong Provincial Key Laboratory of Mucosal and Skin Drug Delivery Technology, Jinan 250101, China)

[Abstract] In recent years, the use of *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) conjugates to target asialoglycoprotein receptors and further deliver oligonucleotides to hepatocytes has become a breakthrough approach in the field of therapeutic oligonucleotides. Compared with traditional delivery methods of nucleic acid drugs, GalNAc-nucleic acid conjugation is a simple method of liver delivery. It exhibits liver targeting specificity, high efficiency, high safety, large-scale preparation and many other advantages, thus has research value of in-depth development and broad prospects for clinical application. Givosiran, developed using GalNAc conjugation, has been approved by FDA for the treatment of acute hepatic porphyria, and there are 7 other conjugates are in registration review or phase III clinical trials, and at least 21 GalNAc nucleic acid conjugates are in the early stages of clinical development. However, the relevant research foundation of GalNAc conjugation in China is relatively weak, and no related products are on the market, making it a neck-stuck technology in China. Therefore, this review focuses on GalNAc and its derivatives as nucleic acid drug delivery vehicles and their application progress in small interfering

[基金项目] 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)资助项目(2021CXGC010515)

[作者简介] 李大伟,男,硕士,主任药师,研究方向:新型给药系统的研究与开发。联系电话:(0531)81213060,E-mail:david9999@126.com。

[通讯作者] 刘正平,女,硕士,副主任药师,研究方向:药物制剂研究与开发。联系电话:(0531)81213062,E-mail:65097702@qq.com。

RNA (siRNA) and antisense oligonucleotides (ASO). This review provides reference for the development of domestic GalNAc conjugates.

[**Key words**] *N*-acetylgalactosamine; small interfering RNA; antisense oligonucleotides; preclinical research; clinical research; listing

寡核苷酸通常是由 20 个左右的短链核苷酸 (脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸) 组成, 可以通过 Watson-Crick 碱基互补配对原理与 DNA, mRNA 或 pre-mRNA 配对而实现非常高的选择性, 精准地抑制某些基因, 使编码异常的基因保持“沉默”, 从而阻止许多“错误”的蛋白质表达。

大多数的寡核苷酸疗法都专注于基因沉默。目前在研的寡核苷酸药物种类很多, 包括反义寡核苷

酸 (antisenseoligonucleotide, ASO)、小干扰核糖核酸 (smallinterfering RNA, siRNA)、微小核糖核酸 (microRNA, miRNA)、核酸适配体 (aptamer) 等。

截至 2020 年 1 月, 已有 10 种寡核苷酸药物获得美国 FDA 批准, 见表 1。但寡核苷酸疗法的广泛应用仍面临着许多难题, 如有效递送、脱靶干扰、序列和化学依赖性毒性等。

表 1 美国 FDA 批准的寡核苷酸疗法

通用名 (商品名)	公司	靶标	适应证	器官	化学修饰 (类型)	美国 FDA 批准时间	意义
fomivirsen (Vitravene)	Ionis Pharma; Novartis	巨细胞病毒 (CMV) UL123	CMV 视网膜炎	眼 (玻璃体 内注射)	21mer PS DNA (RNase H 依赖型 ASO 药物)	1998 年 8 月	首个获批的核酸 药物; 局部给 药; 由于临床需 求减少而停止 使用
pegaptanb (Macugen)	NeXstar Pharma; Eyetech Pharma	血管内皮生长因子 (VEGF)-165	新生血管性年龄 相关性黄斑变 性	眼 (玻璃体 注射)	27mer 2'-F/2'-OMe 聚 乙二醇化 (适体)	2004 年 12 月	首个获批的适体 药物; 局部给 药; 由于竞争所 占市场有限
mipomersen (Kynamro)	Ionis Pharma; Genzyme; Kastle Tx	载脂蛋白 B (APOB)	纯合子家族性高 胆固醇血症	肝脏 (皮下 注射)	20merPS 2'-MOE (RNase H 依赖型 ASO 药物)	2013 年 1 月	因安全性问题被 欧洲 EMA 拒 绝; 由于竞争所 占市场有限
defibrotide (Defitelio)	Jazz Pharma	尚不明确	肝静脉闭塞病	肝脏 (静脉 注射)	PO 修饰的 ssDNA 和 ds- DNA 混合物	2016 年 3 月	特殊的非序列依 赖性作用机制
eteplirsen (Exondys 51)	Sarepta Therapeutics	DMD 基因 51 号外 显子	杜氏肌营养不良 症 (DMD)	骨骼肌 (静 脉注射)	30mer PMO (空间位阻 型 ASO 药物)	2016 年 9 月	全身递送非肝组 织; 疗效差
nusinersen (Spinraza)	Ionis Pharma; Biogen	SMN2 基因 7 号外 显子	脊髓性肌萎缩症	脊髓 (鞘内 注射)	18mer PS 2'-MOE (空 间位阻型 ASO 药物)	2016 年 12 月	局部给药
patisiran (Onpattro)	Alnylam Pharma	转甲状腺素蛋白 (TTR)	遗传性甲状腺素 转运蛋白淀粉 样变性、多发 性神经病	肝脏 (静脉 注射)	19 + 2mer 2'-OMe 修饰 (载有 siRNA 的脂质 纳米颗粒药物)	2018 年 8 月	首个获批的 RNA 干扰 (RNAi) 药 物; 纳米颗粒输 送系统; 需要类 固醇和抗组胺 药联合治疗
inotersen (Tegsedi)	Ionis Pharma; Akcea Pharam	TTR	遗传性甲状腺素 转运蛋白淀粉 样变性、多发 性神经病	肝脏 (皮下 注射)	20mer PS 2'-MOE (RNase H 依赖型 ASO 药物)	2018 年 10 月	与 mipomersen 相同 的 gapmer ASO 药物

