

## 小核酸药物非临床特点和药理毒理评价策略

王 恒<sup>1</sup> 李 华<sup>1</sup> 汪溪洁<sup>1</sup> 邱云良<sup>1</sup> 汤纳平<sup>1</sup> 黄芳华<sup>2</sup> 常 艳<sup>1</sup>

(1 上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203; 2 国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100038)

**[摘要]** 通过与靶向信使 RNA 结合, 小核酸药物能特异性地沉默疾病基因来治疗疾病。目前, 已有 12 种小核酸药物在欧美国家上市, 还有更多药物处于各个研发阶段。小核酸药物虽然来自人工合成, 但因其自身特点不能单纯按照化学药物进行非临床评价。本文结合已上市药物的研究资料和相关指导原则, 分别从成药性、药效学、药动学及安全性评价四方面对小核酸药物非临床特点和评价策略进行阐述。

**[关键词]** 小核酸药物; 药效学; 药动学; 安全性评价

**[中图分类号]** R961; R992 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2022)12-1137-09

## Nonclinical features of small nucleic acid drugs and the pharmacology and toxicology evaluation strategy

WANG Heng<sup>1</sup>, LI Hua<sup>1</sup>, WANG Xi-jie<sup>1</sup>, QIU Yun-liang<sup>1</sup>, TANG Na-ping<sup>1</sup>, HUANG Fang-hua<sup>2</sup>, CHANG Yan<sup>1</sup>

(1 Shanghai InnoStar Bio-tech Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 2 Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100038, China)

**[Abstract]** By binding to target messenger RNAs, small nucleic acid drugs can treat some diseases by specifically interfering their genes translations. At present, 12 small nucleic acid drugs have been approved in Europe and the United States, and more are in various development stages. Although synthesized chemically, they have their own characteristics, and can't be evaluated for non-clinical features only according to chemical drugs' principle. In this paper, the non-clinical features and evaluation strategy of small nucleic acid drugs were discussed from four aspects, *i. e.*, druggability, pharmacodynamics, pharmacokinetics and safety evaluation, on the basis of the research data of marketed drugs and relevant guidelines.

**[Key words]** small nucleic acid drugs; pharmacodynamics; pharmacokinetics; safety evaluation

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指小 RNA (small RNA, sRNA) 分子通过抑制靶向 mRNA 的染色质修饰或降低其稳定性或翻译的潜力, 在转录时或转录后以序列特异性方式沉默靶基因表达的一种生物学过程<sup>[1]</sup>。人类已将其用于开发核酸类药物

治疗疾病, 包括肿瘤、病毒感染、代谢性疾病和心脏疾病等<sup>[2]</sup>。RNAi 疗法不仅可以作为目前的小分子药物或抗体药物治疗失败后的替代治疗手段, 还能对基因突变逃脱的感染性疾病提供治疗的希望, 因此, 认为它是下一个药品市场的革新技术<sup>[3]</sup>。其中, 利用核酸小分子与靶向的 mRNA 结合, 特异性地沉默疾病基因的表达, 以治疗特定疾病的药物被称为小核酸药物。狭义的小核酸药物仅指 RNA 小干扰药物(small interfering RNAs, siRNA), 而本研究讨论的是广义的小核酸药物, 它与寡核苷酸药物相近, 除了 siRNA 外, 还主要包括反义寡核苷酸药

**[作者简介]** 王恒, 男, 在读博士生, 研究方向: 肿瘤免疫药理学。E-mail: wanghenghec@163.com。

**[通讯作者]** 常艳, 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 遗传和生殖毒理学。联系电话: (021) 60211997, E-mail: ychang@ncdser.com。黄芳华, 女, 博士, 主任药师, 主要从事新药药理毒理审评工作。联系电话: (010) 85243169, E-mail: huangfh@cde.org.cn。

物(antisense oligonucleotides, ASOs)和靶向微小RNA(micro RNA, miRNA)<sup>[4]</sup>等。SiRNA是合成的短RNA双链,插入到细胞质中的RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)后双链分开,带有5'末端比较稳定的链与RISC结合,通过RISC催化蛋白寻找和裂开致病RNA,干扰其翻译<sup>[5]</sup>。ASO是长度一般为20~30个核苷酸的寡核苷酸链,根据Watson-Crick碱基配对原则与靶向RNA特异性结合,通过多种机制(如劈裂、占位、降解和封锁等)调节RNA的功能<sup>[6]</sup>;因其高稳定性、低成本等特点,在小核酸药物研发中占据主导地位。miRNA是一类长度为20~24个核苷酸的非编码RNA,在3'-非翻译区(3'-UTR)与目标mRNA不完美互补结合,调节其后转录,抑制翻译或RNA稳定性<sup>[7]</sup>,此类药物正在研发中,尚无获批药物。小核酸药物可用于治疗肿瘤、神经性疾病、心血管和代谢性疾病、感

染、肝脏疾病、骨骼肌肉和皮肤疾病、眼科疾病等<sup>[8]</sup>。截至2020年12月,已有12种小核酸药物获得美国FDA或欧洲EMA批准上市,分别为fomivirsen, pegaptanib, mipomersen, eteplirsen, defitelio, nusinersen, inotersen, patisiran, golodirsen, givosiran, waylivra和leqvio(见表1)。除此之外,截至2020年4月,全球还有约150种RNAi药物进入了临床研究阶段<sup>[8]</sup>,在我国,小核酸药物也被列为重点研发领域。自从第一个小核酸类药物fomivirsen上市以来,经过20年的发展,这类药物与其他药物相比,具有高特异性、高效性、长效性的优势,其审批也在明显加速<sup>[9]</sup>。目前,因高活性抗逆转录病毒疗法的快速发展,巨细胞病毒病例数量急剧下降,仅fomivirsen分别于2002年和2006年在欧洲和美国被撤市,非药物本身的缺陷所致<sup>[10]</sup>。

表1 上市小核酸药物(截至2020年12月)

