スピンラザ髄注 12 mg

第 2 部 CTD の概要

2.4 非臨床試験の概括評価

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

略語・略号一覧表 4
1 非臨床試験計画概略 6
1.1 序文 6
1.2 ISIS 396443 6
1.3 非臨床開発プログラム 7
1.3.1 動物種の選択 7
1.3.2 薬理試験 8
1.3.3 薬物動態試験 9
1.3.4 毒性試験 10
1.4 被験物質 11
1.4.1 残留溶媒及び元素不純物の適格性評価 12
1.4.2 オリゴヌクレオチド不純物の適格性評価 12
2 薬理試験 14
2.1 効力を裏付ける試験 14
2.1.1 *In vitro* 薬理試験 14
2.1.2 *In vivo* 薬理試験 15
2.1.2.1 軽症 SMA マウスモデルにおける ICV 投与 15
2.1.2.2 SMA C/C マウスモデルにおける CNS での効果 17
2.1.2.3 重症 SMA マウスモデル（Δ7 SMA）における CNS での効果 17
2.2 副次的薬理試験 19
2.2.1 SMN 転写産物に対する ISIS 396443 の特異性 19
2.3 安全性薬理試験 19
2.4 薬力学的薬物相互作用試験 20
2.5 考察及び結論 20
3 薬物動態試験 21
3.1 分析方法 21
3.2 吸収 21
3.3 CSF 中及び血漿中薬物動態及び組織分布 21
3.3.1 単回投与後の薬物動態及び組織分布 21
3.3.2 反復投与後の薬物動態及び組織分布 22
3.3.2.1 サルを用いた複数回投与薬物動態試験（396443-APK01 試験） 23
3.3.2.2 幼若サルを用いた 14 週間（396443-AS-03）及び 53 週間（396443-AS06）反復投与毒性試験 25
3.3.3 血漿中及び CSF 中のタンパク結合 26
3.4 代謝 27
3.5 排泄 28
3.6 薬物動態学的薬物相互作用 28

3.7 考察及び結論 29
4 毒性試験 30
4.1 全身（IV、SC）投与又は局所（IT）投与後の ASO の毒性 30
4.2 ISIS 396443 の毒性試験プログラム 30
4.2.1 カニクイザルを用いた単回投与毒性試験（396443-AS01 試験） 31
4.2.2 反復投与毒性試験 31
4.2.2.1 マウスを用いた反復投与毒性試験（396443-AS07 試験） 31
4.2.2.2 サルを用いた反復投与毒性試験（396443-AS03、-AS06 試験） 32
4.2.3 その他の毒性試験 34
4.2.4 遺伝毒性（396443-IS02、-IS03、-AS10 試験） 35
4.2.5 がん原性 35
4.2.6 生殖発生毒性試験 36
4.2.7 局所刺激性試験 36
4.2.8 免疫毒性試験 36
4.2.9 光毒性試験 36
4.2.10 薬物乱用に関する試験 37
4.2.11 安全域 37
5 総括及び結論 39
6 参考文献 41
7 付録 44

略語・略号一覧表

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
2'-MOE	2'-O-(2-methoxyethyl)	2'-O-(2-メトキシエチル)
2'-OMe	2'-O-methyl	2'-O-メチル
Aif1	Allograft inflammatory factor-1	アログラフト炎症因子-1
ALT	Alanine transaminase	アラニントランスアミナーゼ
ASO	Antisense oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
AST	Aspartate transaminase	アスパラギン酸トランスアミナーゼ
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid	相補的デオキシリボ核酸
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CSF	Cerebrospinal fluid	脳脊髄液
EC_{50}	Effective concentration, 50%	50%有効濃度
ECG	Electrocardiograms	心電図
ECL	Electrochemiluminescence	電気化学発光法
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
GD	Gestational day	妊娠日齢
Gems	Gemini of coiled body	コイル小体対
Gfap	Glial fibrillary acidic protein	グリア原線維酸性タンパク質
HED	Human equivalent dose	ヒト等価量
HELISA	Hybridization enzyme-linked immunosorbant assay	ハイブリダイゼーション酵素結合免疫吸着測定法
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質
HPLC	High performance liquid chromatograhy	高速液体クロマトグラフィー
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.	日米欧医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議
ICV	Intracerebroventricular	脳室内
IP	Intraperitoneal	腹腔内
ISS-N1	Intron splicing silencer N1	イントロンスプライシングサイレンサーN1
IT	Intrathecal	髄腔内

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
IV	Intravenous	静脈内
MS	Mass spectrometer	質量分析計
MS/MS	Tandem mass spectrometer	タンデム質量分析計
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
PK/PD	Pharmacokinetic/pharmacodynamic	薬物動態／薬力学
PND	Postnatal day	出生後日数
RNA	Ribonucleic acid	リボ核酸
SC	Subcutaneous	皮下
SD	Standard deviation	標準偏差
SMA	Spinal Muscular Atrophy	脊髄性筋萎縮症
SMN	Survival motor neuron	－
SMN1	Survival motor neuron 1	－
SMN2	Survival motor neuron 2	－
snRNPs	Small nuclear ribonuclear proteins	核内低分子リボ核タンパク質
Δ7 SMA	Severe SMA mouse model	重症 SMA マウスモデル

1 非臨床試験計画概略

1.1 序文

脊髄性筋萎縮症（SMA）は、脊髄前角の運動ニューロンの変性による四肢及び体幹の随意筋の萎縮を特徴とする常染色体劣性遺伝性神経筋疾患である。

遺伝子検査及び分子診断法が利用可能となり、現在では SMA に複数の遺伝的病因が存在することが明らかとなっている。SMA を引き起こす突然変異により、重症度及び発症年齢や遺伝型も様々である。90%以上の症例の病因は染色体 5q11-q13 領域における survival motor neuron 1（*SMN1*）遺伝子の機能喪失を起こす突然変異である（Lefebvre 1995; Ogino 2002）。

5qSMA（以下、SMA と呼ぶ）は、*SMN1* 遺伝子におけるホモ接合性欠失及び、まれに突然変異に起因する SMN タンパク質レベルの低下が直接的な原因である。SMN タンパク質の欠如は運動ニューロンの機能障害、最終的には運動ニューロン細胞死を起こす。*SMN1* 遺伝子は、第 5 染色体の逆位重複領域内に存在し、ここには *SMN1* 遺伝子と相同の *SMN2* 遺伝子も存在している。両遺伝子は同一のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしているが、*SMN2* 遺伝子と *SMN1* 遺伝子とでは 11 個のヌクレオチドが異なる。この 11 個のヌクレオチドの違いの 1 つは、*SMN2* 遺伝子のエクソン 7 領域でのシトシンからチミンへの置換である。その結果、エクソン 7 を選択的にスキップする正常とは異なるスプライシングが起こる。*SMN2* 遺伝子から産生された転写物の 80%～90%はエクソン 7 を欠失しており（Cho 2010; Wirth 2013）、結果として不完全で不安定な短縮型タンパク質を産生する（Cho 2010）。SMA 患者では、*SMN2* 遺伝子からの全長転写物の産生量が増加すれば SMN タンパク質の量が増加すると予想される（Hua 2010）。ヒトが有する *SMN2* 遺伝子のコピー数は様々である（0～8 コピー）。*SMN2* 遺伝子のコピー数は SMA 疾患重症度の重要な予測因子であり、一般にコピー数が多い患者ほど疾患の重症度は低い傾向にある。

SMA の世界的な発症率は出生 10 万人に対して 8.5～10.3 人であり、SMA は乳児の死亡における最も多い遺伝的原因であり、小児期の筋力低下に起因する罹患の主な原因である（Pearn 1973; Sugarman 2012）。SMA で承認されている治療法はない。現在の医療は補助的である。すなわち、換気補助、栄養補助、及び SMA によって生じる筋・腱性拘縮及び神経筋性（脊柱）側弯症に対する装具固定、理学療法及び外科手術である。これらの進歩は全体的な生存率の改善に結びついたが、運動機能及び筋力を向上させることはなく、患者の生活の質は低く、介護者は重い負担を抱えている。したがって、現在、SMA 患者の有効な治療法に対するニーズはほとんど満たされていない。

1.2 ISIS 396443

ISIS 396443 は 2’-*O*-(2-メトキシエチル) アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）である。ISIS 396443 は 18 塩基残基（18-mer）のホスホロチオエートオリゴヌクレオチドである。18 個の核酸における糖残基すべてが 2’-*O*-(2-メトキシエチル)-D-リボース（MOE）である。シトシン塩基はすべて 5 位がメチル化されている。ISIS 396443 配列の簡潔な表記を以下に示す。

5’-^{Me}U^{Me}CA^{Me}C^{Me}U ^{Me}U ^{Me}U^{Me}CA^{Me}UAA^{Me}UG^{Me}C^{Me}UGG-3’

ISIS 396443 は、SMA の治療薬として中枢神経系（CNS）組織に直接到達するよう髄腔内（IT）投与される。SMA 患者に対する治療アプローチは、*SMN2* 遺伝子の mRNA スプライシングパターンを修正することで、*SMN2* 遺伝子から産生される全長タンパク質の量を増加させることに基づいている。ISIS 396443 は、*SMN2* 転写産物である mRNA 前駆体のエクソン 7 のイントロン下流における特定の配列に結合するように設計されている。ISIS 396443 が標的とする mRNA 前駆体領域は通常、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 A1/A2（hnRNPs）によって占有されており、イントロンスプライシングサイレンサーN1 と呼ばれている（Hua 2008; Rigo 2012）。ISIS 396443 がこの結合部位で hnRNP A1/ A2 を置換することで、最終的には *SMN2* mRNA へのエクソン 7 の含有が促進され、全長転写物の産生が増加する。本作用機序に基づくと、ISIS 396443 の投与により、SMN タンパク質レベルは正常なヒトでのレベル以上には増加しないと推測される。

1.3 非臨床開発プログラム

SMA 治療のための髄腔内（IT）長期投与の妥当性を示すために、*in vitro* 及び *in vivo* 試験を用いて ISIS 396443 の非臨床プログラムを広範に実施した。ISIS 396443 の非臨床開発は、バイオ医薬品では標準的な計画で既存のガイドライン（ICH M3R2）に従う方針とした。非臨床プログラムの目的は、以下のとおり、ISIS 396443 の薬理、薬物動態（PK）及び安全性を評価することであった。

- 薬理試験：*SMN2* 遺伝子から産生される全長 SMN タンパク質の増加による作用を *in vitro* 及び *in vivo* で評価、またマウスの CNS 組織で薬理作用を示すに足るレベルで SMN タンパク質を増加させる ISIS 396443 の組織中最小濃度を確認。
- 薬物動態試験：患者における IT 投与頻度の予測を助けるために中枢神経系（CNS）組織における ISIS 396443 の消失半減期を評価、また薬理・毒性モデル動物における ASO の脳脊髄液（CSF）中濃度と組織中濃度との関連性を検討。
- GLP 非臨床安全性薬理試験及び毒性試験：SMA 患者の治療を適応とした ISIS 396443 の長期使用の妥当性。

技術的な制限から、IT 投与による反復投与毒性試験には動物種としてカニクイザルのみを用いた。

1.3.1 動物種の選択

ヒトは *SMN2* 遺伝子を有することが知られている唯一の動物種である。したがって、ISIS 396443 の非臨床的な薬理作用を検討できるのは、遺伝子組換え動物モデル又はヒト細胞のみである。SMA の領域においては、表現型の重症度が異なる数種の SMA マウスモデルがこれまでに開発されている。SMA マウスモデルの開発における一般的なアプローチは、遺伝子工学を用いて内因性のマウスゲノムを除去し、様々なコピー数のヒト *SMN2* 遺伝子を組み込むものである。*SMN2* 遺伝子の導入コピー数が多いマウスモデルでは一般に、コピー数の少ないモデルよりも表現型の重症度が軽度である。表現型の重症度が異なる数種のマウスモデルを用いて、ISIS 396443 の薬理学的特性を評価した。PK/PD を評価するため、ヒト *SMN2* 遺伝子を 4 コピー発現する軽症 SMA マウスモデルを用いた（Hsieh-Li 2000）。軽症 SMA マウスモデルを用いて PK/PD を評価することで、重症 SMA マウスモデルで認められる病態の急速な悪化及び進行に関連して解析が複雑になる可