通用名 (商品名)	公司	靶标	适应证	器官	化学修饰 (类型)	美国 FDA 批准时间	意义
givosiran (Givlaari)	Alnylam Pharma	氨基乙酰丙酸合酶 1 (ALAS1)	急性肝卟啉症	肝脏(皮下 注射)	21/23mer Dicer siRNA 底 物 (GalNAc 偶联物)	2019 年 11 月	化学稳定性增强 肝细胞靶向生 物偶联物;首个 采用 ESC-Gal- NAc 递送技术 的 RNAi 药物
golodirsen (Vyondys 53)	Sarepta Therapeutics	DMD 基因 53 号外 显子	DMD	骨骼肌(静 脉注射)	25mer PMO(空间位阻 型 ASO 药物)	2019 年 12 月	与 eteplirsen 相同 的磷酸二酰胺 吗啉寡聚物 (PMO)药物

早期的寡核苷酸递送主要依靠脂质纳米粒 (lipid nanoparticles, LNP) 及聚合物纳米颗粒来完成^[1-2]。LNP 可以掩盖 siRNA 的电荷,保护其不被 RNA 酶降解,并促进寡核苷酸从内涵体逃逸到细胞质中。LNP 也可以包载含有 2'-羟基修饰的 siRNA, 但 LNP 体积过大这一问题无法忽视。

近年来,使用 *N*-乙酰半乳糖胺 (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc) 缀合物靶向去唾液酸糖蛋白受体来递送寡核苷酸至肝细胞已成为治疗性寡核苷酸领域的突破方法。与传统的 LNP 递送方法相比, GalNAc-siRNA 偶联是一种更简单、更小、组成成分更简单的肝脏递送方法。GalNAc-siRNA 可以在固态寡核苷酸合成仪上合成^[3],并用质谱仪等设备进行理化指标测定。利用该技术开发的 givosiran 已被美国 FDA 批准用于治疗急性肝卟啉症 (AHP),此外还有 7 种缀合物处于注册审评或 III 期临床试验中,另外至少还有 21 种 GalNAc 核酸缀合物处于临床开发的早期阶段。

本综述重点介绍 GalNAc 递送系统用于递送 siRNA 和 ASO,下调靶 mRNA 和蛋白质的研究进展。本综述总结了 GalNAc 载体技术的原理、优势、GalNAc 缀合物的药动学 (pharmacokinetics, PK) 特征以及安全性特征,并提供了过去 2~3 年有关 GalNAc 缀合物临床经验的许多详细信息。

1 GalNAc 载体技术

1.1 GalNAc 载体技术原理

GalNAc 技术依赖于肝细胞表达的去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR),该受体可以结合并清除循环糖蛋白,去除其中的唾液酸残基以暴露糖残基。GalNAc 最常用的载体是三聚

体,它与主要在肝细胞上表达的 ASGPR 紧密结合。ASGPR 也称为肝结合蛋白或 Ashwell-Morell 受体,是第一个被检测到的动物凝集素^[4]。ASGPR 是一种高容量、快速内化的受体,每个肝细胞约有 500 000 个拷贝。20 世纪 70 年代,研究人员通过部分取代去唾液酸糖蛋白 (asialoglycoprotein, ASGR) 上的唾液酸残基,证明了该受体对半乳糖 (galactose, Gal) 残基的结合阈值,表明快速清除 ASGR 至少有 2 个 Gal 残基。其他的早期研究表明,该受体的结合取决于糖的类型 (GalNAc > Gal) 和糖的数量 $4 = 3 > 2 > 1$ ^[5-6]。GalNAc 缀合物与 ASGPR 结合并被内体吸收,缀合物从受体上解离, GalNAc 糖和分支在寡核苷酸逃逸到细胞质之前迅速从其中裂解,该机制目前尚不清楚。

1.2 GalNAc 载体在 ASO 和 siRNA 递送中的优势

1.2.1 GalNAc 递送载体的优势 病毒载体是最常用的寡核苷酸类递送载体,但病毒载体存在许多局限性,包括致癌性、免疫原性、广泛的趋向性、有限的包装能力和大规模生产较困难等问题,迄今为止仅有少量基于病毒载体的核酸类药物获批用于临床。现代核酸药物给药方式主要采用安全性更高的非病毒载体纳米给药系统,如脂质体、纳米粒、胶束等,但这些载体的递送效率也不高并且递送缺乏靶向性。因为与 ASGPR 的高亲和力, GalNAc-核酸偶联物已表现出肝靶向特异性以及高效性的优点。而且 GalNAc 不存在阳离子成分,是非常安全的小分子物质。另外, GalNAc-核酸偶联物可以在固态寡核苷酸合成仪上合成^[3],具有可规模化制备的优势。因此,与其他递送载体相比, GalNAc 具有深入开发的研究价值和临床应用的广阔前景。

1.2.2 在 ASO 递送中的优势 Prakash 等^[7]的研究测定了非缀合的 B1 型清道夫受体 (SRB1) ASO 和与 GalNAc 缀合的 SRB1 ASO 在小鼠肝脏细胞内的分布,结果发现未结合的 ASO 主要被肝脏的非实质部分细胞吸收 (>70%),而 GalNAc-SRB1 ASO 主要被肝脏细胞吸收 (>80%)。与非缀合的 SRB1 ASO 相比, GalNAc 缀合递送可增加约 7 倍体内效力 (以肝脏 SRB1 mRNA 的 50% 沉默为基准);此外该研究还比较了其他肝脏细胞靶标的 ASO,结果表明 GalNAc 缀合递送可增加体内效力是 GalNAc-ASO 缀合物的一般特性。Crooke 等^[8]的研究表明,功能性靶点沉默所需的 GalNAc-ASO 剂量与非靶向 ASO 相比,通常低 10~30 倍。

