

本文引用: 王伟志, 司书毅, 许艳妮. 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 抑制剂的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(8): 645-653. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2022.08.001.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-08-0645-09

· 专家论坛 ·

## 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 抑制剂的研究进展

王伟志, 司书毅, 许艳妮

(中国医学科学院 北京协和医学院医药生物技术研究所 国家新药(微生物)筛选实验室  
卫健委抗生素生物工程重点实验室, 北京市 100050)

[专家简介] 许艳妮, 研究员, 博士研究生导师。2005 年毕业于山东大学药学专业, 理学学士; 2010 年毕业于北京协和医学院, 微生物与生物化学药学专业, 医学博士; 2010 年 9 月在中国医学科学院/北京协和医学院医药生物技术研究所工作; 2016 年 3 月—2017 年 3 月国家公派留学美国罗彻斯特大学(University of Rochester)心血管研究所; 2020 年 9 月聘为研究员。获得国家自然科学基金青年基金、国家自然科学基金面上项目、国家科技重大专项、协和青年教师基金、中央级公益性科研院所基本科研业务费等资助。主要从事动脉粥样硬化性心血管疾病药理学研究, 包括筛选模型、药物靶标、候选药物发现以及结构改造、临床前研究等。发表论文 48 篇, 其中以第一作者或通信作者(含并列)发表论文 30 篇(SCI 论文 20 篇), 发表在 *European Heart Journal*、*ATVB*、*FASEB J*、*European Journal of Medicinal Chemistry*、*Bioorganic Chemistry*、*Journal of Lipid Research*、*Atherosclerosis*、*Journal of the American Heart Association*、*Acta Pharmaceutica Sinica B*、*Eur J Med Chem* 等杂志上。授权国家发明专利 15 项。获得 SLAS 青年科学家旅行奖、2015 年 SLAS 亚洲会议一等奖、中国医学科学院北京协和医学院第三届青年科技人员创新论坛三等奖、《药学报》第七届优秀研究论文奖等。



[关键词] 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 动脉粥样硬化; 低密度脂蛋白受体; 高胆固醇血症

[摘要] 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 是一种主要在肝细胞中表达的分泌型丝氨酸蛋白酶。PCSK9 能够与低密度脂蛋白受体 (LDLR) 结合形成复合物, 并通过溶酶体途径使 LDLR 降解, 从而减少细胞表面 LDLR 的数量, 最终导致血浆低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 水平升高。近年来, PCSK9 抑制剂成为一个治疗高胆固醇血症及动脉粥样硬化性心血管疾病 (ASCVD) 药物研发的新热点。目前全球上市了三款 PCSK9 抑制剂, 包括依洛尤单抗 (Evolocumab)、阿利珠单抗 (Alirocumab) 及小干扰 RNA 药物 Inclisiran (Leqvio®)。本文对 PCSK9 的结构、功能、抑制剂的研究进展进行了综述。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Advances in proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors

WANG Weizhi, SI Shuyi, XU Yanni

(Chinese Academy of Medical Sciences & Institute of Medicinal Biotechnology, Peking Union Medical College & National Center for New Microbial Drug Screening & NHC Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, Beijing 100050, China)

[KEY WORDS] proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; atherosclerosis; low density lipoprotein receptor; hypercholesterolemia

[ABSTRACT] Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is a secretory serine protease, which is mainly expressed in hepatocytes. PCSK9 binds to low density lipoprotein receptor (LDLR) forming PCSK9-LDLR complex, and

[收稿日期] 2021-10-29

[修回日期] 2022-05-20

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2019-RC-HL-009、2021-1-I2M-030); 京津冀基础研究合作专项 (19JCZDJC63900); 国家自然科学基金面上项目 (81973328); 国家重大新药创制专项 (2018ZX09711001-003-006)

[作者简介] 王伟志, 博士研究生, 主要研究方向为心血管疾病治疗药物筛选及机制研究, E-mail: wangweizhi18@126.com。通信作者许艳妮, 研究员, 博士研究生导师, 主要研究方向为新型抗动脉粥样硬化和骨质疏松药物的发现及药理学研究, E-mail: xuyanniwendeng@hotmail.com。通信作者司书毅, 研究员, 博士研究生导师, 主要研究方向为新型抗动脉粥样硬化及抗感染药物的发现及药理学研究, E-mail: sisymb@hotmail.com。

leads to LDLR degradation in lysosomes, which finally results in the reduction of cell membrane LDLR protein level and the elevation of plasma low density lipoprotein cholesterol (LDLC) level. PCSK9 inhibitors have become a hot spot in the research of hypercholesterolemia and atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) drugs discovery. There are three globally marketed PCSK9 inhibitors including evolocumab, alirocumab and PCSK9 siRNA drug inclisiran (Leqvio®). This article reviewed the structure, functions and inhibitors of PCSK9.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是心肌梗死等心血管疾病发生的主要原因<sup>[1-2]</sup>。血浆中的胆固醇,尤其是低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDLC),是动脉粥样硬化斑块发生发展的重要驱动因素。降低血浆LDLC水平可以有效减缓动脉粥样硬化斑块的进展<sup>[3]</sup>。他汀类药物通过抑制胆固醇生成中的限速酶羟甲基戊二酰辅酶A还原酶(hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase,HMG-CoA)来降低血液中LDLC,但仍有部分患者使用大剂量的他汀仍无法将LDLC降低至目标水平。

前蛋白转化酶枯草溶菌素9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9,PCSK9)是继低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor,LDLR)和载脂蛋白B(apolipoprotein B,ApoB)后与常染色体显性遗传性高胆固醇血症(autosomal dominant hypercholesterolemia,ADH)相关的第三大基因<sup>[4]</sup>。PCSK9能够促进LDLR降解,升高血浆中LDLC水平。PCSK9抑制剂作为一种新的降脂药物,可以与他汀类等调脂药协同降低血液中LDLC水平。经过十几年的发展,国内外已批准上市了安进公司的依洛尤单抗<sup>[5]</sup>和赛诺菲与再生元公司的阿利珠单抗<sup>[6]</sup>两款PCSK9单抗药物以及PCSK9小干扰RNA(small interfering RNA,siRNA)药物inclisiran(Leqvio®)<sup>[7]</sup>。

