

N-乙酰半乳糖胺偶联小干扰RNA类药物的非临床毒性研究进展

窦德虎, 王 陈, 鲁 静, 张 慧, 宫新江, 张雪峰

江苏鼎泰药物研究(集团)股份有限公司, 江苏 南京 211800

摘要: 小干扰核糖核酸(siRNA)作为核苷酸类药物,通过RNA干扰(RNAi)特异性诱导基因沉默而发挥作用,在代谢性疾病、抗感染及肿瘤等领域被广泛应用。目前已获批上市4款基于*N*-乙酰半乳糖胺(GalNAc)偶联技术siRNA药物,汇总分析已上市GalNAc偶联药物的非临床毒性特征及临床不良反应,初步明确非临床研究中毒性常见类型,包括脱靶与非脱靶毒性等。结合GalNAc-siRNA类药物非临床研究实践,了解可预测的脱靶毒性及对于非临床安全性评价中的毒性关注点,以期GalNAc-siRNA药物临床研究提供参考。

关键词: 小干扰核糖核酸; *N*-乙酰半乳糖胺; 偶联技术; 基因沉默; 脱靶毒性; 安全性评价

中图分类号: R969.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2023)12-2709-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.12.028

Advances in non-clinical toxicity of *N*-acetylgalactosamine-conjugated small interfering RNA drugs

DOU Dehu, WANG Chen, LU Jing, ZHANG Hui, GONG Xinjiang, ZHANG Xuefeng

TriApex Laboratories Co., Ltd., Nanjing 211800, China

Abstract: Small interfering RNA (siRNA), nucleotide drugs, are interfering with gene silencing specifically through RNA interference (RNAi) and have been widely applied in metabolic diseases, anti-infection and tumor indications. Currently, four siRNA drugs based on *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) conjugated technology have been approved for market. In this paper, we summarized the non-clinical toxicity characteristics and clinical adverse reactions of approved GalNAc drugs, by clarifying the common types of toxicity in non-clinical studies identified, including off-target toxicity and non-off-target toxicity. Combined with the practice of non-clinical studies on GalNAc-siRNA drugs, the predictable off-target toxicity and toxicity concerns in non-clinical safety evaluation were understood to provide references for clinical trials.

Key words: small interfering ribonucleic acid; *N*-acetylgalactosamine; coupled techniques; gene silencing; off-target toxicity; safety evaluation

小干扰核糖核酸(siRNA)药物通常与靶向下游蛋白药物不同,siRNA靶向上游信使核糖核酸(mRNA),主要针对靶向小分子和单抗无法成药的靶点^[1]。siRNA药物递送系统成功发挥作用的关键在于能克服递送过程中的生理屏障及内源性核酸酶降解,使该类药物成功递送进靶细胞并发挥治疗作用^[1]。目前应用较成熟的偶联siRNA药物主要基于*N*-乙酰半乳糖胺(GalNAc)载体,也是目前应用比较广泛的肝靶向递送载体^[2]。随着化学修饰和递送系统技术的提升,siRNA药物的研发也进入快速发展阶段,基于siRNA药物在分子结构、作用机制及化学修饰方面的特殊性,药物的吸收、分布、代

谢和排泄及安全性等方面有独特性,GalNAc-siRNAs药物作为核酸类治疗药物在非临床与临床阶段仍面临较多挑战^[3]。

GalNAc-siRNAs药物会因核苷酸序列、化学修饰RNA干扰(RNAi)表现不同毒性,评价人员需要分析上述毒性改变与临床不良反应的相关性,区分杂交依赖性与非依赖性的脱靶效应^[4],进一步提高GalNAc-siRNAs药物的安全性和有效性,为临床研究转化提供更多的参考。基于已上市药物的安全性研究策略与理解,结合笔者在GalNAc-siRNAs药物非临床安全性评价中的实践,对GalNAc-siRNA药物作用机制、非临床研究中的毒性表现及毒性机

收稿日期: 2023-05-06

第一作者: 窦德虎,博士,研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: doudehu@tri-apex.com

制、已上市 GalNAc-siRNA 药物安全性情况进行汇总介绍,为该类药物非临床研究毒性判断及临床转化提供参考,也为后续 RNAi 疗法药物的评价提供指导与借鉴。

1 GalNAc-siRNA 药物作用机制

siRNA 作为合成双链 RNA 分子,长度通常为 20~25 个核苷酸,可利用内源性 RNAi 途径介导目标 RNA 沉默,达到最终降解靶蛋白的作用^[3]。作为 GalNAc-siRNA 药物,在核糖的 2'位置及有限数量的硫代磷酸酯(PS)修饰后,与正义链 3'末端的三价 GalNAc 配体结合,靶向肝细胞表面去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)。通过 ASGPR 和内涵体逃逸向肝细胞递送 GalNAc-siRNA 后,siRNA 结合至 RNAi 诱导沉默复合体(RISC)形成,在 siRNA 双链展开后,反义链与 RISC 结合并介导互补靶 RNA 序列位点特异性切割,导致 RNA 沉默和靶蛋白表达减少^[4]。

