

去唾液酸糖蛋白受体及其在药物肝靶向递送中的应用*

黄渊余** 梁子才**

(北京大学分子医学研究所, 北京 100871)

摘要 去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)是肝细胞特异性表达的受体, 且是一种高效的内存型受体, 去唾液酸糖蛋白、半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺等糖分子对其有高亲和性. 该综述回顾了 ASGPR 的发现历程、结构特征、生物学功能、表达模式、胞吞特点. 总结了影响 ASGPR 与其配体亲和、介导胞吞的影响因素(包括配体类型、触角数量、空间距离与颗粒粒径). 概述了早期 ASGPR 与其特异性配体在药物递送中的应用. 最后介绍了最近利用 N-乙酰半乳糖胺的缀合或修饰来实现肝靶向核酸药物递送的研究进展.

关键词 去唾液酸糖蛋白受体, N-乙酰半乳糖胺, 药物递送, 肝靶向, 小干扰 RNA, 反义核酸
学科分类号 Q52, R945, O629.1 **DOI:** 10.16476/j.pibb.2015.0028

去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR) 是肝细胞特异性表达的一种内存型受体, 近年来, 利用 ASGPR 的高亲和性配体 N-乙酰半乳糖胺 (N-acetylgalactosamine, GalNAc) 作为靶向分子, 在核酸药物的肝靶向递送方面取得了突破性进展. 尽管该受体已被发现多年, 但基于该受体及其配体的肝靶向药物递送正在焕发出持续的能量, 因此, 对 ASGPR 及其配体的特点、性质、机制等深入的了解, 对创新基础研究、新型药物设计与开发均显得十分重要.

1 去唾液酸糖蛋白受体

1.1 简介

去唾液酸糖蛋白受体是数量丰富的一种异源低聚物的内存型受体, 主要存在于肝脏实质细胞朝向窦状隙一侧的细胞膜表面, 具有对糖的特异性^[1]. 由于各种糖蛋白在用酶水解或用酸解除去末端唾液酸后, 暴露出的次末端是半乳糖残基, 所以 ASGPR 的糖结合特异性实际上在于半乳糖基, 故又称半乳糖特异性受体.

1.2 发现

ASGPR 最早是被 Morell 等^[2]在研究去唾液酸铜蓝蛋白 (ceruloplasmin, CER) 的代谢时发现, 当时研究人员推测肝细胞膜上存在与去唾液酸铜蓝蛋白特异结合的受体. 后来, 有报道称 ASGPR 只存在于肝细胞中, 并特异性地识别与结合具有非还原性 D-半乳糖 (β -D-galactose, Gal) 或 N-乙酰半乳糖胺 (N-acetylgalactosamine, GalNAc) 作为末端糖基的去唾液酸 N 链接糖蛋白, 尤其是三触角、四触角糖蛋白.

1.3 结构

ASGPR 属于 C 型凝集素家族, 以钙依赖的方式完成配体的特异性识别, 分子质量为 42 ku. ASGPR 的结构可以分为 4 个功能域: 胞质域、跨膜域、茎域 (stalk) 以及糖识别域 (carbohydrate

* 国家自然科学基金(81402863)和博士后基金(2014M550008)资助项目.

** 通讯联系人.

黄渊余. Tel: 010-62750683, Email: yyhuang@pku.edu.cn

梁子才. Tel: 010-62769862, Email: liangz@pku.edu.cn

收稿日期: 2015-01-24, 接受日期: 2015-04-24

recognition domain, CRD)^[3]. 功能性的 ASGPR 结构由被称为 HL1、HL2 的两个同源亚基组成, 这两个亚基有 55% 的相同氨基酸序列, 比例为 2:2, 这两个亚基多肽对血液循环系统中去唾液酸糖蛋白的有效清除都是必需的.

1.4 功能

ASGPR 的主要功能是清除血液循环系统中的去唾液酸糖蛋白、凋亡细胞以及脂蛋白等^[4]. 除了去唾液酸铜蓝蛋白, ASGPR 还能和其他多种去唾液酸糖蛋白结合, 如促红细胞生成素、干扰素、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、肝球蛋白、胎球蛋白、凝血酶原等, 并且这些结合有很高的特异性. 同时也有研究发现, ASGPR 是潜在的乙肝病毒^[5]、马堡病毒(Marburg virus)^[6]入侵的肝特异性受体, 它与淋球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)感染 HepG2 细胞^[7]或原发性人尿道上皮细胞(primary human urethral epithelial cells, PHUECs)^[8]有关, 且在酒精性肝硬化病人中也可能是溶血的一大促因^[9].

1.5 表达与胞吞特征

ASGPR 蛋白的氨基酸序列在各物种间保守性高. 人类 ASGPR 主要表达在肝实质细胞中, 每个人肝实质细胞表达的 ASGPR 数量大概为 50~100 万个, 人肝癌细胞系 HepG2 约为 22.5 万个^[10], 大鼠肝实质细胞则为约 50 万个^[11]. 在妊娠 15 周的人类胎儿肝脏中即可检测到 ASGPR 的表达^[12].

在 37℃ 下, 大鼠肝实质细胞胞吞去唾液酸血清类黏蛋白(asialoorosomucoid, ASOR, 含半乳糖/乙酰半乳糖胺的蛋白)的速率大概是 $0.1 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$ ^[13], 胞吞去唾液酸胎球蛋白(asialofetuin)的速率约为 $0.75 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$ ^[13]; HepG2 胞吞 ASOR 的速率约为 $0.02 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$ ^[14], 或约 15 000/min^[10]. ASGPR 在胞吞过程中循环时间约需近 15~16 min^[10]. 在胞吞模式上, 有文献称, 通过 GalNAc 与 ASGPR 相互作用而实现的药物递送过程是网格蛋白(clathrin)介导的胞吞过程^[15].

1.6 其他肝细胞表面受体

除了肝实质细胞表达的 ASGPR 外, 在肝脏 Kupffer 细胞上, 一种与 ASGPR 同源的钙依赖半乳糖识别受体也可以识别乙酰半乳糖胺和海藻糖^[16], 但这种受体在所有其他的巨噬细胞上均不表达. 除了 ASGPR 外, 肝实质细胞表面存在的受体还有转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)、高密度脂蛋白受体(high density lipoprotein receptor, HDLR)、

低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)、生长因子受体、胰岛素受体等, 其中 ASGPR 和 TfR 是两种高效的内吞受体, TfR 存在于许多种细胞的细胞膜上, 因此 ASGPR 成为肝脏定向转运的最佳受体.