能性を最小化した。より重症の SMA マウスモデルは、ISIS 396443 の有効性評価に用いた。

一般的な毒性試験動物種（マウス、ラット、イヌ、マカクザル）は *SMN2* 遺伝子を有さないため、薬理活性を示す動物種で ISIS 396443 の毒性評価を行うことはできなかった。*SMN2* 遺伝子転写物のスプライシングを修正することで全長 SMN タンパク質の産生量は増加するが、全長 SMN タンパク質は、健常人では産生されており、また SMA 患者でも不十分なレベルであるが産生されているため、ISIS 396443 には薬理作用に由来する特異的な安全性リスクはほとんどないと考えられる。よって、毒性評価では ISIS 396443 への曝露に関連した非特異的な作用を重視した。

毒性試験は複数の動物種（CD-1 マウス、Sprague Dawley ラット、ニュージーランド白色ウサギ及びカニクイザル）で実施したが、反復 IT 投与毒性試験には以下の 2 つの理由からカニクイザルを選択した。第 1 に、静脈内（IV）又は皮下（SC）投与を用いた他のプログラムから、ASO の組織分布、細胞内への取り込み、代謝及び薬剤クラス毒性（炎症誘発作用等）に対する感受性の観点から、サルはヒトに近い動物種として最も適切である（Henry 2008）。第 2 に、神経解剖学的にみると非ヒト霊長類は、毒性試験で一般的な毒性試験動物種の中ではヒトに最も近く、反復 IT 投与が可能であると共に IT 投与後のヒトでの薬物分布モデリングが可能である。よって、サルには臨床を反映した方法（IT 投与）で反復投与できるため、患者への IT 投与について最も適切な安全性及び曝露情報が得られる。

げっ歯類を用いて IT ボーラス投与による中期又は長期反復投与毒性試験を実施するのは技術的に困難である。そこで、全身曝露量を最大化させ、また小児患者での治療の妥当性を裏付けるために、幼若 CD-1 マウスを用いた 13 週間反復 SC 投与毒性試験を実施した。安全性薬理試験にはラットを用い、投与方法は腰椎領域への持続 IT 投与（0.25 μL/時間で 25 日間、最大 0.2 mg/日）とした。全身曝露量を最大化するため SC 投与により、マウス（受胎能・発生毒性）及びウサギ（胚・胎児発生）を用いた生殖発生毒性試験を実施した。

1.3.2 薬理試験

ヒトの遺伝的なエビデンスから、SMA 患者では SMN タンパク質発現の増加によってベネフィットが得られることが強く示唆される。1 つの治療アプローチとして、エクソン 7 を含有する *SMN2* mRNA の割合を増加させることがある。エクソン含有量を変えるアンチセンスオリゴヌクレオチドを見い出すため、ヒト *SMN2* のエクソン 7 周辺のイントロン及びエクソン領域に結合するように設計した数百個の 2’-MOE ASO の広範なスクリーニングを行った。薬理作用は、*in vitro* スプライシングアッセイ、レポーター遺伝子アッセイ、及び SMA 患者の線維芽細胞を用いた細胞培養試験で評価した（Hua 2008; Singh 2007）。これらの試験により、イントロン 7 のイントロン・エクソン接合部から約 10 ヌクレオチド下流に、ASO が標的とする *SMN2* 転写産物へのエクソン 7 含有を促進する新しい部位が同定された。

その後、ヒト線維芽細胞での活性を示すことと作用機序を明らかにするため、ISIS 396443 の *in vitro* 追加試験を実施した。これらの試験では、ISIS 396443 が *SMN2* の mRNA 前駆体に結合して、通常スプライスサプレッサーとして作用するヘテロ核リボヌクレオタンパク質 A1/A2（hnRNP A1/A2）を置換することが示された（Hua 2008; Rigo 2012）。このスプライスサプレッサーの置換は、成熟 mRNA のエクソン 7 の含有率を増加させる。

ISIS 396443 の *in vivo* 薬理作用は、4 種類のマウスモデル（それぞれ、内因性のマウス *SMN1* 遺伝子を欠失し、ヒト *SMN2* 遺伝子を発現するよう改変されたマウスモデル）を用いて評価した。マウスモデルの 2 つは、軽度の表現型及び通常の生存期間を示し、他の 2 つのマウスモデルは重度の表現型で生存期間の中央値は 10～16 日であった。この 4 つのマウスモデルでは、*SMN2* コピー数は表現型の重症度と逆相関している。急速に進行する病態による解析の複雑さを回避するため、2 つの軽症マウスモデルを用いて PK/PD 解析を実施した。最初のマウスモデルは 4 コピーのヒト *SMN2* 遺伝子を発現し、軽度の表現型を有する（*SMN*$^{-/-}$; *SMN2*$^{2TG/2TG}$）（Hsieh-Li 2000）。このマウスは成熟動物期まで生存でき、唯一の目立った表現型は尾と耳の壊死である。2 つ目の軽症マウスモデル（C/C マウス）では、修飾されたマウス SMN 遺伝子のタンデムリピート配列にヒト *SMN2* 遺伝子配列が続いている。両モデルで、ISIS 396443 の組織中濃度が 2～10 μg/g（投与後 2 週間目に測定）のとき、CNS 中に 50%～90%のエクソン 7 含有率が観察された。

重症 SMA モデルにおける ISIS 396443 の効果を検討するために 2 つのモデルを用いた。1 つめのモデルは、マウス *SMN* 遺伝子の両コピーを欠失し、ヒト *SMN2* 遺伝子のコピーがマウスゲノムに組み込まれている。さらに、*SMN2* Δ7 cDNA の複数のコピーがマウスゲノム内にタンデムに組み込まれている（以下、SMNΔ7 モデル）。2 つめのモデルは、マウス *SMN* 遺伝子の両コピーを欠失し、2 コピーのヒト *SMN2* 遺伝子を発現したトランスジェニックマウスである（以下、Hung 2 SMN2 copy モデル）。SMNΔ7 マウスモデルで ISIS 396443 の有効性を評価した。このマウスモデルは、疾患が急速に進行し、生存期間は約 16 日である。ISIS 396443 投与は、SMNΔ7 マウスの生存期間を最大 26 日（中央値）まで延長させた（全般的に生存期間の改善は用量依存的であった）。一部の試験では、別の重症マウスモデル（Hung 2 SMN copy モデル）を使用した（Hsieh-Li 2000）。PK 評価可能な範囲で、これらのマウスも 2～10 μg/g の組織中濃度で有効性を示した（Passini 2011）。

安全性薬理試験の 25 日間持続 IT 投与では、ラットの呼吸系又は心血管系に影響は認められず、またサルを用いた反復 IT 投与毒性試験でも心電図への影響は認められなかった。安全性薬理試験で観察された唯一の作用は、投与後の一過性の脊髄下部反射低下であった。この変化は、サルでの最高用量（3 mg 以上）で認められたが、投与に伴って重症化することはなかった（2.2 項）。また、カニクイザルでの毒性試験で、一般的な神経学的検査値（一般感覚、運動機能及び脳反射）の結果にも影響は認められなかった。

以上、*in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験により、ヒト *SMN2* 遺伝子におけるスプライシングの効果的な修正が全長 SMN タンパク質を産生させる機序が確認された。これらの試験結果は、SMA 患者への ISIS 396443 の IT 投与により SMN タンパク質産生が増加する可能性があるという治療的根拠を裏付けるものであった。

1.3.3 薬物動態試験

IT 投与後のカニクイザルの CSF、血漿及び組織を用いて、ISIS 396443 の PK プロファイルを検討した。これらの PK 試験の目的は以下のとおりであった。

- IT 投与後の、CSF 及び血漿中 ISIS 396443 濃度と CNS 及び全身組織中 ISIS 396443 濃度との関連性の検討。
- SMA 患者での投与頻度の選択根拠を得るための、CSF、血漿、CNS 及び全身組織におけ

る消失半減期の推定。

- 薬理試験で有効性が認められた組織中濃度範囲（2～10 μg/g tissue）をサルにおいて達成するために必要な投与量の確認。

薬物間相互作用（タンパク結合、代謝物の同定、及び CYP450 の阻害又は誘導を含む）の可能性を検討するための試験も実施した。

- マウスの血漿中、並びにサル及びヒトの血漿及び CSF 中における ISIS 396443 のタンパク結合の検討。
- サルの CSF、血漿及び組織中、並びにヒトの CSF、血漿及び尿中の ISIS 396443 の代謝物の同定。
- ISIS 396443 が、CYP450 による酸化的代謝の誘導因子又は阻害因子となる可能性、並びに吸収及び排出トランスポーターの阻害因子又は基質となる可能性の評価。

関連する PK 試験の概要を M2.6.4 表 1 に記載する。

IT 投与後、ISIS 396443 は速やかに CSF 全体に分布し、CNS 組織に取り込まれた後に CSF ターンオーバーを介して全身循環へと移行する。IT 投与後、血漿中濃度は CSF 中濃度よりも十分低い値に維持される。推定される CSF 中の終末相消失半減期は成熟サルと幼若サルの両方で 102～111 日であった。CNS 組織での終末相消失半減期が 116～174 日であることから、CSF 中濃度は CNS 組織中濃度と平衡状態に達していると考えられた。

以上、PK 試験から、IT 投与後の薬理作用に必要な脊髄及び脳領域への ISIS 396443 の分布及び取り込みの一貫したパターンが確認された。反復投与 PK 及び反復投与毒性試験での消失半減期が長いことより、SMA 患者へ IT 投与する際の投与間隔は長いことが示唆された。

1.3.4 毒性試験

毒性試験プログラムは ICH M3（R2）の原則に準拠し、以下の試験を実施した。

- カニクイザルを用いた GLP 単回 IT 投与毒性試験（396443-AS01 試験）
- CD-1 マウス及びカニクイザルを用いた GLP 反復投与毒性試験：
  - 幼若 CD-1 マウスを用いた 13 週間 SC 投与試験（396443-AS07 試験）
  - 幼若カニクイザルを用いた 14 週間 IT 投与試験（396443-AS03 試験）
  - 幼若カニクイザルを用いた 53 週間 IT 投与試験（396443-AS06 試験）
- CD-1 マウス及びニュージーランド白色ウサギを用いた GLP 生殖発生毒性試験（マウスでは 396443-AS08 試験及び 396443-AS12 試験、ウサギでは 396443-AS09P 試験及び 396443-AS09 試験）
- GLP 遺伝毒性試験（396443-IS02、-IS03、-AS10 試験）
- CD-1 マウスを用いた 13 週間 SC 反復投与毒性及び不純物適格性評価試験（396443-AS13 試験）
- 各種組織固定法を用いたカニクイザル腰部 IT ボーラス投与後のオリゴヌクレオチドに関連する海馬の空胞化の評価のための非 GLP 試験（396443-AS11 試験）

対象小児患者集団の年齢範囲に基づいて、幼若サルを用いた IT 投与による 2 つの反復投与毒性

試験（14 週間試験及び 53 週間試験）を実施した。サルでの反復投与試験の最高用量（3 及び 4 mg/回）は、サルでの単回 IT 投与試験より得られた忍容性に関する急性所見（7 mg/回で一過性の脊髄反射低下）により上限が設定された。その結果、曝露量を最大にするため、負荷投与及び維持期投与を臨床試験よりも頻回にした。最大全身曝露量を求め、また小児患者での治療の妥当性を裏付けるために、幼若 CD-1 マウスでの 13 週間 SC 投与試験を実施した。また、特定の工程不純物を多量に含有する原薬を用いて、CD-1 マウスでの 13 週間 SC 投与試験も実施した。

ISIS 396443 の遺伝毒性の可能性は、*in vitro* 試験（細菌を用いた復帰突然変異試験［エームス試験］及びチャイニーズハムスター卵巣由来［CHO］細胞株を用いた染色体異常試験）及び *in vivo* 試験（マウス小核試験）により評価した。遺伝毒性試験の結果はすべて陰性であった。