首次批准上市机构	上市年份	药物通用名称	适应证	靶器官/靶点	可能的作用机制
美国 FDA	1998	fomivirsen	巨细胞病毒视网膜炎	眼/IE2 mRNA	与 IE2 mRNA 结合,阻止其翻译
美国 FDA	2004	pegaptanib	年龄相关性新生血管性黄斑病变	血管/VEGF 蛋白	高特性结合 VEGF 165 亚型,阻断血管生成
美国 FDA	2013	mipomersen	家族性高胆固醇血症	肝脏/ApoB mRNA	靶向结合 ApoB mRNA,并通过 RNase H 诱导其降解
美国 FDA	2016	eteplirsen	DMD	肌肉/肌营养不良蛋白 mRNA	诱导肌营养不良蛋白 mRNA 外显子 51 外排,影响蛋白功能
欧洲 EMA	2013	defitelio	造血干细胞移植后的肝静脉闭塞性疾病(VOD)	肝脏/纤溶酶	提高纤溶酶水解纤维蛋白凝块的活性,增加组织纤溶酶原激活物(t-PA)和血栓调节蛋白的表达水平等
美国 FDA	2016	nusinersen	脊髓型肌萎缩症(SMA)	中枢神经/SMN2 mRNA	与 SMN2 前 mRNA 结合,促进 7 号外显子编入 mRNA 中,增加 SMN 的蛋白水平
美国 FDA	2018	inotersen	遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性	肝脏/甲状腺素运载蛋白 mRNA	与转甲状腺素蛋白 mRNA 结合,并通过 RNase H 诱导其降解
美国 FDA	2018	patisiran	遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性	肝脏/甲状腺素运载蛋白 mRNA	通过 RNA 干扰,抑制肝脏中甲状腺素运载蛋白的形成
欧洲 EMA	2019	golodirsen	杜氏肌营养不良症(DMD)	肌肉/DMD mRNA	诱导肌营养不良蛋白 mRNA 外显子 53 外排,影响蛋白功能
美国 FDA	2019	givosiran	急性肝卟啉症(AHP)	肝脏/氨基乙酰丙酸合成酶 1(ALAS1) mRNA	通过 RNA 干扰,抑制肝脏中 ALAS1 蛋白的形成
欧洲 EMA	2019	waylivra	家族性乳糜微粒血症综合征(FCS)	肝脏/APOC3 mRNA	明显降低三酰甘油水平及其他脂质指标(乳糜微粒-三酰甘油和 APOC3 等)
欧洲 EMA	2020	leqvio	原发性高胆固醇血症或混合型血脂异常	肝脏/PCSK9 酶	促进低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的吸收和降低其在循环系统中的水平

IE2: 立早基因 2(immediate-early 2); VEGF: 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor); ApoB: 载脂蛋白 B(apolipoprotein B); APOC3: 载脂蛋白 C3(apolipoprotein C3); PCSK9: 原蛋白转化酶枯草杆菌科新 9 型(proprotein convertase subtilisin kexin type 9)

尽管近年来小核酸类药物发展迅速,但仍有一些限制其应用到临床的因素,包括但不限于易被核酸酶降解、系统给药后进入细胞内传递到靶部位效率低以及潜在的不良反应,如肾小球肾炎、血管炎和血小板减少等<sup>[11]</sup>。小核酸药物的发现和开发过程,一般包括疾病发病机制研究、疾病相关靶向 RNA 的鉴定、RNAi 候选药物的筛选、序列优化、递送系统研究、药理活性确认及临床研究<sup>[12-13]</sup>。其中,临床前研究对这类药物成药性的评价至关重要。然而,目前尚无专门针对此类药物药理毒理研究的技术指南,ICH S6(R1) 和美国 FDA 有关细胞和基因治疗的指导原则也仅提到小核酸药物可以参考。本研究结合已上市小核酸药物的研究资料、相关技术指南和文献报道等,阐述此类药物的非临床特点和药理毒理评价的策略。

## 1 小核酸药物成药性的关键因素

### 1.1 化学修饰

小核酸药物来自化学合成,其理化性质较为明确,且同一系列药物非常相似,发挥作用的部位均在细胞内。然而,未经修饰的小核酸药物成药性差,如稳定性差、难于进入细胞内及与靶向 mRNA 结合的特异性不高等,因此化学修饰是这类药物开发过程中的关键环节。ASO 化学修饰的途径主要包括:通过形成共轭物增强细胞吸收和组织靶向性,糖基化修饰增加与靶向 RNA 的亲合力和稳定性及降低促炎性,骨架修饰增加稳定性及与调节蛋白结合能力,碱基修饰降低促炎性及增加亲和力<sup>[6]</sup>。siRNA 化学修饰的途径主要包括:控制在 21~22 个核苷酸长度以获得最佳序列沉默效果,2 个核苷酸悬垂于双链的 3 端达到最大 RNA 干扰作用,核糖修饰增加稳定性,连接硫代磷酸增加体内药效,形成共轭物增加 RISC 的形成<sup>[14]</sup>。miRNA 修饰的途径也包括糖基化

修饰和骨架修饰等<sup>[15]</sup>。

### 1.2 递送系统

小核酸药物必须进入细胞内到达细胞质或细胞核的靶位才能发挥药理活性,因此它们进入细胞的途径至关重要。ASO 通过与细胞表面蛋白(如网格蛋白和小窝蛋白)结合,以内吞的方式进入细胞,然而,由于它们一般带负电,很难跨过脂质双分子层,尤其很难到达肝脏外的靶器官。目前,已经报道了一些新的方式可以直接将 ASO 运输至细胞质或细胞核,如通过与胰高血糖素样肽 1 受体(GLP1R)的配体形成共轭物,将 ASO 递送至胰腺 β 细胞<sup>[16]</sup>;采用神经降压素介导的递送系统,可以改善 ASO 的细胞吸收,提高药物活性<sup>[17]</sup>。siRNA 分子量更大,且具有亲水性,以阴离子的形式存在,导致这类药物很难穿过细胞膜,极大地影响了它们的细胞吸收;另外,为了保证药效、稳定性及安全性,还需要避免被肾脏过滤、被非靶向细胞吸收及被核酸酶降解。因此,与这些因素密切相关的递送问题成为 siRNA 开发和应用的巨大挑战。目前,用于改善 siRNA 递送系统的策略主要包括:通过化学合成和修饰成共轭物、直接与配体形成共轭物、形成纳米粒、脂质体递送系统和聚合物递送系统等<sup>[18]</sup>。miRNA 同样因细胞吸收差和易被核酸酶降解导致递送存在很大挑战,目前正在研发各种递送系统,尤其是非病毒的聚合物载体<sup>[19]</sup>。

