

团 体 标 准

T/CBPIA 0017—2025

寡核苷酸药物重复给药毒性研究技术指南
Technical Guidelines for Repeated Dose Toxicity
Studies of Oligonucleotide Therapeutics

2025 - 12 - 29 发布

2026 - 01 - 28 实施

中国生化制药工业协会 发布

目 次

目 次.....	I
前 言.....	II
1 目的和范围.....	1
2 术语和定义.....	1
3 非临床安全性研究的考虑.....	2
4 重复给药毒性研究.....	3
5 临床起始剂量换算.....	6
6 参考文献.....	6
附录（资料性）案例：Inclisiran 的非临床重复给药毒性研究内容.....	8



前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国生化制药工业协会提出。

本文件由中国生化制药工业协会归口。

本文件起草单位：北京昭衍新药研究中心股份有限公司、成都华西海圻医药科技有限公司、江苏鼎泰药物研究（集团）股份有限公司、苏州熙萃医药科技有限公司、康诺亚生物医药科技（成都）有限公司。

本文件主要起草人：马金玲、邹家杰、严立恒、胡晓敏、王雷、樊阿莉、邓洋、徐刚、司端运、李超、申文晋、胡文言、周斌、范蕊萌、金燕京、李鑫。



寡核苷酸药物重复给药毒性研究技术指南

1 目的和范围

寡核苷酸药物（oligonucleotide therapeutics, ONTs）是由十几个至几十个或更长的核苷酸构成的短链核酸药物，通过化学合成的方式制备。目前国内尚无针对其非临床安全性评价的指导原则，也尚未形成全球监管的统一要求。本指南旨在为 ONTs 的重复给药毒性试验的设计、实施提供技术参考。本指南适用于反义寡核苷酸（ASO）、小干扰 RNA（siRNA）、适配体（Aptamer）等寡核苷酸，不包括用于基因编辑的 mRNA 和 RNA，DNA/RNA 疫苗以及 CpG 寡核苷酸。当 ONTs 与其他类型分子（如糖类、脂质、肽或抗体等）结合时，可参考本技术指南。本技术指南的起草基于当前对 ONTs 的科学认知，随着研究的进展和经验积累，本技术指南中的相关内容将不断完善与适时更新。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

ONTs: Oligonucleotide therapeutics, 寡核苷酸药物

ASO: Antisense oligonucleotide, 反义寡核苷酸

siRNA: Small interfering RNA, 小干扰 RNA

miRNA: MicroRNA, 微小 RNA

ICH : The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 国际人用药品注册技术协调会

WoE: Weight-of-Evidence, 权重证据

MTD: Maximum tolerated dose, 最大耐受剂量

MFD: Maximum feasible dose, 最大可行剂量

AGT: Angiotensinogen, 血管紧张素原

TK: Toxicokinetics, 毒代动力学

NOAEL: No Observed Adverse Effect Level, 未见不良反应剂量水平

HED: Human Equivalent Dose, 人体等效剂量

MRSD: Maximum Recommended Starting Dose, 最大推荐起始剂量

LNP: Lipid Nanoparticles, 脂质纳米粒

GalNAC: N-Acetylgalactosamine, N-乙酰半乳糖胺

3 非临床安全性研究的考虑

3.1 在靶毒性

ONTs 通过多种作用机制实现其预期的药理学作用。通常 ONTs 含有与细胞内目标核酸序列互补的碱基序列，该序列可能影响各种下游通路机制中（如反义、沉默）特定基因的表达。此外，反义剪接调节 ONTs 与前信使 RNA（pre-mRNA）进行碱基配对影响成熟 mRNA 中核苷酸的含量，改变编码蛋白的水平或活性。一些 ONTs（如适配体）依赖于碱基序列经过非杂交依赖的方式，与特定蛋白质或其他细胞成分结合来发挥药理作用。

