

日本药品和医疗器械管理局《寡核苷酸治疗产品非临床安全性评价指导原则》指南介绍

Introduction of guideline for non-clinical safety evaluation of oligonucleotide therapeutic products from Japan's National Agency for Medicines and Medical Devices

周宇, 王士奇, 孙涛,
王庆利, 叶旋

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京
100022)

ZHOU Yu, WANG Shi - qi,
SUN Tao, WANG Qing - li,
YE Xuan

(Center for Drug Evaluation, China
National Medical Products
Administration, Beijing 100022, China)

收稿日期: 2022-06-29

定稿日期: 2022-09-06

作者简介: 周宇(1986-)男, 硕士, 主要从事化
学药品、生物制品 IND/NDA 的非临
床技术审评工作

通信作者: 叶旋, 副研究员

Tel: (010) 85243172

E-mail: yex@cde.org.cn

摘要: 随着首款寡核苷酸药物 Fomivirsen 在 20 世纪 90 年代末获批上市, 该领域发展迅速, 目前已有上百个临床试验正在世界范围内开展。对于寡核苷酸类药物, 不同的药品监管机构虽然发布了一些指导原则和考虑要点文件, 但尚未形成完整的指导原则体系。日本药品和医疗器械管理局(PMDA)于 2020 年 3 月发布了《寡核苷酸治疗产品非临床安全性评价指导原则》, 较为系统地阐述了 PMDA 在寡核苷酸非临床安全性评价方面的一般考虑, 并提供了寡核苷酸类产品非临床安全性评价的基本框架, 对于各项安全性研究试验需要重点考虑的方面也提供了建议。本文通过对该指导原则的介绍, 并与现行非临床安全性评价相关指导原则进行比较, 探讨寡核苷酸药物非临床安全性评价的关注要点, 为我国寡核苷酸药物的相关研发和监管工作提供参考。

关键词: 寡核苷酸; 指导原则; 非临床安全性评价

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2022.22.028

中图分类号: R95 **文献标志码:** C

文章编号: 1001-6821(2022)22-2788-05

Abstract: With the approval of Fomivirsen in the late 1990s, the first oligonucleotide drug, the field is evolving rapidly. More than 100 clinical trials were conducted worldwide. Various regulatory agencies have issued guidelines and considerations for such drugs. However, a complete guiding principle system has not yet been formed. In March 2020, Japan's National Agency for Medicines and Medical Devices (PMDA) issued the guideline for the non-clinical safety evaluation of oligonucleotide therapeutic products. This guideline systematically expounds the general considerations of PMDA in the non-clinical safety evaluation of oligonucleotides, provides the basic framework for the non-clinical safety evaluation of oligonucleotides, and also provides suggestions for the key aspects to be considered in various safety research trials. By introducing this guideline and comparing with existing guidelines, we hope to discuss on the key points of the non-clinical safety evaluation of oligonucleotide drugs and provide some references for the study design and supervision of oligonucleotide drugs in China.

Key words: oligonucleotide; guideline; nonclinical safety evaluation

寡核苷酸药物是当前发展较为快速的领域, 在现行的人用药品

注册技术要求国际协调会议(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 安全性指导原则中, ICH S6《生物制品的临床前安全性评价》中提到“本指导原则可能也适用于寡核苷酸药物”,但寡核苷酸药物除了具有与生物制品相似的作用特点(靶点和种属特异性、非预期的脱靶效应^[1])外,还应关注其细胞内的作用,以及化学修饰的影响。因此,寡核苷酸药物的非临床安全性评价不仅需要参考ICH S6,还要考虑核酸药物的生物学特性,并参考化学药物的常规指导原则。本文通过介绍日本药品和医疗器械管理局(Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, PMDA)发布《寡核苷酸治疗产品非临床安全性评价指导原则》(后简称“Oligonucleotide Guideline”),并与国内现行非临床安全性评价相关指导原则进行比较,探讨寡核苷酸药物非临床安全性评价的关注要点,为我国寡核苷酸药物的相关研发和监管工作提供参考。

1 指导原则适用范围

Oligonucleotide Guideline 的适用范围为与特定核酸序列结合而产生生物学作用的线性 DNA、RNA 或经修饰的核酸,不涉及新的蛋白质合成。例如反义寡核苷酸、siRNA、miRNA,也可能适用于核酸适配体和诱饵核酸,不包括用于基因编辑的 mRNA 和 RNA, DNA/RNA 疫苗以及 CpG 寡核苷酸。Oligonucleotide Guideline 严格限定了适用范围,尤其是排除了新合成蛋白质的情况,减少了非临床安全性评价中相关问题的复杂性。