2 ASGPR 配体与受体的亲和性影响因素

2.1 糖分子类型

末端为非还原性的半乳糖(Gal)或 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)残基的糖蛋白均可以被 ASGPR 识别, GalNAc 与 ASGPR 结合的亲和性比 Gal 高几十倍(约 50 倍)^[17-18]. Rensen 等^[18]的研究观察到, 单独的半乳糖(单触角)只能轻微地抑制 ASOR 与大鼠或小鼠肝实质细胞的结合, 但三触角的成簇化半乳糖苷缀合可以将其与肝实质细胞的亲和性提高约 40 倍, 进一步将半乳糖苷替换成乙酰半乳糖胺后, 其亲和性进一步提高了约 50 倍.

2.2 触角数量

研究表明, 成簇的糖残基可以通过同时占据受体的结合位点而使其亲和性远高于不成簇的糖残基. 三糖残基(三触角)亲和性比单糖残基高 50~100 倍, 其亲和力的次序为: 四触角 > 三触角 >> 双触角 >> 单触角半乳糖苷^[19]. 四触角多糖相对于三触角多糖而言, 其余 ASGPR 的亲和性无明显提高, 这可能源于三触角多糖与受体的结合已经饱和了. 这种现象被称为“成簇效应”(cluster effect), 该效应在分离出的 ASGPR 受体分子上观察不到^[20], 故该效应的产生应该依赖于细胞膜表面受体结构的立体构象.

2.3 空间距离

Lee 等^[19]的研究发现, 糖残基的分支方式、它们之间的距离对配体与受体的亲和力影响很大, 同样是双触角多糖, 分支距离为 15Å 的五糖与 ASGPR 的亲和力高于距离为 23Å 的五糖以及距离为 25Å 的七糖. 尽管之前也有研究^[21]推测, Gal/GalNAc 残基之间距离 25Å~30Å 有利于配体与受体的结合, 但 Lee 等^[19]的研究证明 Gal/Gal 残基之间的距离为 15Å 时, 与距离为 25Å 相比, 其与受体的亲和性要高出 100 倍. 此外, Biessen 等^[22]的研究中, 一个残基距离为 20Å 的半乳糖苷所展现出的亲和力最强, 亲和力从强到弱顺序为 20Å >> 10Å >> 4Å. 综合而言, 糖残基之间的距离至少为 15Å 时^[18], 有利于糖分子与受体之间的识别与结合.

2.4 颗粒粒径

除糖残基的种类(species)、配价(valency, 即触角数)和空间距离(orientation)外, 配体的粒径也在配体与受体的特异性识别、结合、胞吞过程中扮演了十分重要的角色^[18]. Rensen 及其同事利用糖脂分子制备了不同粒径范围(30~90 nm)的脂质体纳米粒, 结果显示 30 nm 的纳米粒进入血液循环系统后, 可快速、大量富集到肝脏, 但当颗粒粒径大于 70 nm 时(如 90 nm), ASGPR 不再能特异性地识别与介导配体胞吞. Bergen 等^[23]的研究也发现, 50 nm 的半乳糖修饰的聚乙二醇化纳米金颗粒在肝实质细胞富集的量是非实质细胞的 2.5 倍, 而 80、100、150 nm 的半乳糖修饰的聚乙二醇化纳米金颗粒以及无半乳糖修饰金颗粒的在实质细胞与非实质细胞的富集量则基本相当. 此外, 其他一些研究中, 获得良好肝实质细胞靶向效果的纳米颗粒的粒径基本均小于 70 nm, 如粒径为 56.3 nm 混合纳米胶束^[24]、粒径约为 40~70 nm 的静脉给药脂质体^[25]、粒径为 35 nm 的皮下注射的另一种脂质体^[26]等.

总之, 上述研究证明, 三触角的 GalNAc 分子在间距约为 20 Å、粒径小于 70 nm 时拥有极高的与 ASGPR 的亲合性, 这为后续的基于 ASGPR/GalNAc 的应用研究奠定了理论基础.

3 早期 ASGPR 在药物设计与递送中的应用

3.1 利用去唾液酸糖蛋白为配体

1987 年, Wu 等^[27]的早期开拓性工作证明, 连接 ASOR 的聚-L-赖氨酸(ASOR-PL)通过静电作用负载表达氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)的质粒后形成的复合物 ASOR-PL-DNA, 可以被 HepG2 细胞有效胞吞, 并表现出 CAT 酶活性. 随后其在 SD 大鼠体内进行的研究亦观察到类似结果^[28]. 后来 Wu 等^[29]又将 ASOR 应用到反义核酸的给药当中, 证明用 ASOR-PL 负载针对 HBV 的反义核酸, 在表达 HBV 病毒的 HepG2.2.15 细胞上可显著降低 HBsAg 与 HBV DNA 水平.

3.2 利用半乳糖、半乳糖苷、半乳糖胺、半乳糖聚糖为配体

1992 年, Plank 等^[30]设计与合成了四触角半乳糖苷修饰的糖肽(gal)4pL, 该糖肽可以有效介导质粒 DNA 在人肝癌细胞 HepG2、小鼠胚胎肝细胞 BNL CL.2 上的转染与表达. 后来又有研究者将核苷酸类似物 araAMP (adenine arabinoside

monophosphate, 单磷阿糖腺苷)缀合到阿拉伯半乳糖聚糖(polysaccharide arabinogalactan)上(美国专利 5, 554, 386), 或将单一的半乳糖部分与核苷类似物 5-氟尿嘧啶(5-Fu)共价结合(得到药物 OGT719)^[31], 抑或将半乳糖胺修饰聚 N-(2-羟丙基)甲基丙烯酸酰胺(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide, HPMA)聚合物, 再在该聚合物上通过可被溶酶体中组织蛋白酶降解的四肽(Gly-Phe-Leu-Gly)连接上化疗药物阿霉素(doxorubicin)^[32], 都实现了理想的肝实质细胞靶向递送效果. 值得注意的是, Fiume 等^[33]将乳糖胺化的(lactosaminated)血清白蛋白(L-HAS)或乳糖胺化的聚赖氨酸(Lac-poly(Lys))修饰各种药物分子, 包括核苷酸类似物(araAMP)、三唑核苷(ribavirin)、5-氟脱氧尿苷(5-fluoro 2'-deoxyuridine)、阿霉素(doxorubicin)等, 均显著地提高了药物的肝靶向特性、增强了药物的抗病毒或抗肿瘤效果.