ISIS 396443 のがん原性試験は実施しておらず、また計画もしていない。ICH S6 に従い、科学的根拠に基づく重要性（WOE）アプローチを用いて、ヒトでの ISIS 396443 の発がんリスクを評価した。発がん性評価に対する原則に基づき、この WOE 評価では、げっ歯類を用いてがん原性試験を実施する場合の技術的な制約として投与経路が IT であること、ターゲットの薬理作用（SMN タンパク質の産生）、ASO の作用機序（*SMN2* 遺伝子から転写される mRNA のスプライシング修正）、及び遺伝毒性、増殖反応、内分泌かく乱又は免疫抑制作用の可能性を示す既存の前臨床データの精査を考慮に入れた。この評価に基づき、患者に ISIS 396443 を IT 投与した際の有意な発がんリスクは示されていない。したがって、ISIS 396443 の潜在的発がん性を評価する追加の *in vitro* 又は *in vivo* 試験を実施しても、ヒトでの発がんリスク評価に有用な追加情報が得られるとは考えられない。

最大全身曝露量を求めるため SC 投与により、マウス（受胎能・発生毒性併合試験、出生前及び出生後発生試験）及びウサギ（胚・胎児発生毒性試験）を用いた生殖発生毒性試験を実施した。

反復投与毒性試験に使用した ASO 原薬ロット（　　001*　　）は、最初の臨床試験及びピボタル臨床試験でも使用された。被験物質は、投与に必要な正確な濃度で供給されるか、又はより高濃度（100 mg/mL）で供給された後に動物試験施設で投与に適切な濃度に希釈された。したがって、毒性試験に使用された原薬ロットは、臨床試験で使用されたロット及び市販用の原薬を代表するものである。

14 週間複数回投与及び 53 週間反復投与毒性試験で得られた無毒性量（NOAEL）から、投与 1 年目は負荷投与期に続き 4 ヵ月に 1 回の維持投与を行う SMA 患者での推奨用法・用量の適切な安全域が示された。安全域は、投与 1 年目は約 7 倍、その後の年間あたりの維持期用量（年 3 回）では約 14 倍である。非臨床安全性プログラム全体の結果は、本臨床プログラムの妥当性を裏付けており、また SMA 治療薬としての承認申請の裏付けとなる安全性データを提供する。

1.4　被験物質

被験物質である ISIS 396443 溶液は、150 mM Na、3.0 mM K、1.4 mM Ca、0.8 mM Mg、1.0 mM P 及び 155 mM Cl を含有する人工 CSF（aCSF）を用いて調製した。被験物質ロットの一覧を付録に記載する。

＊新薬承認情報提供時に置換えた

1.4.1 残留溶媒及び元素不純物の適格性評価

残留溶媒及び元素不純物について申請する限度値は、それぞれ ICH Q3C (R5)及び ICH Q3D に規定される 1 日許容曝露量（PDE）に準拠している（3.2.S.4.5 項を参照）。

1.4.2 オリゴヌクレオチド不純物の適格性評価

オリゴヌクレオチド不純物の適格性評価は、原薬ロット　001*　を用いて幼若サルで実施した 53 週間反復投与毒性試験の結果に基づいている。本ロットは I 型 SMA 患者のピボタル臨床試験（乳児を対象としたオープンラベル試験［CS3A］及び乳児を対象としたシャム対照試験［CS3B］）にも使用されている。53 週間試験の用法･用量は患者に用いられる用法･用量と近いことから（サルと患者のいずれでも負荷投与期の後に維持用量を投与）、オリゴヌクレオチド不純物の適格性評価には 53 週間試験を選択した。具体的には、患者に対して Day 1、15、29 及び 64 に負荷投与し、その後は 4 ヵ月に 1 回の維持投与を行った。毒性試験では、動物に対して週 1 回の負荷投与を 5 週間継続し、その後は 6 週間に 1 回の維持投与を行った。

53 週間毒性試験の結果に基づき、ロット　001*　は臨床試験で用いられたよりも高い累積用量で良好な忍容性が示された（4.2.11 項「安全域」）。動物では投与頻度が高く、CSF 容積もサルとヒトとの間で 10 倍の違いがあることから、無毒性量（NOAEL）が 4 mg/回で安全域は 14.4 倍であった（表 3）。

構造的に関連するオリゴヌクレオチド不純物の量は、ロット　001*　中の含量に包含係数を掛けたレベルまで安全と考えられる。53 週間毒性試験で求めた NOAEL（4 mg/回）に基づき包含係数は [redacted] とした（4.2.11 項、表 3）。重要不純物の毒性確認範囲を 3.2.S.3.2 項の表 1 に記載する。すべての不純物について十分な毒性確認範囲が得られており、後の原薬ロットを患者に使用することの妥当性及び規格値の妥当性が示されている。

種々の不純物を多量に含有する親 ASO（ISIS 396443）の全身性の毒性を評価するため、追加の毒性試験を実施した（396443-AS13 試験）。この試験では、各種組織中における ASO 混合物濃度を最大とするため SC 投与を行い、一覧に示した不純物の毒性の可能性を評価した。不純物を多量に含有するロットを､マウスに週 1 回 13 週間 SC 投与した｡3 種の不純物含有ロットを調製し、5 又は 25 mg/kg/週で投与した。これらの不純物含有ロットで得られた結果を、ISIS 396443 を 5 又は 25 mg/kg/週で投与した群及び生理食塩水を投与した対照群の結果と比較した｡各群に雄雌 6 例ずつを割付けた。この試験で使用した ISIS 396443 のロット（　002*　）の純度（全長 ASO の含有率）は [redacted]%であった。これに対し、不純物含有ロットの純度（親 ASO の含有率）は 49.5%～61.8%、各不純物の含有率は 4.1%～6.7%であった。

死亡率、生存期間中の所見、血液学的検査値、剖検時の肉眼的観察又は器官重量に被験物質の影響は認められなかった。各投与群の個々の動物で軽度の AST 及び ALT の増加が散発的に認められた。全被験物質投与群のマウスにおいて、全身組織に空胞化/顆粒状のマクロファージが認められ、腎臓の尿細管上皮内の好塩基性顆粒の蓄積が病理組織学的に認められた。これら所見はオリゴヌクレオチドの取込み、又はオリゴヌクレオチドの炎症誘発作用による細胞活性化及びサイトカイン産生と一致していた。親 ASO（ISIS 396443）を投与した動物と比べて、3 つの不純物含有ロットのいずれを投与した場合も追加すべき毒性所見は認められなかった。

＊新薬承認情報提供時に置換えた

以上、オリゴヌクレオチド不純物は 2 つのエビデンスによりその安全性が確認されている。第 1 に、患者での推奨用法･用量（IT 負荷投与後に IT 維持投与）と近い用法･用量で実施した 53 週間長期毒性試験の結果を用いて、毒性確認範囲が求められている。第 2 に、各種不純物を多量に含有するロットを用いた 13 週間 SC 投与毒性試験で、親 ASO と比べて不純物と関連する追加すべき全身毒性の懸念は示されていない。このように、製剤中の不純物に起因する大きな問題はないと考えられる。

2 薬理試験

薬理試験プログラムでは、*in vitro* 及び *in vivo* 試験において、ISIS 396443 が *SMN2* 遺伝子からの全長 SMN タンパク質の産生量を増加させることによる効果を評価した。*In vitro* 試験では SMA 患者から得られた線維芽細胞を使用し、*in vivo* 試験ではヒト *SMN2* 遺伝子を発現するよう改変された 4 種類のマウスモデルを用いて実施した。これらの薬理試験において、目的の薬理作用を得るために必要な ISIS 396443 の CNS 組織中最低濃度及び至適濃度を求めた。

2.1 効力を裏付ける試験

2.1.1 *In vitro* 薬理試験

In vitro スプライシングアッセイ、レポーター遺伝子アッセイ及び SMA 患者の線維芽細胞を用いたスプライシングアッセイを用いて、ヒト *SMN2* 遺伝子のエクソン 7 周辺のイントロン及びエクソン配列に結合するよう設計した 500 個を超える 2'-MOE ASO をスクリーニングした結果、ISIS 396443 が見いだされた（Hua 2007; Hua 2008; 未発表データ; 396443-NP01 試験）。初期の試験で、エクソン 7 の含有が促進されるエクソン 7 内の領域を特定し、その後の研究でイントロン･エクソン接合部から約 10 ヌクレオチド下流のイントロン 7 に新規の領域を同定した（M2.6.2、図 2）。イントロンスプライシングサイレンサーN1（ISS-N1）と呼ばれるこの領域での作用は、他施設の研究グループによって確認された（Singh 2007）。

SMA 患者の線維芽細胞を用いてさらに徹底的なスクリーニングが行われ、ISS-N1 領域を標的とする ASO が、*SMN2* エクソン 7 含有率を促進するのに最も有効であることが示された（M2.6.2、図 2）。ASO の糖残基の修飾はその力価及び忍容性に影響を及ぼすことができる。当初、2'-*O*-(2-メトキシエチル)（2'-MOE）と 2'-*O*-メチル（2'-OMe）の異なる糖修飾を有する 2 つの ASO を比較した。同一ヌクレオチド配列の 2 つの ASO を用いて、SMA 患者の線維芽細胞におけるエクソン 7 の含有率の促進作用を比較した。ISIS 396443（18-mer 2'-MOE）は既にその作用が報告されていた 2'-OMe オリゴヌクレオチド（Singh 2006; Williams 2009）よりも活性が高く、EC_{50} 値はそれぞれ 1.9 nM と 7.5 nM であった。エクソン 7 含有率の増加は 2 つの手法により確認した。最初の手法では、ウェスタンブロットにより総 SMN タンパク質の産生が増加することを確認した。2 つめの手法では、SMN タンパク質が Gems と呼ばれる核内構造に局在することを確認した。Gems は核内に存在するリボ核タンパク質でカハール体と関連しており、核内低分子リボ核タンパク質（snRNP）の会合及び RNA スプライシングに関与すると考えられている。Gems は免疫蛍光染色で容易に可視化できる。患者の線維芽細胞を ISIS 396443 で処理すると、Gems の数が増加した。検体数が少なかったため当該所見により決定的な結論は得られなかったが、*in vitro* データから総合的に考えると、ISIS 396443 はエクソン 7 の含有率を増加することにより SMN タンパク質の発現を増加させることが示された（M2.6.2、2.2 項」）。

ISIS 396443 がエクソン 7 の含有を促進する機構は、HeLa 細胞核抽出物を使った研究により明らかにされている（Hua 2008; Rigo 2012; 396443-NP03 試験）。ISIS 396443 が特異的に結合する ISS-N1 配列には、hnRNP A1/A2 ファミリーに対する弱い認識配列が 2 つ近接して存在する。ISIS 396443 は、この配列を含む RNA 上で特異的に hnRNP A1 及び A2/B1 タンパク質を置換する。

これらの研究には HeLa 細胞核抽出物が用いられたが、分子学的機構は細胞の種類によって違いはないと考えられ、哺乳類の成熟ニューロンでも同様と考えられる。

2.1.2 *In vivo* 薬理試験

In vivo 薬理試験は大きく 2 つに分かれる。ISIS 396443 と *SMN2* スプライシングとの頑健な PK/PD の確立に焦点を置いたものと、SMA モデルマウスでのスプライシングの変化と表現型改善との相関性を検討することに焦点を置いたものである。前者の試験には、2 種類の軽症 SMN マウスモデルを使用した。1 つはマウス *SMN* 遺伝子のホモ接合性欠失とヒト *SMN2* 遺伝子 4 コピーを有するマウスモデル（$SMN^{-/-}$; $hSMN2^{2TG/2TG}$）（Hsieh-Li 2000）、もう 1 つは C/C マウスモデルである(Osborne 2012)。後者の試験では、2 種類の SMA 重症マウスモデルを用いて ISIS 396443 の有効性を検討した。重症マウスモデルはいずれも短命で、生存中央値が約 10～16 日である。急速に重症化する表現型では PK/PD 解析が困難になるが、疾病関連評価項目に対する ISIS 396443 の影響を検討するうえで適したモデルである。これらのマウスモデルにおいて、全身投与（IP 投与）、脳室内（ICV）投与、子宮内 ICV 投与など、異なる投与経路を用いた。ASO は血液脳関門を通過しにくいため、大半の試験では ICV 投与を用いた。組織特異的な PK/PD を評価する、又は有効性を示すための ICV 投与試験が終了している。