## 1 PCSK9 的结构与功能

PCSK9是枯草杆菌蛋白酶转化酶家族的第9个成员,是一种丝氨酸蛋白酶。人PCSK9位于常染色体1p32.3,长度为3 617 bp,含有12个外显子和11个内含子,编码692个氨基酸<sup>[8-9]</sup>。PCSK9主要在肝脏表达,在神经系统、肠道、肾脏、胰腺等也有表达<sup>[8-10]</sup>。

PCSK9合成之初是以约74 kDa的可溶性、非活性的酶原(proPCSK9)形式存在,由N端的信号肽序列(signal peptide,SP)(1~30位氨基酸)、前结构域(prodomain)(31~152位氨基酸)、催化结构域(catalytic domain)(153~449位氨基酸)以及富含半胱氨酸和组氨酸的C端结构域(C-terminal domain)(453~692位氨基酸)组成<sup>[11-12]</sup>。PCSK9翻译完成后需要进入内质网、高尔基体进行进一步加工。在内质网中,proPCSK9的SP被切除,前结构域通过自催化裂解反应被切割,释放N末端前结构域。PCSK9催化裂解后的前结构域以非共价键与催化结构域相连,避免PCSK9与其他底物发生相互作用(图1)。成熟的PCSK9(mature PCSK9)以无活性的二聚体形式从内质网分泌,然后进入到高尔基体中进行进一步翻译后修饰<sup>[12]</sup>。

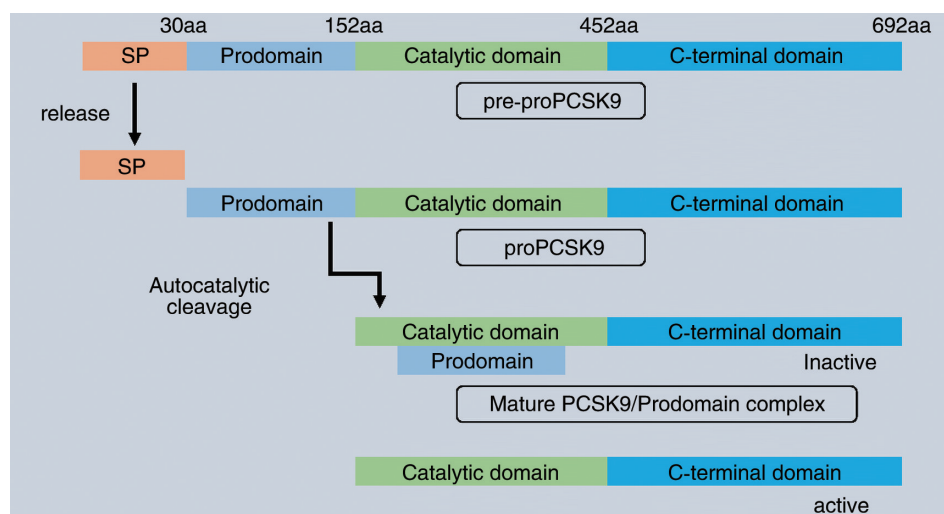


图1. PCSK9 蛋白一级结构及成熟过程

Figure 1. Primary structure and maturation process of PCSK9

PCSK9 分泌到细胞外后,与肝细胞膜表面 LDLR 的表皮生长因子前体同源结构域 A(epidermal growth factor precursor homologous domain-A,EGF-A)结合,使 LDLR 通过溶酶体途径降解,血浆 LDLC 清除降低,最终导致机体发生高胆固醇血症、动脉粥样硬化及其他心脑血管疾病的风险升高。PCSK9 基因功能获得性突变(gain of function mutation, GOF)是造成 ADH 的三大基因突变之一,而 PCSK9 的功能缺失型突变(lose of function mutation, LOF)者血浆 LDLC 水平大幅下降,PCSK9 无义突变者的 LDLC 水平比普通人群低 28%<sup>[12]</sup>。小鼠全身和肝细胞特异性敲除 PCSK9 基因可以使血浆胆固醇水平分别降低 43% 和 27%,而 LDLR 单敲除和 LDLR/PCSK9 双敲除小鼠血浆胆固醇水平保持一致,这说明 PCSK9 专一性地通过 LDLR 调节体内胆固醇稳态<sup>[13]</sup>。此外,也有研究发现 PCSK9 在血管炎症、病毒感染、CD8+T 细胞的抗肿瘤活性等方面发挥调节作用<sup>[14]</sup>。

## 2 PCSK9 的调节

PCSK9 的表达受转录调控。胆固醇调节元件结合蛋白 2(sterol-regulatory element binding protein 2, SREBP2)、肝细胞核因子 1 $\alpha$ (hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$ , HNF-1 $\alpha$ )<sup>[15]</sup>、碳水化合物反应元件结合蛋白(carbohydrate-responsive element-binding protein, ChREBP)<sup>[16]</sup>、调控细胞周期的转录因子 E2F1(E2F transcription factor 1)<sup>[17]</sup>等可以结合到 PCSK9 的启动子区,增加 PCSK9 的转录水平。叉头转录因子(forkhead transcription factor O3, FoxO3)可以募集去乙酰化酶 Sirt6(sirtuin 6)至 PCSK9 的近端启动子区域,使 H3 组蛋白的第 9 位和第 56 位的赖氨酸去乙酰化,从而抑制 PCSK9 基因转录<sup>[18]</sup>。miR-224-5p 靶向结合 PCSK9 mRNA 3' UTR,抑制 PCSK9 表达<sup>[19]</sup>。此外,重组人促甲状腺激素<sup>[20]</sup>、雌激素<sup>[21]</sup>、胰岛素<sup>[22]</sup>也可以在转录水平调节 PCSK9。

PCSK9 的表达受转录后调控。PCSK9 前结构域 47 位的丝氨酸磷酸化能保护前结构域不被水解,使其能够从内质网中分泌<sup>[23]</sup>。内质网中新生的膜相关可溶性分泌蛋白向高尔基体的转运具有高度选择性<sup>[24]</sup>。包裹蛋白 II(coat protein complex II, COP II)是新生蛋白向高尔基体转运所必需的一种