3.3 利用 N-乙酰半乳糖胺为配体

早期研究中, Merwin 及其同事^[34]设计合成了三触角 GalNAc 修饰的载体系统 PL-HSA-Suc-YEE (GalNAcAH)₃, 该系统被证明可以在动物体内介导质粒 DNA 快速、大量富集于小鼠肝脏, 并成功表达荧光素酶. 后来又有研究将 GalNAc 应用在反义核苷酸(寡脱氧核苷磷酸甲酯, oligodeoxynucleoside methylphosphonate, Oligo-MP)^[35]、反义肽核酸(antisense peptide nucleic acid, asPNA)^[36]以及糖脂分子^[37]的给药当中, 均得到了较理想的治疗效果.

4 GalNAc 应用于核酸药物递送的最新进展

4.1 GalNAc 应用于 siRNA 递送的研究进展

2010 年, Akinc 等^[25]在研究肝靶向 siRNA (small interfering RNA, 小干扰 RNA)给药脂质体的靶向机制时发现, 传统阳离子型脂质体(比如 98N₁₂-5(I)^[38])在实现 siRNA 的肝靶向递送时不依赖于 ApoE(载脂蛋白 E)和 LDLR(低密度脂蛋白受体), 而可电离的脂质体(如 Dlin-KC2-DMA^[39])则依赖于 ApoE 和 LDLR, 在 ApoE 或 LDLR 基因敲除的小鼠模型中, Dlin-KC2-DMA 组成的脂质体的肝靶向给药效果消失. 更重要的是, 如果将这种可电离脂质体中的一部分聚乙二醇脂质(PEG-lipid)用 GalNAc 修饰之后, 在 ApoE 或 LDLR 基因敲除的小鼠模型中, 其肝靶向的有效性即可得到恢复. 该研究在探索脂质体肝靶向递送 siRNA 内在机制的同时, 也证明 GalNAc 修饰的脂质体可以实现高效的 siRNA 体内递送.

经过多年持续的研发, 美国阿尔尼拉姆医药有限公司 (Alnylam Pharmaceuticals Inc.) 在利用 GalNAc/ASGPR 这种给药机制方面取得了突破性的进展. 从其公开的文献^[40-43]与专利(例如授权号为 US 8106022 B2 的专利)可以看到, 其开发的 GalNAc 缀合的 siRNA 分子, 三个触角之间的距离分别为 15Å、20Å、25Å, 与 ASGPR 的亲合性很高(解离常数(K_d) = 2.7 nmol/L). 他们比较了静脉给药与皮下给药两种给药方式, 发现皮下给药的效果更好. 基于此 GalNAc 缀合给药技术^[44-45](图 1a), Alnylam 公司开发了一系列 siRNA 药物品种(<http://www.alnylam.com/capella/presentations/alnylam-rd-day-2014/>), 包括 ALN-TTRsc(治疗淀粉样病变)(<http://www.alnylam.com/capella/presentations/positive-initial-revusiran-phase-2-data/>)^[46-48]、ALN-AT3(治疗血友病和罕见出血障碍)^[49]、ALN-CC5(治疗补体介导的疾病)^[50]、ALN-AS1(治疗肝脏卟啉症)^[51]、ALN-PCSSc^[48](治疗高胆固醇血症, 先前基于脂质体给药技术开发的治疗高胆固醇血症的药物 ALN-PCS 则已完成临床 I 期研究^[52-53])、ALN-HBV(治疗乙肝)^[48, 54]、ALN-AGT(治疗妊娠期高血压, 包括子痫前期)等其他项目(表 1).

Alnylam 的 GalNAc 缀合技术目前发展到了第二代. 第一代是基于标准模板化学 (standard template chemistry, STC) 的 GalNAc 技术, 第二代是基于增强的稳定化化学 (enhanced stabilization chemistry, ESC) 技术. 从多方面的数据综合分析, 第二代的效力较第一代相比提高了 10 倍以上^[40]. 例如在非人灵长类中, 单剂量给药的 ED_{50} 从第一代的 10 mg/kg 降到第二代的 1 mg/kg; 每周给药一次的多剂量给药的 ED_{50} 则从 2 mg/kg 下降到 0.2 mg/kg. 此外, 一代技术的安全性在二代技术中均得以继承. 目前 Alnylam 公司除了 ALN-TTRsc 项目仍使用一代技术外, 其他后续项目全部过度到了二代技术(表 1)^[40].

除了 Alnylam 制药公司之外, 另一家领先的 siRNA 制药公司, 箭头研究公司 (arrowhead research corporation), 开发了一种称为 Dynamic PolyConjugates™(DPC) 的 siRNA 给药技术. 该技术的核心特征是可以对含有丁基氨基乙烯基醚的聚合物 PBAVE (polymer composed of butyl and amino vinyl ether) 进行可逆修饰. 该聚合物为两亲性分子, 具有感应内涵体 / 溶酶体 pH 而促进逃逸的能力^[55].

PBAVE 可用含聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 的羧基二甲基马来酸酐 (carboxy dimethylmaleic anhydride, CDM)(CDM-PEG) 来修饰, 同时亦可用含 N-乙酰半乳糖胺 (N-acetylgalactosamine, NAG, 亦即 GalNAc) 的 CDM (CDM-NAG) 来修饰, siRNA 则通过二硫键与 PBAVE 键合. 该复合物被胞吞后, 在内涵体 / 溶酶体的酸性环境下, CDM 键断裂, PEG、NGA 解离, PBAVE 分子则带上正电荷, 从而促进复合物从内涵体 / 溶酶体逃逸到胞质中, 最后在胞质内还原环境下, 二硫键断裂, 释放出来 siRNA, 完成 RNAi 干扰过程. 基于该技术, Rozema 等^[56]在 小鼠体内高效抑制了内源基因 ApoB (apolipoprotein B, 载脂蛋白 B) 以及 PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α , 过氧化物增殖物激活核受体 α) 的表达.

