

## 寡核苷酸药物的临床药理学研究进展

汤仙阁, 关晓多, 陈锐\*, 胡蓓\*

(北京协和医院临床药理研究中心, 创新药物临床PKPD研究北京市重点实验室, 北京 100032)

**摘要:** 一些罕见、难治愈疾病仍然难以攻克, 继化学小分子和单克隆抗体药物之后, 寡核苷酸药物因其在RNA水平上调控疾病基因转录翻译的独特机制, 有望填补空白治疗领域。此外最近3年FDA批准6个寡核苷酸药物, 吸引制药行业广泛关注这个领域。作为新一类药物分子, 寡核苷酸药物极性大、带电荷、需要借助化学修饰和递药系统改善成药性, 因而具有不同于化学小分子和单抗药物的临床药理学特性, 为临床早期研发带来新挑战。本文主要从寡核苷酸药物的技术发展、作用机制、人体药代动力学、药效和安全性的角度综述其特征。

**关键词:** 寡核苷酸; 化学修饰; 药物递送; 药代动力学; 药效; 安全性

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)02-0218-08

## Progress in clinical pharmacology of oligonucleotides

TANG Xian-ge, GUAN Xiao-duo, CHEN Rui\*, HU Pei\*

(Clinical Pharmacology Research Center, Peking Union Medical College Hospital, Beijing Key Laboratory of Clinical PK and PD Investigation for Innovative Drugs, Beijing 100032, China)

**Abstract:** Following small molecules and monoclonal antibodies, oligonucleotides are expected to overcome the rare and refractory human diseases. It has been attracted the attention of the pharmaceutical industry since the approval of six oligonucleotides in recent years because of their unique mechanism of regulating disease gene transcription at the RNA level. As a new class of drug molecules, oligonucleotides are highly polar, charged, and need to be improved by means of chemical modification and drug delivery systems. And therefore, they have different clinical pharmacology properties compared with chemical molecules and monoclonal antibodies, which pose new challenges for early clinical development. This paper reviews the characteristics of oligonucleotides from the perspective of technological development, mechanism of action, human pharmacokinetics, efficacy and safety.

**Key words:** oligonucleotides; chemical modification; drug delivery; pharmacokinetics; efficacy; safety

寡核苷酸药物 (oligonucleotides, ONs) 是由人工化学合成的12~30个核糖寡核苷酸单链或双链组成的一类药物, 通过Watson-Crick碱基配对原则作用于目标信使RNA (mRNA)<sup>[1]</sup>, 主要分为反义寡核苷酸药物 (antisense oligonucleotides, ASOs) 和小干扰RNA药物 (small interference RNA, siRNA) 两大类。

虽然人工合成寡核苷酸调节靶向基因表达的概念在40年前就被提出<sup>[2]</sup>, 但是因为核酸的药理学成药性差、脱靶毒性、递药系统等技术瓶颈没有解决, 主要用于细胞或动物科研实验中的基因敲除<sup>[3]</sup>。随着过去20年化学和生物技术的发展, 一些关键技术难题被攻克, 全球迎来核酸类药物研发热潮。

2016至2019短短3年间, 美国FDA就批准了4个反义寡核苷酸类药物 (Defibrotide、Eteplirsen、Nusinersen和Inotersen) 和2个siRNA药物 (Patisiran、Givosiran), 其调节转录翻译的机制引起制药行业关注。一些罕见、疑难疾病, 如遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样

收稿日期: 2019-10-23; 修回日期: 2019-12-17.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助 (2016-I2M-1-010).

\*通讯作者 Tel: 86-10-69158367, E-mail: chenrui04@126.com;

Tel: 86-10-69158366, E-mail: hubei01\_pumch@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0834

变性、杜氏肌萎缩症、乙型肝炎等仍然不能得到有效治愈, 核酸类药物通过基因敲除或者剪接调控机制有望填补小分子药物和单克隆抗体药物的空白治疗领域<sup>[4]</sup>。目前全球有 50 多个寡核苷酸药物处于不同的临床研究阶段<sup>[5]</sup>, 覆盖罕见病、难治愈疾病多个治疗领域。中国寡核苷酸药物的研发公司多处于起步阶段, 主要集中在昆山小核酸产业基地<sup>[6]</sup>。