2 非临床安全性研究

在 Oligonucleotide Guideline 中,寡核酸非临床安全性研究内容包括评价药效和毒性的靶器官、剂量依赖性、暴露的量效关系、可恢复性。目前在先进治疗产品(区别于传统小分子药物、生物制品)的研发中,有部分观点认为核酸层面的干预可能没有经典的量效关系,也没有传统药理毒理学中暴露的概念。从 Oligonucleotide Guideline 看来, PMDA 认为寡核酸的生物学作用仍具有量效关系,且应基于暴露量来开展非临床安全性评价。

Oligonucleotide Guideline 认为,与常规药物的安全性评价相同,寡核酸的非临床安全性评价必须遵循非临床研究质量管理规范(Good Laboratory Practice, GLP)。如果寡核苷酸拟用于无有效治疗手段、严重威胁生命的疾病, Oligonucleotide Guideline 认为可参考 ICH S9《抗肿瘤药物非临床评价》,延后、简化、豁免一

部分的试验项目。Oligonucleotide Guideline 的这部分观点与现行的非临床研究评价策略一致,基于不同适应症临床试验受试者、患者的风险/获益来开展评价,而不局限于受试物本身。

2.1 评价策略

Oligonucleotide Guideline 要求全面评价受试物特征,并基于具体产品特点设计评价方案的关注重点。多数寡核苷酸药物(除适配体和诱饵核酸外)通过与靶核苷酸序列杂交,并在不合成新蛋白质的情况下引起生物反应。基于寡核苷酸药物的作用特点, Oligonucleotide Guideline 将寡核苷酸的毒性分为①靶向毒性,为靶点相关的药理学活性放大所引起的毒性反应;②杂交依赖的脱靶毒性,即与靶序列相似的序列杂交而产生的脱靶效应;③非杂交依赖的脱靶毒性,即不依赖于杂交,由寡核苷酸分子的结构和物理/化学性质所引起的脱靶毒性。Oligonucleotide Guideline 建议,对于靶向毒性,由于其高度的种属特异性和靶点特异性,可以参考 ICH S6 开展评价;对于杂交依赖的脱靶毒性,考虑到人与动物基因组的差异,建议采用生物信息学的方法和体外考察人源细胞基因表达的方法进行评价;对于非杂交依赖的脱靶毒性,由于来自其物理、化学性质,建议参考化学药物非临床评价的一般要求。

此外,具有相似结构和物理/化学性质的某一类寡核苷酸,可能会引起相类似的毒性反应,即类效应^[2],包括例如血浆蛋白结合(APTT 延长和补体激活)、免疫刺激^[3-4]、炎症反应以及肝肾毒性等^[5-6]。这个方面的信息也可作为同类寡核苷酸药物开发的重要参考。

2.2 种属选择

与化学药物和生物制品相似, Oligonucleotide Guideline 认为,寡核苷酸非临床安全性评价应采用 2 个动物种属。

对于脱靶毒性,寡核苷酸应在啮齿类和非啮齿类中开展非临床安全性评价。对于靶向毒性,可以在具有药理学活性的 1 种或 2 种动物中开展非临床安全性评价。当无药理学相关动物种属时,靶向毒性可采用在动物中具有药理学活性的替代物开展毒性研究。通常只在 1 个种属中采用替代物开展毒性研究。

在靶向毒性方面,对于动物种属的要求 Oligonucleotide Guideline 与 ICH S6 较为相似。ICH S6 中提到“安全性评估项目应该包括 2 种相关动物种属,但如只能确定 1 种,那 1 种相关动物种属也可能满足要求”以及“短期试验中 2 种动物的毒性特征相似时,随

后的长期试验可能仍有理由仅使用1种动物”。这是基于3R(减少/优化/替代)方面的考虑,但2个动物种属中的毒性反应相似时,1种动物的安全性研究可能已经足够暴露靶点相关的风险。而2个动物种属中的毒性反应是否相似,应根据受试物的特点,具体问题具体分析。