载体蛋白,Sec24 是 COP II 的一个重要亚基,Sec24 通过与新生蛋白相互作用将其整合到囊泡中<sup>[25]</sup>。在 Sec24 缺陷的小鼠肝脏中,PCSK9 从内质网中退出特异性受阻,致血浆 PCSK9 水平降低<sup>[26]</sup>。超位点蛋白 4(surfeit locus protein 4, Surf4)是一种可以将 PCSK9 募集到 COP II 的一种内质网转运受体,促进 PCSK9 从内质网中分泌<sup>[27]</sup>;最近也有学者提出 Surf4 能够调节 PCSK9 的表达,不是 PCSK9 分泌所必需<sup>[28]</sup>。内质网驻留蛋白 94(endoplasmic reticulum resident protein 94, GRP94)可以与内质网中的 PCSK9 结合,避免了内质网中 LDLR 在加工早期与 PCSK9 结合,肝脏特异性敲除 GRP94 小鼠 LDLR 降低约 80%,表现出更高的血浆 LDLC 水平<sup>[29]</sup>。碱性氨基酸转化酶 Furin 能够特异性地在 RFHR218↓QA 序列 218 位氨基酸处切割成熟的 PCSK9 使其失活<sup>[30]</sup>;在肝细胞敲除 Furin 的小鼠中,55 kDa 失活形式的 PCSK9 明显减少<sup>[31]</sup>。激活长寿基因 Sirt1(sirtuin 1)<sup>[32]</sup>、抑制动力相关蛋白 1(dynamin-related protein 1, DRP1)<sup>[33]</sup>可以减少小鼠肝脏中 PCSK9 的分泌。胰高血糖素以 Epac2 和 Rap1 作为下游介质,在不影响 mRNA 水平的前提下增强了成熟 PCSK9 在溶酶体中的降解<sup>[34]</sup>。

## 3 PCSK9 抑制剂

鉴于 PCSK9 在调节 LDLR 功能及 LDLC 代谢中的重要作用,PCSK9 已成为高胆固醇血症、动脉粥样硬化等相关心血管疾病药物开发的新靶标。

目前已经研发了包括单克隆抗体(依洛尤单抗等)、小分子肽及肽拟似物(Pep2-8、SRX55、LIB003 等)、小分子化合物(CVI-LM001、CB\_36 等)、反义寡核苷酸和干扰核糖核酸(Leqvio®、AZD8233、CiVi-007 等)、CRISPR、疫苗、Fab 片段等多种 PCSK9 抑制剂。这些 PCSK9 抑制剂的作用方式大致可归纳为三种:(1)通过与 PCSK9 结合阻断其与 LDLR 之间的相互作用(如依洛尤单抗、Pep2-8、CB\_36 等);(2)干扰 PCSK9 的成熟和分泌过程或影响 PCSK9 的结构和功能,使得分泌到膜外的成熟 PCSK9 的数量减少或造成 PCSK9 功能缺陷(如 C8 等);(3)抑制 PCSK9 基因的转录和(或)翻译过程,使 PCSK9 蛋白产生减少(如小檗碱衍生物、CVI-LM001、Leqvio®、疫苗、CRISPR 技术等),见图 2 和表 1。

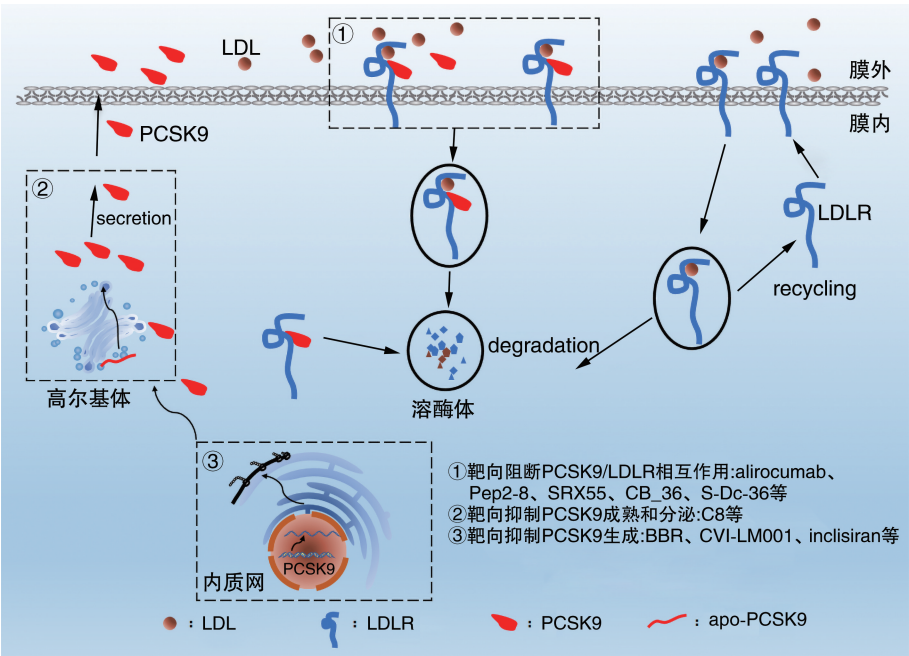


图 2. PCSK9 抑制剂的研发策略

Figure 2. Research and development strategy of PCSK9 inhibitors

表 1. 靶向 PCSK9 药物研发汇总

Table 1. Summary of developed drugs targeting PCSK9

作用方式	药物类型	药品	研发阶段	研发公司/机构
阻断 PCSK9 与 LDLR 相互作用	单克隆抗体	依洛尤单抗	已上市	Amgen
		阿利珠单抗	已上市	Sanofi
		伯考赛珠单抗	已终止	Pfizer
		IBI306	Ⅲ期临床	信达生物
		JS002	Ⅲ期临床	君实生物
		Ebronicumab	Ⅱ期临床	康方生物/东瑞制药
		SHR-1209	Ⅱ期临床	恒瑞
		B1655	Ⅰ期临床	天士力
		SAL003	Ⅰ期临床	信立泰
		LY3015014	Ⅱ期临床	Eli Lilly
	重组融合蛋白	LIB003	Ⅲ期临床	Postgraduate
		MEDI4166	Ⅱ期临床	Astrazeneca
	小分子肽类	Pep2-8	临床前	Genentech
抑制 PCSK9 转录、翻译	siRNA	Inclisiran	Ⅲ期临床	Novartis
		ALN-PCS	Ⅰ期临床	Alnylam
	寡核苷酸	CiVi-007	Ⅱ期临床	CiVi
		AZD8233	Ⅱ期临床	Ionis/Astrazeneca
		BMS-844421	已终止	BMS
	CRISPR 技术	SPC5001	已终止	Roche
		CRISPR	临床前	Astrazeneca
		AT04A	Ⅰ期临床	Affiris
	疫苗	PF-06446846	已终止	Pfizer
		CVI-LM001	Ⅱ期临床	西威埃
		SAL092	Ⅰ期临床	信立泰
	小分子药物	DC-371739	Ⅰ期临床	中科院上海药物所