建议在非临床安全性研究中评估靶向活性导致的潜在不良反应（过度药理作用）。通常至少在一种相关种属动物中对临床候选分子进行在靶毒性的评估。若无相关动物种属，可以使用替代寡核苷酸或转基因动物等进行评估。对于某些无法在毒理学研究中评估过度药理作用的 ONTs，可基于文献的权重证据（WoE）评估由过度药理作用引起不良效应的潜在可能性。例如：

（1）临床候选分子或序列不存在于动物种属的基因组中（如隐性剪接位点、插入/缺失突变或外源靶点），无法直接观察药物作用。

（2）在动物模型和患者中预期的药理学效应（如排除特定外显子）不同，如外显子跳跃引起移码突变，导致编码异常氨基酸序列或提前终止密码子。

3.2 脱靶毒性

3.2.1 杂交依赖的脱靶毒性

鉴于 ONTs 可能与自身碱基序列存在部分或完全互补的非靶标 RNA 或 DNA 序列结合，从而导致的潜在不良反应在毒理学研究中可能无法被预测，因此可使用适当的计算机模拟或体外方法，通过生物信息学预测和体外实验研究（如转录组分析）潜在脱靶风险。

脱靶研究应考虑 ONTs 及其代谢产物，包括正义链和反义链和各种降解片段，并评估它们与基因组或转录组中潜在结合位点的相互作用。应采用体外试验（如细胞分析、RNA 测序）对计算机模拟中识别出的潜在脱靶杂交风险进行验证。

评估脱靶效应时应考察人类脱靶位点在相关动物模型中是否保守，以此判断动物实验数据的临床相关性。此外还需要考虑不同条件下的表达差异（不同细胞/组织、不同时间点的表达情况）、药代动力学特性以及杂交依赖性结合效率等，以综合评估脱靶风险。

3.2.2 非杂交依赖的脱靶毒性

ONTs 除了通过与核酸结合发挥作用外，还可能直接与蛋白质或其他细胞成分发生相互作用。相比核酸杂交依赖性的脱靶效应，非杂交依赖的脱靶效应更复杂且难以预测，因此生

物信息学预测的方法可能不太适用，可开展动物体内的毒性试验评估此类毒性。

4 重复给药毒性研究

4.1 供试品

4.1.1 临床候选分子

应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能代表临床试验拟用样品，并提供质量检测报告。在药物研发的过程中，若受试物的工艺等发生可能影响其安全性的变化，应进行相应的安全性桥接试验。

4.1.2 替代分子

如果临床候选分子没有合适的相关动物种属评价其安全性，需考虑选择替代分子进行安全性评估。替代分子的药学特性（如序列、修饰、递送系统等）和生产工艺尽可能和临床分子接近，其纯度和含量基本相似，分析比较临床分子和替代分子的质量差异以及体内外药理学作用的相似性。

4.2 动物种属

ONTs 的毒性研究通常在啮齿类和非啮齿类两种动物中进行，至少包含一个能产生药理学作用的动物种属。理想的动物模型应具有以下特点：①动物模型的靶基因序列与人类高度一致；②靶基因在动物组织中的表达模式（如肝脏、肾脏、CNS 等）与人类匹配；③动物模型中能观察到与预期作用机制一致的药效；④动物模型能产生和人体相近的免疫反应。

如没有药理学相关的动物种属，也建议在啮齿类和非啮齿类两个种属中对临床候选分子进行研究，以考察非杂交依赖性脱靶效应。如果使用替代分子，研究应同时包括临床候选分子和替代分子。使用转基因动物或疾病模型动物，需验证靶标表达和药理学效应。

4.3 给药方案

4.3.1 动物分组

ONTs 的毒性评价应基于剂量-效应关系，通常设置低、中、高 3 个剂量组，以及溶媒或辅料对照组，必要时设立空白对照组。对于新型辅料按照新辅料的评价要求单独开展或伴随重复给药毒性试验增加辅料组的研究。

4.3.2 给药途径

原则上应与临床拟用途径一致，如不一致应说明理由。

4.4 剂量设计

高剂量的设计应达到最大药理学作用，且能产生明显的毒性反应，可以参考 ICH M3(R2) 指导原则，综合考虑最大耐受剂量（MTD）、暴露饱和剂量、最大可行剂量（MFD）等因