在脱靶毒性方面,Oligonucleotide Guideline 建议采用化学药物非临床评价的常规要求,采用啮齿类和非啮齿类2种动物评价其脱靶毒性。具体的实验动物选择一般应考虑代谢的种属差异以及同类产品的毒性特点,选择与人体具有相似代谢、同类产品毒性较为敏感的动物。此外,与生物制品的替代分子相比,替代寡核苷酸的制备速度更快,成本更低,这使得选择在结构、药代动力学(pharmacokinetics,PK)和药效学(pharmacodynamics,PD)等方面与临床候选药物相似的替代药物可以较为方便地实现。但是,任何与替代分子相关的毒理学发现都将包含靶向效应、替代分子杂交依赖性脱靶效应以及替代分子非杂交依赖性脱靶效应,应注意区分替代分子的靶向和脱靶效应。替代分子的脱靶效应不应该用来评价临床候选物的安全性。

2.3 重复给药毒性试验设计

2.3.1 高剂量的选择

Oligonucleotide Guideline 认为有必要设置多个剂量组考察寡核苷酸药物的靶向毒性和脱靶毒性。对于靶向毒性,与生物制品相似,参考ICH S6的建议,高剂量组应产生最大的药理学作用。对于脱靶毒性,参考ICH M3(R2),高剂量组设置一般为最大耐受剂量(maximum tolerated dose,MTD)、暴露饱和剂量、最大可行剂量(maximum feasible dose,MFD)、50倍临床暴露量或限制剂量($1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

2.3.2 分组

Oligonucleotide Guideline 建议设置3个剂量组以考察受试物潜在的量效关系。在此处,Oligonucleotide Guideline 再次强调了寡核苷酸安全性评价中量效关系的重要性。采用替代物的试验,可以不单独进行,可在原有试验中增加1个组以考察替代物新增的药理学作用。

2.3.3 其它

试验的给药途径、给药方案、试验期限、恢复期均参考ICH M3的相关建议。

2.4 时间安排

寡核苷酸非临床安全性评价的时间安排参考ICH M3。Oligonucleotide Guideline 是在小分子药物、生

物制品非临床安全性评价的现有框架下,设计的寡核苷酸的非临床安全性评价体系。

2.5 代谢/降解产物

通过核酸酶自然降解的产物不是寡核苷酸安全性评价需要特别关注的方面。但是,化学修饰寡核苷酸的代谢或降解产物一般应参考ICH M3,作为常规化学药物来开展非临床安全性评价。

2.6 杂质

在Oligonucleotide Guideline 中,寡核苷酸杂质分为寡核苷酸相关物质、有机小分子杂质、残留溶剂和元素杂质。与多个ICH、美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,FDA)指导原则所体现的观点一致,在寡核苷酸的生产过程中,应尽量降低杂质水平,而不是通过非临床安全性评价来为杂质设置安全的限度;此外,杂质的安全性应基于药学研究、非临床研究数据、文献资料来综合评价。

由于物理化学性质相似,寡核苷酸相关物质常常难以分离,难以参考ICH Q3A来界定。因此,寡核苷酸相关物质的安全性评价基于受试物整体的安全性试验数据。寡核苷酸关于杂交依赖脱靶毒性的生物信息学分析可以用于评价寡核苷酸相关物质的杂交依赖脱靶毒性。当寡核苷酸相关物质显著低于寡核苷酸时,其脱靶毒性不是安全性评价的重点。

小分子杂质、残留溶剂和元素杂质的评价参考ICH Q3、M7指导原则。

2.7 递送系统

由于核酸不稳定,核酸类药物的递送系统在很大程度上影响药物的安全性和有效性。Oligonucleotide Guideline 认为,评价寡核苷酸最终制剂(结合物质、脂质体)的安全性是非常重要的^[7]。寡核苷酸药物载体物质的安全性可基于浓度水平和已有的数据开展评价。

3 具体试验研究的考虑

3.1 毒代动力学和PK

与传统小分子药物、生物制品相似,Oligonucleotide Guideline 再次强调基于系统暴露开展寡核苷酸的毒代动力学和PK试验,体现了日本监管机构对此类药物量效关系的关注。

3.2 安全药理学

对主要生理功能(如心血管、呼吸和中枢神经系统)的非预期药效学作用应参考ICH S7A《人用药物安全药理学试验指导原则》进行评价,但不一定需要独立的安全药理学试验。由于寡核苷酸药物不太可能作用于hERG之类的离子通道,开展体外hERG试