### 3.1 单抗类药物

目前已经有两款 PCSK9 抑制剂在临床使用,分别是依洛尤单抗和阿利珠单抗,均为人源化的单抗药物,通过特异性与 PCSK9 结合来阻断其与 LDLR 之间的相互作用,增加肝细胞膜表面的 LDLR 数量<sup>[35-36]</sup>。依洛尤单抗和阿利珠单抗治疗家族性高胆固醇血症的疗效和安全性的系统回顾以及 Meta 分析结果显示,依洛尤单抗和阿利珠单抗每隔 2~4 周皮下注射一次可显著降低总胆固醇 (total cholesterol, TC)、LDLC、ApoB、脂蛋白(a)及 TG 水平,同时升高高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 和载脂蛋白 A1 水平<sup>[37]</sup>,与他汀类药物联用时可在其基础上进一步降低血浆 LDLC 水平<sup>[38]</sup>。以依洛尤单抗为例,其对 PCSK9 的作用迅速,4 h 内具有最大的抑制作用,在体内的有效半衰期为 11~17 天<sup>[35]</sup>。在随机安慰剂对照的临床研究中,在接受单药治疗<sup>[39-40]</sup>或联合他汀<sup>[41]</sup>治疗的杂合型家族性高胆固醇血症 (heterozygous familial hypercholesterolemia, HeFH) 患者<sup>[42]</sup>、原发性高脂血症和混合性血脂异常的患者中,与应用安慰剂相比,每两周 140 mg 或每月 420 mg 依洛尤单抗治疗,持续 12 周,LDLC 降低 55%~75%。此外,对依洛尤单抗降低心血管事件(死亡、心肌梗死、脑血管事件、不稳定型心绞痛和需要住院治疗的心力衰竭)的 OSLER 研究表明,依洛尤单抗治疗组和普通治疗组心血管事件的发生率分别为 0.95% 和 2.18%<sup>[6]</sup>。ODYSSEY 研究结果显示,阿利珠单抗明显降低心血管事件发生<sup>[43]</sup>。伯考赛珠单抗 (Bococizumab) 是另一种人源化的抗 PCSK9 单克隆抗体。在 SPIRE 心血管结果试验中,接受伯考赛珠单抗的受试者中有 48% 产生了抗药物抗体,有 29% 产生了中和抗体,由于抗药抗体的产生限制了长期疗效,其临床试验<sup>[44]</sup>停止。此外,包括信达生物的 IB1306、君实生物的 JS002 等多个单抗类药物处于临床研发中。

### 3.2 小分子肽及肽拟似物

Pep2-8<sup>[45]</sup> 是 Genentech 公司研发的一款由 13 个氨基酸组成的一类线性小分子肽类药物,目前正处于临床前研发阶段。Pep2-8 能够模拟 PCSK9 的 EGF-A 结构域的  $\beta$  折叠和不连续的  $\alpha$  螺旋,在很大程度上覆盖在 PCSK9 与 EGF-A 结构域结合的位置。在 Pep2-8 的基础上, Lammi 等<sup>[46]</sup> 通过计算机虚拟筛选的方法,发现了两种 Pep2-8 类似物作为 PCSK9/LDLR 相互作用的潜在抑制剂,其能增加 HepG2 细胞膜上的 LDLR 蛋白水平和摄取细胞外低

密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 的能力。2014 年, SRX Cardio LLC 公司在 WO 2014/127316 A2 专利<sup>[47]</sup> 中设计了一组含有 3~8 个氨基酸的寡肽,该系列寡肽可以与 PCSK9 结合,使其构象发生变化,从而影响 PCSK9 与 LDLR 之间的相互作用; SRX55 是其中最为有效的多肽,其加入了磷酸基等负电基团来增加负电性,具有更好的成药潜力<sup>[48]</sup>。口服默克公司合成的 44 号环肽,在大鼠和食蟹猴中均展现出良好的降低 LDLC 的有效性,且在食蟹猴中的效果与单抗类药物降低 LDLC 效果相当<sup>[49]</sup>。

肽拟似物是一类将生物活性肽经过结构修饰而获得的类肽、拟肽或非肽类化合物。肽拟似物不具有肽的性质,但仍然能够模拟肽分子与受体或酶的作用来激活或阻止某种生物功能。目前 PCSK9 肽拟似物主要包括 Adnectin (BMS-962476、LIB003)、Anti-calnexin (DS-9001a) 以及融合蛋白 MEDI4166, BMS-962476 和 DS-9001a 目前已终止开发。BMS-962476 衍生自人纤连蛋白第 10 型 III 结构域,经过工程改造后以约 11 kDa 的多肽与聚乙二醇连接改善其药代动力学性质,能够在亚纳摩尔级与人 PCSK9 高亲和力结合;在过表达人 PCSK9 的转基因高胆固醇血症小鼠中, BMS-962476 降低游离人 PCSK9 的半数有效剂量为 0.01 mg/kg;在食蟹猴中, BMS-962476 也可迅速抑制游离 PCSK9,使 LDLC 降低约 55%<sup>[50]</sup>。LIB003 是能够将 PCSK9 结合的 Adnectin 与人血清白蛋白结合形成的融合蛋白;在 II 期临床试验中,患者每 4 周应用 300 mg LIB003 可使 LDLC 降低约 77%<sup>[51]</sup>;目前,比较 4 周应用 300 mg LIB003 与每周应用 420 mg 依洛尤单抗的 III 期临床试验正在进行当中。