本文主要从寡核苷酸药物的技术发展、临床药理学(包括作用机制、药代动力学、药效和安全性)的角度综述其特征。

## 1 成药性改造面临的挑战

### 1.1 化学修饰

未经化学修饰的寡核苷酸药物成药性通常不理想。它们具有较差的 PK 特性, 比如稳定性差, 易被核酸酶降解; 极性大, 很难进入细胞, 分布特性差; 对目标 mRNA 的结合亲和力不佳。为了达到临床效用, 寡核苷酸必须经过化学改造(图 1)。目前广为使用的结构改造的基础骨架是磷硫(PS)修饰, 即将非桥接的磷酸二酯氧替换成硫原子。PS 骨架的修饰减少了寡核苷酸的亲水性、增加了对核酸酶降解的抵抗力以及增加了其与血浆蛋白结合<sup>[5]</sup>, 进而使得寡核苷酸稳定性增加, 减少肾小球滤过到尿液中排泄<sup>[7,8]</sup>。PS 骨架的改造虽然改善了部分 PK 特性, 使其系统暴露增加进而增加细胞摄取和转运, 但是单一的 PS 骨架修饰不能保障寡核苷酸不被酶降解, 并且在高浓度时这种修饰降低了寡核苷酸和靶标的亲和力, 使机体产生炎症反应<sup>[5,7,9]</sup>。为了进一步增加靶标结合亲和力、抵抗核酸酶降解、减少促炎症反应, 在 20 世纪 90 年代出现了具有糖基修饰的二代寡核苷酸药物<sup>[5,8,10]</sup>。二代寡核苷酸是在 PS 骨架修饰的基础上将 2'-羟基(2'-hydroxyl, 2'-OH) 替换成 2'-甲氧基(2'-O-methyl, 2'-O-Me)、2'-甲氧乙氧基(2'-methoxyethyl, 2'-MOE)、2'-氟(2'-fluoro, 2'-F) 或者引入构象约束结构, 比如锁核酸(locked nucleic acid, LNA)

以及它的甲基化衍生物即约束乙基(constrained ethyl, cEt)<sup>[7]</sup>。2'-F 或者 2'-O-Me 20 世纪 60 年代就合成了, 但是 30 年后才应用到临床治疗中。2'-O-Me 的修饰提高了靶标亲和力、核酸酶降解的抵抗力以及减弱 PS 骨架引起的免疫刺激性<sup>[9]</sup>。在 2'-O-Me 基础上, 2'-MOE 可以进一步增加靶标结合亲和力和抵抗核酸酶降解。而相对于 2'-MOE, LNA、cEt 结构降低了构象灵活性, 与靶标亲和性增加了 5~10 倍<sup>[5,7]</sup>。然而 LNA 和 cEt 报道和肝毒性有关, 这种肝毒性可能由脱靶降解不匹配的 RNA 造成<sup>[7]</sup>。目前仍在探索其他的结构化学改造方式, 2'-MOE 在反义寡核苷酸药物中应用最多。上市的 Mipomersen、Nusinersen 和 Inotersen 均是这种化学修饰, 同时还有 20 多个同类药处于临床不同研究阶段。但是对于 siRNA 而言, 2'-MOE 改造应用有限, siRNA 广泛应用 2'-F 或者 2'-O-Me, 如上市的 Patisiran, 同时应用了 2'-F 和 2'-O-Me 修饰<sup>[5]</sup>。

### 1.2 细胞内递送

单克隆抗体药物通常和细胞外的可溶性靶标或者细胞表面的靶标结合发挥治疗作用, 而寡核苷酸药物必须进入细胞才能产生药理活性<sup>[8,11]</sup>。和小分子相比, 寡核苷酸药物的分子质量较大(6~14 kDa), 高度带负电, 亲水性高, 不易透过脂质双分子层和血脑屏障<sup>[12,13]</sup>。

没有递送系统的 ASOs (~7 kDa), 大多数通过网格蛋白或者小窝蛋白介导的胞饮作用摄取进细胞。寡核苷酸的细胞内化分为“有效途径”和“无效途径”<sup>[14,15]</sup>。“有效途径”有依赖于非巨胞饮作用和内含体的细胞内分布, 寡核苷酸从内含体逃逸出来, 进入细胞质或细胞核内发挥药理作用<sup>[16]</sup>, 而“无效途径”也就是巨胞饮途径, 导致寡核苷酸聚集在溶酶体中被降解或清除出细胞<sup>[16]</sup>。在内含体中有很多和先天免疫相关的 Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs), 当 TLRs 识别进入内含体的 ONs 可能会引起干扰素和其他细胞因子的激活<sup>[17]</sup>。这个问题在第一代核酸类药物中比较常见, 第二代核

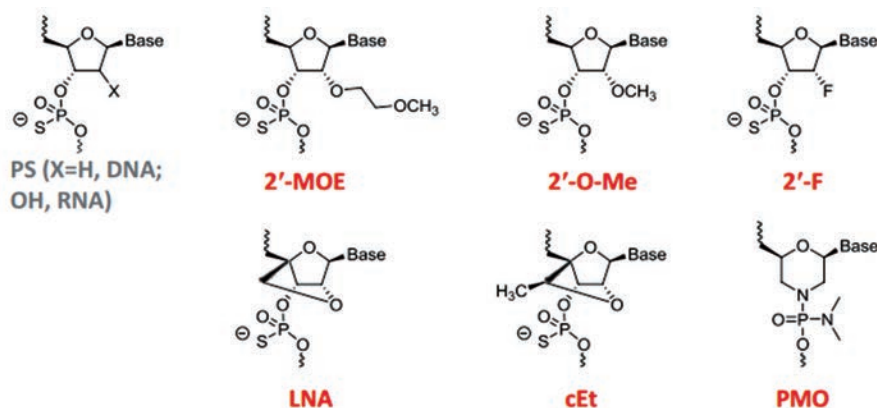


Figure 1 Common chemical modifications for the ASOs and siRNAs approved and in clinical trials

酸经过核糖骨架的 2'-*O*-甲基等修饰很大程度上解决了这个问题<sup>[18]</sup>。

和分子质量~7 kDa的 ASOs相比, 分子质量~14 kDa 的双链 siRNA 因为较大分子体积和亲水性, 经细胞摄取有限。为了增加细胞摄取, siRNA 通常连接靶向配体, 比如 *N*-乙酰半乳糖胺 (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc)<sup>[19]</sup> 或包裹在脂质纳米粒中<sup>[20,21]</sup>:

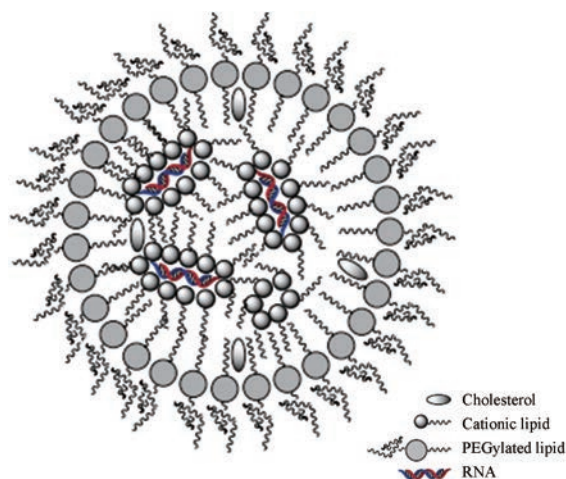
**1.2.1 siRNA-GalNAc** 和 siRNA 连接的 GalNAc 可以被去肝细胞表面唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR) 识别, 并将其摄取进靶向的肝细胞中。ASGPR 是一种 C 类凝集素, 肝脏细胞表面高度特异表达, 在肝肾以外的组织中表达低于 5%<sup>[22]</sup>, 主要功能是清除血液中的去唾液酸化的糖蛋白, 每个肝细胞表达 0.5~1 百万个拷贝的 ASGPR, 在种属间具有高度保守性<sup>[23]</sup>, 它内化迅速, 约 15 min 即可循环到肝细胞表面, 是靶向肝脏的理想受体。ASGPR 的最佳识别配体是 3 个 *N*-乙酰半乳糖胺<sup>[24]</sup>, 利用这一点, 在 siRNA 正义链的 (sense strand, SS) 3' 端连接三触角的 GalNAc 可以实现 siRNA 向肝细胞的靶向运载 (图 2)。当 siRNA-GalNAc 进入肝细胞内含体中, 其较低的 pH 使得 ASGPR 与 siRNA-GalNAc 解离, ASGPR 循环至肝细胞表面, 而 siRNA-GalNAc 逃逸至细胞质或转运至溶酶体中<sup>[20]</sup>。



**Figure 2** siRNA conjugation with a trivalent GalNAc ligand at the 3' end of the sense strand allows for targeting to the ASGPR on hepatocytes. SS: sense strand, AS: antisense strand

**1.2.2 LNPs (lipid nanoparticles)** 脂质纳米粒递送系统的基础是阳离子脂质体, 经过多年的发展, 目前应用的脂质多具有低毒、生物可降解、pH 敏感等特性。构建这种递送系统需要 3 种物质<sup>[21]</sup>(图 3), 按照从里到外层的顺序依次是: ① 阳离子脂质, 可电离的阳离子脂质体纳米粒可以通过静电作用封装具有聚阴离子中心的 siRNA (带负电荷) 以形成 LNPs/siRNA 复合物<sup>[25]</sup>; ② 辅助脂质即促融合磷脂, 通过破坏细胞膜脂质双层结构, 增加 LNPs 的转染活性; ③ 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 脂类, 通过增加胶体稳定性和保护 LNPs 免受巨噬细胞的侵袭而降低免疫反应, 过多的 PEG 脂类会阻碍 LNPs 的细胞内化。填充以上 3 种脂质间空隙的一般是胆固醇, 用于稳定 LNPs。脂质种类的选择、比例、浓度、生成温度、pH 等工艺都要经过严格优化。

和上面提到 ONs 的内吞一样, LNPs 也经组织细胞内吞进入内含体中, 然后释放出来。实现 LNPs 细胞



**Figure 3** Schematic structures of lipid nanoparticles

靶向的方法常用的有, 在脂质纳米粒上连接配体如 GalNAc 靶向肝细胞表面的 ASGPR 受体<sup>[26]</sup>或连接配体透明质酸特异结合 CD44 受体<sup>[27]</sup>等, 也可和单抗结合后, 引导 LNPs 进入感兴趣的靶组织<sup>[28,29]</sup>。

第一个上市的 siRNA 药物 Patisiran 就是通过脂质纳米粒 (lipid nanoparticles, LNPs) 包裹递送到肝脏。然而 Patisiran 脂质纳米粒制剂会引起促炎症反应, 在治疗前需要输注皮质类固醇、对乙酰氨基酚和抗组胺药物减缓给药后的炎症反应<sup>[30]</sup>。因此直接连接靶向配体的 siRNA 递药策略似乎更有发展前景。寻找靶向除肝脏之外组织的共轭配体仍是十分活跃的研究领域<sup>[7,11]</sup>。目前, 临床在研的 siRNAs 有 10 多个采取纳米颗粒包裹运载, 更多的是采取 siRNA-GalNAc 技术<sup>[5]</sup>。共轭配体技术和 LNPs 同样也适用于 ASOs<sup>[31]</sup>。