验意义不大^[8-9]。如果在研发过程中,发现了安全药理学毒性风险,有可能需要开展针对性的体外评价。

3.3 单次给药毒性试验

如果可从剂量递增试验、短期剂量范围探索试验、药理学试验或重复给药毒性试验中获得急性毒性信息,可不开展单独的单次给药毒性试验。

ICH M3(R2)和S6(R1)有类似的观点。M3(R2)指出,当在剂量递增或短期剂量范围试验中获得时,不建议进行单独的单次给药毒性试验。S6(R1)中也提到可将单次给药毒性试验作为药理学试验的一部分。

3.4 重复给药毒性试验

该试验重点关注:①重复给药后,寡核苷酸在特定器官的蓄积情况;②毒性反应情况的评估。试验的给药期限和实施时间安排参考ICH M3(R2)。

寡核苷酸主要分布在肝、肾等组织,一些经化学修饰具有抗核酸酶活性的寡核苷酸药物,长期给药后,可能会在特定组织中积累并产生毒性反应^[10]。在寡核苷酸药物的重复给药毒性试验中,组织病理学检查常发现肝和肾存在嗜碱性颗粒,蓄积程度呈剂量依赖性。出现嗜碱性颗粒可能是细胞摄取寡核苷酸的适应性改变;出现嗜碱性颗粒的蓄积与毒性反应的发生和严重程度相关,高剂量下嗜碱性颗粒大量蓄积时可观察到病理损伤以及功能障碍(肝细胞空泡化或变性/坏死、肝功能改变等)。

3.5 遗传毒性

Oligonucleotide Guideline认为,由天然核酸组成的核酸药物不必开展遗传毒性试验;对于化学修饰的核酸药物的评价,应参考ICH S2(R1)《人用药物遗传毒性试验和结果分析指导原则》。

寡核苷酸药物遗传毒性试验的经验在积累之中。目前获得的信息与Oligonucleotide Guideline的建议基本一致,遗传毒性标准试验组合尚未检测到寡核苷酸药物的遗传毒性;而有研究表明一些被降解并整合入DNA的化学修饰寡核苷酸可能会引起基因毒性^[11]。

3.6 生殖毒性

寡核苷酸的生殖和发育毒性(developmental and reproductive toxicology, DART)试验在考虑临床应用和目标疾病后,原则上参考ICH S5(R3)《人用药物生殖与发育毒性检测》。基于临床适应症的风险获益分析,这也是目前药物评价的策略。对于严重威胁生命又没有有效治疗手段的疾病,药物的非临床研发计划可以进行一定的调整。

啮齿类动物通常用于生育力和围生期试验。啮齿类动物和兔通常用于胚胎-胎仔发育(embryo-fetal developmental, EFD)研究。当临床候选物在上述种属中没有药理学活性时,无需对非人灵长类(non-human primate, NHP)进行EFD试验。作为代替,在EFD试验中常用的种属(啮齿类和兔)中使用替代分子是可以接受的,因为采用这些动物种属开展DART试验是具有很多优势的。DART的实施时间可参考ICH M3(R2)。

当证据权重分析(作用机制,基因修饰动物的表型数据,类效应等)认为在生育力或者妊娠结果方面出现明显药物不良反应时,这些数据可以提供足够的信息来提示生殖的风险,不推荐再开展更多生殖毒性的非临床试验。这部分观点与ICH S6基本一致。

3.7 致癌性

关于进行致癌性试验的必要性,可参考ICH S1A《药物致癌性试验必要性指导原则》,ICH S1B《药物致癌性试验》和ICH S1C(R2)《药物致癌性试验的剂量选择》。当由于作用机制(如免疫抑制)而引起对致癌性的担忧时,当遗传毒性试验、重复给药毒性试验或杂交引起的脱靶毒性评估均提示致癌性担忧时,很难通过非临床安全性试验排除这种担忧。应结合临床风险和获益进行合适的风险评估。

Oligonucleotide Guideline在ICH S1、S6的框架中考虑寡核苷酸的致癌性要求,所采用的评价策略与目前传统小分子药物、生物制品也基本一致。

3.8 局部耐受性

如果可以在重复给药毒性等试验中评估给药部位,则可不进行独立的局部刺激性试验。

3.9 免疫毒性试验

如果可以根据重复给药毒性等试验的结果进行评价,则可不进行独立的免疫毒性试验。如适用,参考ICH S8《人用药物免疫毒性研究》。

3.10 光毒性

对于化学修饰的核酸,如果存在特殊的光安全性问题,参考ICH S10《药物光安全性评价》。

4 讨论

目前已有超过10款药物获FDA批准上市,部分产品同时在欧洲和日本获批,已上市的寡核苷酸药物种类包括反义核酸(antisense oligonucleotides, ASO),小干扰核酸(siRNA),核酸适配体(aptamer),在研的还包括微小核酸(miRNA)、诱饵核酸(decoyRNA)等。随着研发技术的创新进步,还可能出现新型的寡核苷