siRNA 递送需要经过多层生理屏障才可到达靶器官中,三价 GalNAc 作为亲和力相对较高的载体需要结合相应的受体 ASGPR,该受体作为完整的跨膜糖蛋白寡聚体,相对分子质量约 4.1×10^4 ,在人肝细胞中由 2 个结构不同的亚基 H1 和 H2 组成。H1 作为主要受体,其含量为 H2 的 7 倍。2 个亚基的相对分子质量相似,具有 57% 的序列同源性^[5],ASGPR 主要表达在哺乳动物肝细胞肝窦表面,介导内吞作用从循环中清除具有去唾液酸化半乳糖或乙酰半乳糖胺残基糖化蛋白,同时也负责清除脂蛋白和凋亡细胞。亚基 H1 和 H2 包含氨基末端,用于内部信号传导的跨膜结构域和羧基末端胞外结构域,其中包含 N 连接的寡糖结合位点,能够结合脱唾液酸化的非还原半乳糖残基和 GALNAC 残基。

亚基 H1 或 H2 缺陷小鼠在发育中表现出表型异常,H1 缺陷小鼠中可见 H2 表达降低,反之亦然^[6]。一旦配体与受体的细胞外结构域结合,受体-配体复合物发生内化,经过内吞作用后,配体被释放到核内体(pH 值较低),该过程依赖于 pH 水平^[7]。核内体中的酸化导致配体与受体分离,受体分子循环回到质膜。受体的 2 个亚基以不同的平均速率内吞,配体结合增加两个亚基的周转率。ASGPR 作为 C 型凝集素受体,有助于清除血液中去糖化糖蛋白^[8]。它在肝细胞表面以高拷贝数(每个细胞 50~100 万)表达^[9],每个肝细胞每小时可内吞高达 500 万 ASGPR,为药物结合和摄取提供了丰富受体^[10]。尽管在人甲状腺、大肠、肾上皮、睾丸和血液单核细胞在内的 ASGPR 亚基比例不一致^[11],但不同物种

ASGPR1 mRNA 仅在肝脏中唯一表达;通过免疫组织化学检测,可见 ASGPR 由抗体与受体发生交叉反应, GalNAc-siRNAs 的组织分布通常低于靶器官(肝脏)和主要排泄器官(肾脏)的 5%。非临床筛选可以在动物模型中以高剂量鉴定具有最小毒性的 GalNAc-siRNA,因受体容量高,对肝脏内源性底物几乎没有干扰,对其他组织没有明显影响。

2 GalNAc-siRNA 药物非临床毒性特征

通过检索同类品种在研情况及已上市 GalNAc-siRNA 药物安全性数据,结合本机构在 siRNAs 药物中非临床研究中的实践,汇总发现 siRNA 安全性的主要表现为杂交依赖性毒性(在靶毒性与脱靶毒性)与非杂交依赖性毒性,具体表现为肝毒性、药理作用放大引起在靶毒性、RNA 结合的脱靶毒性、免疫毒性、给药部位反应、肾毒性、过敏反应及血液学毒性等。

2.1 肝肾毒性

GalNAc-siRNA 进入肝细胞由 GalNAc 与 ASGPR 的特异性结合介导,该过程取决于受体-配体结合的亲和力^[4]。研究发现,大鼠皮下给予 GalNAc-siRNA 后可见较为一致的组织学改变,即肝细胞空泡数量和大小呈剂量相关增加。小鼠给予具有相同修饰的连接子、配体和化学修饰 GalNAc-siRNA 药物,其空泡改变表现一致,但在较高毒性剂量时所有肝脏改变并非一致,认为该改变可能与序列的杂交效应对天然 RNAi 途径的序列依赖效应有关^[10]。

大鼠 sc 给予 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ GalNAc-siRNA 后,可观察到肝脏单细胞轻微到轻度坏死,肝单细胞高嗜酸性细胞质和小浓缩核改变的细胞凋亡。单细胞坏死和空泡形成通常独立发生。肝单细胞坏死后通常可见细胞再生,镜下亦可观察到有丝分裂和轻微核变大,但肝单细胞坏死确切病理生理学机制尚待进一步研究^[13]。坏死细胞不会形成明显的肝细胞凝固性坏死病灶,并且与全身炎症变化无关。肝单细胞坏死,肝细胞空泡形成可能也会与肝脏质量的增加相关,但与肝脏临床病理学指标,如丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、谷氨酸脱氢酶(GLDH)等的变化尚无直接关联。因此当仅观察到肝细胞空泡样改变时并不认为是不良反应,亦不影响毒性研究中对大鼠未见不良反应剂量(NOEL)的判定;但当严重程度增加时,且观察到临床病理变化,肝酶升高具有毒理学意义时,应

关注与临床相关风险的可能性。由于 GalNAc-siRNA 给药导致的肝细胞单细胞坏死在很大程度上对大鼠具有特异性,在非人灵长类种属中并不常见,目前已获批上市 GalNAc-siRNA 药物非临床毒性研究中未见食蟹猴重复给药后肝细胞空泡改变。