### 3.3 PCSK9 小分子抑制剂

目前发现一些阻断 PCSK9 与 LDLR 相互作用的小分子抑制剂,如 CB\_36、WO 2017/034990 A1<sup>[52]</sup>、尼洛替尼衍生物<sup>[53]</sup>等。Min 等<sup>[54]</sup> 通过计算机虚拟筛选发现了一系列能够抑制 PCSK9 与 LDLR 相互作用的化合物,野生型 C57 小鼠经尾静脉连续两天注射 1 mg/kg CB\_36 能使 TC 水平降低 18%,而对 PCSK9<sup>-/-</sup> C57 小鼠无效,说明 CB\_36 以 PCSK9 依赖的方式发挥降低 TC 的作用。Xin 等<sup>[55]</sup> 开发出了一种探索关键取向 (exploring key orientation, EKO) 的数据挖掘算法来发现可以在 PCSK9/LDLR 相互作用界面产生干扰的化合物,成功发现 7 种经 SPR 和 ELISA 证明能够与 PCSK9 结合的化合物,其中 3 个苗头化合物 LDL1-1dlnr、DLDD-1nclnk、LDLL-1dl (CN) r

与 PCSK9 结合的解离常数在  $20 \sim 40 \mu\text{mol/L}$  [56-57]。PCSK9 在血浆中的浓度约为  $6 \text{ nmol/L}$ , 但与 LDLR 发生作用时, 浓度需达到  $170 \sim 628 \text{ nmol/L}$  [58]。Gustafsen 等从 PCSK9 与 LDLR 发生相互作用所需要的蛋白浓度出发, 提出了一种间接抑制 PCSK9 的方法。Gustafsen 等 [59] 发现硫酸肝素蛋白多糖在肝脏中作为 PCSK9 受体, 使其发生聚集, 增加局部 PCSK9 浓度, 使 PCSK9/LDLR 复合体得以形成。已经发现硫酸葡聚糖、硫酸戊聚糖、苏拉明和硫代磷酸酯寡核苷酸 S-dC-36 等几种模拟肝素结构的小分子在 HepG2 细胞水平中能够抑制 PCSK9 功能、增加肝细胞膜表面 LDLR 水平 [60]。

目前还发现了一些干扰 PCSK9 的转录和翻译过程的小分子化合物, 如 CVI-LM001、小檗碱 (berberine, BBR) [61]、姜黄素 (Curcumin) [62]、西红花酸 (Crocetin) [63] 等。西威埃医药公司的 CVI-LM001 是目前处于临床开发阶段的 PCSK9 小分子抑制剂。根据 NIH 临床试验网站显示, 西威埃医药公司已成功完成 CVI-LM001 在健康受试者中的单剂量递增、食物影响、多剂量递增给药耐受性及药代动力学的 I 期临床研究, 以及在高血脂人群中的药效机制探索性研究。研究结果表明, CVI-LM001 具有优异的安全性、耐受性和良好的药代动力学特征, 并获得了在健康受试者和高血脂人群中降低血液中 PCSK9 蛋白水平的关键数据。在高血脂受试者中开展的 I b 期药效探索研究显示, 与安慰剂组相比, 高血脂受试者口服 CVI-LM001 显著降低血浆 LDLC 水平。目前正在进行 12 周的随机双盲 II 期临床试验, 每日给予 CVI-LM001 ( $100 \text{ mg}$ ,  $200 \text{ mg}$ ,  $300 \text{ mg}$ ) 或安慰剂, 来确定 CVI-LM001 是否在 LDLC 升高患者中的安全性和有效性。小檗碱是从黄连、黄芩、黄柏等中分离得到的异喹啉类生物碱 [64], 其调脂作用多有报道, 临床研究中也验证了它的降血脂效果 [65-66]。小檗碱通过抑制 SREBP-2 和 HNF-1 $\alpha$  减少 PCSK9 表达 [67], 增加肝细胞膜表面 LDLR 数量。中国科学院上海药物研究所蒋良华研究员课题组通过计算机辅助药物设计发现, PCSK9 可能是小檗碱的作用靶标, 进一步进行结构改造和成药性优化, 最终发现小分子候选药物 DC371739 并成功推向临床试验 [68]。姜黄素是从姜黄根茎中提取出的天然产物, 其对脂代谢的影响也在多个临床研究中得到证实 [69-70]。在肝硬化大鼠中, 姜黄素通过抑制 HNF-1 $\alpha$  [71], 从而减少 PCSK9 表达, 达到提高 LDLR 水平的作用。

干扰 PCSK9 的成熟和分泌过程, 也可以减少血

浆中 PCSK9 数量、保护肝细胞膜表面 LDLR 蛋白。Chorba 等 [72] 构建了一种高通量荧光素酶法, 在过表达 PCSK9 的 HEK293T 细胞内筛选能够抑制 PCSK9 自催化裂解功能的小分子化合物。2018 年, 默克公司发现一系列能与 PCSK9 结合的四氢异喹啉类化合物 [73], 但其结合部位并非是在 PCSK9 与 LDLR 相互作用的接触面上, 而是结合到 PCSK9 C 末端结构域和催化域之间的一个口袋, 使 PCSK9 稳定在一种非活性的构象来抑制与 LDLR 的结合、提高肝细胞膜表面 LDLR 数量。

### 3.4 反义寡核苷酸和干扰核糖核酸

反义寡核苷酸是直接作用于细胞核中发挥作用的单链 RNA, 在 PCSK9 转录表达方面的抑制作用更为直接, 已有多家公司开展了该类抑制剂的开发。BMS 公司在 2010 年 4 月开始 BMS-844421 的 I 期临床试验, 7 月因与 PCSK9 的亲合力较低而被终止。NIH 临床试验网站显示, 罗氏在 2011 年 5 月开始 SPC5001 的 I 期临床试验, 11 月由于肾毒性而终止临床试验。Gennemark 等 [74] 研发了一种通过 N-乙酰半乳糖苷耦联、可用于口服的反义寡核苷酸 AZD8233, 增大了反义寡核苷酸的肝脏靶向性。在狗、大鼠、食蟹猴中, 口服 AZD8233 均可以降低血浆 PCSK9 和 LDLC 水平, 目前处于 II 期临床研究阶段。CiVi-007 是另一个处于临床试验中的反义寡核苷酸类 PCSK9 抑制剂, 在 2018 年 2 月开始 I 期临床试验, 共入组 68 名志愿者, 目前已经完成试验; 2019 年 11 月在美国开始 II a 期临床试验, 该阶段主要任务是在常规他汀类药物治疗条件下, 考察 CiVi-007 合并给药在患者中的安全性、耐受性、药效动力学和药代动力学性质, 目前已经完成。此外, 根据 CiVi Biopharma 官网显示, 正在进行 PCSK9 长效口服抑制剂 CiVi-008 的临床前研发工作。

