



運用奈米技術承載 siRNA 藥品之 指導原則

第一版

中華民國 115 年 03 月 18 日

財團法人醫藥品查驗中心

序言

運用奈米技術承載核酸藥品為近年來藥品開發上熱門之議題，自預防新型冠狀病毒疾病(COVID-19，嚴重特殊傳染性肺炎)的疫苗到ONPATTRO™(patisiran)等藥品皆採用此類技術。有鑑於我國尚未發布運用奈米技術承載 siRNA 藥品的指引，故制定本指導原則，期能提供製藥業者可遵循之方向。

【撰寫團隊】

林憶珊審查員、黃振瑋小組長、周家瑋小組長、徐巧縈小組長、黃豐淳副組長、葉嘉新組長、詹明曉組長、陳可欣主任秘書、徐麗娟副執行長、劉明勳執行長

目錄 (Table of Contents)

1	介紹.....	3
1.1	前言.....	3
1.2	適用範圍.....	3
2	品質考量.....	4
2.1	藥物動力學和遞送至目標細胞的相關品質考量.....	4
2.1.1	藥物動力學相關考量.....	4
2.1.2	遞送至目標細胞的相關考量.....	4
2.2	安全性的相關品質考量.....	5
2.2.1	優化載體成分.....	5
2.2.2	優化藥品特性.....	5
2.2.3	靶向遞送.....	5
3	非臨床考量.....	5
3.1	非臨床藥物動力學研究.....	5
3.2	非臨床毒性研究.....	6
3.2.1	siRNA 的毒性.....	6
3.2.2	載體的毒性.....	6
4	首次人體試驗(first-in-human)考量.....	6
5	參考文獻.....	7

本指導原則係參考日本 MHLW 於 2016 年發佈之「Reflection paper on nucleic acids (siRNA)-loaded nanotechnology-based drug products」規範，亦代表醫藥品查驗中心 (Center for Drug Evaluation, CDE) 對此議題的當前想法。如果未來有相關的科學證據，則會進一步修訂此指導原則。此外，本指導原則不具任何約束力，凡涉及政策方向及法規解釋與適用，仍應依衛生主管機關之指示為準。

若對此指導原則有任何疑問，歡迎來信至 feedbackbox@cde.org.tw

1 介紹

1.1 前言

目前已有多種以核酸為基礎之化合物(nucleic acid-based compounds)陸續被研發為藥品，其中，小干擾核糖核酸(small interfering RNAs, siRNAs; 或稱 short interfering RNAs、silencing RNA)，為含有 21 至 23 個鹼基對的雙股 RNA 分子，可藉由促進標的 mRNA 的特異性降解，從而使特定序列的基因靜默(gene silencing)。由於 siRNA 具有強效的 mRNA 降解活性及序列特異性，因此被視為藥品開發應用的潛在候選者。至 2018 年時，全球第一個 siRNA 藥品 ONPATRO™ (Patisiran)在美國核准上市。

相較於小分子化學藥，siRNA 具有高分子量、帶有負電荷，且高度親水性。這些物理化學特性使得 siRNA 難以有效地被遞送至目標細胞；此外，siRNA 在血液中也容易被快速降解，並經由腎臟的腎絲球過濾排除。這些特性被認為 siRNA 應用於藥品開發的主要障礙。目前已有許多的藥品研發策略及技術正在被開發以期克服這些障礙，例如透過微脂粒與高分子微胞(polymeric micelles)等運用奈米技術之載體(nanotechnology-based carriers)的技術，藉由帶有正電荷載體的靜電作用(electrostatic interactions)或共價鍵結(covalent binding)與 siRNA 結合，幫助運送 siRNA 至目標細胞或組織/器官；此外，脂質及聚合物也在部分 siRNA 製劑開發中應用於改善其藥物動力學行為。又，多數情況下 siRNA 是以奈米粒(nanoparticles)的形式透過胞吞作用(endocytosis)進入細胞中，為了使 siRNA 自胞內體(endosome)釋出至細胞質中以進行其調控作用，也有研發策略嘗試將 siRNA 藥品設計為具有胞內體釋放(endosomal release)機制，且能夠在胞內體與溶酶體(lysosome)融合前進行，以避免 siRNA 被溶酶體降解。其他研發策略則包括如導入經化學修飾的核酸以強化藥效動力學特性及體內安定性等。

本指導原則目的為闡述評估運用奈米技術載體製備的 siRNA 藥品(以下稱為運用奈米技術承載 siRNA 藥品)時，需要考慮要點，供藥品研發單位參考依循。

1.2 適用範圍

雖然本指導原則內容討論運用奈米技術承載 siRNA 藥品製劑開發，部分內容也可能適用於其他運用奈米技術載體之核酸藥品。有關特定載體的考量，應同步參閱相關公告及指引。