大鼠 sc 给药 GalNAc-siRNA 毒性研究中,重复给药剂量 $\geq 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,在近端肾小管细胞中可见药物相关性细胞质嗜碱性颗粒,免疫组化确认这些颗粒为药物和(或)代谢物,主要原因认为与 GalNAc 配体介导肾脏近端小管摄取的能力较低,故在毒理学剂量下这种蓄积在偶联和非偶联 siRNA 中都可以观察到。值得关注的是在大鼠和食蟹猴每周给予 GalNAc-siRNA 剂量高达 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,未见其他肾脏退行性改变或任何表明肾毒性的临床病理学变化。

2.2 免疫毒性

模式识别作为先天免疫系统的重要功能之一,主要表现在哺乳动物对病原体及其代谢物的识别和清除,或将病原体呈递给适应性免疫系统。哺乳动物细胞似乎不仅获得了识别模式指示分子(如脂多糖、肽聚糖及病毒糖蛋白)的能力,而且还获得了识别细菌 DNA 和病毒 DNA 的能力^[14-16],通常 siRNA 小于 30 个核苷酸,早期研究发现 siRNA 在一定程度上可逃避免疫识别,不会引起广泛的干扰素反应。随着研究数据的积累,研究者发现即使是合成的短 siRNA 也可介导一定程度的免疫反应,并显著增加多种细胞因子的水平^[16],其机制是通过位于细胞质的 toll-白介细胞素-1 受体(TIR)域触发下游信号,激活干扰素调节转录因子(IRF)、核因子- κB (NF- κB)和丝裂原活化蛋白激酶信号(MAPK)通路,导致干扰素(IFN)和促炎细胞因子的表达有关。在 siRNA 诱导的免疫激活过程中,核内体中表达的 Toll 样受体(TLR)3、TLR7、TLR8 和 TLR9 均能识别核苷酸,核内体成熟才能传递信号,TLRs 亚家族的信号需要适配器分子 MyD88,并通过多个细胞内通路,导致 NF- κB 、MAPK 和干扰素调节转录因子-7(IRF-7)的动员。不同通路的激活取决于特定的 TLR 和配体。在不同的免疫细胞类型中不同,导致诱导不同的细胞因子,包括肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-12(IL-12)和干扰素- α (IFN- α)。TLRs 的激活还可诱导树突状细胞中共刺激分子的上调,这也是先天免疫向获得性免疫转变的必要过程^[17]。

由于 siRNA 介导的免疫反应表现出细胞类型

特异性,这种脱靶效应可能会给 siRNA 药物开发带来挑战。因 TLR7 在人和小鼠中均表现相应功能活性,TLR7 对序列依赖 siRNA 和单链 RNA(ssRNA)识别均有必要,而 TLR8 只在人体表现出功能活性,TLR7 和 TLR8 在人体和小鼠的表达模式不同,部分原因可能是因其免疫细胞亚型分类不同。因此,小鼠和人体之间存在关键性差异,这使得使用小鼠模型对 siRNA 信号进行功能分析变得复杂^[17],这也进一步解释了啮齿类种属相对 siRNA 较为敏感。

小鼠体内数据表明这种免疫激活副作用具有明显的毒性,可引起血清中肝酶升高,降低淋巴细胞和血小板水平^[18],TLR3 可以识别 siRNA 的双链形式,而 TLR7 和 TLR8 可以识别 siRNA 的双链形式和单链形式。因此,正义和反义 siRNA 链均可诱导免疫反应。单链 siRNA 的激活效果与双链 siRNA 相当,在某些情况下,单链 siRNA 引起的免疫应答要强得多^[19-20]。除了结构特征外,siRNA 的长度也是决定其免疫应答的重要因素,较短的 siRNA(如 12 或 16 个核苷酸),即使包含特定的免疫激活元素,一般也不会诱导免疫反应。如果 siRNA 的长度扩展到大于 19 个核苷酸,可以诱导较明显的免疫反应,如介导了全身 IFN- α 反应,激活 T 淋巴细胞和髓样树突状细胞,但单独注射 siRNA 或脂质体不会引起该免疫反应。有研究表明载体-siRNA 复合物相比于单独的 siRNA 或脂质体,更容易引起免疫反应^[21],尽管有研究认为 TLR7 和 TLR8 的激活具有相似的序列相似性,但发现 siRNA 对 TLR7 和 TLR8 的激活具有序列特异性,如鸟嘌呤(G)、尿嘧啶(U)GU 二核苷酸和 5'-UGU-3'^[22]等富含 GU 的序列。此外富含谷氨酸序列也被证明可以介导相对较弱的免疫反应,亦有缺乏 GU 也可激活免疫反应^[23]的报道,富含核苷酸腺嘌呤(A)、尿嘧啶(U)AU 的结构,包括单个尿嘧啶也有激活免疫反应的报道^[24]。

2.3 给药部位反应

在淋巴结髓质中的巨噬细胞等网状内皮细胞和注射部位单个核细胞中,药物蓄积更明显地表现为细胞质空泡化而非明显嗜碱性颗粒。在食蟹猴毒性研究中,腋窝、肠系膜、腹股沟 1 个或多个淋巴结伴有细微嗜碱性点状斑点,经免疫组化检查证实为药物。这一改变在大鼠体内较少观察到,但在组织病理学改变方面表现较为相似。大鼠与食蟹猴种属中, GalNAc-siRNA 重复给药后,在皮下注射部位可见细胞质空泡化,以巨噬细胞和树突状细胞系中较明显。