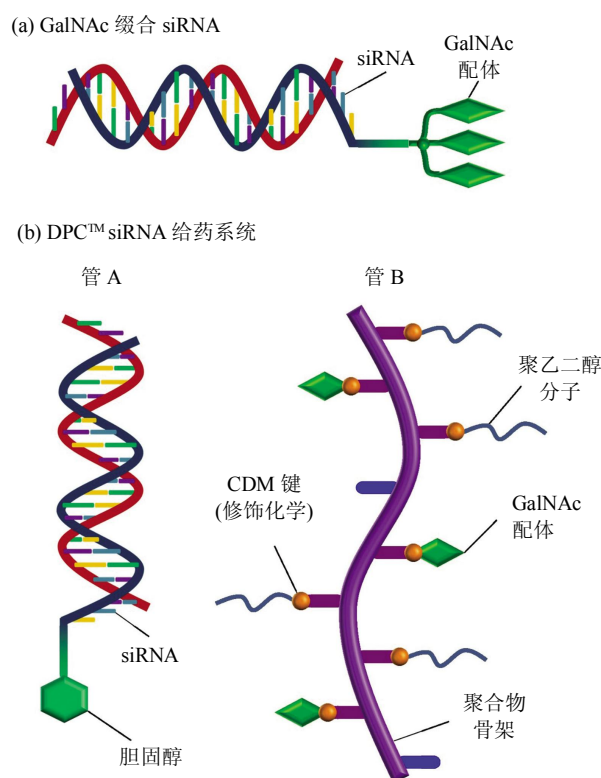


Fig. 1 Representative GalNAc-based siRNA delivery technologies^[40, 57]

图 1 利用 GalNAc 为配体的 siRNA 递送技术^[40, 57]

(a) Alnylam 制药公司开发的三触角 GalNAc 缀合 siRNA 结构示意图^[40]. (b) 箭头研究公司 (Arrowhead Research Corporation) 开发的第二代 Dynamic PolyConjugates (DPC) siRNA 给药技术示意图. 该二代技术中, siRNA 用胆固醇修饰(管 A), 与聚合物无共价连接; 聚合物则延续一代技术中的修饰化学(管 B), siRNA 与聚合物通过共注射的方式给药.

Table 1 Alnylam’s siRNA drug development pipeline and the corresponding delivery technologies
表 1 Alnylam 制药公司部分 siRNA 药物及其给药技术

项目 /Program	适应症 /Indication	研发阶段 /Stage	给药技术 /Delivery Technology*
ALN-TTRsc	甲状腺素运载蛋白介导的淀粉样病变	临床 II 期	STC-GalNAc 缀合技术
	TTR-Mediated Amyloidosis	Phase 2	STC-GalNAc-Conjugates
ALN-AT3	血友病与罕见出血障碍	临床 I 期	ESC-GalNAc 缀合技术
	Hemophilia and Rare Bleeding Disorders	Phase 1	ESC-GalNAc-Conjugates
ALN-CC5	补体介导的疾病	开发	ESC-GalNAc 缀合技术
	Complement-Mediated Diseases	Development	ESC-GalNAc-Conjugates
ALN-AS1	肝脏卟啉症	开发	ESC-GalNAc 缀合技术
	Hepatic Porphyrias	Development	ESC-GalNAc-Conjugates
ALN-PCSsc	高胆固醇血症	开发	ESC-GalNAc 缀合技术
	Hypercholesterolemia	Development	ESC-GalNAc-Conjugates
ALN-AAT	α 1- 抗胰蛋白酶缺乏症	开发	ESC-GalNAc 缀合技术
	Alpha-1 Antitrypsin Deficiency	Development	ESC-GalNAc-Conjugates
ALN-HBV	乙型肝炎	开发	ESC-GalNAc 缀合技术
	Hepatitis B Virus Infection	Development	ESC-GalNAc-Conjugates
ALN-HDV	丁型肝炎	开发	ESC-GalNAc 缀合技术
	Hepatitis D Virus Infection	Development	ESC-GalNAc-Conjugates
ALN-TMP	β - 地中海贫血和铁超负荷疾病	发现	ESC-GalNAc 缀合技术
	Beta-Thalassemia and Iron-Overload Disorders	Discovery	ESC-GalNAc-Conjugates
ALN-ANG	混合型高脂血症和高甘油三酯血症	发现	ESC-GalNAc 缀合技术
	Mixed Hyperlipidemia and Hypertriglyceridemia	Discovery	ESC-GalNAc-Conjugates
ALN-AC3	高甘油三酯血症	发现	ESC-GalNAc 缀合技术
	Hypertriglyceridemia	Discovery	ESC-GalNAc-Conjugates
ALN-AGT	妊娠期高血压	发现	ESC-GalNAc 缀合技术
	Hypertensive Disorders of Pregnancy	Discovery	ESC-GalNAc-Conjugates

来源: <http://www.alnylam.com/capella/presentations/alnylam-rd-day-2014/>

近期, DPC 给药技术也发展到了第二代(DPC 2.0)^[58](图 1b). 二代技术中, siRNA 不用二硫键与 PBAVE 键合, 而是直接将胆固醇修饰的 siRNA (chol-siRNA)与聚合物通过共注射(coinjection)的方式进行给药^[57]. 在 小鼠体内实现同等抑制效果时, 这种共注射的 chol-siRNA 给药剂量比单独施用 chol-siRNA^[59]低 500 倍以上, 在恒河猴(rhesus monkey)体内亦证明, 共注射这种药物能有效抑制靶基因的表达.