1.2.3 在 siRNA 递送中的优势 siRNA 是双链 RNA,其大小通常是 ASO 的 2 倍 (约 14 000 Da),且含有更多的负电荷,这使得 siRNA, RNA 干扰 (RNAi) 疗法不能自行进入细胞,必须通过递送系统实现^[1,9-10]。此外裸 siRNA 在血液中会快速被 RNA 酶降解,经肾脏清除后被肝脏清除受体吸收,并会激活先天免疫 Toll 样受体 (TLR)3/7/8,诱导基因蛋白 I (RIG-I) 和黑色素瘤分化相关基因 5 (MDA-5) 系

统^[1,9-12]。这些因素导致 siRNA 的成药性较差,因此要达到其理想的疗效必须先解决以上问题。

2018 年上市的用于治疗遗传性转甲状腺素蛋白 (transferrin, TTR) 淀粉样变性的 patisiran (商品名 Onpattro) 是首个获得美国 FDA 批准的 siRNA 药物,其利用 LNP 载体技术进行肝脏递送^[13]。近年来的研究表明, GalNAc 技术已被开发用于治疗性 siRNA,并已逐步取代作用于肝脏靶点的 LNP 递送系统^[4,14]。Alnylam 制药公司开创了 GalNAc-siRNA 疗法,其首个产品 givosiran (商品名 GivlaariTM) 于 2019 年 11 月获得美国 FDA 批准,该产品用于治疗 AHP。

1.3 GalNAc 递送系统的化学修饰

Nair 等^[5]的研究发现使用 GalNAc 作为寡核苷酸递送载体的关键是对核苷酸的 2'-位进行广泛的化学修饰,并用硫代磷酸酯 (phosphorothioate, PS) 键取代磷酸二酯键,以实现体内活性。这些修饰使缀合物具有足够的核酸酶稳定性,可在静脉或皮下注射后到达肝脏。GalNAc 缀合物中使用的关键化学修饰方法的结构见图 1, X 和 Z 通常是乙二醇或烷基间隔物; Y 是允许簇分支的多功能部分。

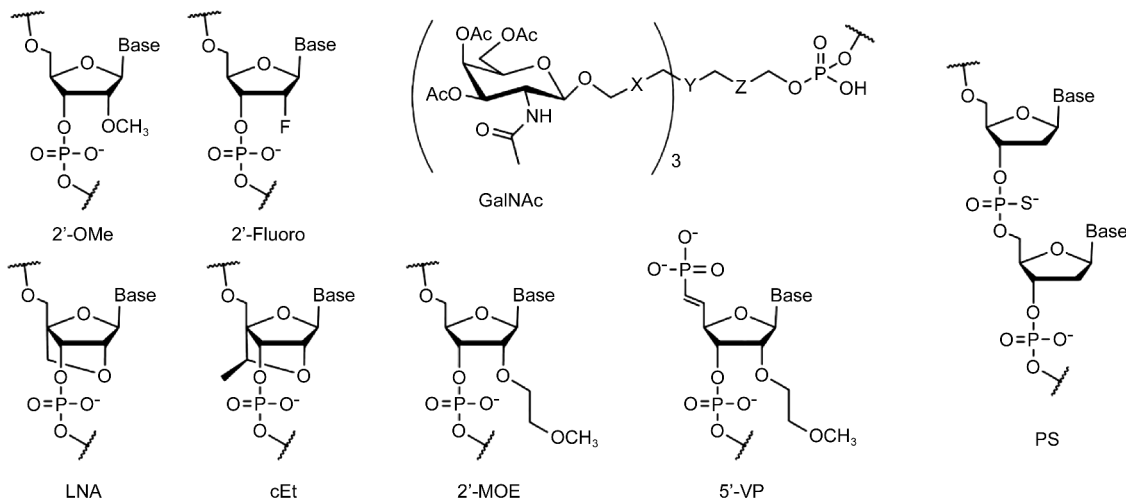


图 1 GalNAc 缀合物中最常见的化学修饰方案

1.3.1 siRNA 的修饰 GalNAc-siRNA 缀合物的修饰通常是 2'-O-甲基和 2'-氟核苷酸交替修饰 siRNA 链,并在链的末端插入 PS 键。在第 1 代载体系统中, siRNA-GalNAc 缀合物仅进行了部分修饰,但通过体内试验发现,扩大修饰范围会进一步提高药效和作用时长^[5-6]。Alnylam 预测,若第 2 代 siRNA 的 PS 键能被完全修饰且具有稳定性,将会使人体所需

的 siRNA 年化剂量降低 280 倍。另有研究表明,使用稳定的磷酸类似物磷酸乙烯酯修饰 siRNA 反义链的 5' 末端,能提高 siRNA 缀合物的稳定性和效力,这是因为 5'-乙基磷酸盐可保护 siRNA 的末端免于降解,同时也无需在插入 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 之前细胞对双链磷酸化。