2.4 药理作用放大毒性

GalNAc-siRNA 药物 Fitusiran (ALN-AT3), 靶向抗凝血酶, 通过与表达抗凝血酶的 RNA 结合, 降低抗凝血酶的产生, 临床用于血友病治疗。在野生型小鼠中, Fitusiran 给药后导致血栓形成, 弥漫性血管内凝血和非计划死亡等改变。但在血友病小鼠模型中, 给药后可明显改善血友病表型, 延长血友病小鼠存活期。因此, GalNAc-siRNA 的在靶毒性 (on-target effects) 相关药理作用放大也应是毒性评估的关注点之一^[25]。

2.5 补体激活及血液学毒性

化学修饰可以显著影响寡核苷酸的毒性, 单链寡核苷酸中硫代磷酸酯含量可能导致肝毒性或肾毒性的高蛋白结合, 包括可能的神经毒性。补体激活、血管炎和肾小球病, 血小板减少症等免疫刺激效应可能与骨架修饰中高硫代磷酸酯含量相关^[26-31]。

3 已上市 GalNAc-siRNA 药物非临床毒性及 siRNA 终止开发案例

3.1 Givosiran

美国食品药品监督管理局 (FDA) 于 2019 年批准 Givosiran 用于成人急性肝卟啉症 (AHP) 治疗的 GalNAc-siRNA 药物。非临床研究数据显示, 大鼠 sc 给药后, Givosiran 主要分布于肝脏, 肝脏与血浆暴露量 (AUC) 比值约为 4 500, 在肝脏组织半衰期明显长于血浆。单次 sc 给药肝脏暴露量显著高于静脉给药后的肝脏暴露量, 表明 sc 给药后肝脏吸收更有效; sc 后肝脏吸收更有效可能是由于血浆浓度逐渐增加, 而非静脉注射后急剧增加, 可避免 ASGPR 介导的肝脏吸收饱和。SD 大鼠每周 1 次, 连续 26 周恢复 13 周重复 sc 给药毒理学研究, Givosiran 主要毒性靶器官为肝脏, 相关临床病理改变可见总胆红素和肝酶升高。肝脏组织学检查可见单细胞坏死, 有丝分裂增多和肝细胞核增大。在肾脏中可见管状嗜碱性颗粒, 可能与阴离子寡核苷酸分子在溶酶体中蓄积有关。食蟹猴每周 1 次, 连续 39 周恢复 13 周重复给药毒理学研究, 与大鼠重复毒性研究结果一致, 肝脏也是食蟹猴毒性试验主要靶器官。临床病理可见肝酶升高 (ALT、GGT), 组织病理可见肝细胞单细胞坏死, 肝细胞嗜碱性颗粒和枯否细胞嗜碱性颗粒, 淋巴结有巨噬细胞空泡化。临床不良反应主要表现为恶心及注射部位反应, 未见肝肾异常^[32]。

3.2 Inclisiran

欧洲药品管理局 (EMA) 于 2020 年批准

Inclisiran 用于原发性高胆固醇血症治疗的 GalNAc-siRNA 药物, 通过抑制肝细胞中前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶 Kexin-9 (PCSK9) 的翻译, 阻止细胞表面低密度脂蛋白受体 (LDLR) 的降解, 达到降低低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 的目的。非临床研究数据显示, SD 大鼠单次 sc 给药后, 在肝脏和肾脏分别 14、56 d 仍可检测到 inclisiran。肝脏平均表观半衰期为 53.1~191 h。肾脏暴露呈剂量相关性增加, 肝脏平均浓度比肾脏高 200%~500%。Inclisiran 组织分布主要分布于肝脏、肾脏。在大鼠 sc 给药 4、15 和 29 周重复给药毒理学研究中, 多数剂量组可见雄性和 (或) 雌性动物肝细胞空泡, 小空泡未见核移位, 单个大空泡未见细胞核, 停药后可见肝脏改变恢复。食蟹猴 sc 给药 4、15、40 周的毒理学研究, 未见肝细胞空泡化。在食蟹猴 15 周和 40 周连续给药毒性研究中, 所有剂量组动物肝细胞细胞质中可见嗜碱性颗粒^[33], 临床中最常发生的注射部位不良事件为注射部位反应、疼痛、红斑和皮疹。

3.3 Lumasiran

欧洲药品管理局 (EMA) 于 2020 年批准 Lumasiran 用于高草酸尿症治疗的 GalNAc-siRNA 药物。大鼠与食蟹猴组织分布的非临床研究显示, Lumasiran 主要分布于肝脏及肾脏。反义链 3' 端剪切掉 1 个核苷酸后代物 [AS(N-1)3'] 暴露量在大鼠与食蟹猴血浆中占 10%。大鼠 sc 给药每周 1 次, 连续 8 周恢复 13 周毒性试验, 组织学改变可见 Kupffer 细胞嗜碱性颗粒, 肝单个细胞坏死, 有丝分裂增加, 肝小叶中心型细胞肥大, 肝细胞空泡形成, 肝细胞肥大, 核肿大, 肾小管上皮嗜碱性颗粒。大鼠 sc 给药 29 周重复给药可见肝细胞空泡形成; Kupffer 细胞的色素增加; 肝细胞有丝分裂增加; 肾小管细胞质中嗜碱性颗粒。食蟹猴 sc 给药连续 8 周, 36 周恢复 13 周毒性试验, 可见淋巴结巨噬细胞蓄积, Kupffer 细胞嗜碱性颗粒^[34]。临床常见不良事件为注射部位反应, 其次是发热、头痛、鼻炎、上呼吸道感染和呕吐。