素；低剂量原则上相当或高于动物药效剂量或临床使用剂量的等效剂量；中剂量应结合毒性作用机制和特点在高剂量和低剂量之间设立，以考察毒性反应的剂量-反应关系。

4.5 给药间隔及给药期限

根据具体药物的分布特点、组织半衰期、药理学效应持续时间，并结合临床拟给药方案设计合理的给药频率。ONTs 在靶组织中通常具有较长的半衰期，会产生持久的药效作用，建议通过检测药效生物标志物，为毒性试验给药频率提供依据。ONTs 在动物组织中（特别是啮齿类动物）的半衰期可能比人类短，可适当缩短给药间隔。目前上市的 ONTs 产品的重复给药毒性研究中给药间隔多数是每周一次或每两周一次，也有更长间隔如四周给药一次等。给药间隔结合产品的特性考虑，确保总暴露量覆盖临床预期的暴露水平。

给药期限应覆盖临床试验，建议参考 ICH M3(R2)指导原则分阶段进行重复给药毒性试验以支持不同期限的临床试验。由于 ONTs 临床给药间隔可能较长，试验期限的选定需要考虑拟定的临床疗程、适应症、用药人群等。

4.6 恢复期

恢复期的设置应考虑毒性反应的可逆性和可能出现的迟发性毒性反应，根据受试物药代动力学特点，尤其关注靶组织蓄积情况，药理学效应持续时间，靶器官毒性反应和恢复情况等，确定恢复期时长。根据目前已经上市的 ONTs 产品的重复给药毒性研究资料，恢复期多数是 8 周以上，也有 13 周或更长的恢复期，但对于具有较长组织半衰期（作用持续时间较长）的寡核苷酸，为了评估恢复情况而设置过长的恢复期也可能是不合适的，需要综合毒性发现和药理学作用设置合理的恢复期时长。

4.7 检测指标

4.7.1 常规指标

按照《药物重复给药毒性试验技术指导原则》进行临床观察、体重、摄食量、眼科检查、体温和心电图（非啮齿动物）、血细胞计数、凝血功能、血液生化、尿液分析、骨髓涂片、病理学检查（脏器重量、大体观察和组织病理学检查）等常规指标的检查。

4.7.2 免疫毒性

ONTs 的自身结构（核酸序列、化学修饰等）、递送系统或免疫系统靶向性等特点，可能会引起免疫毒性风险。该毒性的评估需根据产品特点进行设计，可整合在重复给药毒性等试验中进行，评估 ONTs 诱导的免疫效应（如细胞因子、补体、免疫细胞表型），相关具体要求可参考 ICH S8 指导原则。

4.7.3 免疫原性

ONTs 的分子特性介于传统生物大分子与化学小分子药物之间，且结构复杂，其作用机制涉及多种细胞内过程，因此需要关注潜在的免疫原性风险。ONTs 的免疫原性既与其核酸序列及化学修饰有关，也受到递送系统的显著影响。不同递送系统在细胞摄取途径、组织分布及与先天免疫受体的相互作用方面存在差异，其对寡核苷酸药物免疫原性的影响差异明显。常见的递送系统包括 GalNAc 偶联、肽偶联、抗体偶联、LNP 纳米颗粒等。通常，化学偶联的 siRNA 分子（如 GalNAc-siRNA）因结构明确且靶向性强，免疫原性风险相对较低。对于递送系统的免疫原性研究可根据具体成分确定是否进行。ONTs 的免疫原性的评估有助于解释分析毒代动力学，药理学效应和毒性试验结果。

免疫原性样本采集时间点通常可选择首次给药前，给药期间谷浓度时间点，恢复期结束等时间点；其检测方法与治疗性蛋白的一致，通常采用配体结合方法或者电化学发光法进行检测，但 ONTs 包被或者标记效率无法达到与治疗性蛋白相同的程度，故对检测方法的灵敏度提出了更高的要求。