PCSK9 的 siRNA 药物包括 Leqvio<sup>®</sup> 和 ALN-PCS 等。它们通过靶向 PCSK9 的 mRNA, 抑制其翻译过程, 减少肝脏合成 PCSK9 蛋白数量。Medicines 公司率先开发的 siRNA 类 PCSK9 抑制剂 Inclisiran (Leqvio<sup>®</sup>), 2019 年末诺华收购 Medicines 公司后即向 FDA 递交了 Leqvio<sup>®</sup> 的上市申请, 2020 年 12 月欧洲人用药品管理局委员会 (CHMP) 授予 Leqvio<sup>®</sup> 的销售许可, 美国 FDA 于 2021 年 12 月批准了 Leqvio<sup>®</sup> 的上市申请。在最近发布的两项 III 期临床试验 (ORION-10、ORION-11) 中, 分别招募了 1 561 名接受最大剂量他汀治疗 LDLC 水平偏高患者 (ORION-10) 和 1 617 名患有 ASCVD 或 ASCVD 同等风险的患者; 将患者按 1:1 分别随机分组, 于第 1 天、90 天和之后每

6 个月经皮下注射 Leqvio® (284 mg) 或安慰剂, 持续至第 540 天; 在 ORION-10 试验中, Leqvio® 治疗组 LDLC 水平降低了 52.3%; 在 ORION-11 试验中, Leqvio® 治疗组 LDLC 降低了 49.9%。作为一种 siRNA 药物, Leqvio® 在第 1、3 个月注射后, 仅需每年皮下注射两次。此外, Leqvio® 治疗会引起包括轻度至中度注射部位反应(包括疼痛、发红和皮疹)、腿部或手臂疼痛、尿路感染、关节痛、腹泻、胸部发冷以及呼吸急促<sup>[75-76]</sup>等不良反应。

#### 4 结论与展望

在中国和欧美国家, 高胆固醇血症与动脉粥样硬化导致的心血管疾病发病率、死亡率始终居高不下, 并且呈现逐年增长态势, 位于所有疾病致死因素之首。PCSK9 作为新降脂药物等靶标的发现, 促进了心血管新产品 PCSK9 单克隆抗体及 siRNA 药物的成功开发, 也证明了抑制 PCSK9 是开发高胆固醇血症与动脉粥样硬化所致心血管疾病药物的新策略。

口服药物历史悠久, 生产技术成熟, 生产成本也更加低廉。目前口服 PCSK9 抑制剂产品领域也已经出现了包括阿斯利康的 AZD8233 在内的多个药物进入临床试验。总之, 随着人们对 PCSK9 结构和功能的认识的不断积累, 以及现代制药及生物工程等技术的迅猛发展, 还将会成功开发出更多 PCSK9 抑制剂用于动脉粥样硬化等心血管疾病的治疗。

#### [参考文献]

- [1] LIBBY P, BURING J E, BADIMON L, et al. Atherosclerosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 56.
- [2] 中国医师协会中西医结合分会心血管专业委员会, 中华中医药学会心血管病分会. 动脉粥样硬化中西医结合防治专家共识(2021年)[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 42(3): 287-293.
- CARDIOVASCULAR PROFESSIONAL COMMITTEE OF INTEGRATED TRADITIONAL CHINESE AND WESTERN MEDICINE BRANCH OF CHINESE MEDICAL ASSOCIATION, CARDIOVASCULAR BRANCH OF CHINESE SOCIETY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE. Consensus of experts on prevention and treatment of atherosclerosis with traditional Chinese and western medicine (2021)[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2021, 42(3): 287-293.
- [3] AHMADI A, ARGULIAN E, LEIPSIC J, et al. From subclinical atherosclerosis to plaque progression and acute coronary events: JACC state-of-the-art review[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 74(12): 1608-1617.
- [4] ABIFADEL M, VARRET M, RABÈS J P, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia[J]. Nat Genet, 2003, 34(2): 154-156.
- [5] SABATINE M S, GIUGLIANO R P, KEECH A C, et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease[J]. N Engl J Med, 2017, 376(18): 1713-1722.
- [6] ROBINSON J G, FARNIER M, KREMPF M A, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events[J]. N Engl J Med, 2015, 372(16): 1489-1499.
- [7] OLYRY D A, GIMENO B V, SIERRA S F, et al. Cost-effectiveness and budget impact of treatment with evolocumab versus statins and ezetimibe for hypercholesterolemia in Spain[J]. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2018, 71(12): 1027-1035.
- [8] SEIDAH N G, BENJANNET S, WICKHAM L, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(3): 928-933.
- [9] SEIDAH N G, PRAT A. Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu[J]. Essays Biochem, 2002, 38: 79-94.
- [10] NAURECKIENE S, MA L, SREEKUMAR K, et al. Functional characterization of NARC-1, a novel proteinase related to proteinase K[J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 420(1): 55-67.
- [11] BENJANNET S, RHAINDS D, ESSALMANI R, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol[J]. J Biol Chem, 2004, 279(47): 48865-48875.
- [12] STRUCTURE L X. Function of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in hyperlipidemia and atherosclerosis[J]. Curr Drug Targets, 2019, 20(10): 1029-1040.
- [13] ZAID A, ROUBTSOVA A, ESSALMANI R, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration[J]. Hepatology, 2008, 48(2): 646-654.
- [14] SEIDAH N G, PRAT A. The multifaceted biology of PCSK9[J]. Endocr Rev, 2022, 43(3): 558-582.
- [15] LI H, DONG B, PARK S W, et al. Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine[J]. J Biol Chem, 2009, 284(42): 28885-28895.
- [16] HU D, GUO Y, WU R, et al. New insight into metformin-induced cholesterol-lowering effect crosstalk between glucose and cholesterol homeostasis via ChREBP (carbohydrate-responsive element-binding protein)-mediated PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) regulation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(4): e208-e223.
- [17] LAI Q, GIRALT A, LE MAY C, et al. E2F1 inhibits circulating cholesterol clearance by regulating PCSK9 expression in the liver[J]. JCI Insight, 2017, 2(10): 89729.
- [18] TAO R, XIONG X, DEPINHO R A, et al. FoxO3 transcription factor and Sirt6 deacetylase regulate low density lipoprotein (LDL)-cholesterol homeostasis via control of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gene expression[J]. J Biol Chem, 2013, 288(41): 29252-29259.
- [19] 何倩, 高亚, 唐惠芳. MiR-224-5p 靶向沉默前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 影响 HepG2 细胞脂质摄取与蓄积[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(5): 401-409.