更进一步, Wooddell 等^[60]将 DPC 聚合物更换为类蜂毒素多肽(melittin-like peptide, MLP). 该研究中, MLP 与 PBAVE 一样, 先进行 CDM-NAG、CDM-PEG 的修饰, 然后将这种 NAG-MLP 与 chol-siRNA 进行共注射, 同样实现了在小鼠与恒河猴上的高抑制效率, 并在瞬时与转基因两种乙肝病毒(HBV)小鼠模型上, HBV 病毒 RNA、蛋白、病毒

DNA 全部受到显著抑制. 基于该结果, Arrowhead 公司开发了治疗 HBV 的药物 ARC-520^[48, 58, 61], 目前已完成临床 II a 研究, 正在进行多次给药的临床 II b 研究. I 期临床在健康志愿者中完成, 结果证明 ARC520 药物表现出良好的耐受性; II a 期研究结果表明 ARC520 单次给药后可以显著降低病人血清中 HBsAg 水平 (<http://ir.arrowheadresearch.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=881791>). 除 ARC520 外, Arrowhead 公司还开发了治疗 α 1- 抗胰蛋白酶缺乏症的项目 ARC-AAT, 并已递交临床 I 期研究申请 (<http://ir.arrowheadresearch.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=883540>), 目前处于临床前研究阶段. 此外, 该共给药技术也被用于 siRNA 抗体给药系统中, 亦取得不错效果^[62], 预计这种技术将带来更广、更深的应用.

除上述两家制药公司外, Wang 等^[24]用 GalNAc

分子靶向修饰一种可控的混合纳米胶束体系, 结果表明, PEG 的 GalNAc 修饰促进了肝实质细胞对纳米颗粒的识别和摄取, 提高了 siRNA 进入肝实质细胞的能力, 并成功抑制了肝脏 ApoB 基因的表达. 最近, Chen 等^[26]在研究可通过皮下注射进行给药的肝靶向脂质体时亦证明, 在脂质体体系中加入 0.5% 摩尔比的 GalNAc 修饰的聚乙二醇脂质分子 (GalNAc-PEG lipid), 可提高相应脂质体/siRNA 体系的体内活性, 提高 siRNA 对靶基因的抑制效率.

4.2 GalNAc 应用于反义核酸药物递送的研究进展

早期的应用研究中, 研究者已有将 GalNAc 应用于反义核酸的递送研究^[35]. 最近, 反义核酸制药领域领先的 ISIS 制药公司报道了 GalNAc(GN₃)缀合反义核酸的研究进展^[63]. 其研究结果证明, GalNAc 的缀合修饰可以使第二代 gapmer 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASOs)在小鼠肝脏中的效能提高 6~10 倍. 相对于祖代的 2'-O- 甲氧乙基(2'-O-MOE)修饰 ASO, 将 GalNAc 缀合与下一代 S-cEt (S-2'-O-Et-2', 4'-bridged nucleic acid)修饰结合起来, 可以使 ASO 效能提高 60 倍. 在利用 ASO 治疗性地抑制肝脏靶基因的表达方面, 该项研究结果将可以转化到人体试验当中, 这为提高 ASO 的治疗指数、降低治疗成本, 以及支持每月给药一次的临床方案提供了可能.

4.3 GalNAc 应用于 antagomir 递送的研究进展

除了上述 siRNA 与反义核酸外, GalNAc 也被应用于微小 RNA (microRNA, miRNA) 拮抗核酸 (antagomir) 的递送. Regulus Therapeutics 公司, 开发了一种治疗丙肝的核酸药物 RG-101^[64-65], 该药物的核心分子是 miRNA-122 的拮抗核酸, 该拮抗核酸通过 Regulus 公司专利所有的连接技术与三触角 GalNAc 相连, 从而得到 RG-101. RG-101 可以高效地被肝细胞胞吞, 抑制 miRNA-122 的表达, 从而实现良好的抗丙肝治疗效果(miRNA-122 对 HCV 的病毒复制十分重要). 其临床 I 期研究结果证明, 该药物在 2 mg/kg 剂量下单独用药第 29 天即可将病人平均病毒载量的对数值降低 4.1 (<http://ir.regulusrx.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=877462>), 显示出强有力的抗病毒效果.

5 总结与展望

从 20 世纪 70 年代至今近 40 余年里, 科学家们十分细致与深入地研究了 ASGPR 受体与其配体(半乳糖苷、N- 乙酰半乳糖胺等)的亲亲和特性, 确定

了糖分子种类、触角数目、空间距离以及粒径大小等因素对配体与 ASGPR 受体亲和性的影响, 证明三触角的 N- 乙酰半乳糖胺(GalNAc)、糖分子相互距离约为 20Å、粒径小于 70 nm 的缀合分子或纳米颗粒与 ASGPR 拥有十分理想的亲和力.

后来持续的应用性研究证明, 通过糖分子修饰, 尤其是三触角的 N- 乙酰半乳糖胺修饰, 可以十分特异并高效地将目的分子(药物)递送到肝实质细胞(图 2). 这些研究基础均为而今 GalNAc 缀合