4.7.4 生物分布

ONTs 的生物分布考察是非临床评价的重要内容，可验证药物是否到达预期作用部位，识别潜在毒性风险器官，考察组织暴露量与毒理学结果之间的关系。通常至少对靶组织进行生物分布检测，同时根据 ONTs 主要经肾脏排泄的特点，也可考虑检测肾脏药物浓度。在毒性试验解剖终点进行生物分布考察，特殊情况下也可能进行活体穿刺，如鞘内给药的 ONTs 通过活体脑脊液穿刺（如 NHP 的腰椎穿刺）考察给药后不同时间点药物的生物分布情况。需注意活体穿刺应符合动物福利原则，且在科学必要性时使用。

4.7.5 药理学指标

ONTs 通常具有持久的药理学作用，为评估药理学与毒性之间的关系，若药效试验中未充分考察相关动物种属中药理学指标时，建议在具有药理学活性相关动物种属的重复给药毒性中评估药理学指标。在某些特殊情形下，毒理试验中的正常动物中可能无法直接观察到预期的主要药理学效应，此时可通过设置替代终点指标以预测体内药理学活性。例如，针对血管紧张素原（AGT）的 siRNA 药物，在正常的非人灵长类动物中可能难以直接观察到血压下降的效应，但可通过检测血浆中 AGT 蛋白水平或肝组织中的 AGT mRNA 表达水平来间接评估其药理学活性。

4.7.6 其他指标

重复给药毒性试验需要关注局部耐受性。对于吸入、鞘内给药等直接递送到某个器官的药物，需要对该器官进行更全面的功能或组织病理学的评估。

4.8 毒代动力学

ONTs 的毒代动力学是非临床毒性研究的重要组成部分，也是药代动力学在全身暴露评价中的延伸。其重点是描述动物的全身暴露及其与毒性研究剂量、时间的关系，解释毒性试验结果。在定量分析中，通常需检测药物原形以及主要代谢物的浓度，以便了解药物在体内的组成形式及暴露量评估。ONTs 在血浆中的半衰期通常较短，采样的时间点应尽量达到所需的频度，但不可过于频繁而干扰正常的研究，通常在首末次给药 24h 或 48h 之内采集 6-8 个时间点以获得 C_{max} 、 T_{max} 、AUC 等参数。具体时间点根据早期探索试验确定。此外，ONTs 尽管在血浆中清除较快，但因大多具有组织靶向性，造成长时间组织滞留，因此毒代动力学研究中会关注靶向器官和排泄器官中的浓度水平，以评估组织暴露量与毒理学结果之间的关系。

4.9 毒性特点分析

重复给药毒性试验重点评估 ONTs 在特定组织（如肝脏、肾脏等）的蓄积情况和毒性反应。一些经化学修饰、具有抗核酸酶活性的 ONTs 长期给药后可能会在特定组织（如肝脏、肾脏等）蓄积并产生组织病理学改变，如非临床研究中常见肝脏/肾脏等高暴露组织出现嗜碱性颗粒聚集和空泡化等。应根据药物的组织分布和递送平台的特性，考虑可能出现的组织病理学形态特征和严重程度，结合临床病理的指标改变情况，分析判断是否为不良反应。同时对于一些特殊的递送平台如脂质纳米颗粒（LNP）应关注递送系统相关的毒性（如 LNP 的肝脾蓄积）。

5 临床起始剂量换算

在健康志愿者中进行首次人体试验的剂量应根据相关指导原则进行设置。通常，通过相关动物种属中获得的未见不良反应剂量水平（NOAEL）的 1/10（基于体表面积折算），估算人体等效剂量（HED），获得最大推荐起始剂量（MRSD）。对于严重、不可逆或无法监测的毒性，可采用较大的安全系数。特定给药途径可以采用腔室体积（局部给药，如按脑脊液体积标准化的鞘内剂量）计算人体等效剂量。对于应用于晚期肿瘤的 ONTs，应参考 ICH S9 指导原则设定起始剂量。

6 参考文献

[1] FDA: Nonclinical Safety Assessment of Oligonucleotide-Based Therapeutics (draft). CDER
November 2024

[2] ICH Harmonized Tripartite Guideline M3(R2). Nonclinical Safety Studies for the Conduct of
Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals.