酸药物。一方面此类产品的非临床安全性研究与评价经验在逐步积累,但一方面研发中的非临床安全性评价的相关问题也愈加突出和紧迫。关于寡核苷酸非临床安全性评价的相关考虑,FDA 药理毒理审评部门曾发布白皮书^[12],美国、欧洲的制药企业、学术团体和监管机构专家组成的寡核苷酸安全工作组(Oligonucleotide Safety Working Group,OSWG)也发表过多篇文章来探讨这些问题,但是在相当一段时期内,寡核苷酸治疗产品非临床安全性评价尚未有专门的指导原则。

PMDA 关于寡核苷酸药物非临床安全性评价的指导原则,遵循了相关 ICH 指导原则的建议,延续了小分子药物、生物制品、非临床评价的一般要求,并针对寡核苷酸的特点提出非临床安全性评价的关注要点。Oligonucleotide Guideline 将寡核苷酸的毒性风险分为靶点相关的毒性和脱靶毒性,其中脱靶毒性又分为杂交依赖和杂交非依赖的情况。针对不同的毒性风险,Oligonucleotide Guideline 提供了不同的评价建议。在具体的试验实施中,Oligonucleotide Guideline 多次强调寡核苷酸的系统暴露、药效/毒性的量效关系,强调非临床安全性评价应基于暴露量来开展。寡核苷酸药物仍在不断发展中,其载体技术也不断更新(外泌体、脂质体等)^[13],非临床安全性研究与评价的经验也在不断积累,具体试验的建议可能会随技术和认知的进步不断完善。寡核苷酸药物如果采用了质粒、病毒等涉及体内转录的载体,其非临床评价还需要考虑载体相关的生物学特征。在开展寡核苷酸具体产品的非临床研究时,应考虑产品本身特点,结合临床拟用情况,具体问题具体分析,综合评价风险获益。

参考文献:

- [1] KORNBRUST D, CAVAGNARO J, LEVIN A, et al. Oligo safety working group exaggerated pharmacology subcommittee consensus document[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2013 23(1): 21-28.
- [2] YOUNIS H S, TEMPLIN M, WHITELEY L O, et al. Overview of the nonclinical development strategies and class-effects of oligonucleotide-based therapeutics//FAQI A S. A *Comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development. Second Edition* [M]. Cambridge: Academic Press, 2017: 737-754.
- [3] KLINMAN D M, YI A K, BEAUCAGE S L, et al. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12 and interferon γ [J]. *Molecular Medicine Today*, 1996 2(6): 2879-2883.
- [4] SENN J J. Non-CpG-Containing antisense 2'-methoxyethyl oligonucleotides activate a proinflammatory response independent of Toll-Like receptor 9 or myeloid differentiation factor 88 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005 314(3): 972-979.
- [5] 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.
- [6] BURDICK A D, SIMONE S, MANTENA S R, et al. Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid-modified antisense oligonucleotides [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014 42(8): 4882-4891.
- [7] ZUCKERMAN J E, DAVIS M E. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015 14(12): 843-856.
- [8] STANSFELD P J, SUTCLIFFE M J, MITCHESON J S. Molecular mechanisms for drug interactions with hERG that cause long QT syndrome [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006 2(1): 81-94.
- [9] KIM T W, KIM K S, SEO J W, et al. Antisense oligonucleotides on neurobehavior, respiratory, and cardiovascular function, and hERG channel current studies [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2014 69(1): 49-60.
- [10] SHEN X, COREY D R. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018 46(4): 1584-1600.
- [11] BERMAN C L, BARROS S A, GALLOWAY S M, et al. OSWG Recommendations for Genotoxicity Testing of Novel Oligonucleotide-Based Therapeutics [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2016 26(2): 73-85.
- [12] DEGEORGE L E, CAVAGNARO J J, JORDAN J A, et al. Regulatory considerations for evaluating the pharmacology and toxicology of antisense drugs [J]. *Antisense Res Dev*, 1993 3(4): 399-404.
- [13] ROBERTS T C, LANGER R, WOOD M. Advances in oligonucleotide drug delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020 19(10): 673-694.

(本文编辑 孟海峰)