- 軽症マウスモデル（$SMN^{-/-}$; $hSMN2^{2TG/2TG}$）における ICV ボーラス投与と持続投与の比較。
- 薬理作用を惹起する全長 SMN タンパク質増加に必要な CNS 組織中濃度（$SMN^{-/-}$; $hSMN2^{2TG/2TG}$ マウス及び C/C マウス）
- マウスにおける組織中消失半減期の推定。
- 重症マウスモデル（Δ7 SMA）における運動能及び生存に対する影響。
- Δ7 SMA マウスにおける神経筋接合部及び筋原線維のサイズに対する影響。
- 重症マウスモデル（Hung 2 SMN2 copy モデル）における運動能及び生存に対する影響を中枢投与と末梢投与とで比較。

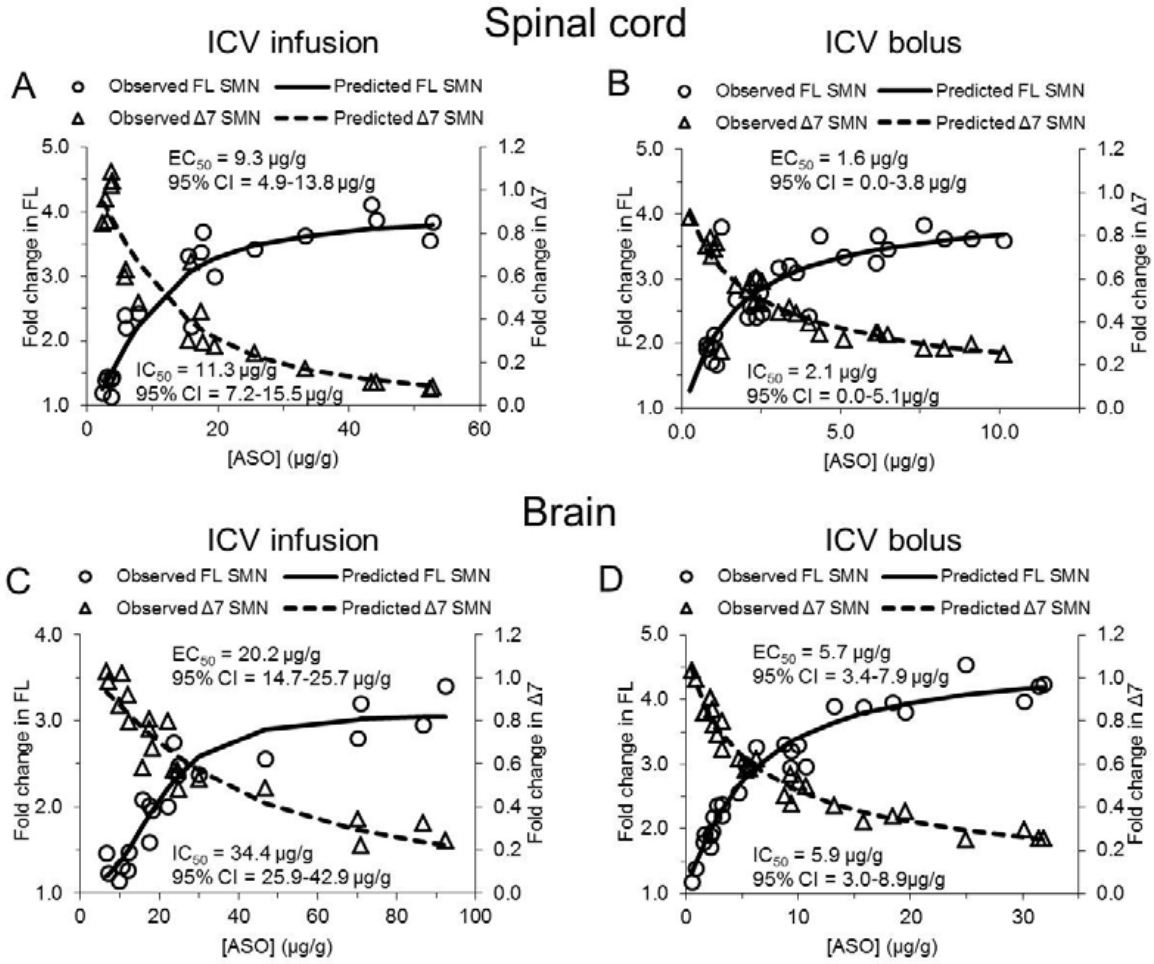
2.1.2.1 軽症 SMA マウスモデルにおける ICV 投与

ASO は完全に発達した血管脳関門を通過しにくい。したがって、CNS において ASO の薬理作用を発現させるためには、ASO を CNS 内に直接注入する必要がある。そのためにマウスでは ICV 投与が、大型の動物では IT 投与が行われる。いずれの投与経路でも、ボーラス投与又は持続投与（インフュージョン）の選択が可能である。$SMN^{-/-}$; $hSMN2^{2TG/2TG}$ マウスを用いた最初の試験で、7 日間の ICV へのボーラス投与と持続投与の比較を実施した。いずれの投与法においても ASO はマウスの CNS 組織全体に同様に分布し、脳及び脊髄内におけるエクソン 7 の含有率（qRT-PCR による測定値）は 90%に達した。

免疫組織化学的手法を用いて CNS 組織での ASO の分布を可視化した。ISIS 396443 は脊髄及び脳全体に広く分布し、皮質、線条体及び海馬領域に蓄積が認められた。ISIS 39644 濃度が最も高かったのは、腰髄の運動ニューロンを含むニューロンであった（M2.6.2、図 9A）。SMN2 タンパク質の染色でも、溶媒対照群と比べて脳及び脊髄での発現が増加していることが示された（M2.6.2、図 9B）。

ASO を定量して *SMN2* スプライシングと比較することにより、EC_{50} 値の推定も行った。396443-NP04 試験では、EC_{50} 値は、持続投与よりも ICV ボーラス投与の方が有意に低かった(Rigo 2014)。この結果によって、投与ルートの妥当性が裏付けられるとともに、ボーラス投与（持続投与ではなく）の妥当性が裏付けられた。単回 ICV ボーラス投与後の脳及び脊髄における EC_{50} 値はそれぞれ 5.7 µg/g 及び 1.6 µg/g であったのに対して、ICV 持続投与後の EC_{50} 値はそれぞれ 20.2 µg/g 及び 9.3 µg/g であった （図 1）。

図 1　　SMN2 マウスモデル（*SMN*$^{-/-}$; *hSMN2*$^{2TG/2TG}$）に ISIS 396443 を ICV 持続投与、又はボーラス投与した後の PK/PD



(A) 図 1A の投与された各マウスについて、胸髄での ISIS 396443 濃度を HPLC-UV で測定し、その結果を同一マウスの腰髄で測定された FL 又は Δ7 の *SMN2* 転写産物濃度に対してプロットした（それぞれ○及び△）。EC50 及び IC50 の算出値を示す。（B）図 1C の投与を受けた各マウスの胸髄の ISIS 396443 濃度を HELISA で測定したことを除き、A と同様。（C、D）脳についての分析であることを除き、A 及び B と同じ。
Data source: M4.2.1.1-4_Figure 2

この試験では効果持続期間及び忍容性の予備的な推定も行った。その結果、ICV 持続投与後 71 日目でもエクソン 7 の含有率が増加していた。SMN2 マウスモデルでも効果持続期間の比較を行った（M2.6.2, 2.3.2 項）。この持続的な薬理作用は、CNS 組織中の ISIS 396443 の消失半減期と一致する（M2.6.4、表 14）。忍容性は、投与後の *Aif1* mRNA を定量することにより検討した。Aif1

はミクログリア活性のマーカーである。いずれのドラッグデリバリー方法及び用量でも脊髄中又は脳組織中で Aif1 の増加は認められず、両ドラッグデリバリー方法の忍容性が示された。ISIS 396443 の忍容性に関する詳細は安全性の項に記載する。

次に、*SMN*$^{-/-}$*; hSMN2*$^{2TG/2TG}$ マウスモデルを用いて ICV ボーラス投与と ICV 持続投与を比較する長期試験を実施した。ICV 持続投与は 7 日間かけて計 350 μg を投与し、一方、ICV ボーラス投与は 100 μg を投与した。ICV 持続投与群では 52 週間後まで、ICV ボーラス投与群では 36 週間後まで *SMN2* スプライシング及び Aif1 発現量を測定した。試験期間中に Aif1 の発現量は緩やかな増加傾向を示したが、PBS 投与群でも同様の増加傾向が認められたことから、これは加齢又は処置に関連した現象と考えられた。投与速度にかかわらず、*SMN2* エクソン 7 の含有率は脳組織中及び脊髄中ともに試験期間を通じて維持された。エクソン 7 の含有率は、最終測定時点付近でわずかに減少する傾向はあるが、その値は依然として最大値に近いことから、薬理作用は非常に長く持続することが示される。mRNA の翻訳は免疫組織化学的な手法による脊髄中の SMN タンパクの陽性染色によって確認された。

薬物動態解析の結果、脳領域及び投与方法によって異なるものの、組織中消失半減期は 71～206 日の範囲と考えられた。マウスにおける ICV ボーラス投与による ISIS 396443 の見かけの半減期は、脳組織中（71 日）よりも脊髄中（145 日）の方が長かった。ICV 持続投与による推定半減期はより長いものの、データに見られるとおり、ICV 持続投与による力価損失が一部認められる（図 1）。ISIS 396443 の CNS 組織中での長い半減期から、これらの組織における持続的な SMN2 発現が説明できる。

2.1.2.2 SMA C/C マウスモデルにおける CNS での効果

SMN$^{-/-}$ *; hSMN2*$^{2TG/2TG}$ マウスモデルを用いた試験により、ISIS 396443 と *SMN2* スプライシングでの PK/PD が確立された。これが当該マウスモデルに特有の所見ではないことを確認するため、別の SMA マウスモデルを用いて試験を行った。C/C マウスモデルは、マウス *Smn* 遺伝子座のエクソン 6 以降をヒト *SMN2* 遺伝子で置換し、さらに完全なヒト *SMN2* 遺伝子を 1 コピー導入したモデルである。C/C マウスモデルの表現型は、*SMN*$^{-/-}$ *; hSMN2*$^{2TG/2TG}$ マウスよりは重度だが比較的軽度である。C/C マウスモデルは体重がやや少なく、神経筋接合部の減少や握力の低下など、神経筋機能に軽度の変化が認められる。

C/C マウスモデルに ISIS 396443 を ICV ボーラス投与すると、SMN2 の発現が増加した。発現の増加は、*SMN*$^{-/-}$ *; hSMN2*$^{2TG/2TG}$ マウスと同じく、用量依存的であった（396443-NP04 試験）。C/C マウスモデルにおける EC_{50} 値は脊髄及び脳においてそれぞれ 1.2 及び 3.4 μg/g であった。*SMN*$^{-/-}$*; hSMN2*$^{2TG/2TG}$ モデルマウスと同様、ISIS 396443 の投与後にミクログリアマーカー*Aif1* の発現は増加しなかった。*SMN*$^{-/-}$ *; hSMN2*$^{2TG/2TG}$ 及び C/C マウスモデルで得られた EC_{50} 値が、ヒトでの目標濃度になる。

2.1.2.3 重症 SMA マウスモデル（Δ7 SMA）における CNS での効果

軽症マウスモデルを用いた試験は、ISIS 396443 と SMN2 スプライシングとの PK/PD の確立を主目的としており、これらのマウスモデルでは限られた有効性の試験を実施した。しかし、これ

らの軽症 SMA マウスモデルでは、尾と耳の壊死という 2 つの表現型が知られている。このような末梢組織の変性は、典型的な SMA 患者ではみられない。胎生期 15 日目に ISIS 396443 を子宮内 ICV 投与により単回投与した結果、生後の新生児の尾の長さが増加した（Hua 2010）。これらの所見は ISIS 396443 の有効性を示唆する有望な結果ではあったが、その有効性は神経筋系が明確に関与するモデルを用いて検討することとした。このようなマウスモデルの 1 つが Δ7 SMA マウスモデルである。

Δ7 マウスは重症 SMA モデルであり、*SMN* 遺伝子のホモ接合性欠失に加え、マウスゲノム内にヒト *SMN2* 遺伝子 2 コピー及びエクソン 7 を欠失した（Δ7）*SMN2* cDNA が組み込まれている。Δ7 cDNA が組み込まれることにより、マウスの生存期間が延長する（Le 2005）。Δ7 SMA マウスは他の同腹児よりも小さく産まれ、生後もあまり成長せず、耳と尾と指の組織壊死が見られる。また、筋力低下及び骨格筋の脱神経及び消耗を認める。生存中央値は約 16 日である。Δ7SMA マウスに ISIS 396443 を投与した結果、行動、運動能及び生存期間が有意に改善した(Passini 2011)。