## 2 小核酸药物药理毒理评价

尽管小核酸药物具备生物制品的属性,但仍按照新化学实体监管,开展相关非临床研究<sup>[4,20]</sup>。本研究通过整理此类已经上市药物的药理毒理研究内容(见表 2),并结合 ICH S6(R1) 等相关指导原则和作者的从业经验,阐述小核酸药物的药理毒理评价的试验设计、研究内容和特点。

表 2 已上市小核酸药物非临床药理毒理研究内容汇总

药品名称	适应证/给药方式	药效学研究	药动学研究	安全性评价
fomivirsen	巨细胞病毒视网膜炎/玻璃体内注射	体外实验:将原代人真皮成纤维细胞、视网膜色素上皮细胞和成纤维细胞分别转染人巨细胞病毒(HCMV),考察抗病毒活性及对 HCMV 临床分离株的抑制活性 体内实验:因缺乏 HCMV 感染的动物模型,未开展	吸收:采用猴,玻璃体注射给药,考察体内吸收情况 分布:分别采用兔和猴,玻璃体注射给药,考察组织分布情况(放射性标记法)以及血浆蛋白结合率实验 代谢和排泄:伴随分布实验	安全药理学实验:未开展 一般毒理实验:小鼠单次静脉注射毒性实验,兔单次玻璃体注射给药眼耐受性实验,小鼠 28 d 重复静脉注射给药毒性实验,猴 4 或 5 周重复玻璃体注射给药眼耐受性实验 生殖毒性实验:小鼠生殖 I 和 II 段实验 遗传毒性实验:Ames、染色体畸变实验、小鼠淋巴瘤实验及小鼠体内微核实验 致癌实验:未开展

药品名称	适应证/给药方式	药效学研究	药动学研究	安全性评价
pegaptanib	年龄相关性新生血管性黄斑病变/玻璃体内注射	体外实验: 对人脐静脉内皮细胞 VEGF 与其受体结合的抑制作用, 对 VEGF 诱导的内皮细胞增殖和钙代谢的抑制作用 体内实验: 分别采用豚鼠、大鼠和小鼠考察对血管生成的影响, 采用人 A673 横纹肌肉瘤异种移植裸鼠模型考察抗肿瘤药效	吸收: 分别采用兔(眼玻璃体注射给药)和猴(皮下、静脉和玻璃体注射), 考察吸收情况 分布: 采用小鼠, 静脉注射给药后分布情况及伴随吸收实验进行 代谢: 体外考察人、兔、猴和犬血浆中代谢稳定性 排泄: 伴随吸收和分布实验, 考察兔经玻璃体注射给药后的排泄情况	安全药理学实验: 大鼠中枢神经安全药理( Irwin 实验)、大鼠呼吸安全药理实验和犬心血管安全药理实验 一般毒理实验: 大鼠单次给药毒性实验, 猴单次给药毒性实验, 兔 12 d 探索性给药眼耐受性实验, 兔 11 周玻璃体注射毒性实验, 大鼠 13 周静脉注射毒性实验, 犬 3 周玻璃体注射重复给药毒性实验, 猴 3 个月玻璃体注射毒性实验, 兔 6 个月玻璃体注射重复给药毒性实验, 犬 9 个月玻璃体注射重复给药毒性实验 生殖毒理实验: 小鼠静脉注射发育毒性实验, 兔玻璃体注射发育毒性实验 遗传毒理实验: 细菌回复突变实验, 人淋巴细胞染色体畸变实验, 仓鼠胚胎细胞转化实验, 小鼠体内微核实验, 小鼠淋巴瘤细胞实验 致癌实验: 被豁免, 未开展 特殊毒性实验: 长期静脉给药后 2-氟尿嘧啶核苷(2-FU) 插入大鼠组织 DNA 实验, 长期静脉给药后 2-FU 插入大鼠和土拨鼠组织 DNA 和 RNA 实验, 体外和体内免疫原性实验
mipomersen	家族性高胆固醇血症/静脉注射	体外实验: 采用人肝癌细胞株 ( HepG2 和 Hep3B)、人和食蟹猴原代肝细胞, 考察对载脂蛋白 B 的 mRNA、蛋白和分泌蛋白的影响 体内实验: 采用小鼠、仓鼠、兔和猴, 考察对载脂蛋白 B 水平的影响, 采用高脂血症和动脉粥样硬化的啮齿动物模型及含有人类载脂蛋白 B 基因组转基因的小鼠, 考察载脂蛋白 B 是否降低以及是否可以使动脉粥样硬化(主动脉斑块体积) 减少	吸收: 采用小鼠、大鼠、猴、犬, 考察体内吸收情况 分布: 血浆蛋白结合率实验, 体内实验伴随进行吸收实验 代谢: 体外检测微粒体和肝细胞中的药物浓度, 体内采用猴进行代谢产物鉴定 排泄: 采用小鼠、大鼠和猴进行排泄实验 药物相互作用: 细胞色素 P450 ( CYP) 酶抑制和诱导实验, 转运体实验	安全药理学实验: 体外 hERG 实验、小鼠 Irwin 实验、小鼠呼吸安全药理实验、猴心血管安全药理实验、小鼠和猴肾脏安全药理实验 一般毒理实验: 小鼠单次静脉注射给药毒性实验, 小鼠 3 个月皮下给药毒性实验, 小鼠 6 个月重复给药毒性实验, 大鼠 5 个月皮下给药毒性实验, 猴 5 周皮下注射毒性实验, 猴 13 周静脉注射给药毒性实验, 猴 12 个月皮下注射重复给药毒性实验 生殖毒理实验: 小鼠生育力和早期胚胎发育毒性实验, 兔胚胎发育毒性实验, 大鼠围产期生殖毒性实验 遗传毒理实验: 细菌回复突变实验, 小鼠淋巴瘤细胞基因突变实验, 小鼠体内微核实验 致癌实验: 小鼠 2 年皮下注射致癌实验, 大鼠 2 年皮下注射致癌实验 特殊毒性实验: 幼龄大鼠 10 周给药毒性实验, 小鼠 5 周皮下给药评价杂质毒性实验, 免疫毒性实验( 小鼠肥大细胞脱颗粒实验和小鼠流感宿主抵抗模型)
etelplrsen	DMD/静脉注射	体外实验: 采用肌细胞和肌移植( 来自于 DMD 患者), 考察对外显子 51 的跳跃情况 体内实验: 采用食蟹猴, 静脉注射给药, 考察在其股四头肌、心脏和横膈肌组织中肌营养不良蛋白基因第 51 外显子的跳跃情况以及采用 DMD mdx 小鼠模型考察药效	吸收、分布、代谢和排泄: 采用 DMD mdx 小鼠, 考察药物的吸收、分布、代谢及排泄情况( 放射性标记, 单次静脉注射) 分布: 采用超滤法评估小鼠、大鼠、猴、人肝微粒体中的血浆蛋白结合率 代谢: 进行小鼠、大鼠、猴、人肝微粒体代谢产物鉴定 药物相互作用: CYP 酶诱导和抑制实验, 转运体和底物考察	安全药理学实验: 采用猴, 同时考察对中枢神经系统、呼吸系统、心血管系统及肝脏和肾脏功能的影响 一般毒理实验: 小鼠 12 周重复给药毒性实验, 小鼠 3 个月重复给药毒性实验, 雄性小鼠 26 周重复给药毒性实验, 猴 12 周重复给药毒性实验, 雄性猴 39 周重复给药毒性实验 生殖毒理实验: 伴随在 26 周小鼠和 39 周猴重复给药毒性实验中进行雄性生殖实验 遗传毒理实验: Ames、染色体畸变和小鼠微核遗传毒性实验 特殊毒理实验: 幼龄大鼠 10 周重复给药毒性实验