3.4 Vutrisiran

FDA 于 2022 年批准用于成人遗传性甲状腺素介导淀粉样变性的多神经病变治疗的 GalNAc-siRNA 药物。Vutrisiran 仅在食蟹猴中具有药理学活性, 非临床研究大鼠与食蟹猴 sc 给药组织分布显示, Vutrisiran 主要分布于肝脏及肾脏。大鼠 sc 给药每月 1 次 (15、50、150 mg·kg⁻¹), 连续 6 个月恢复 13 周毒性试验, 组织学改变可见肝脏细胞嗜碱性颗

粒,肝细胞核增大,有丝分裂增加,大鼠每3个月给药1次,肝脏组织改变与每月1次给药后改变相似。因Vutrisiran与大鼠与兔序列不同源,杂交依赖效应评估仅在食蟹猴毒性研究中开展,食蟹猴连续13周sc给药,39周每月1次给药(30、100、300 mg·kg⁻¹)恢复13周毒性试验,可见Kupffer细胞嗜碱性颗粒,腹股沟及肠系膜淋巴结巨噬细胞空泡化,NOAEL均为300 mg·kg⁻¹[35]。临床常见不良事件为关节痛,呼吸困难和维生素A降低。

3.5 siRNA终止开发案例

AGN-745(siRNA-027),Allergan公司开发靶向于血管内皮生长因子(VEGF)受体,治疗老年性黄斑变性(AMD)的化学修饰siRNA药物,因临床效果不佳且出现脱靶效应,于临床II期终止[36]。

Alnylam Pharmaceuticals开发的siRNA药物ARC-521,旨在降低乙肝表面抗原(HBsAg)和病毒DNA的表达,非临床研究中非人类灵长类动物种属表现严重毒性[37],该药在临床I期终止。

TKM-ApoB(PRO-040201),由Tekmira制药开发,靶向于肝细胞中过表达的载脂蛋白B(ApoB)siRNA药物,用于高胆固醇血症治疗[38]。在啮齿类和非人类灵长类动物模型中能有效降低低密度脂蛋白和三酰甘油[39],而在临床I期研究中,由于siRNA依赖性免疫刺激作用,激活免疫反应而表现出流感样症状,终止开发[38]。

Arbutus Biopharma Corporation公司开发代号为TKM-100201和TKM-100802抗埃博拉病毒的siRNA药物,靶向埃博拉膜相关蛋白(VP24)和埃博拉聚合酶复合物蛋白(VP35),由于免疫系统过度激活,该药的I期临床试验终止[40-41]。

Revusiran是化学合成的双链siRNA(靶向转甲状腺素TTR mRNA),第1代3价GalNAc-siRNA药物。非临床安全性评估包括安全药理学、单次和重复给药毒性研究,遗传毒性和致癌性试验。单次sc给药100 mg·kg⁻¹未见对猴心血管或呼吸功能有影响。在300 mg·kg⁻¹的猴sc重复给药毒性研究中,未见神经系统异常。Revusiran在小鼠每周sc重复给药,大鼠26周、猴39周(5 d连续给药后每周重复给药)毒性研究中具有良好的耐受性。大鼠NOAEL为30 mg·kg⁻¹(约为临床暴露量的1.6倍,所有剂量组可见给药部位水肿,高剂量100 mg·kg⁻¹可见肾近端小管嗜碱性颗粒,肝脏单核细胞空泡化、淋巴结空泡化巨噬细胞和注射部位空泡化巨噬细胞和炎症浸润)。在猴体内未见剂量限制毒性,NOAEL为

高剂量200 mg·kg⁻¹(约为临床暴露量的106倍)。在长期毒性研究中进行了肝脏线粒体形态的超微结构评估,以评估反复暴露于GalNAc-siRNA及其代谢物是否会因核苷类药物和核苷酸类似物相关的线粒体毒性,总体评估认为Revusiran具有良好的非临床安全性[42]。但在“ENDEAVOUR”III期临床试验中,主要不良反应可见心脏衰竭、周围神经性病变、咳嗽、水肿、注射部位疼痛、肝功能异常、肾衰竭,相较于对照组2例死亡,受试药组出现18例受试者死亡,死亡原因认为与心力衰竭引起的心血管疾病相关,随后Revusiran临床试验终止[43]。

siRNA药物非临床常见毒性为肝肾改变,对于临床肝肾不良反应预测具有一定价值,其中肝毒性可能与以下2种机制相关:(1)GalNAc配体/连接子及其代谢物影响;(2)可能导致脱靶效应的AGO蛋白异构体。为降低GalNAc配体/连接子的风险,使用脂质纳米颗粒(LNPs)递送与GalNAc结合或不结合的siRNA,通过选择性地敲除AGO异构体,评估了其siRNA肝毒性的影响。研究结果表明,GalNAc-连接子及其代谢物并非大鼠肝毒性的主要原因,而AGO2-siRNA RISC(非AGO1或AGO4)导致肝脏的脱靶毒性[44]。与大多数基于寡核苷酸的治疗类似,GalNAc-siRNA可以通过沉默与反义链部分互补的非靶RNA来介导杂交依赖性脱靶效应[45]。