### 1.3 非预期的寡核苷酸毒性

细胞内递送提到 ONs 在内含体中被 Toll 样受体识别, 激活先天免疫的问题已经通过核糖骨架结构改造改善。临床试验显示 LNPs 包裹的寡核苷酸药物赋形剂随时间发生降解, 引起剂量限制性毒性, 选择安全低毒的材料是关键<sup>[32]</sup>。除此之外, LNPs 还会引发静脉输注的免疫反应, 需要在给药前给予糖皮质激素和抗过敏药物治疗 (见 1.2)。

尽管 RNAi 可以特异性地针对目标基因, 但一些脱靶 RNAi 沉默 (off-target RNAi silencing) 偶有发生<sup>[33,34]</sup>, 解决的办法如选择疾病高特异性 RNA 作为靶标、靶向递送, 并在多个种属中开展临床前实验, 开展人体试验之前, 在灵长非人类动物中的筛选显得尤为关键。近期有证据显示过大的剂量的 ONs 可能是引起脱靶效应的原因之一<sup>[33]</sup>, 因此不能为了追求最大药效而忽略毒性问题, 剂量优化是临床试验的主要任务之一。Alnylam 最近还研发了专门的 ASOs, 用于逆转

siRNA 在体内的活性<sup>[35]</sup>。

## 2 寡核苷酸类药物的作用机制

寡核苷酸药物通过 Watson-Crick 配对, 以高选择性、亲和性和目标 RNA 结合, 利用内源性核酸酶降解目标 RNA 或通过立体阻断核糖体机制调节 RNA 剪接和翻译过程 (图 4)。

### 2.1 RNase H1 酶降解机制

RNase H1 酶是内源性核酸酶家族的一种。利用这种机制, 沉默目标 RNA 的 ASOs 药物的一端至少要连接 5 个连续的 DNA 脱氧核糖核苷酸序列 (gapmer ASO), 7~10 个最佳<sup>[1]</sup>。ASOs 和目标 mRNA 结合以后, RNA-DNA 异源双链核酸序列就会被 RNase H1 所识别, 引起 mRNA 链被特异性剪切, 而含有 DNA 序列的 ASOs 仍然被完整保留, 继续作用于其他目标 mRNA。目标 mRNA 沉默以后进而使和疾病相关的蛋白表达减少<sup>[8]</sup>。已经上市的 Fomivirsen、Mipomersen 和 Inotersen 均是利用这种机制<sup>[4]</sup>。

### 2.2 Ago2 酶降解机制

这个过程是利用了体内普遍存在的内源性 microRNA 调控基因表达的机制。人工合成的 siRNA 包括正义链 (SS) 和反义链 (AS), 进入细胞质以后加载到 RNA 干扰蛋白 (Dicer and TAR RNA-binding protein, TRBP) 并和 Argonaute 2 (Ago2) 形成 RISC (RNA-induced silencing complex, RISC) 加载复合物, 之后, 正义链被舍弃, 反义链被留下来用于配对识别目标

RNA, Ago2 发挥剪切作用<sup>[36]</sup>。从 siRNA 的双链中选择其中一条作为反义链并不是随机的。这种不对称链选择取决于 siRNA 每条链末端的前 1~4 个碱基的相对热力学稳定性, 5'端不太稳定的链作为反义链, 而另一条链被丢弃<sup>[37]</sup>。反义链 5'端的磷酸基团衍生化形式也会影响正义链丢弃或裂解效率<sup>[5,38]</sup>。

### 2.3 非降解机制

大多数哺乳动物蛋白编码 RNA 经历一系列复杂的加工过程: 添加 5'-cap 结构, 去除大段 RNA 序列、剪拼到一起, 并在 RNA 的 3'端添加聚腺苷酸 (polyadenylate polyA, polyA) 尾巴<sup>[1]</sup>。不同于 2.1 与 2.2 中酶降解机制, 可以设计各式各样的 ASOs 作为空间阻滞剂调控 mRNA 成熟翻译的过程, 包括调控拼接去降低疾病蛋白质的翻译、恢复功能蛋白、阻碍目标 RNA 和关键蛋白相互作用<sup>[39]</sup>, 如治疗杜氏肌营养不良 Eteplirsen 设计为引起外显子跳读或治疗脊髓性肌萎缩 Nusinersen 促进包含外显子 7 而形成完整的存活运动神经元 1 样 mRNA。利用这个作用机制的 ONs 在设计结构时, 应避免成为 RNase H1 和 Ago2 的降解底物<sup>[4]</sup>。

## 3 药代动力学 (PK) 特征

寡核苷酸药物的 PK 特征和核苷酸的一般理化性质、化学修饰、载药系统、偶联物性质密切相关, 大多与核苷酸序列无关, 比如 2'-MOE 修饰的反义寡核苷酸药物的理化性质相近, PK 行为在大鼠、犬、猴、人中较为一致<sup>[4,40,41]</sup>。化学小分子、寡核苷酸及单抗药物的主要