药品名称	适应证/给药方式	药效学研究	药动学研究	安全性评价
defitelio	造血干细胞移植后的肝 VOD/静脉注射	体外实验: 采用人微血管内皮细胞系, 分别考察在高密度培养细胞造成的压力、血清饥饿及氧化应激 3 种不同应激情况下对内皮细胞的保护作用, 以及对基因表达和血栓形成的影响 体内实验: 未进行	吸收、分布和排泄: 采用大鼠, 灌胃和静脉给药后, 考察吸收、分布和排泄情况(放射性标记法)	安全药理实验: 体外 hERG 实验 一般毒理实验: 大鼠和犬 13 周静脉注射重复给药毒性实验 生殖毒理实验: 大鼠胚胎发育毒性实验, 兔静脉注射胚胎发育毒性实验, 大鼠围产期毒性实验 遗传毒理实验: 细菌回复突变实验, 中国仓鼠卵巢细胞染色体畸变实验, 大鼠体内微核实验 致癌实验: 2 年小鼠和大鼠致癌实验 特殊毒理实验: 幼龄大鼠 28 d 静脉注射重复给药毒性实验
nusinersen	SMA/脑脊液鞘内注射	体外实验: 分别采用拼接实验、报告基因实验和 SMA 患者成纤维细胞, 考察体外活性 体内实验: 采用小鼠 SMA 模型(转染人 SMN2 基因), 考察注射该药后小鼠的 SMN 蛋白表达是否发生变化, 采用重度平滑肌肌瘤小鼠模型(SmnΔ7), 考察该药是否能小鼠的运动能力改善及延长存活时间	吸收和分布: 采用成年猴和幼猴, 考察脑脊液、血浆药物浓度和组织分布情况(单次和重复鞘内注射及静脉注射) 分布: 小鼠、猴和人血浆蛋白结合率实验 代谢: 伴随在猴 14 和 53 周重复给药毒性实验中, 进行体内代谢产物鉴定 排泄: 未开展实验(预期经过尿液排泄)	安全药理实验: 大鼠呼吸和心血管安全药理实验 一般毒理实验: 猴单次鞘内注射给药毒性实验, 小鼠 13 周皮下注射重复给药毒性实验 生殖毒理实验: 小鼠皮下注射生育力和胚胎发育毒性实验, 兔皮下注射胚胎发育毒性实验 遗传毒理实验: 细菌回复突变实验, 体外染色体畸变实验, 小鼠体内微核实验 特殊毒性实验: 幼猴 14 周重复鞘内注射给药毒性实验, 幼龄猴 1 年鞘内注射给药毒性实验, 猴鞘内给药考察寡核苷酸相关的海马空泡形成, 小鼠 13 周给药评估杂质毒性实验
inotersen	遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性/皮下注射	体外实验: 分别采用人肝癌细胞 HepG2、表达人甲状腺素运载蛋白(TTR)的雌性转基因小鼠新鲜分离的肝细胞以及新鲜分离的雄性食蟹猴肝细胞, 考察药物能否降低 TTR mRNA 水平 体内实验: 分别采用雄性 HTTR Ile84Ser 转基因小鼠和食蟹猴, 检测肝脏 hTTR mRNA 水平和血浆 hTTR 蛋白水平	吸收: 分别采用小鼠和大鼠, 皮下注射后考察体内吸收情况 分布、代谢和排泄: 大鼠皮下注射后, 采用高效液相色谱-紫外分光光度法(HPLC-UV)、LC/MS、离子对高效液相色谱电喷雾/质谱法(IP-HPLC-ES/MS)进行药物及其代谢物分析 分布: 用超滤法和 ELISA 法评估人和猴血浆蛋白结合率 代谢: 采用小鼠、猴进行体内代谢产物鉴定 药物相互作用: CYP 酶抑制和诱导实验及转运体实验	安全药理实验: 体外 hERG 实验, 小鼠中枢神经安全药理(Irwin 实验) 猴心血管和呼吸安全药理实验 一般毒理实验: 小鼠 13 周皮下注射重复给药毒性实验, 小鼠 26 周皮下注射重复给药毒性实验, 大鼠 26 周皮下注射重复给药毒性实验, 雌性小鼠的生殖实验, 猴 13 周皮下注射重复给药毒性实验, 猴 39 周皮下注射重复给药毒性实验 生殖毒理实验: 小鼠生育力和胚胎发育毒性实验, 兔胚胎发育毒性实验, 小鼠围产期生殖毒性实验 遗传毒理实验: 细菌回复突变实验, 中国仓鼠肺细胞染色体畸变实验, 小鼠体内微核实验 致癌实验: 转基因小鼠 26 周致癌实验 特殊毒理实验: 小鼠流感宿主抵抗模型实验, 人血小板激活实验, 小鼠 13 周给药评估杂质毒性实验
patisiran	遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性/静脉注射	体外实验: 未开展 体内实验: 采用食蟹猴, 静脉注射给药后, 检查血清 TTR 水平, 以及伴随毒理实验考察血清中维生素 A 和甲状腺素的水平	吸收: 采用大鼠和猴, 考察体内吸收情况 分布: 体外蛋白结合实验和采用大鼠和猴, 考察组织分布情况 代谢: 体外代谢产物鉴定和大鼠体内代谢产物鉴定 排泄: 采用大鼠, 考察药物的清除情况 药物相互作用: CYP 酶抑制和诱导实验及转运体实验	安全药理实验: 体外 hERG 实验, 猴中枢系统、心血管系统和呼吸系统安全药理实验 一般毒理实验: 猴单次静脉注射毒性实验, 大鼠静脉注射 2 个月(每月 1 次)毒性实验, 大鼠静脉注射 8 周(每 2 周 1 次)毒性实验, 大鼠 26 周静脉注射毒性实验, 猴静脉注射 8 周(每 2 周 1 次)毒性实验, 猴 39 周重复给药毒性实验 生殖毒理实验: 雄性大鼠生育力实验, 雌性大鼠生育力和胚胎发育毒性实验, 兔胚胎发育毒性实验, 大鼠围产期生殖毒性实验 遗传毒理实验: 细菌回复突变实验, 染色体畸变实验, 小鼠体内微核实验 致癌实验: 转基因小鼠 26 周致癌实验 特殊毒理实验: 体外溶血实验, 评价人外周血中细胞因子/趋化因子的释放水平, 小鼠免疫刺激实验