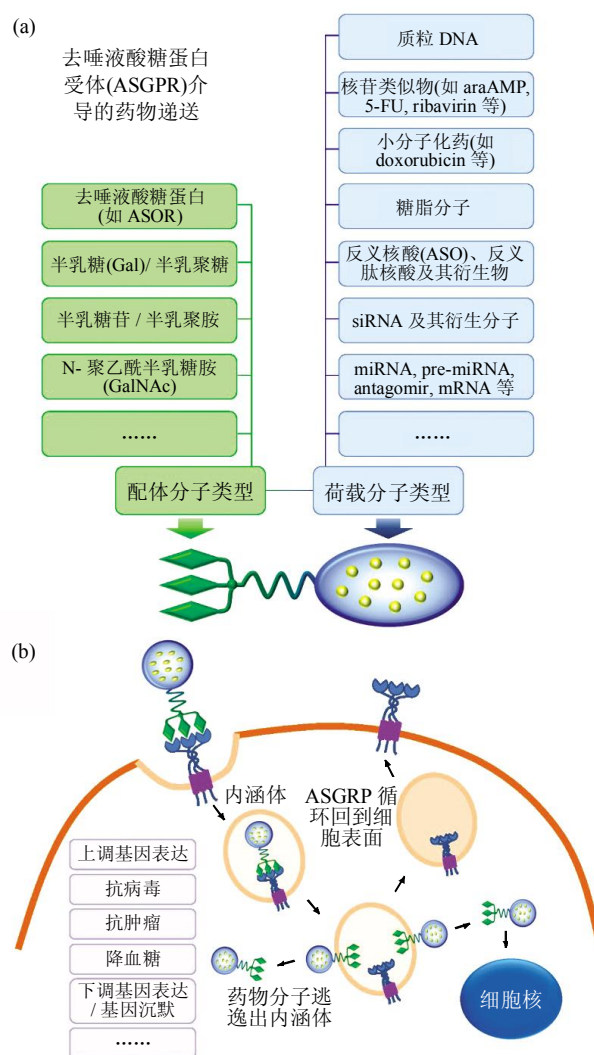


Fig. 2 ASGPR mediated drug delivery

图 2 基于 ASGPR 的药物递送

(a) ASGPR 的配体种类与可行的递送药物分子类型. 其中 miRNA、pre-miRNA、antagomir、mRNA 分别代表微小 RNA (microRNA)、微小 RNA 的前体、微小 RNA 的拮抗物以及信使 RNA, GalNAc 应用于这些分子的递送, 目前文献报道较少, 但理论上可行. (b) ASGPR 介导的特异性药物递送过程. 药物首先通过胞吞作用进入细胞, 之后药物从内涵体中逃逸出到细胞质中或进一步进入细胞核内发挥作用, ASGPR 则再循环到细胞表面、重新介导胞吞. 这些药物分子可以实现各类治疗作用, 包括上调或下调基因表达、抗病毒、抗肿瘤、降血糖等.

技术成功应用于小干扰 RNA、反义核酸、antagomir 的肝靶向递送奠定了基础, 解决了核酸制药领域的最关键技术瓶颈. 目前, 以 Alnylam、Arrowhead、ISIS 等核酸制药公司为代表的企业, 正利用该 GalNAc 缀合(修饰)给药技术, 持续开发了各种治疗肝相关疾病的核酸药物品种, 相信几年之后就将有基于 GalNAc 给药技术的核酸药物上市.

同时, 其他一些药物分子, 如 miRNA、pe-miRNA、mRNA、小分子化药等(图 2), 也将可以利用 GalNAc/ASGPR 来实现高效的肝靶向递送. miRNA 是一类内源性的非编码 RNA, 其大小约 20~25 个核苷酸, miRNA 与 siRNA 一样同属 RNA 干扰家族的一员, 它通过所谓“种子区(seed region)”的碱基互补配对原则识别靶基因的 mRNA, 降解靶 mRNA 或抑制靶 mRNA 的翻译. miRNA 被发现与证明参与了各种各样的调节途径, 包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等. pre-miRNA 则是 miRNA 生成过程中的前体, 长约 70 个碱基.

此外, 基于 mRNA 基因治疗的研究方兴未艾. 2013 年, Chien 等^[66]的研究证明, 在小鼠心肌梗死模型上, 通过心肌细胞注射修饰后的表达血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGF-A)的 mRNA(modRNA), 可以诱使心脏祖细胞扩增以及定向分化, 显著提高了实验小鼠的心脏功能、延长了小鼠的生存期. 该工作首次利用 mRNA 作为一种基因药物来开展细胞命运相关治疗. mRNA 比质粒 DNA 更存在一些优势^[67](传统的基因治疗即是应用质粒 DNA), 主要表现在“高效性”与“安全性”两个方面(这两个方面也便是基因治疗最为关键的两个关注点). a. 在高效性方面, mRNA 不需要穿过核膜去发挥它的生理作用, 这使得 mRNA 进入细胞后, 在时间上可以更迅速地发挥作用, 在强度上可以更高效地表达蛋白质. 质粒 DNA 必须跨越核膜进入细胞核才能表达, 而跨细胞核主要通过细胞分裂过程中核膜解体、再组装而“包裹”进入, 这使得只有不超过 10%的细胞质质粒 DNA 最终进入了细胞核^[68], 从而大大降低蛋白质表达效率, 也延长了发挥效应的时间. b. 在安全性方面, 进入细胞的 mRNA 序列几乎不可能插入到靶细胞基因组中, 而病毒介导的质粒 DNA 序列则存在此潜在风险, mRNA 缺少了 CpG 岛的修饰, 所以相对质粒 DNA, 其细胞免疫反应更小.

基于 miRNA、pre-miRNA、mRNA 等核酸分子的药物开发前景良好, 但无一例外的都会遇到给药技术瓶颈. 虽然目前未见有相关报道, 但 GalNAc/ASGPR 则将为这些药物的开发带来巨大潜力. 同时, 在传统或新兴的小分子化药方面, 从提高药物靶向性与效力、降低药物毒性的角度, GalNAc/ASGPR 同样大有用武之地.

综上所述, ASGPR 是肝细胞特异性表达的内吞型受体, GalNAc 则是其最高效的配体分子. GalNAc 在各类化学、生物药物分子的肝靶向递送方面, 拥有着突出的特异性、高效性、安全性、可规模化制备等优势, 这必将为进一步深入的基础研究与制药应用均带来广阔的前景. 总之, 虽然基于 ASGPR 与 GalNAc 的基础研究已跨越近半个世纪, 但它们正在焕发新的光芒.

参 考 文 献

- [1] Franssen E J, Jansen R W, Vaalburg M, *et al.* Hepatic and intrahepatic targeting of an anti-inflammatory agent with human serum albumin and neoglycoproteins as carrier molecules. *Biochem Pharmacol*, 1993, **45**(6): 1215-1226
- [2] Morell A G, Irvine R A, Sternlieb I, *et al.* Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin *in vivo*. *J Biol Chem*, 1968, **243**(1): 155-159
- [3] Meier M, Bider M D, Malashkevich V N, *et al.* Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor. *J Mol Biol*, 2000, **300**(4): 857-865.
- [4] Tozawa R, Ishibashi S, Osuga J, *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
- [5] Treichel U, Meyer Zum Buschenfelde K H, Dienes H P, *et al.* Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch Virol*, 1997, **142**(3): 493-498
- [6] Becker S, Spiess M, Klenk H D. The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J Gen Virol*, 1995, **76**(Pt 2): 393-399
- [7] Porat N, Apicella M A, Blake M S. *Neisseria gonorrhoeae* utilizes and enhances the biosynthesis of the asialoglycoprotein receptor expressed on the surface of the hepatic HepG2 cell line. *Infect Immun*, 1995, **63**(4): 1498-1506
- [8] Harvey H A, Jennings M P, Campbell C A, *et al.* Receptor-mediated endocytosis of *Neisseria gonorrhoeae* into primary human urethral epithelial cells: the role of the asialoglycoprotein receptor. *Mol Microbiol*, 2001, **42**(3): 659-672
- [9] Hilgard P, Schreiter T, Stockert R J, *et al.* Asialoglycoprotein receptor facilitates hemolysis in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Hepatology*, 2004, **39**(5): 1398-1407
- [10] Schwartz A L, Fridovich S E, Lodish H F. Kinetics of