Janas等[46]在药物开发筛选阶段,药理学放大剂量下通过3周给药的大鼠探索性毒理学研究,观察到的常见毒性包括小叶中心肝细胞变性或凝固性坏死,肝酶升高超2倍。该效应很可能由于RNAi介导,并且主要由反义链的种子区域驱动,类似于内源性microRNA活性。研究发现阻断siRNA RISC形成,阻断siRNA-RISC复合物与反义链化合物的脱靶结合,以及在不改变化学修饰的情况下改变已知有毒和无毒siRNA的种子区域,在药理学放大剂量肝脏暴露条件下,大鼠肝毒性降低。相反,通过对2'核苷酸修饰来改变siRNA化学结构对肝毒性没有影响[45]。所以通过对种子区域的热不稳定化学修饰可以降低这些序列依赖性脱靶效应的风险[47],并可以最大限度地减少siRNA跨物种间的肝毒性发生。虽然认为肝毒性的潜在原因可能与细胞内寡核苷酸及其代谢物的蓄积,RNA干扰(RNAi)介导的杂交脱靶效应和或内源性RNAi通路的干扰有关。目前主要认为啮齿动物肝毒性在很大程度上可归因于RNAi介导的脱靶效应,而非化学修饰或

RNAi通路的干扰。因此可将单个热不稳定的GNA核苷酸引入反义种子区,可以选择性降低种子区介导的脱靶结合概率,提高GalNAc-siRNAs药物安全性^[46]。

4 对GalNAc-siRNA类药物非临床毒性外推临床的思考

研究表明RNAi疗法的临床开发仍面临较大的挑战,从实验室到临床的转化成功率约为0.06%^[48],不仅体现在核酸修饰,靶向递送并解决稳定性和免疫原性及脱靶效应仍是亟待解决的问题。虽然三价GalNAc目前是相对研究较为成熟的siRNAs递送载体,但也会因序列同源性、序列长度、骨架修饰程度等表现个案的毒性反应。

非临床研究应给予风险评价为临床研究提供安全性与有效性参考,对于GalNAc-siRNAs药物非临床毒性研究中需要考虑以下方面:(1)GalNAc-siRNAs在非临床安全性研究中耐受性与剂量、频率、周期及靶组织药物半衰期相关,目前常见的毒性改变可见肝酶升高,肝脏单个细胞坏死等组织学改变,故需要评估其肝酶升高幅度及与肝脏组织病理改变类型与程度,对于长期用药的情况下,充分评估对临床转化的参考价值。(2)对于肾脏和淋巴结中药物蓄积,评估肾脏嗜碱性颗粒的改变是否可见肾脏毒性及功能指标改变。(3)对于补体激活、免疫刺激效应、血小板减少、细胞因子释放等改变、非临床研究中通过特异性补体指标、血小板及细胞因子监测探索可能的免疫激活作用,因TLR3、TLR7、TLR8及TLR9在不同种属及免疫细胞亚群表达的水平不同,对于树突状(DC)细胞,中性粒细胞,单核细胞及T细胞尽可能早期发现其是否活化或高表达,关注是否与化学修饰中高硫代磷酸酯含量有关。如果出现血小板降低及凝血功能异常,必要时进行血小板功能的深入研究。(4)对于给药部位刺激反应,不同修饰程度GalNAc-siRNAs可能表现空泡化或嗜碱性点状斑点,必要时需要进行免疫组化证实病变的具体类型,因给药部位的反应在目前临床上属于常见不良反应,在此类药物的局部刺激评价中仍要加以关注。(5)关注因稳定性及用药剂量相关的脱靶风险,非临床安全性评价大多在健康动物模型中进行,与相应疾病模型中毒性特征并非一致。以Revusiran为例,本身TTR突变引起的淀粉样蛋白沉积会导致心肌病及心脏衰竭可能,临床主要不良反应集中在心脏衰竭,所以可在疾病模型考察中针对靶蛋白影响异常的组织或器官进行早期监

测。基于Revusiran的化学稳定性有限,非临床与临床用药频率及剂量均较高,相比针对同样靶点的已上市Patisiran临床不良反应,同样可达到临床有效性的低暴露会降低安全性风险^[36]。(6)关注药理作用放大毒性,如Fitusiran在野生型小鼠中给药后药理作用放大所致血栓形成,弥漫性血管内凝血改变,关注非临床研究不同种属中药理作用放大对于毒性评估的意义。GalNAc-siRNAs引起的非预期毒性改变,则根据具体病变类型及程度,对临床的风险获益进行权重分析。