生後 0 日目（PND 0）の新生児マウスに ISIS 396443 を単回 ICV ボーラス投与し、その薬理作用を検討した。4 μg を単回 ICV 投与したとき、脊髄組織内でのエクソン 7 の含有率に対して最大の効果が見られた。この単回投与により、対照マウスと比べて生後 16 日目（PND 16）の体重が有意に増加した。単回 ICV 投与後に、運動ニューロン接合部の形態が改善し、筋線維の大きさが増加した。こうした神経筋接合部及び筋形態の改善により、正向反射、握力及び後肢開脚などで評価される筋機能が顕著に改善した（M2.6.2、図 24）。これらの運動機能の変化に伴い、Δ7 マウスの生存期間も延長した（16 日から 26 日に延長）。このように、Δ7SMA マウスモデルに ISIS 396443 を投与すると、行動及び運動機能が顕著に改善した。

Δ7 SMA マウスモデルにおける ISIS 396443 の効果持続期間を求めるため、生後 0 日目の新生児マウスに 4 μg を単回 ICV ボーラス投与した。脊髄中の *SMN2* へのエクソン 7 の含有率を投与後 3、16 及び 30 日目に評価した。エクソン 7 の含有率は投与 16 日後に最大となり、その後 30 日目まで減少した（M2.6.2、図 28）。対応する ISIS 396443 の組織中濃度は生後 3 日目が 8～10 μg/g、生後 16 日目が 1～3 μg/g、生後 30 日目が 1～2 μg/g であった。この結果に基づき、Δ7 SMA マウスモデルではエクソン 7 の含有を促進するために 2～10 μg/g の濃度が必要であることが判明した。

新生児マウスでエクソン 7 の含有率に対する効果持続期間（30 日未満）は、6 ヵ月以上の効果持続期間が示された成熟マウスでの結果とは異なる。この違いの原因は十分に解明されていないが、発達成長段階にある新生児では、組織サイズの増大に伴う希釈効果に加えて、組織からの ASO の消失が成熟マウスよりもより急速である可能性がある。

以上、非臨床薬理試験の結果は、ISIS 396443 は SMA の治療に有用であるという仮説の妥当性を示している。標的組織中の薬物濃度が 2～10 μg/g であれば、脊髄組織中の mRNA へのエクソン 7 の含有率を 50%から 90%高めるのに十分であった。その結果、SMN タンパク質の増加に伴い重症 SMA マウスモデル（Δ7 SMA）の生存期間も延長した。

2.2 副次的薬理試験

2.2.1 SMN 転写産物に対する ISIS 396443 の特異性

バイオインフォマティクス解析として、2011 年にヒトトランスクリプトームの BLAST による解析を、2015 年に Bowtie による解析を実施した。BLAST によるアラインメントにより、18 塩基長の ISIS 396443 は、SMN1 及び SMN2 の mRNA 前駆体の転写物にのみ存在する ISS-N1 部位に特異的に結合すると予測された。18 塩基中 15 塩基が相同な 3 つの転写物が同定された。RNA 転写物に対する ASO の結合親和性はミスマッチ数が多いほど低下する。ASO は RNaseH による RNA 分解又は siRNA 機構を促進せず、3 つのうち 2 つの遺伝子は、相同部位がスプライシング部位との相同性が知られていないイントロン領域にあることから、この 2 つについては検討を行わなかった。3 つ目の遺伝子は活発に転写されていないと考えられた。

最近実施した Bowtie 分析では、ISIS 396443 と相同な 3 つの新規転写物が同定された。1 つは 18 塩基すべてが相同で、*SMN2* 遺伝子座と相同である。残りの 2 つは非翻訳領域の RNA で、18 塩基中それぞれ 17 塩基及び 16 塩基が相同であった。この 2 つの部位に対する ISIS 396443 結合性の意義は不明である。いずれもモデル遺伝子の産物と考えられる。これらは自動的に解析された情報のみから予測されたモデル遺伝子であり、マニュアルでの情報収集及び評価はされていない。さらに、異なるデータ源でもこれらの配列の発現又は機能性を裏付けるエビデンスは得られていない。したがって、ISIS 396443 の作用機序を踏まえ、またスプライシング接合部や他の調節部位付近の遺伝子配列と相同性が認められないことから、ISIS 396443 が他の遺伝子の発現や機能に直接影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

2.3 安全性薬理試験

ラットを用いた脊髄腰椎領域への持続 IT 投与による安全性薬理試験を実施した（M2.6.2、4.1 項）。被験物質又は溶媒を最長 25 日間投与した。肺機能（呼吸数、1 回換気量、毎分換気量）、血圧（収縮期血圧、拡張期血圧、平均動脈圧）及び心拍数を試験期間中に複数回測定した。

ラットにおける ISIS 396443 への曝露量は用量依存的に増加した。0.02、0.06 及び 0.2 mg/日の投与群における腰髄組織中の平均濃度はそれぞれ 73、170 及び 389 µg/g であった。ISIS 396443 の投与は、死亡率又は体重に影響を及ぼさなかった。本試験では肺機能又は心血管機能検査値に被験物質と関連した影響は認められなかった。

さらに、呼吸系及び心血管系への影響は、サルを用いた ISIS 396443 の単回及び反復投与毒性試験でも評価した。これらの毒性試験のいずれでも、ISIS 396443 の心血管系測定値及び呼吸系パラメータのいずれに対する影響も認められなかった。独立した安全性薬理試験は実施していないが、中枢神経系への影響は、サルでの単回及び反復投与毒性試験で評価した。3 mg/回以上の IT ボーラス投与したときに認められた脊髄下部反射での一過性の低下が認められた。カニクイザルの毒性試験において、一般的な神経学的検査（一般感覚、運動機能及び脳反射）の結果に影響は認められなかった。

サルを用いた単回及び反復投与試験では、腎臓への影響を標準的な腎機能関連パラメータを含む血清生化学検査及び尿検査により評価した。これらの毒性試験のいずれでも血清生化学パラ―

メータ及び尿検査値にはいずれの用量及び時点でも ISIS 396443 投与と関連した影響は認められなかった。

ISIS 396443 と類似の構造を有する 7 つのアンチセンスオリゴヌクレオチド（すなわち、2'-MOE ホスホロチオエート）は、hERG チャネル（*in vitro*）に影響を及ぼさないことが明らかとなっている（Kim 2014）。hERG チャネルへの影響の最も一般的な作用機序は、チャネルポアへの直接的な作用であり、上記の結果から、大きな分子サイズを持つアンチセンスオリゴヌクレオチドによるチャネル阻害の可能性は低いことが示唆された。また、ヒトにおいて、類似の化学構造を持つアンチセンスオリゴヌクレオチドの QT/QTc 評価試験が実施されている。ISIS 396443 投与量の 16 倍を超える投与用量（200 mg）においても、QTc 間隔に影響を及ぼさなかった（Yu 2016）。以上の結果より、ISIS 396443 について hERG チャネル試験を含めた *in-vitro* 電気生理学的試験は実施しなかった。また、これまでに実施された非臨床及び臨床試験において hERG チャネルへの影響に関連する安全性リスクは認められていない。

2.4 薬力学的薬物相互作用試験

ISIS 396443 は薬物相互作用を示す可能性が低いため、薬力学的薬物相互作用試験は実施していない（3.6 項）。

2.5 考察及び結論

非臨床薬理試験により、ISIS 396443 は *SMN2* mRNA 前駆体のイントロン領域に結合することにより、*SMN2* のスプライシングを修正し全長 SMN タンパク質をコードする mRNA の産生を促進することが示された。ヒト *SMN2* 導入遺伝子を有するトランスジェニックマウスにおいて、ISIS 396443 は十分な SMN の発現を誘導し、生存期間の有意な延長と運動機能の改善を示した。トランスジェニックマウスモデルでは SMA 患者でみられる病態が完全には再現されないものの、マウスモデルを用いて PK/PD に関する重要な情報が得られた。具体的には、CSF 内への投与、患者での推奨用量及び CNS 組織中での長い半減期を踏まえた間欠投与の妥当性が試験結果から示されている。

ISIS 396443 の CNS 組織中濃度が 2～10 µg/g であれば、トランスジェニックマウスの脊髄中の mRNA へのエクソン 7 の含有率を 50～90%高めるのに十分であることが判明した。作用機序に基づき、健常人でのレベル以上に SMN タンパク質を増加させるほど高い ISIS 396443 の組織中濃度は予想されない。サルを用いた毒性試験において、ISIS 396443 の組織中濃度が高い場合に有害な毒性作用が発現する可能性を検討した。53 週間毒性試験において、定常状態の ISIS 396443 の腰髄組織中濃度（約 100 µg/g、表 1）に関連した有害作用は認められず、この濃度は ISIS 396443 による治療を受けた SMA 患者の組織中の濃度（腰髄中で最大 32 µg/g）よりも高かった。

以上、非臨床薬理試験の結果は、ISIS 396443 が SMA の治療に有用であるという仮説を裏付けている。

3 薬物動態試験

サルを用いた IT 投与による単回及び反復投与毒性/PK 試験で得られた CSF、血漿及び組織試料を用いて ISIS 396443 の非臨床薬物動態を評価した。当該試験より得られたデータ及び *in vitro* 薬物相互作用試験で得られたデータの概要を本項に記載する。マウス及びウサギを用いた SC ボーラス投与による生殖発生毒性試験でも血漿中及び組織中薬物濃度を評価しており、その概要を 4 項に記載する。

サルを用いて実施した以下の 4 つの独立した *in vivo* 試験から結果が得られている。

- 成熟カニクイザルを用いた非 GLP 複数回投与毒性/PK 試験（396443-APK01 試験）
- 成熟カニクイザルを用いた GLP 単回 IT 投与毒性試験（396443-AS01 試験）
- 幼若カニクイザルを用いた GLP 14 週間 IT 投与毒性試験（396443-AS03 試験）
- 幼若カニクイザルを用いた GLP 53 週間 IT 投与毒性試験（396443-AS06 試験）

3.1 分析方法

サルの CSF 中、血漿中及び組織中の全長 ISIS 396443 濃度は、ハイブリダイゼーション-ELISA 又は電気化学発光（ECL）法を用いて測定した。ウサギ及びマウスの全身組織中の ISIS 396443 濃度は HPLC 法を用いて測定した。代謝物（短鎖オリゴヌクレオチド）は HPLC/MS 又は HPLC/MS/MS を用いて同定･定量した。詳細は M2.6.4 表 2 に記載する。

3.2 吸収

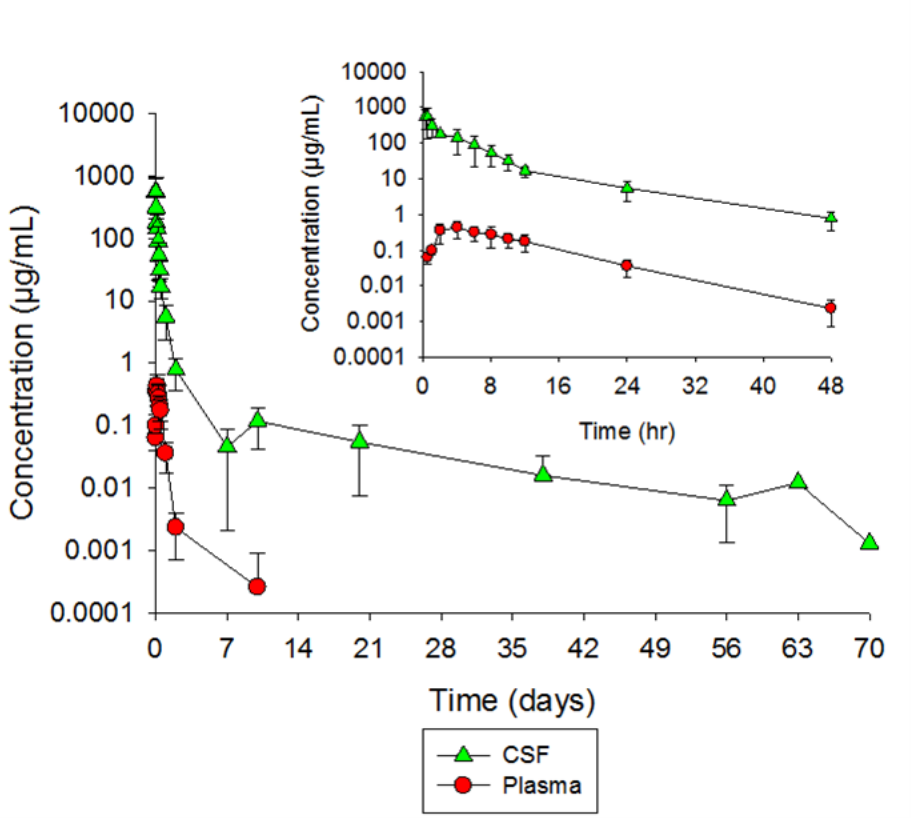
血管脳関門を回避して ISIS 396443 を CSF 内に IT 投与することで、薬剤は初期吸収過程を経ずにすべて標的 CNS 組織に到達する。IT 投与後、ISIS 396443 は速やかに CSF 全体に分布し、代謝クリンアランスをほとんど受けることなく CNS 組織に取り込まれた後、CSF ターンオーバーを介して最終的には全身循環へと移行する。ISIS 396443 の血漿中濃度は CSF 中濃度よりも約 1～3 桁低い値であった。詳細は 3.3 項に記載する。