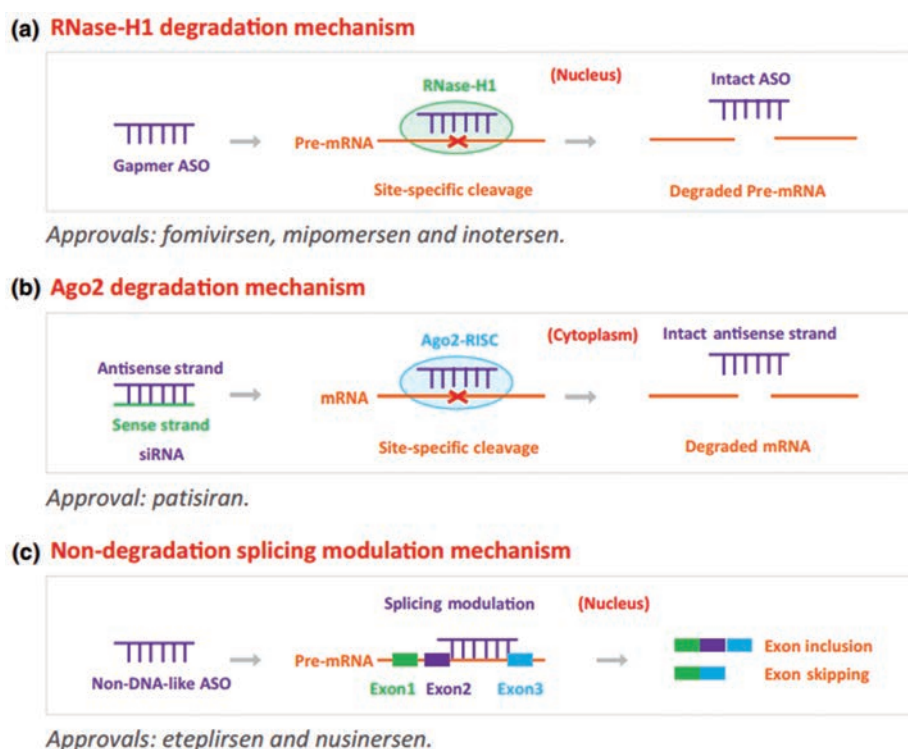


Figure 4 Schematic illustration of three common mechanisms adopted by the approved ASOs and siRNA

PK 特性见表 1。

### 3.1 反义寡核苷酸 (ASOs)

大多需要全身暴露的 ASOs 通过皮下 (sc) 或者静脉输注 (iv) 给药, 有少量报道核酸药物经口服给药, 但生物利用度不足 10%<sup>[42,43]</sup>。ASOs 经皮下给药的生物利用度一般较高, 在猴中报道达到 80%~100%<sup>[13,40]</sup>, 吸收迅速, 3~4 h 达到峰浓度 ( $C_{max}$ )。ASOs 还可以从玻璃体内或鞘内等局部注射实现局部治疗, 鞘内给药后可以广泛分布在中枢神经系统 (脊髓和大脑), 如治疗脊髓性肌萎缩的 Nusinersen 是直接鞘内注射 (Nusinersen, Pharmacology Review, FDA 2016)。

无论是静脉注射还是皮下注射, 血浆浓度以多相的方式从  $C_{max}$  迅速下降, 并在几分钟到几小时内从血浆快速分布到组织, 随后是一个或多个较慢的处置阶段, 长达 4 周至 2 个月的最终消除半衰期<sup>[13]</sup>。血浆中较长的末端消除半衰期代表了组织向血浆室的再分布, 反映了组织细胞向细胞外液和血浆室的缓慢转移。在组织向血浆再分布的阶段, 血浆和肝脏的药物浓度一般成相对固定比例, 如 2'-MOE ASOs 的血浆: 肝脏浓度比约为 1:5 000, 这一比例在不同种属间保持一致<sup>[44,45]</sup>, 提示可以用检测到的血浆药物浓度来推算肝脏部位蓄积的药物浓度。

ASOs 随血流循环至全身, 分布肝脏和肾脏的药物超过 80%<sup>[13]</sup>, 主要经血液和组织中的核酸外切酶和内切酶代谢, 因此 ASOs 半衰期和 2'化学修饰的代谢稳定性相关。原型和核酸酶代谢产物主要经尿液排泄<sup>[41]</sup>。除了吗啉代 ASOs, 其他 ASO 含有的 PS 骨架使其能够和白蛋白发生广泛结合<sup>[5]</sup>, 血浆蛋白结合率大于 85%, 高蛋白结合率有效减少肾小球滤过和尿排泄<sup>[13]</sup>。批准上市的吗啉代 ASO 药物 Eteplirsen 的蛋白结合率 6.1%~16.5%, 尽管经过化学修饰具有良好的代谢稳定性, 其

24 h 内肾脏排泄清除率达 60%~70% (Eteplirsen, Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review FDA 2016)。

### 3.2 小干扰 RNA (siRNA)

几乎所有需要全身暴露的 siRNA 都通过皮下 (sc) 或者静脉输注 (iv), 没有报道核酸药物经口服给药。包裹在脂质纳米粒的 siRNA 只能采取静脉注射的方式给药, 如 Patisiran<sup>[46]</sup>。目前在研的 GalNac-siRNA 多采用皮下给药方式<sup>[47,48]</sup>, 生物利用度未见报道, 吸收迅速, 给药后 2~6 h 可以达到  $C_{max}$ <sup>[47]</sup>。siRNA 也可以实现玻璃体内或鞘内等局部注射治疗, 如终止研发的 Bevasiranib 是靶向 VEGFR 的 siRNA, 玻璃体内注射治疗湿性黄斑变性<sup>[49]</sup>。