針對每個藥品所需進行的研究及評估細節應根據個案情況決定，並以能反映當前學術及

技術進展，以及製造商所累積經驗的合理原因為依據。

2 品質考量

運用奈米技術之載體承載 siRNA，目的是為了增進 siRNA 的體內安定性(*in vivo stability*)、幫助 siRNA 遞送到標的器官及/或組織，並於某些情況下控制 siRNA 的細胞內行為(*intracellular behavior*)。由於載體的組成成分各具功能，單一組成成分品質改變就可能影響藥品的整體品質，因此，製藥業者應提供與原料藥相同詳盡程度之載體各組成成分品質資訊。此外，除了識別可能會影響藥品安全性及療效的關鍵品質屬性(*critical quality attributes*)，特別是體內藥物動力學及藥效動力學特性，建立品質屬性檢測方法也很重要。由於 siRNA 的藥物動力學取決於載體，倘若可預期載體成分變更後會造成藥物動力學特性變化，則應於該變更後再次進行詳盡的藥品品質屬性評估及非臨床相關評估。

2.1 藥物動力學和遞送至目標細胞的相關品質考量

2.1.1 藥物動力學相關考量

當運用奈米技術之載體承載 siRNA 進行體內遞送時，藉由如聚乙二醇(PEG)的修飾(*modification*)來控制載體的粒徑大小及表面特性相當重要，因載體的粒徑大小及表面特性會影響 siRNA 於血液中的滯留狀態，進而影響其遞送至標的器官及/或組織的效率。一般而言，載體可能會與體內生物組成產生交互作用，因此應留意載體內 siRNA 被體內生物組成置換，進而使 siRNA 被酵素降解(*enzymatic degradation*)所造成的藥品安定性變化。將 siRNA 裝載(*loading*)至載體的效率可透過凝膠電泳(*gel electrophoresis*)、螢光標記(*fluorescent labeling*)或使用螢光染劑嵌入等方法進行評估。此外，為了確保 siRNA 具有一致的體內安定性及釋放概況(*siRNA release profile*)，應建立可適當反映生理條件的體外檢測方法，以評估 siRNA 自載體的釋放。

部分藥品設計上會藉由使用與載體接合之配體(*ligand*)或抗體等功能性分子(*functional molecules*)進行主動靶向遞送(*targeting delivery*)，協助將 siRNA 遞送至標的器官、組織或細胞。於此情況下，應優化功能性分子與載體的接合，使連接子(*linker*)不影響功能性分子的效能。此外，應注意功能性分子或連接子的特性可能會影響載體的整體特性。因此，連接子的安定性也很重要。

2.1.2 遞送至目標細胞的相關考量

為了確保有效地將 siRNA 遞送至標的細胞，管控載體的品質屬性及藥物動力學影響相當重要。

增進細胞內攝取(*intracellular uptake*)的技術包括控制粒徑大小及表面特性，例如增加 siRNA 載體的正電荷、增進細胞膜融合，以及功能性分子的接合。

2.2 安全性的相關品質考量

為了降低因載體相關安全性問題導致的風險，應優化載體成分及藥品特性。需特別考量的項目舉例如下：

2.2.1 優化載體成分

- 增進生物降解性(biodegradability)
- 使用具有已知安全性概況的成分
- 設計並優化陽離子脂質及/或聚合物

2.2.2 優化藥品特性

- 優化粒徑大小
- 正電荷的遮蔽(masking)
- 將載體聚乙二醇化(PEGylation)以改善 siRNA 在血液中的滯留，以及分布至標的器官及/或組織的情形
- 改善承載 siRNA 載體的安定性
- 優化與預定給藥途徑相關的藥品特性

2.2.3 靶向遞送

- 使用配體分子進行標定。例如，上皮生長因子受體(epidermal growth factor receptor) [EGFR]、葉酸受體(folate receptor)或運鐵蛋白受體(transferrin receptor)等。
- 使用穿膜胜肽(cell membrane-permeable peptides)等。

3 非臨床考量

3.1 非臨床藥物動力學研究

為了適當地評估以載體遞送之 siRNA 的療效及安全性，定量給藥後的 siRNA 血中濃度與器官及/或組織分布相當重要。

- 可用的含量(assay)分析方法包括螢光標記、放射性同位素標記(radioisotope labeling)、聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)或質譜測定法(mass spectrometry)。應根據標記方法的特性或分析技術的敏感度來選擇適當的含量分析方法。
- 應測量血中未被承載的 siRNA (unloaded siRNA)、被載體承載的 siRNA，以及總 siRNA 濃度。根據 siRNA 在血中的安定性，未被承載之 siRNA(例如未經修飾的自然原型 siRNA) 濃度可能難以測量。

3.2 非臨床毒性研究

原則上，運用奈米技術承載 siRNA 藥品的毒性研究，應與低分子量化合物的毒性研究相同。具體來說，應評估運用奈米技術承載 siRNA 藥品對標的器官的影響及毒性作用，例如評估體內細胞激素的生成等。應根據 siRNA 或其載體性質的具體特徵(specific characteristics)進行實驗動物物種的選擇與試驗設計。當 siRNA 自載體中釋放時，經化學修飾以增進體內安定性的 siRNA 可能會累積在腎臟中，因而有毒性的疑慮。因此，必要時，應針對 siRNA 進行單獨的毒性研究。