3.3 CSF 中及び血漿中薬物動態及び組織分布

3.3.1 単回投与後の薬物動態及び組織分布

成熟サルに 1、3 又は 7 mg を単回 IT ボーラス投与後、CSF 中、血漿中及び組織中の ISIS 396443 濃度を測定した。CSF、血漿、CNS 組織及び肝臓中の ISIS 396443 濃度は用量依存性を示した。IT 投与後に ISIS 396443 は CSF から脊髄及び脳へと分布し、さらに CSF ターンオーバーを介して全身循環へと移行する。血漿中濃度は CSF 中濃度と比べ低かった（すべての測定時点で CSF 濃度よりも 100 倍以上低かった）（図 2）。

図 2　　カニクイザルに 3 mg を単回 IT ボーラス投与後の CSF 中及び血漿中の平均薬物濃度（± SD）の推移



Data source: M4.2.3.1-1_Appendix F_Pharmacokinetics (PK) Report_Figure 1

全般的に、CSF 中濃度はトキシコキネティクス解析の対象とした個々の動物で最初の測定時点（15 分）に最高値に達したが、血漿中濃度は投与後 2～5 時間で最高値（C_{max}）に達した（図 2）。最初の 24 時間で求めた ISIS 396443 の CSF クリアランス（1.9 mL/hr；3 mg を IT 投与）は既知の CSF ターンオーバー速度（1.8～2.4 mL/hr、Artru 1999）と同等であり、このことは、CSF 中の薬剤クリアランスの大部分が CSF のターンオーバーによることを示している。

CNS 組織への分布は広範で、これには脊髄及び脳も含まれた。CNS 組織中の最高濃度は腰髄で認められ、IT 投与部位と一致していた。CNS 組織中の ISIS 396443 の消失半減期は肝臓など全身性組織中の半減期よりもはるかに長かった。3 mg 投与時の神経組織からのクリアランスは緩徐であり、投与終了後に半減期の 2 倍を超える時点では組織を採取しなかったため、この試験での半減期推定値の精度は低い。より長期間試料採取を行ったその後の反復投与試験において CNS 組織中の半減期中央値は 116 日と推定され（3.3.2.1 項）、単回投与試験で認められた緩徐なクリアランスと同様であった。これに対し、肝臓における推定半減期は約 12 日であった（M2.6.6 表 3）。

3.3.2　　反復投与後の薬物動態及び組織分布

反復投与後の PK 及び組織分布の結果は、成熟サルを用いた複数回投与 PK 試験（3 週間の投与期間）及び幼若サルを用いた 2 つの反復投与毒性試験（14 週間及び 53 週間の投与期間）から得られた。

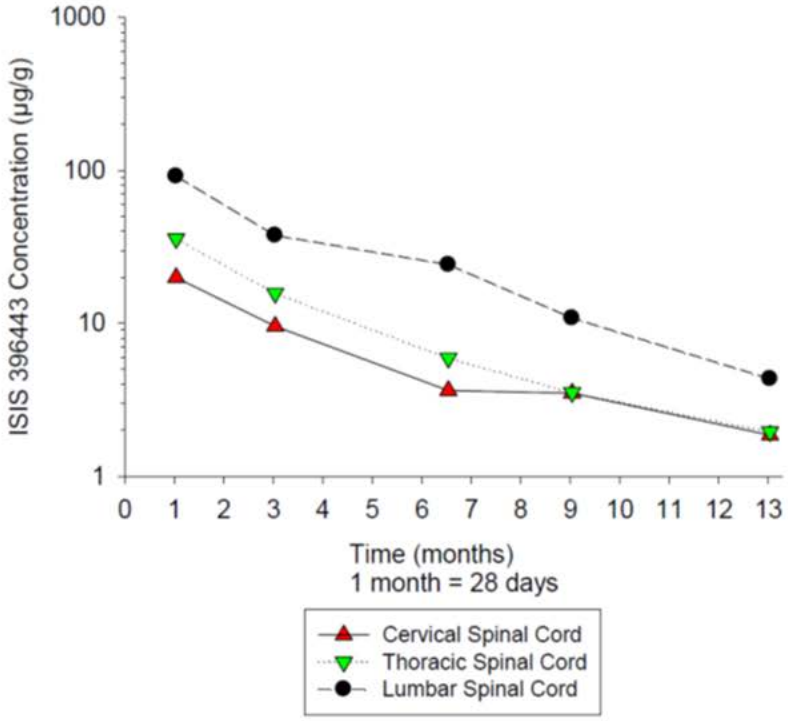
3.3.2.1 サルを用いた複数回投与薬物動態試験（396443-APK01 試験）

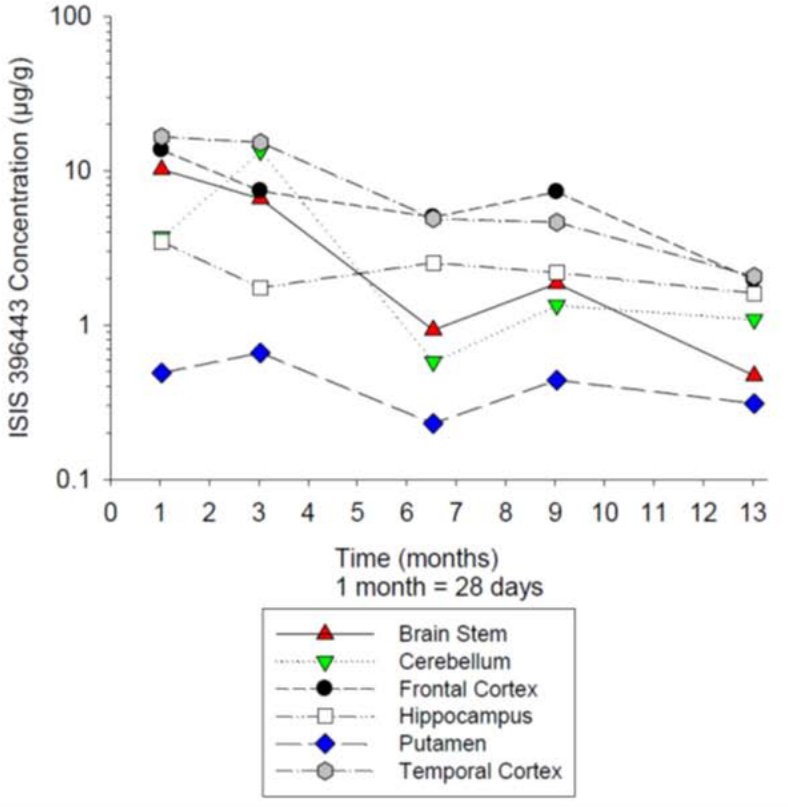
参考資料［4.2.2.2-1］396443-APK01

成熟雄ザルを用いて IT 投与及び IV 投与による包括的な PK 試験を実施した。この 3 週間複数回投与試験では、カニクイザルの雄 17 例には腰部留置カテーテルを介した 4 回の腰部 IT ボーラス投与、雄 3 例には 4 回の IV ボーラス投与をそれぞれ 1 mg/回で Day 1、8、15 及び Day 22 に行った。CSF 中及び血漿中薬物濃度はいずれも IT 投与後に多相性に低下し、単回 IT 投与後と同様に、急速な分布相に続いて比較的緩徐で持続した消失相（分布後相）が認められた。CSF 中の終末相消失半減期は 102 日であった。CSF 中薬物濃度は IT 投与後 1 時間（最初の測定時点）で最高値に達したのに対し、血漿中薬物濃度は IT 投与後 4 時間時点で最高値に達した。直接的な IT 投与によって脊髄及び脳組織に高い分布を認めたが、IT 投与後と IV 投与後血漿中濃度を比較した結果、ISIS 396443 が最終的に CNS から全身循環へと移行する前に CNS 内でのわずかな代謝クリアランスが示唆された。

Day 22 の最終 IT 投与後に、個体は Day 29、85、183、253 又は 365 に剖検を行った。ISIS 396443 は CNS 組織から緩徐に消失し、様々な脳及び脊髄領域の終末相消失半減期は 74～275 日の範囲、中央値は 116 日であった（M2.6.4、表 14）。CNS 中薬物濃度平均値の経時的推移を図 3 に示す。

図 3　　サルにおける 3 週間 IT ボーラス投与した後の脊髄及び脳組織中平均薬物濃度の推移





Data source: M4.2.2.2-1_Appendix C_Nonclinical PK Report_Figure 3 and 4

3.3.2.2 幼若サルを用いた 14 週間（396443-AS-03）及び 53 週間（396443-AS06）反復投与毒性試験

評価資料［4.2.3.2-1］396443-AS03、評価資料［4.2.3.2-2］396443-AS06

幼若サルを用いた 14 週間及び 53 週間毒性試験での CSF 中、血漿中及び組織中薬物濃度推移は、3 週間複数回投与 PK 試験で認められた濃度推移と同様であった。両試験ともに CSF 中及び血漿中薬物濃度は用量依存的に増加した。AS06 試験で求めた CSF 中消失半減期は 111 日であり、複数回投与 PK 試験（396443-APK01 試験）で得られた CSF 中消失半減期と同等であった（3.3.2.1 項）。CSF 中薬物濃度の測定は IT 投与後 7 日目に実施しており、よって CSF 中薬物濃度は予想される最高値よりもはるかに低く、単回 IT 投与試験での 7 日目の CSF 中薬物濃度と同様であった（図 2）。前述の試験と同様、IT ボーラス投与後の血漿中最高濃度到達時間（T_{max}）は約 2～5 時間であった。

CNS に関して測定した組織中濃度は、用法･用量の違いについて補正した場合、14 週間試験と 53 週間試験とで同様であった（表 1）。試験間の用法･用量の違いを以下に示す。14 週間試験では、0.3 mg 及び 1 mg 投与群にはそれぞれ負荷投与として週 1 回 5 週間投与（Day 1、8、15、22 及び 29）の後に維持投与として 2 週間に 1 回投与（Day 43、57、71、85 及び 99）、3 mg 投与群には週 1 回 15 週間の IT 投与を行った。53 週間試験では、すべての個体に負荷投与として週 1 回 5 週間投与（Day 1、8、15、22 及び 29）の後に維持投与として 6 週間に 1 回投与した（Day 71、113、155、197、239、281、323 及び 365）。

この 2 つの毒性試験の投与頻度は、臨床試験及び患者での推奨投与頻度よりも高頻度であった。よって、サルの曝露量をヒトに外挿する際には CSF 容積の種差及び用法･用量の違いを考慮したうえで、安全域を求めた（表 3）。