不同于大多数的 ASOs 药物, siRNA 蛋白结合率较低, 主要分布器官同样为肝脏和肾脏。上市的 Patisiran 蛋白结合率小于 2.1%, 从血浆室快速清除, 血浆末端半衰期 3 天 (Patisiran, Highlights of Prescribing Information 2018, FDA)。因此, siRNA 药物除了需要化学修饰避免核酸酶降解, 还需要递药系统的庇护进入靶器官, 免于被肾脏排泄和核酸酶降解。Patisiran 做成脂质纳米粒增加肝细胞的内吞摄取, 而 GalNac-siRNA 通过肝细胞表面的 ASGPR 快速摄取进肝细胞 (见 1.2), 肝脏清除半衰期可达数周, 支持以数周或季度频率给药<sup>[5]</sup>, 如降低心血管高危患者 LDL-C 水平的 Inclisiran II 期临床试验结果提示间隔 6 个月给药方案的可行性<sup>[48]</sup>。

### 3.3 PK 方面的药物相互作用 (drug-drug interaction, DDI)

因为寡核苷酸类药物主要经核酸外切酶或内切酶代谢, 不太可能是细胞色素 P450 酶和转运体的底物、抑制剂和诱导剂<sup>[50,51]</sup>。和单抗药物类似, 一般情况下, 寡核苷酸药物不是必须要开展常规的药物相互作用临床研究<sup>[13,41]</sup>。PS 骨架修饰的 ASOs 具有较高的血浆蛋白

**Table 1** Comparison of key properties of small molecules, oligonucleotides and mAbs. mAbs: Monoclonal antibodies; MW: Molecule weight; BA: Bioavailability; CL: Clearance

Properties	Small molecule	Oligonucleotides		
		ASOs	siRNA	mAb
MW	~200–500 Da	6–10 kDa	12–15 kDa	15 kDa
Site of action	Extracellular and intracellular	Intracellular	Intracellular	Extracellular
Intracellular delivery	Passive diffusion or uptake	Endocytosis	Must be encapsulated or conjugated	–
Route of administration	Primarily oral	iv/sc	iv/sc	iv/sc/im
Dosing frequency	Often daily	Weekly to once every 4 months	Weekly to once every 3–6 months	Weekly to monthly
BA	Generally good	sc 80%–100%	Not reported	sc 50%–100%
$T_{max}$	Affected by food	sc 3–4 h	sc 2–6 h	sc/im 1–8 d
CL	Often linear CL	Rapid plasma CL; slow clearance from tissues	Rapid plasma CL; slow clearance from tissues	Slow CL
Distribution	Widely	Liver and kidney	Liver and kidney	Plasma/extracellular fluids
Metabolism enzyme	Primarily CYP450s	Nucleases	Nucleases	Proteolytic enzyme
Excretion	Primarily in bile and urine	Primarily in urine	Primarily in urine	–
DDI	High risk	Uncommon	Uncommon	Uncommon

结合率,但是它和非极性的化学小分子与血浆蛋白结合的位点并不相同<sup>[52]</sup>,再考虑到血浆蛋白在人体中含量丰富,不太可能因血浆蛋白结合位点的竞争而引起药物相互作用<sup>[12]</sup>。如果寡核苷酸药物靶向的 mRNA 涉及 CYP 酶形成的转录翻译上游过程,那就需要开展相应的 DDI 临床研究。例如 FDA 于 2019 年 11 月审批通过治疗急性肝卟啉症的 siRNA 药物 Givosiran, 靶向氨基乙酰丙酸合成酶 1 (ALAS1) mRNA 的降解。虽然在体外没有显示有 CYPs 的诱导和抑制作用,但在体内 Givosiran 可以影响肝血红素生物合成途径,因此体内具有降低 CYPs 酶活性的可能, Givosiran 开展了与 CYP1A2、2D6、2C9 等多个 CYPs 底物联用的相互作用研究 (Givosiran, Highlights of Prescribing Information, FDA 2019)。

#### 4 寡核苷酸药物对心脏安全性的影响

FDA 审评资料里显示最新批准寡核苷酸药物均豁免全面 QT 研究,包括 ASOs (Nusinersen and Inotersen) 和 siRNA (Patisiran and Givosiran)。非临床<sup>[53]</sup>和临床数据<sup>[54,55]</sup>提示寡核苷酸高极性、带电的特性使它不太可能和 hERG 钾通道发生直接相互作用<sup>[56]</sup>而改变 QT 间期校正值。Kim 等<sup>[53]</sup>开展了 7 个 ASOs 对 hERG 离子通道影响的体外研究,结果没有发现对 hERG 通道有意义的改变。在猴中植入的遥测装置,该体内实验也同样没有显示与药物相关的血压、心率、心电图等相关参数的变化 (QRS 间期)<sup>[53]</sup>。去纤维蛋白多核苷酸是一个含有 90% 单链和 10% 双链的磷酸二酯-寡核苷酸天然产物,它开展了全面 QT 临床研究,在推荐剂量的 2.4 倍用量下没有观察到和 QT 间期校正值相关的临床改变 (Defibrotide Sodium, Highlights of Prescribing Information, FDA 2016)。上述与这类药物总体上不存在心律失常的可能性是一致的。