- HE Q, GAO Y, TANG H. MiR-224-5p affects lipid uptake and accumulation in HepG2 cells by targeting silence of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 [J]. *Chin J Arterioscler*, 2019, 27 (5): 401-409.
- [20] GONG Y, MA Y, YE Z, et al. Thyroid stimulating hormone exhibits the impact on LDLR/LDL-c via up-regulating hepatic PCSK9 expression[J]. *Metabolism*, 2017, 76: 32-41.
- [21] PETERSEN K S, BOWEN K J, TINDALL A M, et al. The Effect of inflammation and insulin resistance on lipid and lipoprotein responsiveness to dietary intervention[J]. *Curr Dev Nutr*, 2020, 4 (11): nzaa160.
- [22] GHOSH M, GÄLMAN C, RUDLING M, et al. Influence of physiological changes in endogenous estrogen on circulating PCSK9 and LDL cholesterol[J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(2): 463-469.
- [23] DEWPURA T, RAYMOND A, HAMELIN J, et al. PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans[J]. *FEBS J*, 2008, 275 (13): 3480-3493.
- [24] BARLOWE C, HELENIUS A. Cargo capture and bulk flow in the early secretory pathway[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2016, 32: 197-222.
- [25] CHATTERJEE S, CHOI A J, FRANKEL G. A systematic review of Sec24 cargo interactome[J]. *Traffic*, 2021, 22(12): 412-424.
- [26] CHEN X W, WANG H, BAJAJ K, et al. SEC24A deficiency lowers plasma cholesterol through reduced PCSK9 secretion [J]. *Elife*, 2013, 2: e00444.
- [27] EMMER B T, HESKETH G G, KOTNIK E, et al. The cargo receptor SURF4 promotes the efficient cellular secretion of PCSK9 [J]. *Elife*, 2018, 7: e38839.
- [28] SHEN Y, WANG B, DENG S, et al. Surf4 regulates expression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) but is not required for PCSK9 secretion in cultured human hepatocytes[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865 (2): 158555.
- [29] POIRIER S, MAMARBACHI M, CHEN W T, et al. GRP94 regulates circulating cholesterol levels through blockade of PCSK9-induced LDLR degradation [J]. *Cell Rep*, 2015, 13 (10): 2064-2071.
- [30] BENJANNET S, RHAINDS D, HAMELIN J, et al. The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A; functional consequences of natural mutations and post-translational modifications[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(41): 30561-30572.
- [31] ESSALMANI R, SUSAN-RESIGA D, CHAMBERLAND A, et al. In vivo evidence that furin from hepatocytes inactivates PCSK9 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(6): 4257-4263.
- [32] MIRANDA M X, VAN TITS L J, LOHMANN C, et al. The Sirt1 activator SIRT3025 provides atheroprotection in ApoE<sup>-/-</sup> mice by reducing hepatic PCSK9 secretion and enhancing LDLR expression [J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(1): 51-59.
- [33] ROGERS M A, HUTCHESON J D, OKUI T, et al. Dynamin-related protein 1 inhibition reduces hepatic PCSK9 secretion[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(11): 2340-2353.
- [34] SPOLITU S, OKAMOTO H, DAI W, et al. Hepatic glucagon signaling regulates PCSK9 and low-density lipoprotein cholesterol [J]. *Circ Res*, 2019, 124(1): 38-51.
- [35] KASICHAYANULA S, GROVER A, EMERY M G, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of evolocumab, a PCSK9 inhibitor[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2018, 57(7): 769-779.
- [36] TOMLINSON B, HU M, ZHANG Y, et al. Alirocumab for the treatment of hypercholesterolemia [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2017, 17(5): 633-643.
- [37] GE X, ZHU T, ZENG H, et al. A systematic review and Meta-analysis of therapeutic efficacy and safety of alirocumab and evolocumab on familial hypercholesterolemia [J]. *Biomed Res Int*, 2021: 8032978.
- [38] STEIN E A, HONARPOUR N, WASSERMAN S M, et al. Effect of the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia[J]. *Circulation*, 2013, 128(19): 2113-2120.
- [39] KOREN M J, LUNDQVIST P, BOLOGNESE M, et al. Anti-PCSK9 monotherapy for hypercholesterolemia: the MENDEL-2 randomized, controlled phase III clinical trial of evolocumab[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(23): 2531-2540.
- [40] KOREN M J, SCOTT R, KIM J B, et al. Efficacy, safety, and tolerability of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 as monotherapy in patients with hypercholesterolaemia (MENDEL): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study[J]. *Lancet*, 2012, 380(9858): 1995-2006.
- [41] GIUGLIANO R P, DESAI N R, KOHLI P, et al. Efficacy, safety, and tolerability of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in combination with a statin in patients with hypercholesterolaemia (LAPLACE-TIMI 57): a randomised, placebo-controlled, dose-ranging, phase 2 study[J]. *Lancet*, 2012, 380(9858): 2007-2017.
- [42] RAAL F J, STEIN E A, DUFOUR R, et al. PCSK9 inhibition with evolocumab (AMG 145) in heterozygous familial hypercholesterolaemia (RUTHERFORD-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2015, 385(9965): 331-340.
- [43] GAUDET D, LÓPEZ-SENDÓN J L, AVERNA M, et al. Safety and efficacy of alirocumab in a real-life setting: the ODYSSEY APPRISE study[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2020, 28(17): 1864-1872.
- [44] RIDKER P M, AMARENCO P, BRUNELL R, et al. Evaluating bococizumab, a monoclonal antibody to PCSK9, on lipid levels and clinical events in broad patient groups with and without prior cardiovascular events: rationale and design of the studies of PCSK9 inhibition and the reduction of vascular events (SPIRE) Lipid lowering and SPIRE cardiovascular outcomes trials[J]. *Am Heart J*, 2016, 178: 135-144.
- [45] ZHANG Y N, EIGENBROT C, ZHOU L J, et al. Identification of a small peptide that inhibits PCSK9 protein binding to the low density lipoprotein receptor [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (2): 942-955.
- [46] LAMMI C, SGRIGNANI J, ARNOLDI A, et al. Biological characterization of computationally designed analogs of peptide TVFTSWEEYLDWV (Pep2-8) with increased PCSK9 antagonistic activity[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 2343.