表 1 幼若サルにおける 14 週間又は 53 週間 IT ボーラス投与後の CNS 組織及び他の組織中薬物濃度の比較

試験期間	1 回用量（累積投与量）	剖検時の組織中濃度の平均値（μg/g）（SD）[a]		
		脳（大脳皮質）	脊髄（腰部）	肝臓
14 週間	0.3 mg (3 mg)	15.2 (3.9)	31.9 (15.5)	1.9 (0.4)
	1 mg (10 mg)	35.4 (13.7)	78.6 (53.3)	42.5 (40.9)
	3 mg (45 mg)	166 (45.8)	169 (54.2)	115 (65.1)
53 週間	0.3 mg (3.9 mg)	4.2 (1.9)	21.4 (9.3)	0.9 (0.4)
	1 mg (13 mg)	16.6 (6.0)	53.5 (33.6)	2.8 (1.6)
	4 mg (52 mg)	71.3 (29.3)	99.0 (71.5)	21.9 (9.2)

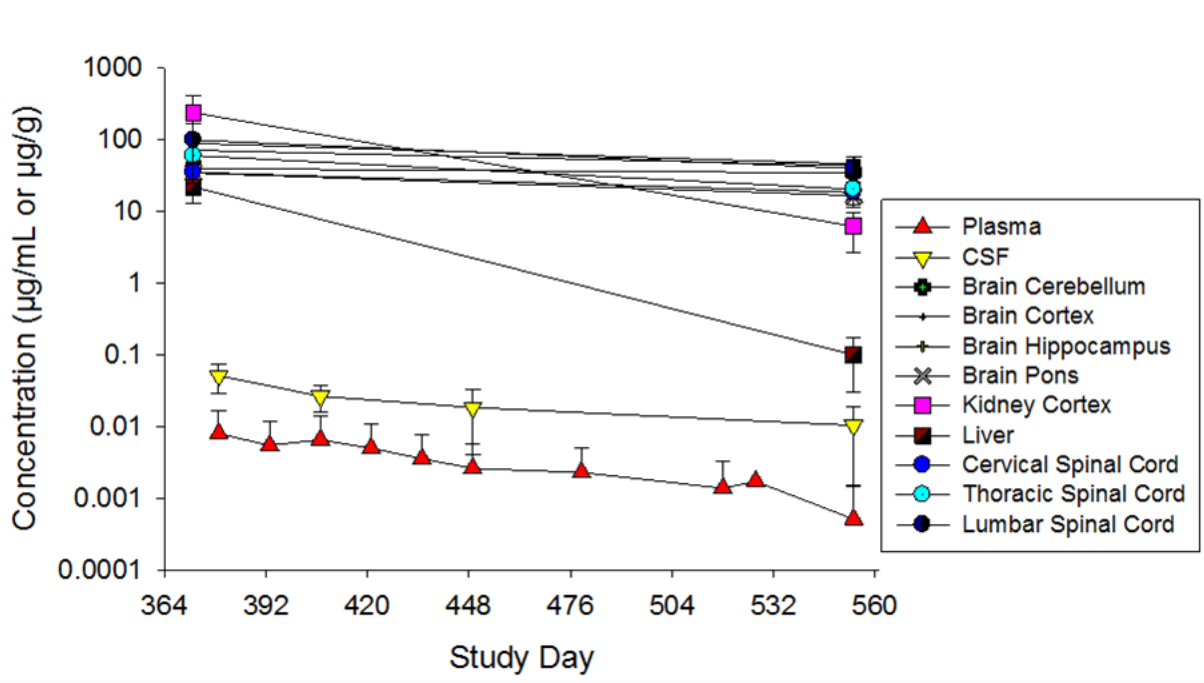
[a]最終投与の 1 週間後に剖検を行った（14 週間試験では Day 106、53 週間試験では Day 372）。
Data source: M4.2.3.2-1_Appendix I_Nonclinical PK Report_Table C
Data source: M4.2.3.2-2_Nonclinical PK Report 396443-AS06PK_Table 9

2 つの反復投与毒性試験の両方で、脳、脊髄及び肝臓の組織中薬物濃度は用量依存性を示した。予想どおり、53 週間試験では維持投与の投与頻度が低いため（6 週間に 1 回）、14 週間試験と比べて組織中濃度は低かった。

53 週間毒性試験では血漿中の抗 ISIS 396443 抗体の有無を評価した。中用量群の 1 例及び高用量群の 2 例で低い抗体価（最大抗体価が 8 倍）が検出されたが、CSF 中、投与部位又は薬理作用標的部位である CNS 組織中の ISIS 396443 濃度に影響は認められなかった。

53 週間毒性試験での 26 週間回復期間のデータから、組織中の消失半減期を推定した（図 4）。CNS 組織中の半減期は 117～195 日（中央値が 174 日）であり、これは複数回投与 PK 試験（396443-APK01 試験）で得られた消失半減期の範囲と一致する（3.3.2.1 項）。

図 4　　サルの 53 週間 IT 投与毒性試験の回復期間における CSF 中、血漿中及び組織中平均薬物濃度の比較



Data source: M4.2.3.2-2_Nonclinical PK Report 396443-AS06PK_Figure 13

3.3.3　　血漿中及び CSF 中のタンパク結合

血漿中（マウス、サル、ヒト）及び CSF 中（サル、ヒト）の ISIS 396443 のタンパク結合性を検討した。マウス、サル及びヒトでは、臨床的に意義のある血漿中濃度若しくはそれ以上の血漿中濃度（100 ng/mL 及び 5 µg/mL で測定）で ISIS 396443 の血漿タンパク結合率は高いため（94%以上）、糸球体でろ過されず（尿中排泄が制限され）、したがって全身組織への分布が促進される。ただし、サル及びヒトの CSF 中のタンパク結合性は低く（5 µg/mL で 25%以下）、150 µg/mL では測定可能な結合は認められない。これは血漿と比べて CSF ではタンパク質含量が低いことと一致

する。

3.4 代謝

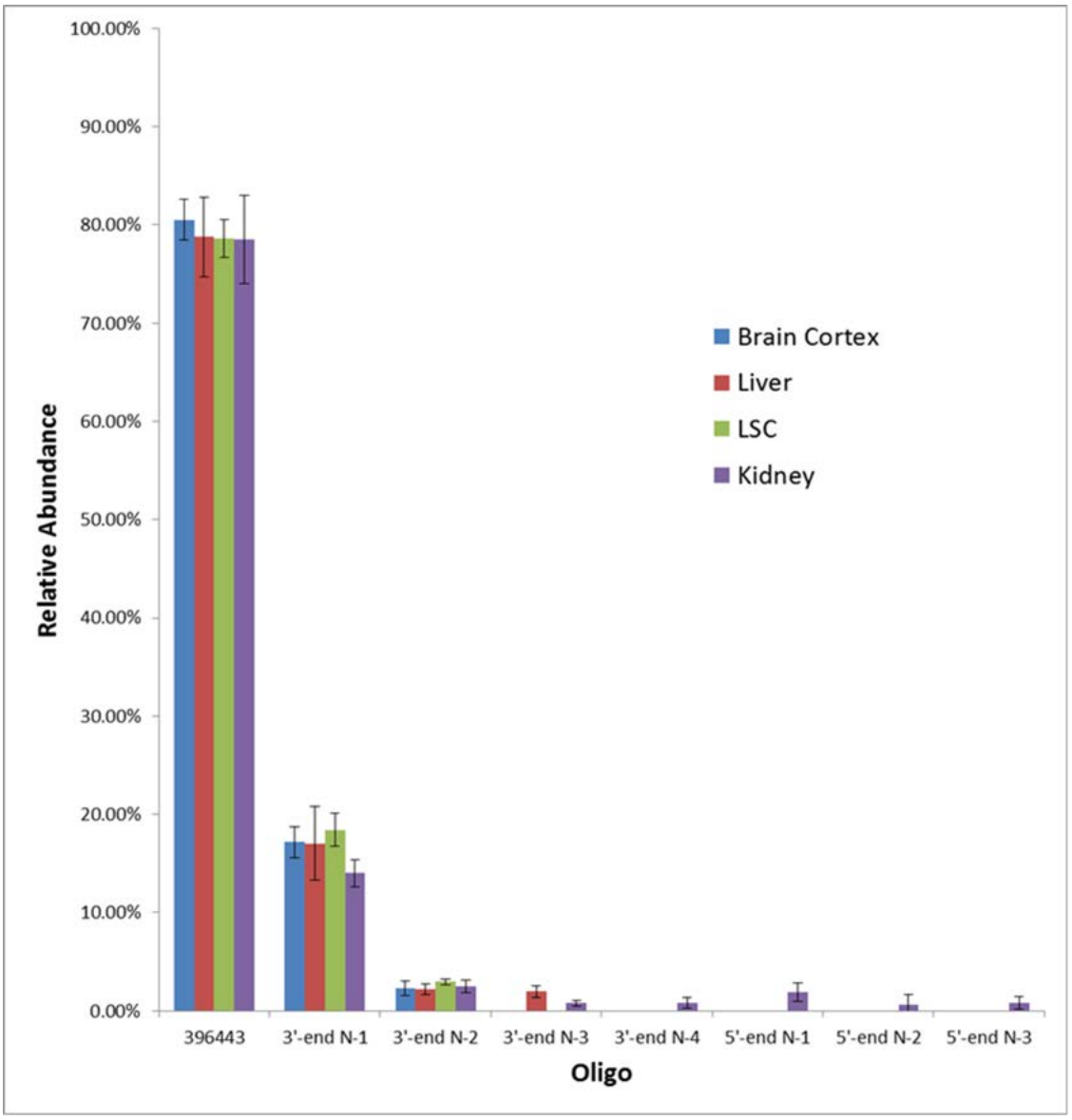
サルを用いた 14 週間及び 53 週間反復投与毒性試験で得られた CSF、血漿及び組織試料を用いて ISIS 396443 の代謝を検討した。4 週間の IT 投与後 7 日目に採取したサルの CSF 中に検出されたオリゴヌクレオチドは未変化 ISIS 396443 のみであった。

サルの血漿試料中では、未変化 ISIS 396443 がオリゴヌクレオチドの中で最も多く検出された（総 ASO の 95%以上）。ASO 関連化合物で唯一検出されたのは、17 塩基長のオリゴヌクレオチド（3’末端からの N-1 代謝物）であった。

未変化 ISIS 396443 がサルの組織（脳皮質、腰髄、肝臓及び腎臓）中で最も多く検出され、総 ASO の 79～81%を占めていた（図 5）。これらの組織中に検出された代謝物は、短鎖オリゴヌクレオチドである 3’末端からの N-1、N-2、N-3 及び N-4 代謝物並びに 5’末端からの N-1、N-2 及び N-3 代謝物であった。

以上、ISIS 396443 は主にエキソヌクレアーゼ（3’及び 5’エキソヌクレアーゼ）による加水分解を介して緩徐に代謝される。ISIS 396443 は CYP450 を介した酸化的代謝の基質にはならないと予想される（3.6 項）。

図 5　　サルを用いた ISIS 396443 複数回 IT 投与試験（396443-AS03 試験及び 396443-AS06 試験）において Day 106（投与後 7 日目）に採取した脳皮質、肝臓及び腰髄（LSC）、及び Day 372（投与後 7 日目）に採取した腎臓皮質中の ISIS 396443 及びその代謝物の相対含有量（%、平均値 ± SD）



Data source: M5.3.1.4-10_Nonclinical and Clinical Report 396443-IS07_Figure 10

3.5　　排泄

非臨床試験において ISIS 396443 の尿中排泄は評価していない。組織中でエキソヌクレアーゼによる緩徐な代謝を受けた後、短鎖オリゴヌクレオチドは尿中に排泄されると予想されるが、これは ASO の全身クリアランスの主要経路であり、ISIS 396443 でも同様と思われる（Geary 2008）。

3.6　　薬物動態学的薬物相互作用

ISIS 396443 が薬物相互作用を示す可能性は低い。ISIS 396443 は血漿タンパクへの結合性が高

いものの、ASO の結合部位（親水性）は疎水性の小分子薬剤の結合部位とは異なる。よって、血漿タンパクへの結合を競合することによる薬物相互作用の可能性は低い。ISIS 396443 は各種ヒトトランスポーターの基質又は阻害剤とはならず（396443-IS12 試験）トランスポーターの競合又は阻害により他の薬剤と相互作用を示す可能性は低い。CSF 中、血漿中及び組織中に認められた ISIS 396443 の代謝物は、主にエキソヌクレアーゼによる緩徐な加水分解によるものであることが強く示唆される。これまでの経験に基づき（Geary 2008; Yu 2007）、ISIS 396443 は CYP450 を介した酸化的代謝の基質にはならないと予想される。また、凍結保存初代培養肝細胞の培養系を用いた *in vitro* 試験において、ISIS 396443 は CYP450 を介する主な酸化的代謝を誘導又は阻害しないことが示されており（396443-IS13 試験及び 396443-IS14 試験）、したがってこの代謝経路に関して他の薬剤と競合することはないと考えられる。