综上,GalNAc-siRNAs药物作为新型治疗方式在非临床与临床阶段仍会面临较多的挑战。目前仅有日本药品监督管理局发布了核苷酸类药物的非临床研究指导原则^[49],还未见其他主要监管机构对于siRNA药物评价的官方指南,但基于GalNAc-siRNAs研究的成熟度及产品本身特点,兼具有化学分子与生物药的属性,该类物质部分毒性相对可预期,通过已公开的研究数据与临床数据分析发现,GalNAc-siRNAs药物会因核苷酸序列、化学修饰、RNAi表现不同毒性,其中肝脏脱靶毒性作为可预期的改变,毒性并非均在此类药物中可见,肾脏嗜碱性颗粒的改变未见肾脏毒性及功能指标改变,与临床不良反应非直接相关。对于非临床研究的安全性评估,应结合临床拟用策略及药物本身的风险进行针对性设计,客观评估其毒性特征。考虑到临床使用间隔基于组织半衰期及靶效应时间的因素,非临床用药频率的设定应具有指导价值。探索毒性反应是否为GalNAc-siRNAs本身可预期反应,同时需兼顾评估其他脱靶效应和或序列化学修饰相关毒性,对于补体激活、免疫刺激效应、血小板减少、细胞因子释放、药理作用放大等改变应评估毒理学意义^[50],是否影响非临床安全剂量界定,并判断上述改变与临床不良反应相关性,区分杂交依赖性与非依赖性的脱靶效应,进一步提高GalNAc-siRNAs和其他基于寡核苷酸的疗法的安全性和有效性,为临床研究转化提供更多的参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Thomas F, Bob D B, Chengjung L. Therapeutic RNA interference: A novel approach to the treatment of primary hyperoxaluria [J]. Clin Pharmacol, 2022, 88: 2525-2538.
- [2] Aaron D S, Steven F D. GalNAc-siRNA conjugates: Leading the way for delivery of RNAi therapeutics [J].

- Nucleic Acid Therapeutics, 2018, 28(3): 109-118.
- [3] Sebastian P, Gunter M. siRNA design principles and off-target effects [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 986: 59-71.
 - [4] Jayaprakash K, Jennifer L, Amy C, 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.
 - [5] Bianucci A, Shiellini F. A 3D model for the human hepatic asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) [J]. *Biomol Struct Dynamics*, 2000, 18: 435-451.
 - [6] Tozawa R, Ishibashi S, Osuga I, et al. Asialoglycoprotein receptor deficiency in mice lacking the major receptor subunit. Its obligate requirement for the stable expression of oligomeric receptor [J]. *Biol Chem* 2001, 276(16): 12624-12628.
 - [7] Wragg S, Drickamer K. Identification of amino acid residues that determine pH dependence of ligand binding to the asialoglycoprotein receptor during endocytosis [J]. *Biol Chem*, 1999, 274(50): 35400-35406.
 - [8] Cummings R, Mc Ever R. *Cold Spring Harbor* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
 - [9] Baenziger J, Fiete D. Galactose and *N*-acetylgalactosamine-specific endocytosis of glycopeptides by isolated rat hepatocytes [J]. *Cell*, 1980, 22(2): 611-620.
 - [10] Dancygier H, Merle U, Stremmel W, et al. *Hepatic Metabolism In Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases* [M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2010.
 - [11] Harris L, van den Berg C, Bowen D. ASGR1 and ASGR2, the genes that encode the asialoglycoprotein receptor (ashwell receptor), are expressed in peripheral blood monocytes and show interindividual differences in transcript profile [J]. *Mol Biol Int*, 2012, doi: 10.1155/2012/283974.
 - [12] Wen J, Friedman J. miR-122 regulates hepatic lipid metabolism and tumor suppression [J]. *Clin Invest*, 2012, 122(8): 2773-2776.
 - [13] Maja M, Carole E, Victoria K. The nonclinical safety profile of GalNAc-conjugated RNAi therapeutics in subacute studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2018, 46(7): 735-745.
 - [14] Judge A, MacLachlan I. Overcoming the innate immune response to small interfering RNA [J]. *Human Gene Therap*, 2008, 19(2): 111-124.
 - [15] Hartmann G. Gene silencing below the immune radar [J]. *Clin Investig*, 2009, 119(3): 438-442.
 - [16] Kariko K, Bhuyan P, Capodici J, et al. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3 [J]. *J Immunol*, 2004, 172(11): 6545-6549.
 - [17] Joao T, Williams B. Activation of the mammalian immune system by siRNA [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1399-1405.
 - [18] Sioud M. Single-stranded small interfering RNA are more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: A central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(5): 1222-1230.
 - [19] Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, et al. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7 [J]. *Nat Med*, 2006, 11(3): 263-270.
 - [20] Sioud M. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization [J]. *J Mol Biol*, 2005, 348(5): 1079-1090.
 - [21] Diebold S S, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA [J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1529-1531.
 - [22] Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8 [J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1526-1529.
 - [23] Forsbach A, Nemorin J G, Montino C, et al. Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses [J]. *J Immunol*, 2008, 180(6): 3729-3738.
 - [24] Goodchild A, Nopper N, King A, et al. Sequence determinants of innate immune activation by short interfering RNAs [J]. *BMC Immunol*, 2009, 10: 40.
 - [25] Sehgal A, Barros S, Ivanciu L, et al. An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia [J]. *Nat Med*, 2015, 21(5): 492-497.
 - [26] Frazier K. S. Antisense oligonucleotide therapies: The promise and the challenges from a toxicologic pathologist's perspective [J]. *Toxicol Pathol*, 2015, 43(1): 78-89.
 - [27] Sewing S, Roth A. B, Winter M, et al. Assessing single-stranded oligonucleotide drug-induced effects *in vitro* reveals key risk factors for thrombocytopenia [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187574.
 - [28] Engelhardt J A, Fant P, Guionaud S, et al. Scientific and regulatory policy committee points-to-consider paper: Drug-induced vascular injury associated with nonsmall