药品名称	适应证/给药方式	药效学研究	药动学研究	安全性评价
golodirsén	DMD/静脉滴注 给药频率:每周1次	体外实验:磷酸二胺吗啉代寡核苷酸(phosphorodiamidate morpholino oligomer, PMO) 序列筛选实验,脱靶序列分析 体内实验:分别采用 mdx 转基因小鼠 DMD 模型和正常小鼠考察体内药效	吸收:未考察 分布:采用小鼠考察单次静脉注射给药后的分布情况;代谢和排泄(放射性标记法),小鼠、大鼠、猴和人的血浆蛋白结合实验 代谢:伴随分布实验,考察小鼠、大鼠、猴和人肝微粒体的代谢情况 排泄:伴随分布实验 药物相互作用:考察对肝微粒体 CYP 酶的抑制作用,及对人肝细胞中 CYP 酶的诱导作用,体外转运体实验	安全药理实验:体外 hERG 实验,猴单次静脉注射考察对心血管和中枢神经系统的影响(伴随考察对呼吸系统的影响) 一般毒理实验:雄性小鼠 12 周静脉注射重复给药毒性实验(伴随雄性生育力检测),雄性小鼠 26 周皮下注射重复给药毒性实验(伴随雄性生育力检测),雄性小鼠 23 周静脉注射重复给药毒性实验(伴随雄性生育力检测),大鼠 13 周静脉注射毒性实验,雄性猴 12 周静脉注射重复给药毒性实验,雄性猴 39 周静脉输注重复给药毒性实验 遗传毒性实验:Ames、体外染色体畸变实验和小鼠骨髓微核实验 特殊毒性实验:幼龄雄性大鼠 10 周静脉注射重复给药毒性实验,雄性小鼠 13 周静脉注射重复给药毒性实验评估杂质
givosiran	AHP/皮下注射 给药频率:每月1次	体外实验:转录水平筛选 siRNA,进行核苷酸多态性筛选,活性评价,脱靶分析 体内实验:单次或重复给药对大鼠或猴 ALAS1 mRNA 的影响,采用小鼠或大鼠急性间歇性卟啉症模型考察对 ALAS1 mRNA 和尿液中的氨基乙酰丙酸(ALA)和胆色素原(PBG)的水平	吸收:大鼠和猴单次皮下注射给药吸收实验 分布、代谢和排泄:大鼠单次皮下给药代谢、排泄、物料平衡和组织分布实验(放射性标记法),体外血浆蛋白结合实验 药物相互作用:雄兔皮下注射给药精液转运实验	安全药理实验:猴心血管和呼吸系统安全药理实验 一般毒理实验:大鼠 26 周皮下注射重复给药毒性实验(伴随生育力和早期胚胎发育毒性实验),大鼠皮下注射生育力和早期胚胎发育毒性实验;兔皮下注射胚胎和胎仔发育毒性实验 遗传毒性实验:Ames、体外染色体畸变实验和大鼠骨髓微核实验,大鼠皮下注射围产期毒性实验 特殊毒性实验:幼龄猴 39 周皮下注射重复给药毒性实验
waylivra	FCS/皮下注射	体外实验:采用人和猴的原代肝细胞、人肝细胞系 HepG2、APOC3 转基因小鼠原代肝细胞考察对 apoC-III 的抑制活性 体内实验:采用体内药效模型(小鼠、大鼠、仓鼠和猴)考察对 apoC-III 的抑制活性(小鼠和仓鼠由于与人 apoC-III 序列存在差异,采用种属特性的 ASO 进行评价)	吸收:分别采用小鼠、大鼠和猴,考察体内吸收情况 分布:分别采用小鼠、大鼠和猴,考察体内分布情况(伴随吸收实验),血浆(人、猴和小鼠)蛋白结合率实验 代谢:考察小鼠、大鼠和猴体内的代谢情况 排泄:大鼠排泄实验 药物相互作用:CYP 酶抑制和诱导实验,转运体实验	安全药理实验:体外 hERG 实验,小鼠呼吸和中枢安全药理实验,猴心血管安全药理实验 一般毒理实验:小鼠 13 和 26 周皮下注射重复给药毒性实验,大鼠 26 周皮下注射重复给药毒性实验,猴 13 和 39 周重复给药毒性实验 生殖毒性实验:小鼠生育力和早期胚胎发育毒性实验,兔胚胎胎仔发育毒性实验,小鼠围产期毒性实验 遗传毒性实验:细菌和哺乳动物细胞基因突变实验及小鼠染色体畸变实验 致癌实验:小鼠和大鼠 2 年长期致癌实验 特殊毒性实验:杂质毒性评价和血小板功能评价实验