1.3.2 ASO 偶联的优化 ASO 的设计取决于其作用机制。如果使用 ASO 实现剪接转换,寡核苷酸将被 2'-O-甲基或含有大量 PS 键的吗啉完全修饰。相反,若 ASO 旨在诱导核糖核酸酶 H (ribonuclease H, RNase H) 使其沉默 mRNA,即 gapmers,其具有仅 PS 修饰的 DNA 中心部分和同时包含 PS 和 2' 位修饰的两侧的翼,其中的 2' 位修饰通常使用锁核酸 (locked nucleic acid, LNA) 或 2'-OME/2'-MOE 核苷酸。ASO 无需转染即可被细胞吸收,研究表明吸收 PS-ASO 的机制之一是与 ASGPR 的相互作用^[15-17]。Prakash 等^[7] 的研究表明, GalNAc 偶联可以使 gapmer ASO 对啮齿动物肝细胞靶标的效力提高 10 倍。Prakash 等^[18] 在小鼠中进行的一项研究表明,当使用 LNA 和 cEt gapmers 时, GalNAc 偶联的效力提高了约 20 倍。

2 GalNAc 缀合物的临床药理学

研究发现, GalNAc 缀合物皮下给药后会被快速吸收,小鼠的达峰时间 (T_{max}) 为 0.25 ~ 1 h,猴子为 1 ~ 4 h,人类为 0.5 ~ 5 h^[12,19]。由于血浆清除速度快, GalNAc 缀合物的血浆半衰期相对较短。虽然 GalNAc 结合在血液中较为稳定,但有研究表明仍会在血浆中检测到未结合的寡核苷酸,即依旧会发生 GalNAc 单体的丢失。

Wang 等^[12] 的研究表明,与未偶联的 ASO 相比, GalNAc 偶联的 ASO 血浆清除率显著提高,在 10% 的剂量下,最大血药浓度 (C_{max}) 和暴露量血药浓度-时间曲线下面积 (AUC) 降低了 50 倍。这表明肝脏靶向性显著提高了效力,可在较低剂量下减少给药频率。Zimmermann 等^[20] 的研究发现,最大药效在给药后可持续 15 d 的时间,这意味着可以大大减少给药次数。并且有证据表明最大药效学效果的持续时间是物种特异性的,与非人类灵长类动物相比,对人类的影响更长,效力更高。

除了肝脏, GalNAc 偶联的寡核苷酸在肾脏也有分布。在 $< 3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量下, GalNAc 结合增加肝肾分布比例,但在较高剂量下, ASGPR 饱和会导致肝脏摄取减少,而肾脏摄取则会成比例增加。细胞的摄取会导致 GalNAc 解离,组织中发现的主要成分是非结合的寡核苷酸。

3 GalNAc 缀合物的安全性

GalNAc 寡核苷酸缀合物在临床前和临床研究中均显示出良好的安全性,与未偶联的寡核苷酸相比,递送有效治疗剂量的 GalNAc 缀合物所需的临

床剂量较低,从而改善了治疗窗。

寡核苷酸的毒性主要是由靶向结合后药理学效应的过分放大、杂交介导的脱靶效应、化学修饰或药物的组织蓄积引起的。但这些问题均可在早期高剂量毒性筛选中被发现,从而作为候选药物被淘汰。杂交介导的脱靶效应可以通过部分或种子区域与脱靶 RNA 结合来介导,后者与反义链具有部分互补性^[21-22]。对 GalNAc-siRNA 肝脏毒性的系统分析表明,在反义链种子区域介导的 RNAi 效应是引起肝脏毒性的主要因素而非化学修饰^[21]。

4 GalNAc 缀合物的有效性研究进展

4.1 在疾病模型中的研究进展

4.1.1 乙型肝炎病毒 (hepatitis B, HBV) Javanbakht 等^[23] 报道了针对病毒 mRNA 的 LNA ASO-GalNAc 缀合物的研究,用这种缀合物对小鼠腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 模型进行皮下注射,结果发现给予最高剂量 $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,可将 HBV 表面抗原的表达降低至检测限以下,且效果可持续 15 d。

4.1.2 遗传病 Pursell 等^[24] 用 GalNAc-siRNA 缀合物靶向肝脏特异性糖原合酶 GYS2 的一项研究结果表明,缀合物能够使小鼠模型和糖原贮积病的糖原积累减少。研究表明,通过下调铁调素的负调节剂 TMPRSS6,达到负调节铁的吸收和再循环的目的,这可用于治疗铁过载疾病^[25-26]。临床前结果显示,在小鼠 HFE/遗传性血色素沉着症模型中,单次给予 1 或 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ GalNAc 结合物靶向 TMPRSS6 后,出现铁调素剂量依赖性增加和血清铁的减少。这些应用表明单一 GalNAc 缀合物具有通过靶向疾病病理学中的共同因素来治疗多种遗传疾病的潜力。

4.1.3 非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) Marjot 等^[27] 的研究表明, GalNAc 缀合物有望用于治疗 NAFLD。研究者还在非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 小鼠模型中评估了靶向 TAZ 和 STK25 的 GalNAc-siRNA 或 ASO 缀合物,结果显示通过治疗可减缓 NASH 进展^[28-29]。在这 2 种情况下, $12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{周}^{-1}$ 或更低剂量均可使肝脏脂肪沉积和炎症减少。Lindén 等^[30] 的研究使用 ASO 靶向基因 *PNPLA3* 的已知遗传变异,该变异已被证实有助于 NAFLD 进展。

另有研究发现,在晚期肝病中 ASGR 表达的降低会减弱 GalNAc 缀合物在 NASH 和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中的效果^[31-33]。然而即

使 ASGR 表达已减少超过 50% ,但 GalNAc-siRNA 和 ASO 缀合物仍在 HCC 和纤维化小鼠模型中保持效力。

4.2 临床研究及产品开发研究进展

GalNAc 与 ASO 或 siRNA 缀合物的临床状态总

结见表 2。临床开发中至少有 29 种不同的 GalNAc 缀合物,其中约 55% 是基于 RNAi 的,约 45% 是基于 ASO 的^[2]。GalNAc 缀合物靶向 HBV 蛋白,从而导致 HBV 失活的作用正在被广泛研究,并取得了一些有前景的结果^[23-34]。