關於 siRNA 及其載體的毒性研究，應考量下列因素：

3.2.1 siRNA 的毒性

為改善 siRNA 的藥物動力學，已有策略針對 siRNA 進行化學修飾及/或使用載體，來改善其體內安定性並增強其靶向遞送。另一方面，應留意 siRNA 在血液與器官及/或組織中滯留時間的延長，可能會增加 siRNA 相關的毒性，以及載體及生物組成之間相互作用的毒理學疑慮。一般而言，應考量下列類型的毒性。

- 免疫毒性(Immunotoxicity)：由某些類型的類鐸受體(toll-like receptors, TLR)媒介的免疫系統活化、補體活化與免疫細胞變異
- 血液毒性(Hematotoxicity)：溶血、凝血與血小板聚集

此外，siRNA 可能會造成其他類型的毒性：

- 藉由對目標序列之作用所致的毒性
- 藉由對非目標序列之作用所致的毒性。

應採用適當的檢測方法來評估該些毒性。

3.2.2 載體的毒性

應說明與載體相關的安全性問題，例如載體與生物組成之間交互作用導致的毒性。此外，在多劑量及/或長期給藥後的載體積蓄(accumulation)可能會引起安全性問題。

4 首次人體試驗(first-in-human)考量

針對運用奈米技術承載 siRNA 藥品的首次人體試驗，原則上與嵌段共聚物微胞(block copolymer micelle)藥品之考量相同，參考日本厚生勞動省(MHLW)及歐洲醫藥品管理局(EMA)於 2014 年 1 月 10 日，針對嵌段共聚物微胞(block copolymer micelle)藥品研發之共同發表文件，首次人體試驗考量的原則如下：

- 由於運用奈米技術承載 siRNA 藥品之設計經常會改變 siRNA 藥品活性成分的體內分布，因此除了應參考 ICH S3 (S3A 及 S3B)、S6(R1)、M3(R2)以及 PMFS/ELD Notification NO. 0402-1 (2012/04/02)號公告或 EMEA/CHMP/SWP/28367/2007 所建議的資訊以外，更應參考該藥品之非臨床藥動學數據。

- 應慎選採血時間點和持續時間，以便準確地測量運用奈米技術承載 siRNA 藥品的總活性成分、游離態活性成分和代謝產物隨時間變化的過程。血中藥動參數包括血液/血漿或血清中的 C_{max} 、半衰期和 AUC 等。採樣頻率和持續時間應足以描述血漿濃度-經時曲線圖，初期時間點的密集採樣對於了解藥品起始分布過程十分重要，採樣時程長度應足以涵蓋完整的藥品濃度經時曲線，以有效地估算總暴露量。應測量運用奈米技術承載 siRNA 藥品及活性成分在目標病灶及主要器官的分布情形、總量與經時變化。
- 在選擇臨床起始劑量時，應遵循 ICH M3(R2)和各區域規範指引，並審慎考量所有相關的非臨床資料，包括藥品的關鍵屬性、藥理劑量反應、藥動和藥理/毒理特性等。人體的劑量限制毒性(DLT)判定方式可採用類似傳統藥物的方法，但過敏反應除外，因為過敏反應不一定具有劑量相關性。
- 應鑑定藥品之潛在關鍵品質屬性，並評估其一致性。非臨床試驗和首次人體試驗所使用的藥品，其品質屬性應確認具有一致性，且應在試驗開始前建立檢測程序。此外，需提供足夠的安定性數據來確保藥品在整個臨床試驗期間的安定性。

5 參考文獻

1. 日本 MHLW: Reflection paper on nucleic acids (siRNA)-loaded nanotechnology-based drug products; March 2016
2. 日本 MHLW: Guideline for preclinical safety assessment of oligonucleotide therapeutics; March 2020
3. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*, 2009; 457, 426-433.
4. Cabral H, Kataoka K. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *J Control Release*, 2014; 190, 465–476.
5. Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products; January 2014, PFSB/ELD Notification No.0110-1
6. Xue HY, Liu S, Wong HL. Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*, 2014; 9, 295-312.
7. Miyakawa S. *J Clin Exp Med*. (in Japanese), 2011; 238, 519-523.
8. 當代醫藥法規月刊第 53 期「以奈米微粒做為傳輸化療藥物的設計考量及國際醫藥法規管理新進展」
9. S3A: Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies (October 1994)
10. S3B: Pharmacokinetics: Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies (October 1994)
11. S6(R1): Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals (June 2011)
12. M3(R2): Guidance on Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (June 2009)
13. Guidance for Establishing Safety in First-in-Human Studies during Drug Development [April 2, 2012, PFSB/ELD Notification No. 0402-1]

14. Guideline on requirements for first-in-man clinical trials for potential high-risk medicinal products [EMA/CHMP/SWP/28367/2007]