[3] 原国家食品药品监督管理总局（2014 年第 4 号通告）《药物重复给药毒性试验技术指导原则》，2014 年 5 月 13 日。

[4] Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals. ICH, S8, 2005.

[5] Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals. ICH/S9, 2009.



附录

(资料性)

案例：Inclisiran 的非临床重复给药毒性研究内容

Inclisiran 作为饮食和他汀类药物治疗的辅助治疗,用于治疗杂合子家族性高胆固醇血症或动脉粥样硬化性心血管疾病成人患者。

1 上市时间

2020 年 12 月, FDA 批准上市。

2 作用机制

Inclisiran 是针对 PCSK9 mRNA 的化学修饰双链小干扰 RNA, 通过 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC) 的活性降低 PCSK9 的基因表达, 导致 PCSK9 mRNA 分解, 并减少向 PCSK9 蛋白的翻译。肝内 PCSK9 蛋白减少导致 LDL-C 受体再循环和肝细胞表面表达增加, 从而增加 LDL-C 摄取, 降低循环中 LDL-C 水平。

3 临床用法

在两次初始负荷剂量 (间隔 3 个月) 给药后每 6 个月给药一次, 临床皮下注射 (SC) 给药。

4 相关动物

由于靶序列的部分同源性, Inclisiran 在猴中具有完全药理学活性。在超药理学剂量下 Inclisiran 在啮齿类动物和兔中具有部分活性。

表 1 重复给药毒性试验内容

周期	动物种属	试验设计	主要结果
4 周试验	大鼠	SC: 10、50、250 mg/kg/Q2WSC: 10 mg/kg/QW 4 周给药期, 8 周恢复期	注射部位炎症、肝细胞空泡形成和肾脏嗜碱性颗粒, NOAEL 为 250 mg/kg
	食蟹猴	SC: 10、50、250 mg/kg/Q2WSC: 30 mg/kg/QW 4 周给药期, 8 周恢复期	淋巴结 (肠系膜、下颌、腋窝和腹股沟) 巨噬细胞空泡化。NOAEL 为 250 mg/kg。

15 周 试验	大鼠	SC: 10、50、250 mg/kg, Q4WSC: 25 mg/kg, Q2W 15 周给药期, 8 周恢复期	肾脏(肾小管上皮嗜碱性颗粒和肾小管局灶性至多灶性变性)、肝脏(肝细胞空泡形成和单核细胞浸润)和心脏(心肌病和单核细胞浸润增加)。NOAEL 为 250 mg/kg。
	食蟹猴	SC: 10、50、250 mg/kg, Q4WSC: 125 mg/kg, Q2W 15 周给药期, 8 周恢复期	淋巴结(下颌、肠系膜、腋窝、腹股沟)和肝细胞嗜碱性颗粒。NOAEL 为 250 mg/kg。
29/40 周试验	大鼠	SC: 10、50、250 mg/kg, Q4W 29 周给药期, 13 周恢复期	肾脏(肾小管嗜碱性颗粒和肾小管空泡形成)和肝脏(肝细胞空泡化)改变, 注射部位的皮下组织出血和血管周围单核细胞浸润。NOAEL 为 250 mg/kg。
	食蟹猴	SC: 30、100、300 mg/kg, Q4W 40 周给药期, 13 周恢复期	肝脏(肝细胞嗜碱性颗粒), 淋巴结(下颌、颈深、腋窝和肠系膜空泡)。NOAEL 为 300 mg/kg。



寡核苷酸药物重复给药毒性试验技术指南

T/CBPIA 0017—2025

*

中国生化制药工业协会秘书处

地址：北京市西城区广内大街广义街 5 号广益大厦 B 座 806

电话：010-67046276 传真：010-67046276

邮箱：chinabpia@163.com

网址：<http://www.cbpia.org.cn>