表 2 领先寡核苷酸平台公司处于临床状态的 GalNAc-siRNA 或 GalNAc-ASO 偶联物汇总

公司	临床阶段	药物名称	种类	靶标	先导适应症
Alnylam	已注册	Givlaari	siRNA	δ 氨基酮戊酸合成酶 1	急性肝卟啉病
Alnylam	已提交注册申请	lumasiran	siRNA	乙醇酸氧化酶 1	I 型高草酸尿症
Alnylam/Novartis(诺华)	已提交注册申请	inclisiran	siRNA	前蛋白转化酶枯草溶菌素 9	高胆固醇血症
Akcea/Ionis	III 期临床	AKCEA-TTR-L _{Rx}	ASO	甲状腺素转运蛋白	TTR 淀粉样变性
Akcea/Ionis/Novartis(诺华)	III 期临床	AKCEA-APO(a)-L _{Rx}	ASO	载脂蛋白(a)	心血管疾病
Alnylam/Sanofi(赛诺菲)	III 期临床	fitusiran	siRNA	抗凝血酶	血友病/出血性疾病
Alnylam	III 期临床	vtusiran	siRNA	甲状腺素转运蛋白	TTR 淀粉样变性
Dicerna	III 期临床	nedosiran	siRNA	乳酸脱氢酶	原发性高草酸尿症
Alnylam	II 期临床	cemdisiran	siRNA	补体 C5	补体介导性疾病
Akcea/Ionis	II 期临床	AKCEA-AOPCIII-L _{Rx}	ASO	载脂蛋白 C-III	心血管疾病
Ionis	II 期临床	IONIS-GHR-L _{Rx}	ASO	生长激素受体	肢端肥大症
Ionis	II 期临床	IONIS-PKK-L _{Rx}	ASO	前激肽释放酶	遗传性血管性水肿症
Ionis	II 期临床	IONIS-TMPRSS6-L _{Rx}	ASO	跨膜丝氨酸蛋白酶 6	β-地中海贫血
Akcea/Pfizer(辉瑞)/Ionis	II 期临床	AKCEA-ANGPTL3-L _{Rx}	ASO	血管生成素样蛋白 3	脂代谢紊乱
Ionis	II 期临床	IONIS-AGT-L _{Rx}	ASO	血管紧张肽原	顽固性高血压
Ionis/Roche(罗氏)	II 期临床	IONIS-FB-L _{Rx}	ASO	补体因子 B	免疫球蛋白 A(IgA) 神经病变/年龄相关性黄斑变性
Ionis/GSK(葛兰素史克)	II 期临床	IONIS-HBV-L _{Rx}	ASO	乙型肝炎病毒蛋白	乙型肝炎感染
Arrowhead(箭头制药)/JNJ(强生)	II 期临床	JNJ-3989(ARO-HBV)	siRNA	HNV 病毒蛋白	乙型肝炎感染
Alnylam	II 期临床	ALN-AAT02	siRNA	α1-抗胰蛋白酶(AAT)	α1 肝病
Alnylam	II 期临床	ALN-HBV02	siRNA	乙型肝炎病毒蛋白	乙型肝炎病毒感染
Arrowhead(箭头制药)/Amgen(安进)	I 期临床	AMG-890(ARO-LPA)	siRNA	脂蛋白(a)	心血管疾病
Alnylam	I 期临床	ALN-AGT	siRNA	血管紧张素(AGT)	高血压
Dicerna/Roche(罗氏)	I 期临床	DCR-HBVS(RG6346)	siRNA	HNV 病毒蛋白	乙型肝炎病毒
Dicerna	I 期临床	DCR-A1AT	siRNA	SERPINA1	α1-抗胰蛋白酶缺乏性肝病
Ionis/Bayer(拜耳)	I 期临床	IONIS-FX1-L _{Rx}	ASO	因子 X1	血栓
Ionis/AstraZeneca(阿斯利康)	I 期临床	IONIS-AZ4-2.5L _{Rx}	ASO	无报道	心血管疾病
Ionis/AstraZeneca(阿斯利康)	I 期临床	ION839	ASO	无报道	非酒精性脂肪性肝炎
Arbutus	I 期临床	AB-729	siRNA	病毒蛋白	乙型肝炎感染
Silence	I 期临床	SLN-124	siRNA	TMPRSS6	β-地中海贫血、骨髓增长异常综合征

资料来源:Alnylam 公司、Ionis 公司、Dicerna 公司、Arbutus 公司、Silence 公司和 Roche(罗氏)公司网站,于 2020 年 3 月访问。其中 Arrowhead 公司的 ARO-AAT, ARO-APOC3, ARO-ANG3 和 ARO-HSD 均使用了其自己的 TRIM(靶向 RNAi 分子)技术,但由于这些分子的肝脏靶向偶联物的确切性质尚未公布,故未在表中列出,但仍被认定为 GalNAc 靶向