- molecule therapeutics in preclinical development: Part 2. antisense oligonucleotides [J]. *Toxicol Pathol*, 2015, 43 (7): 935-944.
- [29] Frazier K. S. Antisense oligonucleotide therapies: The promise and the challenges from a toxicologic pathologist's perspective [J]. *Toxicol Pathol*, 2015, 43(1): 78-89.
- [30] Frazier K S, Sobry C, Derr V, et al. Species-specific inflammatory responses as a primary component for the development of glomerular lesions in mice and monkeys following chronic administration of a second-generation antisense oligonucleotide [J]. *Toxicol Pathol*, 2014, 42 (5): 923-935.
- [31] Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications [J]. *Postdoc*, 2016, 4 (7): 35-50.
- [32] FDA. Givosiran NDA Multi-disciplinary Review and Evaluation [EB/OL]. (2019-11-20) [2023-05-05]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/212194Orig1s000TOC.cfm.
- [33] FDA. Leqvio NDA Multi-disciplinary Review and Evaluation [EB/OL]. (2021-12-22) [2023-05-05]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2022/214012Orig1s000TOC.cfm.
- [34] FDA. Oxlumio NDA Multi-disciplinary Review and Evaluation [EB/OL]. (2020-11-23) [2023-05-05]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2020/214103Orig1s000TOC.cfm.
- [35] FDA. AMVUTTRA NDA Multi-disciplinary Review and Evaluation [EB/OL]. (2022-06-13) [2023-09-12]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2022/215515Orig1s000TOC.cfm.
- [36] Burnett J C, Rossi J J. RNA-Based therapeutics: Current progress and future prospects [J]. *Chem Biol*, 2012, 19 (1): 60-71.
- [37] Thangamani L, Balasubramanian B, Easwaran M. GalNAc-siRNA conjugates: Prospective tools on the frontier of anti-viral therapeutics [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 173: 105864.
- [38] Alabi C, Vegas A, Anderson D. Attacking the genome: Emerging siRNA nanocarriers from concept to clinic [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, 12(4): 427-433.
- [39] Zimmermann T, Lee A, Akinc A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates [J]. *Nature*, 2006, 441(7089): 111-114.
- [40] Thi E P, Mire C E, Lee A C H, et al. Lipid nanoparticle siRNA treatment of Ebola-virus-makona-infected nonhuman primates [J]. *Nature*, 2015, 521(7552): 362-365.
- [41] Safety, tolerability and pharmacokinetic first in human (FIH) study for intravenous (IV) TKM-100802 [J/OL]. (2015-08-07) [2023-04-12]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02041715>.
- [42] Jessica E S, Julia L H, Amy C, et al. Nonclinical safety profile of revusiran, a 1st-generation GalNAc-siRNA conjugate for treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis [J]. *Nucl Acid Therap*, 2020, 30(1): 33-49.
- [43] Judge D, Kristen A, Grogan M, et al. Phase 3 multicenter study of revusiran in patients with hereditary transthyretin-mediated (hATTR) amyloidosis with cardiomyopathy (ENDEAVOUR) [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34(3): 357-370.
- [44] Agarwal S, Moran L, Woldemariam S, et al. Mechanisms of rat hepatotoxicity of GalNAc-siRNA conjugates [EB/OL]. (2018-10-04) [2023-04-12]. https://capella.alnylam.com/wp-content/uploads/2018/10/04_Agarwal.pdf.
- [45] Burel S A, Hart C E, Cauntay P, et al. Hepatotoxicity of high affinity gapmer antisense oligonucleotides is mediated by RNase H1 dependent promiscuous reduction of very long pre-mRNA transcripts [J]. *Nucl Acids Res*, 2016, 44(5): 2093-2109.
- [46] Janas M, Schlege M, Harbison C, et al. Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 723.
- [47] Seok H, Jang E S, Chi S W. Rationally designed siRNAs without miRNA-like off-target repression [J]. *BMB Rep*, 2016, 49(3): 135-136.
- [48] Saw P, Song E. siRNA therapeutics: A clinical reality [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(4): 485-500.
- [49] PSEHB/PED Guideline: Guideline for preclinical safety assessment of oligonucleotide therapeutics [EB/OL]. (2020-03-30) [2023-04-16]. <https://www.pmda.go.jp/english/review-services/regulatory-info/0003.html>.
- [50] Priyanga R, Melisande L, James W. Small interfering RNA: Discovery, pharmacology and clinical development-An introductory review [J]. *Br J Pharmacol*, 2023, 180: 2697-2720.

[责任编辑 李红珠]