#### 5 药政部门对核酸类药物的考虑

中国国家药品监督管理局 (NMPA)、欧洲药品管理局 (EMA) 和美国食品药品监督管理局 (FDA) 均尚无专门针对寡核苷酸药物的指导原则和技术指南, NMPA 提出寡核苷酸是化学合成药物,虽然具备生物制品的属性,但按新化学实体进行监管<sup>[57]</sup>。2017 年 11 月 EMA 研讨会上 (EMA Prior Knowledge Workshop: Case Study: Oligonucleotide Control Strategy) 提出,寡核苷酸药物虽然落在小分子和蛋白药物相关文件的“法外之地”,但可以借鉴化学小分子控制生产环节保证用药的安全性。

#### 6 结论与展望

化学、生物技术难题的攻克使寡核苷酸药物研发进入新时期,与小分子和单克隆抗体药物相比,寡核苷

酸药物通过降解和非降解方式特异性调控疾病目标 RNA 表达翻译过程。已经上市的 7 个反义寡核苷酸药物和 2 个 siRNA 药物给罕见、难治愈疾病患者增加用药选择。希望以后有更多的寡核苷酸药物上市填补化学小分子和蛋白药物不能覆盖的治疗领域。然而寡核苷酸药物高极性、带电特性使得它在载药系统、药代动力学特性、药效方面和化学小分子与单抗药物有明显的区别,为临床药理学研究带来挑战,充分理解该类药物的 PK/PD 特性,有助于早期临床试验设计更合理,加快该类药物的尽早上市。

#### References

- [1] Bennett CF. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age [J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 307-321.
- [2] Stephenson ML, Zamecnik PC. Inhibition of rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978, 75: 285-288.
- [3] Han H. RNA interference to knock down gene expression [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1706: 293-302.
- [4] Yin W, Rogge M. Targeting RNA: a transformative therapeutic strategy [J]. *Clin Transl Sci*, 2019, 12: 98-112.
- [5] Crooke ST, Witztum JL, Bennett CF, et al. RNA-targeted therapeutics [J]. *Cell Metab*, 2018, 27: 714-739.
- [6] An LW. The role of local government in the cultivation of emerging industries—inspiration from Kunshan small nucleic acid industry cultivation model [J]. *Ind Econ Res (产业经济研究)*, 2013, (01): 33-40.
- [7] Khvorova A, Watts JK. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 238-248.
- [8] Shen X, Corey DR. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: 1584-1600.
- [9] Schoch KM, Miller TM. Antisense oligonucleotides: translation from mouse models to human neurodegenerative diseases [J]. *Neuron*, 2017, 94: 1056-1070.
- [10] Bennett CF, Baker BF, Pham N, et al. Pharmacology of antisense drugs [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2017, 57: 81-105.
- [11] Lieberman J. Tapping the RNA world for therapeutics [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25: 357-364.
- [12] Geary RS, Norris D, Yu R, et al. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 87: 46-51.
- [13] Geary RS. Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2009, 5: 381-391.
- [14] Sharma VK, Watts JK. Oligonucleotide therapeutics: chemistry, delivery and clinical progress [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7:

- 2221-2242.
- [15] Ming X. Cellular delivery of siRNA and antisense oligonucleotides via receptor-mediated endocytosis [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, 8: 435-449.
- [16] Wang S, Sun H, Tanowitz M, et al. Intra-endosomal trafficking mediated by lysobisphosphatidic acid contributes to intracellular release of phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 5309-5322.
- [17] Robbins M, Judge A, Maclachlan I. siRNA and innate immunity [J]. *Oligonucleotides*, 2009, 19: 89-102.
- [18] Robbins M, Judge A, Liang L, et al. 2'-O-Methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists [J]. *Mol Ther*, 2007, 15: 1663-1669.
- [19] Nair JK, Willoughby JL, Chan A, et al. Multivalent *N*-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 16958-16961.
- [20] Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 6518-6548.
- [21] Zatsepin TS, Kotelevtsev YV, Koteliensky V. Lipid nanoparticles for targeted siRNA delivery-going from bench to bedside [J]. *Int J Nanomed*, 2016, 11: 3077-3086.
- [22] Janas MM, Harbison CE, Perry VK, et al. The nonclinical safety profile of GalNAc-conjugated RNAi therapeutics in subacute studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2018, 46: 735-745.
- [23] Willoughby J, Chan A, Sehgal A, et al. Evaluation of GalNAc-siRNA conjugate activity in pre-clinical animal models with reduced asialoglycoprotein receptor expression [J]. *Mol Ther*, 2018, 26: 105-114.
- [24] Baenziger JU, Fiete D. Galactose and *N*-acetylgalactosamine-specific endocytosis of glycopeptides by isolated rat hepatocytes [J]. *Cell*, 1980, 22(2Pt2): 611-620.
- [25] Wang JP, Wang S, Shen X, et al. Synthesis of cationic lipids DLin-MC3-DMA [J]. *Chem Reagents (化学试剂)*, 2016, 38: 361-363.
- [26] Kumar V, Qin J, Jiang Y, et al. Shielding of lipid nanoparticles for siRNA delivery: Impact on physicochemical properties, cytokine induction, and efficacy [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e210.
- [27] Cohen ZR, Ramishetti S, Peshes-Yaloz N, et al. Localized RNAi therapeutics of chemoresistant grade IV glioma using hyaluronan-grafted lipid-based nanoparticles [J]. *ACS Nano*, 2015, 9: 1581-1591.
- [28] Ramishetti S, Kedmi R, Goldsmith M, et al. Systemic gene silencing in primary T lymphocytes using targeted lipid nanoparticles [J]. *ACS Nano*, 2015, 9: 6706-6716.
- [29] Weinstein S, Toker IA, Emmanuel R, et al. Harnessing RNAi-based nanomedicines for therapeutic gene silencing in B-cell malignancies [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: E16-E22.
- [30] Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan WD, et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379: 11-21.
- [31] Huang Y. Preclinical and clinical advances of GalNAc-decorated nucleic acid therapeutics [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 6: 116-132.
- [32] Zuckerman JE, Davis ME. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14: 843-856.
- [33] Janas MM, Schlegel MK, Harbison CE, et al. Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 723.
- [34] Soucek L, Whitfield JR, Sodir NM, et al. Inhibition of Myc family proteins eradicates KRas-driven lung cancer in mice [J]. *Genes Dev*, 2013, 27: 504-513.
- [35] Zlatev I, Castoreno A, Brown CR, et al. Reversal of siRNA-mediated gene silencing *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 509-511.
- [36] Setten RL, Rossi JJ, Han SP. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 421-446.
- [37] Kawamata T, Tomari Y. Making RISC [J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35: 368-376.
- [38] Matranga C, Tomari Y, Shin C, et al. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes [J]. *Cell*, 2005, 123: 607-620.
- [39] Rinaldi C, Wood M. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders [J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14: 9-21.
- [40] Yu RZ, Grundy JS, Geary RS. Clinical pharmacokinetics of second generation antisense oligonucleotides [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013, 9: 169-182.
- [41] Mustonen EK, Palomaki T, Pasanen M. Oligonucleotide-based pharmaceuticals: non-clinical and clinical safety signals and non-clinical testing strategies [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2017, 90: 328-341.
- [42] Tillman LG, Geary RS, Hardee GE. Oral delivery of antisense oligonucleotides in man [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97: 225-236.
- [43] Raoof AA, Chiu P, Ramtoola Z, et al. Oral bioavailability and multiple dose tolerability of an antisense oligonucleotide tablet formulated with sodium caprate [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93: 1431-1439.
- [44] Yu RZ, Kim TW, Hong A, et al. Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35: 460-468.
- [45] Croke ST, Geary RS. Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2013, 76: 269-276.
- [46] Hoy SM. Patisiran: first global approval [J]. *Drugs*, 2018, 78:

- 1625-1631.
- [47] Zimmermann TS, Karsten V, Chan A, et al. Clinical proof of concept for a novel Hepatocyte-targeting GalNAc-siRNA conjugate [J]. *Mol Ther*, 2017, 25: 71-78.
- [48] Ray KK, Landmesser U, Leiter LA, et al. Inclisiran in patients at high cardiovascular risk with elevated LDL cholesterol [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376: 1430-1440.
- [49] Garba AO, Mousa SA. Bevasiranib for the treatment of wet, age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmol Eye Dis*, 2010, 2: 75-83.
- [50] Yu RZ, Warren MS, Watanabe T, et al. Lack of interactions between an antisense oligonucleotide with 2'-*O*-(2-methoxyethyl) modifications and major drug transporters [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2016, 26: 111-117.
- [51] Yu RZ, Geary RS, Flaim JD, et al. Lack of pharmacokinetic interaction of mipomersen sodium (ISIS 301012), a 2'-*O*-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting apolipoprotein B-100 messenger RNA, with simvastatin and ezetimibe [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2009, 48: 39-50.
- [52] Watanabe TA, Geary RS, Levin AA. Plasma protein binding of an antisense oligonucleotide targeting human ICAM-1 (ISIS 2302) [J]. *Oligonucleotides*, 2006, 16: 169-180.
- [53] Kim TW, Kim KS, Seo JW, et al. Antisense oligonucleotides on neurobehavior, respiratory, and cardiovascular function, and hERG channel current studies [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2014, 69: 49-60.
- [54] Yu RZ, Gunawan R, Li Z, et al. No effect on QT intervals of mipomersen, a 2'-*O*-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting ApoB-100 mRNA, in a phase I dose escalation placebo-controlled study, and confirmed by a thorough QT (tQT) study, in healthy subjects [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2016, 72: 267-275.
- [55] Yu RZ, Gunawan R, Geary RS, et al. Lack of QT prolongation for 2'-*O*-methoxyethyl-modified antisense oligonucleotides based on retrospective exposure/response analysis of ten Phase I dose-escalation placebo-controlled studies in healthy subjects [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2017, 27: 285-294.
- [56] Stansfeld PJ, Sutcliffe MJ, Mitcheson JS. Molecular mechanisms for drug interactions with hERG that cause long QT syndrome [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, 2: 81-94.
- [57] Yu SS, Hu XM, Wang HX, et al. Overview of non-clinical research evaluation of therapeutic single-stranded oligonucleotide drugs [J]. *Chin J New Drug (中国新药杂志)*, 2018, 27: 1122-1129.