4.2.1 Givlaari 首个注册的 GalNAc 缀合物是 Alnylam 的 Givlaari(givosiran),于 2019 年 11 月 20 日在美国获得批准,2020 年 3 月 3 日在欧盟获得批准。givosiran 中的 siRNA 使用了 Alnylam 先进的增强稳定化学(enhanced stabilization chemistry, ESC) GalNAc 技术,靶向氨基乙酰丙酸合酶 1(aminolevulinic synthase 1, ALAS1),从而使得 ALAS1 下调并防止与 AHP 发作相关的神经毒性 δ -氨基乙酰丙酸和胆色素原的累积^[3]。该药物的获批基于其 ENVISION III 期临床试验的数据。试验招募了 94 例 AHP 患者,按 1:1 随机分配,给予 givosiran(每季度 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,共 6 个月)或安慰剂,结果证明与安慰剂相比,给予 givosiran 的患者卟啉症发作率平均降低 74%。在 6 个月的治疗期间,使用 givosiran 的患者中有一半未发病,而安慰剂组只有 16.3% 未发病。但 givosiran 组的不良事件略有增加,其中有 7 例患者的丙氨酸氨基转移酶升高并超过正常上限 3 倍。随后,试验中的 94 例患者中有 93 例继续参与开放标签延长期研究,所有患者都接受了 givosiran,结果表明毒性是可控的。

4.2.2 lumasiran 和 inclisiran 来自 Alnylam 的另外 2 种 GalNAc 缀合物(lumasiran 和 inclisiran)已提交注册。lumasiran 用于原发性 I 型高草酸尿症(PH1),这是一种罕见的危及生命的疾病,其特征是肝脏病理性过量产生草酸盐后,在肾脏中积聚形成有毒的草酸钙晶体,从而导致肾功能衰竭^[35]。lumasiran 可靶向肝脏中编码乙醇酸氧化酶的 HAO1 mRNA,该酶是肝脏草酸生成途径中的关键酶。lumasiran 的 ILLUMINATE-A III 期临床研究是一项针对约 30 例 PH1 患者的随机、双盲、安慰剂对照研究。患者按 2:1 随机分配至 lumasiran 组(每月 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,3 个月,然后按季度维持剂量)和安慰剂组。Lumasiran 达到了其主要终点,在 3~6 个月内平均 24 h 尿草酸盐排泄量显著减少($P < 0.0001$),无严重的不良事件^[36]。2020 年 1 月,Alnylam 已在美国滚动提交新药申请(NDA)^[37]。

Inclisiran 通过靶向前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9 型(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) mRNA,使肝脏 PCSK9 产生减少。PCSK9 是一种与低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)结合的丝氨酸蛋白酶受体和靶向溶酶体降解的受体。阻断该途径会导致 LDL 受体增加和 LDL 胆固醇(LDL-cholesterol, LDL-C)清除率增

加,从而降低与 LDL-C 升高相关的心血管疾病风险^[38]。inclisiran 进行了 3 项 III 期临床试验(Orion 9,10,11)^[39-40]。研究结果表明,在间隔 3 个月的 2 次给药(284 mg)后,与安慰剂相比,每年皮下给药 2 次 inclisiran 可使 LDL-C 持续有效降低。Orion10 和 11 研究招募了 3000 多例患有 LDL-C 升高的动脉粥样硬化性心血管疾病的患者,在 540 d 内,患者以 1:1 的比例随机接受 inclisiran 或安慰剂,结果表明 inclisiran 组的 LDL-C 水平降低了约 50% (与安慰剂相比, $P < 0.001$)。给药频率低和安全性高为 inclisiran 占领降脂市场提供了巨大优势。

4.2.3 AZD8233 2022 年 3 月,国家药品监督管理局药品审评中心(CDE)官网显示,阿斯利康公司的降脂药 AZD8233 获批临床,用于高胆固醇血症。AZD8233(ION449)是阿斯利康公司和 Ionis 公司合作研制的一款靶向 PCSK9 的 ASO 药物。

4.2.4 ASO-GalNAc III 期临床试验中最先进的 ASO-GalNAc 缀合物是 AKCEA-TTR-LRx 和 AKCEA-APO(a)-LRx,是由 Ioni 公司开发,后授权给 Akcea Therapeutics 公司。该 GalNAc-ASO 专注于 AKCEA-APO(a)-LRx,靶向载脂蛋白(a),其升高是心血管疾病的独立遗传风险因素。2020 年 1 月公布的阳性 II 期临床试验数据来自一项随机、双盲、安慰剂对照试验,该试验涉及 286 例已确诊心血管疾病和脂蛋白(a)升高的患者^[41],结果表明脂蛋白(a)水平呈剂量依赖性下降,每 4 周给予 60 mg AKCEA-APO(a)-LRx,72% 观察到脂蛋白(a)水平降低,而安慰剂组仅为 6% ($P < 0.001$)。所有 APO(a)-LRx 剂量和安慰剂在血小板计数、肝脏和肾脏测量或流感样症状方面均无显著差异。其 III 期临床试验已于 2019 年启动,每月给予 80 mg 皮下注射剂。

目前有许多 GalNAc 缀合物处于临床前开发阶段,进入临床研究的大多是基于 siRNA 或 ASO,但其他寡核苷酸药物也在尝试将 GalNAc 递送技术用于肝细胞靶点。例如:Regulus Therapeutics 公司开发了针对 microRNA-122 的 GalNAc 缀合的抗 microRNA(miRs),用于治疗慢性丙型肝炎病毒感染,还开发了一种 microRNA-103/107 寡核苷酸,可改善 NASH 动物模型中的胰岛素敏感性和葡萄糖耐量。MiNA Therapeutics 公司利用小激活 RNA(saRNA)用于 RNA 激活^[42]。与 siRNA 相似,saRNA 虽然被加载到 Ago2 中,但在细胞核中起作用,与靶基因的启动子区域结合以产生 RNA 诱导的转录激活复合物,从