数据来源于美国 FDA pharmacology review 或欧洲 EMA assessment report<sup>[21-32]</sup>

## 2.1 药效学

### 2.1.1 体外药效学

在体外药效学实验方面,可以选择动物或人(含拟定适应证患者)的原代细胞、正常细胞系和转染的细胞系,考察药物对细胞活性、功能、相关蛋白和基因 mRNA 水平的影响。因小核酸作用的靶点为特异的 mRNA,故需要开展靶点结合实验,不仅可以验证对靶点的作用,还能对毒理研究

动物种属的选择提供合理的依据。已上市小核酸药物体外药效学研究结果显示,此类药物在体外能很好地调控靶 RNA 的功能和改变蛋白表达水平,发挥体外药效活性,且具有一定的浓度/时间依赖性。

### 2.1.2 体内药效学

小核酸药物是通过调节 mRNA 增加或减少疾病相关蛋白的产生而发挥药理作用,mRNA 和蛋白水平可以通过合适的动物模型进行评

价。根据靶向人的 mRNA 序列同源性选择动物模型,因为小核酸药物与靶向 RNA 结合具有很高的特异性,一个碱基配对错误可能导致结合率下降 500 倍,同源性高才能确保碱基配对成功,发挥预期的药效作用。已上市小核酸药物选择的动物模型包括小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、猴等;如缺乏同源性高的动物模型,也可以选择人的转基因动物模型<sup>[33]</sup>。如果找不到合适的动物模型,也可以仅开展体外药效实验,如 fomivirsen 和 defitelio。给药频率多采用单次给药,但小核酸因分布至细胞内所需时间长,往往起效慢,应根据具体情况合理设计给药次数<sup>[20]</sup>。评价参数除常规药效指标外,还需关注靶基因 mRNA 的水平。

## 2.2 药动学

### 2.2.1 吸收

动物种属通常选择常规的小鼠、大鼠、犬、食蟹猴及新西兰白兔。给药途径采用临床拟用的给药方式,其中静脉注射最为常见,也有部分已上市的小核酸药物采用灌胃、腹腔注射、鞘内注射或玻璃体内注射等给药方式。多种生物分析方法可用于定量分析动物血浆中的药物及其短链寡核苷酸代谢物的浓度,如 HPLC 法、ELISA 法和毛细管凝胶电泳-紫外检测法(CGE-UV)、HPLC-UV 法、IP-HPLC-ES/MS 法等。已有研究结果显示,在多个动物种属中,小核酸药物的药动学特性和人具有较好的相关性<sup>[33]</sup>。

### 2.2.2 分布

可以采用定量全身放射自显影(QWBA)法测定药物在动物体内各个组织的放射性浓度,以研究其组织分布情况,大多数小核酸药物在组织中分布迅速,且具有比较一致的组织分布特征,即在很多组织中均有分布,其中肾脏中最高,其次为肝脏中,脑中最低<sup>[34]</sup>;另外,采用超滤法检测药物与血浆中蛋白质的结合率,小核酸药物的血浆蛋白结合率通常较低,且结合程度与药物浓度无明显相关性<sup>[33]</sup>。

### 2.2.3 代谢

在体外,可以采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定各个种属肝微粒体和肝细胞中的药物浓度。肝微粒体一般对小核酸药物没有明显的代谢作用,如 eteplirsen<sup>[34]</sup>。另外,小核酸药物通常不是 CYP 酶和转运体的抑制剂或诱导剂及底物,因此产生药物相互作用的风险低<sup>[33]</sup>。

### 2.2.4 排泄

可以采用液体闪烁计数法(LSC)测定药物在尿液和粪便中的放射性浓度,以提供物质平衡的信息。小核酸药物一般被核酸酶代谢,以原形药或代谢产物的形式主要经尿液排泄,但是 ASO

因与血浆白蛋白结合率较高,导致尿液排泄和肾脏清除减少<sup>[33]</sup>。

## 2.3 安全性评价

小核酸药物非临床安全性评价内容与小分子化学药物基本类似,主要包括安全药理学实验、一般毒理学实验、遗传毒性实验、生殖毒性实验和致癌性实验及特殊毒性实验,参考的技术指南包括国家药品监督管理局、美国 FDA 及 ICH 等有关的药物安全性评价相关指导原则。尽管如此,小核酸药物还存在自身特点,它们产生的毒性既有来自于药理作用放大而引起的靶点(on-target)毒性,也有来自于与同源性 RNA 序列结合或本身理化性质产生的脱靶(off-target)毒性,因此,不能完全照搬生物制品或者化学药物非临床安全性评价的要求来进行小核酸药物毒理研究<sup>[4]</sup>。

### 2.3.1 安全药理学实验

因小核酸药物发挥药理作用的方式与生物大分子药物类似,因此在合适时可以考虑将安全药理学结合到重复给药毒性实验中一起评价,评价的项目包括呼吸、中枢和心血管系统安全药理学实验,选择的动物种属包括小鼠、大鼠及猴等。尽管小核酸药物由于分子量相对较大且带有电荷,其无法直接抑制 hERG 钾离子通道,但仍有大部分已上市的此类药物进行了体外 hERG 实验<sup>[33]</sup>。因此,建议小核酸药物开展体外 hERG 实验,以进一步评价药物可能引起的心血管风险。除了上述三大核心系统外,还因部分小核酸药物分别通过肝脏代谢和肾脏排泄,故也需要考虑补充肝脏和肾脏安全药理实验。

### 2.3.2 一般毒理学实验

动物种属通常需要选择一种啮齿类和一种非啮齿类动物,啮齿类多为小鼠和大鼠,非啮齿类多为犬和猴。值得注意的是,由于小核酸药物存在“on-target”毒性,故在种属选择时,有必要评估是否包含了至少一种能产生与临床药理活性具有可比性的动物。如无法获得相关动物种属,也可根据药物特点选择转基因动物和同源化模型动物等替代,但需要充分评估产生的毒性与临床相关性。一般采用临床拟用的给药途径,其中静脉注射和皮下注射较为常见。给药期限主要参考 ICH M3(R2) 指导原则的要求,应支持相应的临床试验给药疗程,一般情况下最长给药期限为啮齿类给药 26 周、非啮齿类给药 39 周,可用于支持所有临床试验和上市。除常规的检测指标外,小核酸药物还应考察药效终点指标,以便进一步验证在长期给药过