- internalization and recycling of the asialoglycoprotein receptor in a hepatoma cell line. *J Biol Chem*, 1982, **257**(8): 4230–4237
- [11] Schwartz A L, Rup D, Lodish H F. Difficulties in the quantification of asialoglycoprotein receptors on the rat hepatocyte. *J Biol Chem*, 1980, **255**(19): 9033–9036
- [12] Yoshida S, Furuhashi M, Suganuma N. Expression of asialoglycoprotein receptor in human fetal liver. *Endocr J*, 1999, **46**(1): 67–73
- [13] Tolleshaug H, Berg T, Frolich W, *et al.* Intracellular localization and degradation of asialofetuin in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1979, **585**(1): 71–84
- [14] Schwartz A L, Fridovich S E, Knowles B B, *et al.* Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line. *J Biol Chem*, 1981, **256**(17): 8878–8881
- [15] Bareford L M, Swaan P W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, **59**(8): 748–758
- [16] Lehrman M A, Hill R L. The binding of fucose-containing glycoproteins by hepatic lectins. Purification of a fucose-binding lectin from rat liver. *J Biol Chem*, 1986, **261**(16): 7419–7425
- [17] Iobst S T, Drickamer K. Selective sugar binding to the carbohydrate recognition domains of the rat hepatic and macrophage asialoglycoprotein receptors. *J Biol Chem*, 1996, **271**(12): 6686–6693
- [18] Rensen P C, Slidregt L A, Ferns M, *et al.* Determination of the upper size limit for uptake and processing of ligands by the asialoglycoprotein receptor on hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*, 2001, **276**(40): 37577–37584
- [19] Lee Y C, Townsend R R, Hardy M R, *et al.* Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. Dependence on fine structural features. *J Biol Chem*, 1983, **258**(1): 199–202
- [20] Lee R T, Lin P, Lee Y C. New synthetic cluster ligands for galactose/N-acetylgalactosamine-specific lectin of mammalian liver. *Biochemistry*, 1984, **23**(18): 4255–4261
- [21] Baenziger J U, Maynard Y. Human hepatic lectin. Physicochemical properties and specificity. *J Biol Chem*, 1980, **255**(10): 4607–4613
- [22] Biessen E A, Beuting D M, Roelen H C, *et al.* Synthesis of cluster galactosides with high affinity for the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J Med Chem*, 1995, **38**(9): 1538–1546
- [23] Bergen J M, Von Recum H A, Goodman T T, *et al.* Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery. *Macromol Biosci*, 2006, **6**(7): 506–516
- [24] Wang H X, Xiong M H, Wang Y C, *et al.* N-acetylgalactosamine functionalized mixed micellar nanoparticles for targeted delivery of siRNA to liver. *J Control Release*, 2013, **166**(2): 106–114
- [25] 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
- [26] Chen S, Tam Y Y, Lin P J, *et al.* Development of lipid nanoparticle formulations of siRNA for hepatocyte gene silencing following subcutaneous administration. *J Control Release*, 2014, **196**: 106–112
- [27] Wu G Y, Wu C H. Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem*, 1987, **262**(10): 4429–4432
- [28] Wu G Y, Wu C H. Receptor-mediated gene delivery and expression *in vivo*. *J Biol Chem*, 1988, **263**(29): 14621–14624
- [29] Wu G Y, Wu C H. Specific inhibition of hepatitis B viral gene expression *in vitro* by targeted antisense oligonucleotides. *J Biol Chem*, 1992, **267**(18): 12436–12439
- [30] Plank C, Zatloukal K, Cotten M, *et al.* Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconjug Chem*, 1992, **3**(6): 533–539
- [31] Rohlf C, Watson S A, Morris T M, *et al.* A novel, orally administered nucleoside analogue, OGT 719, inhibits the liver invasive growth of a human colorectal tumor, C170HM2. *Cancer Res*, 1999, **59**(6): 1268–1272
- [32] Seymour L W, Ferry D R, Anderson D, *et al.* Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *J Clin Oncol*, 2002, **20**(6): 1668–1676
- [33] Fiume L, Di Stefano G. Lactosaminated human albumin, a hepatotropic carrier of drugs. *Eur J Pharm Sci*, 2010, **40**(4): 253–262
- [34] Merwin J R, Noell G S, Thomas W L, *et al.* Targeted delivery of DNA using YEE(GalNAcAH)₃, a synthetic glycopeptide ligand for the asialoglycoprotein receptor. *Bioconjug Chem*, 1994, **5**(6): 612–620
- [35] Hangeland J J, Levis J T, Lee Y C, *et al.* Cell-type specific and ligand specific enhancement of cellular uptake of oligodeoxynucleoside methylphosphonates covalently linked with a neoglycopeptide, YEE(ah-GalNAc)₃. *Bioconjug Chem*, 1995, **6**(6): 695–701.
- [36] Biessen E A, Slidregt-Bol K, Pa T H, *et al.* Design of a targeted peptide nucleic acid prodrug to inhibit hepatic human microsomal triglyceride transfer protein expression in hepatocytes. *Bioconjug Chem*, 2002, **13**(2): 295–302
- [37] Rensen P C, Van Leeuwen S H, Slidregt L A, *et al.* Design and synthesis of novel N-acetylgalactosamine-terminated glycolipids for targeting of lipoproteins to the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J Med Chem*, 2004, **47**(23): 5798–5808
- [38] Akinc A, Goldberg M, Qin J, *et al.* Development of lipidoid-siRNA formulations for systemic delivery to the liver. *Mol Ther*, 2009, **17**(5): 872–879
- [39] Semple S C, Akinc A, Chen J, *et al.* Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*, 2010, **28**(2): 172–176
- [40] 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
- [41] Rajeev K G, Nair J K, Jayaraman M, *et al.* Hepatocyte-specific delivery of siRNAs conjugated to novel non-nucleosidic trivalent N-Acetylgalactosamine elicits robust gene silencing *in vivo*. *Chembiochem*, 2015, **16**(6): 903–908