而导致新的 mRNA 和蛋白质的增加。使用 GalNAc-HNF4A saRNA 缀合物上调肝细胞核因子 4-a (hepatocyte nuclear factor 4-a, HNF4A) 在原代大鼠肝细胞中已被报告。使用基于树状体的递送载体将 HNF4A saRNA 递送至肝脏已被证明在 NAFLD 的高脂肪饮食模型中具有活性,并且由于 GalNAc 递送应集中递送至肝脏细胞,这对于脂肪性肝病和肝硬化有益处^[43]。

综上所述,目前首个 GalNAc-寡核苷酸缀合物已注册,7 种其他 GalNAc-寡核苷酸缀合物已提交批准或处于 III 期临床试验中,同时至少还有 21 种缀合物处于早期临床试验中。到目前为止,这些缀合物的耐受性良好,最常见的不良事件是偶尔的肝脏和注射部位反应。

5 前景展望

GalNAc 寡核苷酸的突破将是通过口服而不是皮下给药来递送这些药物,这特别适用于慢性病和广泛的患者群体。Ionis 公司和 Alnyam 公司最近报告了这种新递送方式的进展。虽然大多数基于配体的方法都使用 GalNAc 进行递送,但其他基于配体的靶向肝外组织的寡核苷酸递送系统正在出现。转铁蛋白受体作为一种有前景的配体靶点引起了关注,转铁蛋白受体-抗体-siRNA 缀合物在静脉内给药后能够使其在骨骼肌和心肌中的靶标沉默。

寡核苷酸领域的另一个研究重点是增加内体逃逸的方法,因为这是许多寡核苷酸的限速步骤。据文献报道,仅有不到 1% 的药物能从内体中实现逃逸^[4,44]。据推测,肝细胞中的高 ASGR 表达和快速周转的结合为寡核苷酸释放到细胞质中所需的罕见内体膜不稳定提供了更多的机会^[45]。GalNAc 缀合物可能存在另一种未知机制,该机制可以改善内体逃逸。加深对逃逸动力学的研究可能会增加 GalNAc 缀合物的效力,并使其他合适的受体靶标能够用于寡核苷酸的组织特异性递送。

总之,能应用于多种肝脏疾病的 GalNAc 寡核苷酸载体的出现为寡核苷酸治疗领域带来了新的研究方向,同时该载体也开始被其他基于配体的递送系统所运用。

[参 考 文 献]

[1] WANG F, ZUROSKE T, WATTS JK. RNA therapeutics on the rise[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(7): 441-442.
[2] KHVOROVA A, WATTS JK. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility[J]. *Nat Biotechnol*, 2017,

35(3): 238-248.
[3] SCOTT LJ. Givosiran; first approval[J]. *Drugs*, 2020, 80(3): 335-339.
[4] SPRINGER AD, DOWDY SF. GalNAc-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNAi therapeutics[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2018, 28(3): 109-118.
[5] NAIR JK, ATTARWALA H, SEHGAL A, et al. Impact of enhanced metabolic stability on pharmacokinetics and pharmacodynamics of GalNAc-siRNA conjugates[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(19): 10969-10977.
[6] HASSLER MR, TURANOV AA, ALTERMAN JF, et al. Comparison of partially and fully chemically-modified siRNA in conjugate-mediated delivery *in vivo*[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(5): 2185-2196.
[7] PRAKASH TP, GRAHAM MJ, YU JH, et al. Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(13): 8796-8807.
[8] CROOKE ST, BAKER BF, XIA ST, et al. Integrated assessment of the clinical performance of GalNAc₃-conjugated 2'-O-methoxyethyl chimeric antisense oligonucleotides: I. human volunteer experience[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2019, 29(1): 16-32.
[9] LEVIN AA. Treating disease at the RNA level with oligonucleotides[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(1): 57-70.
[10] CRAIG K, ABRAMS M, AMIJI M. Recent preclinical and clinical advances in oligonucleotide conjugates[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2018, 15(6): 629-640.
[11] YIN W, ROGGE M. Targeting RNA: a transformative therapeutic strategy[J]. *Clin Transl Sci*, 2019, 12(2): 98-112.
[12] WANG YF, YU RZ, HENRY S, et al. Pharmacokinetics and clinical pharmacology considerations of GalNAc₃-conjugated antisense oligonucleotides[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2019, 15(6): 475-485.
[13] ADAMS D, GONZALEZ-DUARTE A, O'RIORDAN WD, et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(1): 11-21.
[14] HUANG YY. Preclinical and clinical advances of GalNAc-decorated nucleic acid therapeutics[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 6: 116-132.
[15] SCHMIDT K, PRAKASH TP, DONNER AJ, et al. Characterizing the effect of GalNAc and phosphorothioate backbone on binding of antisense oligonucleotides to the asialoglycoprotein receptor[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(5): 2294-2306.
[16] DONNER AJ, WANCEWICZ EV, MURRAY HM, et al. Co-administration of an excipient oligonucleotide helps delineate pathways of productive and nonproductive uptake of phosphorothioate antisense oligonucleotides in the liver[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2017, 27(4): 209-220.
[17] SETH PP, TANOWITZ M, BENNETT CF. Selective tissue targeting of synthetic nucleic acid drugs[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(3): 915-925.
[18] PRAKASH TP, YU JH, KINBERGER GA, et al. Evaluation of the effect of 2'-O-methyl, fluoro hexitol, bicyclo and Morpholino nucleic acid modifications on potency of GalNAc conjugated antisense oligonucleotides in mice[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(23-24): 3774-3779.
[19] AGARWAL S, SIMON AR, GOEL V, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the small interfering ribonucleic acid, givosiran, in patients with acute hepatic Porphyria[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2020, 108(1): 63-72.
[20] ZIMMERMANN TS, KARSTEN V, CHAN A, et al. Clinical proof of concept for a novel hepatocyte-targeting GalNAc-siRNA conjugate[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(1): 71-78.
[21] JANAS MM, SCHLEGEL MK, HARBISON CE, et al. Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 723.
[22] JANAS MM, HARBISON CE, PERRY VK, et al. The nonlini-