程中,药物能否与组织中靶 mRNA 结合而产生相应的药理作用<sup>[20]</sup>。

**2.3.3 遗传毒理实验** 就寡核苷酸自身性质而言,此类药物一般不会引起遗传毒性,且目前的药物均为阴性结果,但寡核苷酸安全工作组(OSWG)遗传毒理委员会仍认为对于新的寡核苷酸药物有必要进行遗传毒性实验,因为修饰的单体可能从寡核苷酸代谢时释放出来并整合到DNA中,理论上会导致链终止、错误编码和/或错误复制或修复;另外,该委员会推荐选用ICH S2(R1)指导原则标准“组合1”考察此类药物的遗传毒性,即2项体外实验(细菌回复突变实验+哺乳动物细胞染色体畸变实验或小鼠淋巴瘤 Tk 基因突变实验)与1项体内实验(体内微核实验或染色体畸变实验)<sup>[35]</sup>。

**2.3.4 生殖毒性实验** 小核酸药物一般需要开展生殖毒性实验,其时间和内容主要参照ICH M3(R2)和S5(R3)的要求。一般可采用分段式生殖实验策略,包括生育力和早期胚胎发育毒性实验、胚胎-胎仔发育毒性实验和围产期发育毒性实验,选择的动物种属多为小鼠、大鼠和兔,给药方式一般采用临床拟用给药途径。另外,根据拟用人群,必要时需要开展幼龄动物毒理学实验。

**2.3.5 致癌性实验** 根据ICH S1A,预期临床用药至少连续6个月的药物都应进行致癌性实验,小核酸药物也不例外,除非用于晚期肿瘤等预期寿命较短的疾病。一般选择大鼠开展为期2年的长期致癌性实验,以及采用转基因小鼠开展6个月的致癌性实验,给药方式亦采用临床拟用途径。

**2.3.6 特殊毒性实验** ICH M3(R2)指导原则中提到“如果药物或同类药物以往的非临床或临床发现提示药物具有特殊的安全性担忧,进行附加的非临床试验是有益的”。根据小核酸药物自身的特点和已上市同类药物评价的经验,需要开展的特殊毒性实验包括但不限于:①部分小核酸药物根据拟用人群的需要,开展了幼龄动物毒性实验,如 mi-pomersen 等。②鉴于小核酸药物也具有部分生物药的性质,故也需要进行免疫原性和免疫毒性实验及细胞因子/趋化因子评估实验<sup>[4]</sup>。③因一些小核酸药物被发现会引起血小板减少,如 inotense 和 volanesorsen,且它们的给药方式多数为注射,故有必要进行体外溶血实验<sup>[33]</sup>。④为了考察小核酸药物长期给药后是否会被降解,还应检测 2-FU 插入细胞内DNA和RNA的水平,如 pegaptanib。此外,小核

酸药物在合成及工艺开发过程中也会产生一些杂质,需要根据ICH Q3A和Q3B指导原则的要求,开展杂质毒性评价实验等。

### 3 结语和展望

小核酸药物因其特异性高、效果显著及维持时间长等优势,近20年来取得了长足发展。已上市小核酸药物的成功开发,让人们积累了一些研发经验,但同时也要意识到,仍有不少问题制约着此类药物的发展。首先是脱靶效应,目前尚无有效的方式可彻底消除寡核苷酸链的脱靶效应,一般通过筛选出高特异性适当长度的寡核苷酸链,以降低脱靶效应与药物毒性<sup>[10]</sup>。其次是稳定性,由于天然核酸稳定性不高,容易被水解酶水解而失去药效,故需要采取有效措施增加稳定性,如化学修饰成共轭物、直接使RNA酶降解、利用环状RNA(circRNA)保护和运输等<sup>[36]</sup>。再次是实现高效跨膜和有效体内运输,针对靶mRNA的位点进行靶向运输可能是一种有效方法,而新兴较具潜力的靶向纳米复合物载体的颗粒特性和载药量可能具有异质性,而且颗粒可能在储存或给药后变得不稳定,并释放毒性分解产物,需要特别注意<sup>[37]</sup>。另外,小核酸药物因其自身的特点,如作用靶点为靶组织RNA,目前使用的评价模型与人类的基因组序列存在一定差异,因此把小核酸药物完全当成是化学合成药物进行评价有一定的局限性,亟需用更好的能模拟人体器官、生化信号和机械刺激等的模型来代替<sup>[38-39]</sup>。因此,为了加快推动小核酸药物的发展,不仅需要药物研发机构运用新的技术改进目前存在的问题,也期待各国药品监管部门尽快制定专门针对此类药物研发的指导原则,从监管和审评的角度给予支持。

### [参考文献]

- [1] LIU S, JAOUANNET M, DEMPSEY DA, et al. RNA-based technologies for insect control in plant production[J]. *Biotechnol Adv* 2020, 39: 107463.
- [2] SCOMPARIN A, POLYAK D, KRIVITSKY A, et al. Achieving successful delivery of oligonucleotides—from physico-chemical characterization to *in vivo* evaluation[J]. *Biotechnol Adv* 2015, 33 (6 Pt 3): 1294–1309.
- [3] BOBBIN ML, ROSSI JJ. RNA interference (RNAi)-based therapeutics: delivering on the promise[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2016, 56: 103–122.
- [4] MAKI K. Preclinical safety assessments of mRNA-targeting oligonucleotide therapeutics[J]. *Transl Regul Sci* 2020, 2(3): 90–93.
- [5] SAW PE, SONG EW. siRNA therapeutics: a clinical reality[J]. *Sci China Life Sci* 2020, 63(4): 485–500.
- [6] BENNETT CF. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age[J]. *Annu Rev Med* 2019, 70: 307–321.