- [47] MUEHLEMANN T E B M M, MONROE K D, BOURNE J W, REECE M T, NEVALAINEN V. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) allosteric binding ligands to modulate serum low density lipoprotein (LDL) levels; US, WO 2014/127316 A2 [P/OL]. 2014-08-21.
- [48] BARTA J W B T E, MONROE K D, MUEHLEMANN M M, PANDEY A, BOWERS S. Composition and methods of use of small molecules as binding ligands for the modulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) protein activity; US, WO 2016/029037 A1 [P/OL]. 2016-02-25.
- [49] TUCKER T J, EMBREY M W, ALLEYNE C, et al. A series of novel, highly potent, and orally bioavailable next-generation tricyclic peptide PCSK9 inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(22): 16770-16800.
- [50] MITCHELL T, CHAO G, SITKOFF D, et al. Pharmacologic profile of the adnectin BMS-962476, a small protein biologic alternative to PCSK9 antibodies for low-density lipoprotein lowering [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 350(2): 412-424.
- [51] STEIN E A, TURNER T, KEREIAKES D J, et al. Safety, tolerability and LDL-C reduction with LIB003; a novel anti-PCSK9 recombinant fusion protein; results of open-label extension phase 2B study[J]. *Circulation*, 2019, 140(Suppl 1): A17222-A.
- [52] BARTA J W B T E, MONROE K D, MUEHLEMANN M M, PANDEY A, BOWERS S. Composition and methods of use of tetrahydroisoquinoline small molecules to bind and modulate PCSK9 protein activity; US, WO 2017/034990 A1 [P/OL]. 2017. [https://www.lens.org/lens/patent/WO\\_2017\\_020996\\_A1](https://www.lens.org/lens/patent/WO_2017_020996_A1).
- [53] EVISON B J, PALMER J T, LAMBERT G, et al. A small molecule inhibitor of PCSK9 that antagonizes LDL receptor binding via interaction with a cryptic PCSK9 binding groove[J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28(6): 115344.
- [54] MIN D K, LEE H S, LEE N, et al. In silico screening of chemical libraries to develop inhibitors that hamper the interaction of PCSK9 with the LDL receptor [J]. *Yonsei Med J*, 2015, 56(5): 1251-1257.
- [55] XIN D, HOLZENBURG A, BURGESS K. Small molecule probes that perturb a protein-protein interface in antithrombin[J]. *Chem Sci*, 2014, 5(12): 4914-4921.
- [56] TAECHALERTPAISARN J, ZHAO B, LIANG X, et al. Small molecule inhibitors of the PCSK9 · LDLR interaction[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(9): 3242-3249.
- [57] KO E, RAGHURAMAN A, PEREZ L M, et al. Exploring key orientations at protein-protein interfaces with small molecule probes [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(1): 167-173.
- [58] CUNNINGHAM D, DANLEY D E, GEOGHEGAN K F, et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(5): 413-419.
- [59] GUSTAFSEN C, OLSEN D, VILSTRUP J, et al. Heparan sulfate proteoglycans present PCSK9 to the LDL receptor[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 503.
- [60] XU S, LUO S, ZHU Z, et al. Small molecules as inhibitors of PCSK9: current status and future challenges[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 162: 212-233.
- [61] SONG D, HAO J, FAN D. Biological properties and clinical applications of berberine[J]. *Front Med*, 2020, 14(5): 564-582.
- [62] CAI Y, LU D, ZOU Y, et al. Curcumin protects against intestinal origin endotoxemia in rat liver cirrhosis by targeting PCSK9[J]. *J Food Sci*, 2017, 82(3): 772-780.
- [63] SIDDIQ A A, MARTIN A. Crocetin exerts hypocholesterolemic effect by inducing LDLR and inhibiting PCSK9 and Sortilin in HepG2 cells[J]. *Nutr Res*, 2022, 98: 41-49.
- [64] IMANSHAHIDI M H H. Therapeutic effects of berberis vulgaris, its active constituent[J]. *Reactions Weekly*, 2016, 1632(1): 57-57.
- [65] YAN H M, XIA M F, WANG Y, et al. Efficacy of berberine in patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134172.
- [66] MAZZA A, SCHIAVON L, RIGATELLI G, et al. The effects of a new generation of nutraceutical compounds on lipid profile and glycaemia in subjects with pre-hypertension [J]. *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 2019, 26(4): 345-350.
- [67] CAMERON J, RANHEIM T, KULSETH M A, et al. Berberine decreases PCSK9 expression in HepG2 cells[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 201(2): 266-273.
- [68] WANG J, ZHAO J, YAN C, et al. Identification and evaluation of a lipid-lowering small compound in preclinical models and in a phase I trial[J]. *Cell Metab*, 2022, 34(5): 667-680.
- [69] YANG Y S, YF S, YANG H W, et al. Lipid-lowering effects of curcumin in patients with metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Phytother Res*, 2014, 28(12): 1770-1777.
- [70] SOHAEI S, AMANI R, TARRAHI M J, et al. The effects of curcumin supplementation on glycemic status, lipid profile and hs-CRP levels in overweight/obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial[J]. *Complement Ther Med*, 2019, 47: 102201.
- [71] ZHANG C P, SUN S W, GONG Y Z, et al. PCSK9/LDLR pathway mediates curcumin trinitrocinat promoting lipid uptake of HepG2[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2015, 42(9): 825-832.
- [72] CHORBA J S, GALVAN A M, SHOKAT K M. A high-throughput luciferase assay to evaluate proteolysis of the single-turnover protease PCSK9[J]. *J Vis Exp*, 2018, 28(138): 58265.
- [73] IMBRIGLIO W L P J E, XIONG Y S, FENG Z, YOU M H, CHANG W, LIANG R, LU Z J, JERRY J A, HOYT S B. Substituted 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline molecules as PCSK9 allosteric binders; US, WO2018/057409 A1 [P/OL]. 2018-03-29.
- [74] GENNEMARK P, WALTER K, CLEMMENSEN N, et al. An oral antisense oligonucleotide for PCSK9 inhibition [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(593): eabe9117.
- [75] RAY K K, WRIGHT R S, 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.
- [76] RAAL F J, KALLEND D, RAY K K, et al. Inclisiran for the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(16): 1520-1530.