- cal safety profile of GalNAc-conjugated RNAi therapeutics in sub-acute studies[J]. *Toxicol Pathol*, 2018, 46(7): 735 – 745.
- [23] JAVANBAKHT H, MUELLER H, WALTHER J, *et al.* Liver-targeted anti-HBV single-stranded oligonucleotides with locked nucleic acid potentially reduce HBV gene expression *in vivo* [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 11: 441 – 454.
- [24] PURSELL N, GIERUT J, ZHOU W, *et al.* Inhibition of glycogen synthase II with RNAi prevents liver injury in mouse models of glycogen storage diseases[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(7): 1771 – 1782.
- [25] ALTAMURA S, ALTAMURA S, MUCKENTHALER MU, *et al.* SLN124, a galnac-siRNA conjugate targeting TMPRSS6, for the treatment of iron overload and ineffective erythropoiesis such as in beta-thalassemia[J]. *Blood*, 2018, 132: 2340.
- [26] ALTAMURA S, SCHAEFER U, DAMES S, *et al.* SLN124, a GalNAc-siRNA conjugate targeting TMPRSS6, efficiently prevents iron overload in hereditary haemochromatosis type 1 [J]. *HemaSphere*, 2019, 3(6): e301.
- [27] MARJOT T, MOOLLA A, COBBOLD JF, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease in adults; current concepts in etiology, outcomes, and management [J]. *Endocr Rev*, 2020, 41 (1): bnz009.
- [28] WANG XB, SOMMERFELD MR, JAHN-HOFMANN K, *et al.* A therapeutic silencing RNA targeting hepatocyte TAZ prevents and reverses fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Hepatal Commun*, 2019, 3(9): 1221 – 1234.
- [29] CANSBY E, NUÑEZ-DURÁN E, MAGNUSSON E, *et al.* Targeted delivery of Stk25 antisense oligonucleotides to hepatocytes protects mice against nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(3): 597 – 618.
- [30] LINDÉN D, AHNMARK A, PINGITORE P, *et al.* Pnpla3 silencing with antisense oligonucleotides ameliorates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in Pnpla3 I148M knock-in mice [J]. *Mol Metab*, 2019, 22: 49 – 61.
- [31] WILLOUGHBY JLS, CHAN A, SEHGAL A, *et al.* Evaluation of GalNAc-siRNA conjugate activity in pre-clinical animal models with reduced asialoglycoprotein receptor expression [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(1): 105 – 114.
- [32] KIM Y, JO M, SCHMIDT J, *et al.* Enhanced potency of GalNAc-conjugated antisense oligonucleotides in hepatocellular cancer models [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(9): 1547 – 1557.
- [33] TANOWITZ M, HETTRICK L, REVENKO A, *et al.* Asialoglycoprotein receptor 1 mediates productive uptake of N-acetylgalactosamine-conjugated and unconjugated phosphorothioate antisense oligonucleotides into liver hepatocytes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(21): 12388 – 12400.
- [34] MARTINEZ MG, VILLERET F, TESTONI B, *et al.* Can we cure hepatitis B virus with novel direct-acting antivirals? [J]. *Liver Int*, 2020, 40(Suppl 1): S27 – S34.
- [35] WEIGERT A, MARTIN-HIGUERAS C, HOPPE B. Novel therapeutic approaches in primary hyperoxaluria [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2018, 23(4): 349 – 357.
- [36] Alnylam Pharmaceuticals. Alnylam reports positive topline results from ILLUMINATE-A phase 3 study of Lumasiran for the treatment of primary hyperoxaluria type 1 [EB/OL]. (2019) [2022 – 04 – 19]. <https://investors.alnylam.com/press-release? id = 25891>.
- [37] Alnylam Pharmaceuticals. Alnylam initiates rolling submission of new drug application (NDA) to U. S. Food and Drug Administration (FDA) for Lumasiran for the treatment of primary hyperoxaluria type 1 (PH1) [EB/OL]. (2020) [2022 – 04 – 19]. <https://investors.alnylam.com/press-release? id = 24431>.
- [38] KOSMAS CE, MUÑOZ ESTRELLA A, SOURLAS A, *et al.* Inclisiran: a new promising agent in the management of hypercholesterolemia [J]. *Diseases*, 2018, 6(3): 63.
- [39] RAY KK, WRIGHT RS, KALLEND D, *et al.* Two phase 3 trials of inclisiran in patients with elevated LDL cholesterol [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(16): 1507 – 1519.
- [40] RAAL FJ, KALLEND D, RAY KK, *et al.* Inclisiran for the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(16): 1520 – 1530.
- [41] ANDREOTTI F, MAGGIONI AP. Lipoprotein (a) reduction in persons with cardiovascular disease [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(21): e65.
- [42] VOUTILA J, REEBYE V, ROBERTS TC, *et al.* Development and mechanism of small activating RNA targeting CEBPA, a novel therapeutic in clinical trials for liver cancer [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(12): 2705 – 2714.
- [43] HUANG KW, REEBYE V, CZYSZ K, *et al.* Liver activation of hepatocellular nuclear factor-4 α by small activating RNA rescues dyslipidemia and improves metabolic profile [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 361 – 370.
- [44] JULIANO RL. Intracellular trafficking and endosomal release of oligonucleotides; what we know and what we don't [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2018, 28(3): 166 – 177.
- [45] DOWDY SF. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(3): 222 – 229.

编辑:蒋欣欣/接受日期:2022-09-26