- [7] DAVIS S, LOLLO B, FREIER S *et al.* Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides [J]. *Nucl Acids Res*, 2006, 34(8): 2294–2304.
- [8] WANG F, ZUROSKE T, WATTS JK. RNA therapeutics on the rise [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(7): 441–442.
- [9] 梁巧静, 郭健敏. 小核酸药物特点及其研究进展 [C]. 第九届药物毒理学年会——新时代·新技术·新策略·新健康论文集, 2019.
- [10] 王均, 王兰, 吕家臻, 等. 上市核酸药物的疗效分析和研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(18): 8.
- [11] CHI X, GATTI P, PAPOIAN T. Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics [J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(5): 823–833.
- [12] BARTOSZEWSKI R, SIKORSKI AF. Editorial focus: understanding off-target effects as the key to successful RNAi therapy [J]. *Cell Mol Biol Lett* 2019 24: 69.
- [13] KIM YK. RNA therapy: current status and future potential [J]. *Chonnam Med J* 2020, 56(2): 87–93.
- [14] MAGUREGUI A, ABE H. Developments in siRNA modification and ligand conjugated delivery to enhance RNA interference ability [J]. *Bio Chem* 2020, 21(13): 1808–1815.
- [15] LIMA JF, CERQUEIRA L, FIGUEIREDO C *et al.* Anti-miRNA oligonucleotides: a comprehensive guide for design [J]. *RNA Biol* 2018, 15(3): 338–352.
- [16] ÄMMÄLÄ C, DRURY WJ, KNERR L *et al.* Targeted delivery of antisense oligonucleotides to pancreatic  $\beta$ -cells [J]. *Sci Adv*, 2018, 4(10): 3386.
- [17] NIKAN M, TANOWITZ M, DWYER CA *et al.* Targeted Delivery of antisense oligonucleotides using neurotensin peptides [J]. *J Med Chem* 2020, 63(15): 8471–8484.
- [18] DONG Y, SIEGWART DJ, ANDERSON DG. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems [J]. *Adv Drug Deliv Rev* 2019, 144: 133–147.
- [19] BAN E, KWON TH, KIM A. Delivery of therapeutic miRNA using polymer-based formulation [J]. *Drug Deliv Transl Res* 2019, 9(6): 1043–1056.
- [20] 余珊珊, 胡晓敏, 王海学, 等. 治疗用单链寡核苷酸药物的非临床研究评价概述 [J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(10): 8.
- [21] FDA. Pharmacology review(s) for vitravene (fomivirsen sodium intravitreal injectable) injection [EB/OL]. (1998–08–26) [2021–02–01]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/98/20961\\_Vitravene\\_pharmr.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20961_Vitravene_pharmr.pdf).
- [22] FDA. Pharmacology review(s) for macugen (pegaptanib sodium) injection [EB/OL]. (2004–12–17) [2021–02–01]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2004/21-756\\_Macugen\\_pharmr.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/21-756_Macugen_pharmr.pdf).
- [23] FDA. Pharmacology review(s) for kynamro (mipomersen sodium) injection [EB/OL]. (2013–03–27) [2021–02–01]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2013/203568Orig1s000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/203568Orig1s000PharmR.pdf).
- [24] FDA. Pharmacology review(s) for exondys 51 injection (eteplirsen) [EB/OL]. (2016–10–26) [2021–02–01]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2016/206488\\_Orig1s000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/206488_Orig1s000PharmR.pdf).
- [25] FDA. Pharmacology review(s) for defitelio injection [EB/OL]. (2016–05–09) [2021–02–01]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2016/208114Orig1s000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/208114Orig1s000PharmR.pdf).
- [26] FDA. Pharmacology review(s) for spinraza (nusinersen) injection [EB/OL]. (2017–01–18) [2021–02–01]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2016/209531Orig1s000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/209531Orig1s000PharmR.pdf).
- [27] FDA. Pharmacology review(s) for tegsedi (inotersen) [EB/OL]. (2018–11–01) [2021–02–01]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2018/211172Orig1s000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/211172Orig1s000PharmR.pdf).
- [28] FDA. Multi-discipline review/summary, clinical, non-clinical for onpattro (patisiran) [EB/OL]. (2020–04–15) [2021–02–01]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2018/210922Orig1s000MultiR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210922Orig1s000MultiR.pdf).
- [29] FDA. Non-clinical review(s) for vyondys 53 (golodirsen) [EB/OL]. (2020–01–21) [2021–02–01]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2019/211970Orig1s000PharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/211970Orig1s000PharmR.pdf).
- [30] FDA. Multi-discipline review for Givlaari (givosiran) Injection [EB/OL]. (2019–12–16) [2021–02–01]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2019/212194Orig1s000MultidisciplineR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/212194Orig1s000MultidisciplineR.pdf).
- [31] EMA. Waylivra: EPAR-Public assessment report [EB/OL]. (2019–02–28) [2021–02–01]. [https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/waylivra-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/waylivra-epar-public-assessment-report_en.pdf).
- [32] EMA. CHMP summary of positive opinion for leqvio [EB/OL]. (2020–10–15) [2021–02–01]. [https://www.ema.europa.eu/documents/smop-initial/chmp-summary-positive-opinion-leqvio\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/smop-initial/chmp-summary-positive-opinion-leqvio_en.pdf).
- [33] YIN W, ROGGE M. Targeting RNA: a transformative therapeutic strategy [J]. *Clin Transl Sci* 2019, 12(2): 98–112.
- [34] GEARY RS, NORRIS D, YU R, *et al.* Pharmacokinetics, bio-distribution and cell uptake of antisense oligonucleotides [J]. *Adv Drug Deliv Rev* 2015, 87: 46–51.
- [35] BERMAN CL, BARROS SA, GALLOWAY SM, *et al.* OSWG recommendations for genotoxicity testing of novel oligonucleotide-based therapeutics [J]. *Nucl Acid Ther* 2016, 26(2): 73–85.
- [36] DAMMES N, PEER D. Paving the road for RNA therapeutics [J]. *Trends Pharmacol Sci* 2020, 41(10): 755–775.
- [37] SETTEN RL, ROSSI JJ, HAN SP. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(6): 421–446.
- [38] YU AM, CHOI YH, TU MJ. RNA drugs and RNA targets for small molecules: principles, progress, and challenges [J]. *Pharmacol Rev* 2020, 72(4): 862–898.
- [39] 王菲菲, 符合, 任进, 等. siRNA 药物研究进展 [J]. *中国新药杂志* 2022, 31(5): 427–434.

编辑: 王宇梅/接受日期: 2021–11–05