- [42] Abstracts 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, Boston, Massachusetts, USA, October 28-31, 2012 Abstracts. *Nucleic Acid Ther*, 2012, **22**(6): A2-A2
- [43] Matsuda S, Keiser K, Nair J K, *et al.* siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-Acetylgalactosamine linked through nucleosides elicit robust gene silencing *in vivo* in hepatocytes. *ACS Chem Biol*, 2015, **10**(5): 1181-1187 (DOI: 10.1021/cb501028c)
- [44] Kanasty R, Dorkin J R, Vegas A, *et al.* Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat Mater*, 2013, **12**(11): 967-977
- [45] Monia B P. Board of the Oligonucleotide Therapeutics S. 9th annual meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society Naples, Italy October 6-8, 2013. Session summaries. *Nucleic Acid Ther*, 2013, **23**(6): 450-458
- [46] Zimmermann T, Karsten V, Harrop J, *et al.* Phase I first-in-humans trial of ALN-TTRsc, a novel RNA interference therapeutic for the treatment of familial amyloidotic cardiomyopathy (FAC). *Journal of Cardiac Failure*, 2013, **19**(8): S66-S66
- [47] Castano A, Drachman B M, Judge D, *et al.* Natural history and therapy of TTR-cardiac amyloidosis: emerging disease-modifying therapies from organ transplantation to stabilizer and silencer drugs. *Heart Fail Rev*, 2015, **20**(2): 163-178
- [48] Lorenzer C, Dirin M, Winkler A M, *et al.* Going beyond the liver: Progress and challenges of targeted delivery of siRNA therapeutics. *J Control Release*, 2015, **203**: 1-15
- [49] Sehgal A, Barros S, Ivanciu L, *et al.* An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nat Med*, 2015, **21**(5): 492-497 (DOI: 10.1038/nm.3847)
- [50] Borodovsky A, Yucius K, Sprague A, *et al.* Aln-CC5, an investigational RNAi therapeutic targeting C5 for complement inhibition. *Blood*, 2014, **124**(21)
- [51] Yasuda M, Gan L, Chen B, *et al.* RNAi-mediated silencing of hepatic Alas1 effectively prevents and treats the induced acute attacks in acute intermittent porphyria mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(21): 7777-7782
- [52] Fitzgerald K, Frank-Kamenetsky M, Shulga-Morskaya S, *et al.* Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet*, 2014, **383**(9911): 60-68
- [53] Stock J. Improving the care of high-risk patients: the potential of PCSK9. *Atherosclerosis*, 2014, **232**(2): 420-422
- [54] Sepp-Lorenzino L, Abrams M, Carayannopoulos L, *et al.* ALN-HBV, a GalNAc-siRNA enhanced stabilization chemistry RNAi therapeutic for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 2014, **60**(Supplement S1): 1091A-1091A
- [55] Alabi C, Vegas A, Anderson D. Attacking the genome: emerging siRNA nanocarriers from concept to clinic. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, **12**(4): 427-433
- [56] Rozema D B, Lewis D L, Wakefield D H, *et al.* Dynamic PolyConjugates for targeted *in vivo* delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(32): 12982-12987
- [57] Wong S C, Klein J J, Hamilton H L, *et al.* Co-injection of a targeted, reversibly masked endosomolytic polymer dramatically improves the efficacy of cholesterol-conjugated small interfering RNAs *in vivo*. *Nucleic Acid Ther*, 2012, **22**(6): 380-390
- [58] Sebestyen M G, Wong S C, Trubetskoy V, *et al.* Targeted *in vivo* delivery of siRNA and an endosome-releasing agent to hepatocytes. *Methods Mol Biol*, 2015, **1218**: 163-186
- [59] Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 2004, **432**(7014): 173-178
- [60] Wooddell C I, Rozema D B, Hossbach M, *et al.* Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Mol Ther*, 2013, **21**(5): 973-985
- [61] Steinbach O C. Industry update. *Therapeutic Delivery*, 2015, **6**(3): 277-381
- [62] Schneider B, Grote M, John M, *et al.* Targeted siRNA delivery and mRNA knockdown mediated by bispecific digoxigenin-binding antibodies. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2012, **1**: e46
- [63] Prakash T P, Graham M J, Yu J, *et al.* Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(13): 8796-8807
- [64] Baek J, Kang S, Min H. MicroRNA-targeting therapeutics for hepatitis C. *Arch Pharm Res*, 2014, **37**(3): 299-305
- [65] Baumann V, Winkler J. MiRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents. *Future Med Chem*, 2014, **6**(17): 1967-1984
- [66] Zangi L, Lui K O, Von Gise A, *et al.* Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(10): 898-907
- [67] Rejman J, Tavernier G, Bavarsad N, *et al.* mRNA transfection of cervical carcinoma and mesenchymal stem cells mediated by cationic carriers. *J Control Release*, 2010, **147**(3): 385-391
- [68] Tachibana R, Harashima H, Shinohara Y, *et al.* Quantitative studies on the nuclear transport of plasmid DNA and gene expression employing nonviral vectors. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **52**(3): 219-226

Asialoglycoprotein Receptor and Its Application in Liver-targeted Drug Delivery*

HUANG Yuan-Yu**, LIANG Zi-Cai**

(Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) was specifically expressed by hepatocytes, which could recognize and bind asialoglycoprotein, galactose (Gal), galactosamine, N-acetylgalactosamine (GalNAc), etc. with high affinity. In a receptor-mediated-endocytosis (RME) manner, various molecules could be delivered into hepatocytes effectively. In this review, we firstly introduced the discovery, structure, function, expression pattern and endocytosis properties of ASGPR. Then the influence factors of ligand/receptor interaction and RME, including ligand species, valence, orientation and particle size, were analyzed. In addition, studies on ASGPR-mediated drug delivery in the past decades were reviewed. More importantly, progress in GalNAc-conjugation or -modification technologies employed in liver-targeted transportation of siRNA, antisense and antagomir were summarized.

Key words ASGPR, GalNAc, drug delivery, liver-targeting, siRNA, Antisense oligonucleotides

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0028

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81402863) and Postdoctoral Science Foundation of China (2014M550008).

**Corresponding author.

HUANG Yuan-Yu, Tel: 86-10-62750683, E-mail: yyhuang@pku.edu.cn

LIANG Zi-Cai, Tel: 86-10-62769862, E-mail: liangz@pku.edu.cn

Received: January 24, 2015 Accepted: April 24, 2015