3.7 考察及び結論

IT 投与した ISIS 396443 は速やかに CSF 全体に分布し、CNS 組織に取り込まれた後に CSF ターンオーバーを介して全身循環へと移行する。IT 投与後の血漿中濃度は CSF 中濃度よりも十分に低く維持される。推定される CSF 中の終末相消失半減期は成熟サル及び幼若サルで 102～111 日であった。CNS 組織での最終消失半減期が 116～174 日であることから、CSF 中薬物濃度は CNS 組織中濃度と平衡状態にあると考えられた。

複数回投与 PK 試験及び反復投与毒性試験において長い消失半減期が示されたことから、SMA 患者に対する IT 投与の長期投与間隔の妥当性が裏付けられている。毒性試験で測定された CNS 組織中薬物濃度は予想有効薬物濃度範囲（2～10 μg/g）より高く、毒性試験では十分に高い用量が用いられ、臨床試験の妥当性を裏付ける適切な安全域が得られたと考えられる。

4 毒性試験

4.1 全身（IV、SC）投与又は局所（IT）投与後の ASO の毒性

これまでに実施された 2'-MOE オリゴヌクレオチドの毒性試験の大部分は IV 又は SC 投与を用いており、一貫した PK、組織分布及び毒性所見が示されている。

IV 投与後、2'-MOE オリゴヌクレオチドの血漿中濃度の経時的推移は二相性を示し、急速な分布相（1 時間以内）に続いて緩徐な消失相（2～4 週間）がみられる。IV 投与後の主要分布組織は肝臓、腎臓、脾臓及び骨髄である（Henry 2008）。

ヒト以外の霊長類に IV 又は SC 投与した場合、2'-MOE オリゴヌクレオチド化学構造クラスの薬剤で最もよく認められる急性毒性は、一過性の補体副経路活性化及び凝固カスケードの阻害である（Chan 2006; Henry 2008; Henry 2012）。これらの所見は血漿中薬物濃度に依存し、全般的に 10 mg/kg 以上を週 1 回 IV 又は SC 投与した際に認められる。サルでは一過性の血小板減少症も認められている（Henry 2008）。全身投与の標的臓器には肝臓及び腎皮質が含まれ、組織変化はオリゴヌクレオチドの組織蓄積と直接関連する。肝臓クッパー細胞又は近位尿細管上皮内の薬剤蓄積は全般的に軽度の組織変化を生じるが、これらは臨床曝露量に対する適切な安全域で認められることから臨床的な意義は限定的である。ホスホロチオエート 2'-MOE オリゴヌクレオチドは、特にヒトを含む霊長類よりも感受性が高いマウス及びラットで軽度の炎症誘発作用を示す。このようなクラス作用は、ASO の負に荷電したホスホロチオエートジエステル骨格によるもので、配列特異的ではない（Chan 2006; Henry 2008）。

動物で 2'-MOE ASO の IV 又は SC 投与後に多くみられる毒性プロファイルは、ISIS 396443 の IT 投与後には認められていない。これは、局所 CNS 投与では全身曝露量が比較的低いこと、及び投与が低頻度であることに直接起因する。ISIS 396443 は水溶性の分子であるため、CNS 組織に移行せずに残った薬剤分子はすべて通常の CSF ターンオーバーにより全身循環へと移行する。しかし、IT 投与後の血漿中濃度は IV 投与と比べるとはるかに低い。また、ヒトへの IT 投与は低頻度で総投与量も少ないことを考えると、CNS 以外の組織での蓄積は無視できる程度である（全身組織からの ASO の消失半減期は約 3 週間）。

4.2 ISIS 396443 の毒性試験プログラム

ISIS 396443 の包括的な毒性試験プログラムを実施し、SMA 患者における使用の安全性を裏付ける適切な評価を行った。毒性試験で一般に用いられる実験動物種（マウス、ラット、イヌ、マカクザル）は *SMN1* 遺伝子のみを有するため、薬理学的活性を示す動物種で ISIS 396443 の毒性評価を行うことはできなかった。しかし、エクソン 7 を含有するように *SMN2* 転写産物のスプライシングを修正することにより産生される全長 SMN タンパク質はネイティブであるため、薬力学的（PD）反応に関連する毒性の懸念はない。よって、毒性評価では ISIS 396443 への曝露に関連した非特異的な作用に重点を置いた。

カニクイザルを用いた IT 投与による中核となる反復投与毒性試験を実施した。ISIS 396443 は乳児及び小児への投与を予定していることから、亜慢性及び慢性毒性評価のピボタル試験には幼

若動物を用いた。成長及び免疫系又は学習能力の発達に対する影響の有無を検討するため、サルを用いた 1 年間の長期投与試験を実施した。最大全身曝露量を求め、さらに小児患者での治療の妥当性を示すために、幼若マウスを用いた 13 週間 SC 投与毒性試験を実施した。さらに、不純物を多量に含有する ASO 被験物質を用いてマウスの 13 週間 SC 投与試験も実施した。ラットを用いた持続 IT 投与による安全性薬理試験では、呼吸器系又は心血管系に対する影響を評価し（M2.6.2）。最大全身曝露量が得られる SC 投与を用いて、マウス及びウサギの生殖発生毒性試験を実施した。

4.2.1 カニクイザルを用いた単回投与毒性試験（396443-AS01 試験）

評価資料［4.2.3.1-1］396443-AS01

カニクイザルを用いた単回 IT 投与毒性試験を実施した。投与量は 1、3 及び 7 mg であった。7 mg 投与群の 6 例中 1 例に急性で一過性の脊髄下部反射低下が認められた以外、単回 IT 投与の忍容性は良好であった。体重、ECG、CSF の生化学的検査項目、臨床病理学的検査項目又は補体の活性化に対する影響も認められなかった。ISIS 396443 を投与した個体で臓器重量に対する影響や病理組織学的変化も認められなかった。

げっ歯類を用いた単回投与性試験は実施していないが、ISIS396443 のげっ歯類における急性毒性は幼若 CD-1 マウスを用いた 13 週間皮下投与毒性試験（396443-AS07 試験）における初回投与後 7 日間の観察結果から評価した。ISIS396443、0、1、10、50 mg/kg を CD-1 マウスに皮下投与後、生死、一般状態、体重及び摂餌量を 2 回目投与までの 7 日間の観察結果から、死亡及び切迫屠殺例は認められず、何ら異常所見は認められなかった。

4.2.2 反復投与毒性試験

カニクイザルを用いた反復 IT 投与毒性試験及び CD-1 マウスを用いた反復 SC 投与毒性試験を実施した。

4.2.2.1 マウスを用いた反復投与毒性試験（396443-AS07 試験）

評価資料［4.2.3.2-3］396443-AS07

小児患者に対して ISIS 396443 を使用する場合の全身性曝露の安全域と関連する追加の安全性データを補足するため、幼若 CD-1 マウスを用いた SC 投与による 13 週間毒性試験を実施した。SC 投与を出生後 4 日（PND 4）から週 1 回 4 週間（PND 25 まで）、その後は最終投与（PND 95）まで隔週投与した。投与量は 1、10 及び 50 mg/kg/回であった。すべての投与量で ISIS 396443 の忍容性は良好であった。瀕死あるいは死亡例、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、又は剖検時の肉眼的観察について、いずれも被験物質の影響は認められなかった。成長及び発達にも明らかな影響はなかった。被験物質に関連した病理組織学的所見が、50 mg/kg 投与群の雄の肝臓（クッパー細胞肥大）及び雌雄のリンパ節（マクロファージ空胞化）に認められ、これらの所見はこれら 2 つの臓器での器官重量の増加と関連した。脾臓重量の増加が 10 mg/kg 投与群の雄及び 50 mg/kg 投与群の雌雄で認められ、これはマウスでの ASO 投与による既知の炎症誘発作用に伴う所見と同様であった。このような病理組織学的所見はこの種

の薬剤クラスで予想されるもののみであり、壊死、変性又は炎症性変化を伴わなかったため、これら所見は有害ではないと考えられた。このように、幼若動物で観察された影響は成熟動物で報告された所見と同様であった。以上の結果から、負荷投与と維持投与からなる用法･用量での NOAEL は 50 mg/kg と考えられる。この NOAEL は、臨床試験の維持投与（4 ヵ月に 1 回の IT 投与）で用いられるヒト等価用量（0.6～2 mg/kg）をかなり上回る。

4.2.2.2 サルを用いた反復投与毒性試験（396443-AS03、-AS06 試験）

評価資料［4.2.3.2-1］396443-AS03、評価資料［4.2.3.2-2］396443-AS06

幼若カニクイザルを用いた IT 投与による 2 つの反復投与毒性試験を実施した。1 つは 12 週間の回復期間を含む 14 週間試験、もう 1 つは 26 週間の回復期間を含む 53 週間試験である。これらの試験では、適切な投与経路を用いて局所及び全身的な安全性を詳細に検討した。CNS 組織での ISIS 396443 の長い消失半減期（74～275 日、396443-APK01 試験）を踏まえて、53 週間試験では回復期間を 26 週間に延長した。

サルの両試験で、臨床用法･用量と同様、負荷投与期に続いて低頻度の維持投与を行った。両試験とも、負荷投与期には週 1 回 5 週間の IT 投与を行った。維持投与期には、14 週間試験では 2 週に 1 回、53 週間試験では 6 週に 1 回の投与を行った。例外的に、14 週間試験の最高用量群では全投与期間を通じて週 1 回の IT 投与を行った。曝露量を最大にするため、またサルに投与可能な投与量には（一過性の脊髄反射低下による）制限があることから、臨床試験と比べるとサルの毒性試験では負荷投与期及び維持投与期の投与頻度を高くした。したがって ASO への曝露量をサルからヒトに外挿する際には、CSF 量における 10 倍の種差及び用法･用量の違いを考慮しなければならない。

サルの試験における毒性評価項目には、生存期間中の観察（一般状態、体重、推定摂餌量、身体検査）、眼科学的検査、臨床病理学的検査（血液学的検査、血液生化学的検査、凝固検査、尿検査、CSF 中の総細胞数及び補体活性化）、心血管機能検査、並びに神経学的検査が含まれた。神経学的検査では一般感覚（意識レベル、追従）、運動機能、脳の反射（瞳孔、眼輪筋、角膜）及び脊髄反射を評価した。剖検時評価には病理肉眼的観察、臓器重量、病理組織学的検査が含まれた。

幼若サルの 53 週間試験では追加の評価項目として、骨格系の成熟度、T 細胞依存性抗体反応及び学習能力試験が含まれた。

単回投与試験で認められたように、14 週間試験の最高用量（3 mg）及び 53 週間試験の最高用量（4 mg）では急性で一過性の脊髄下部反射低下が認められた。これらの影響は主に膝蓋腱反射及び足の把握反射の低下として認められた。全般に、これら所見はほとんどの場合投与後数時間以内に発現し、投与後 48 時間以内に回復し、IT 反復投与に伴って重症化しなかった。この一過性の変化を生じる機序は不明だが、腰椎穿刺部位周辺領域での高濃度の ISIS 396443 を反映すると考えられる。

14 週間試験及び 53 週間試験では、身体検査、臨床病理学的検査、眼科学的検査、心血管機能検査、骨格系の成熟度又は免疫系への影響は認められなかった（T 細胞依存性抗体反応も検出されていない）。特に、神経行動学的又は学習パラメータに対して被験物質の影響は認められず、全

身臓器の病理組織学的検査にも影響は認められなかった。ISIS 396443 は肝臓及び腎臓で検出されたが、この 2 つの組織で投与関連の所見は認められず、これは低頻度の IT 投与では血漿中濃度及び組織中濃度が比較的低いことと一致する（IT 投与後の肝臓中濃度は 120 µg/g 以下、全身投与後は 1000 µg/g 以上；Henry 2008）。53 週間試験では抗 ASO 抗体の評価を行っており、ごくわずかな抗体反応が認められた。1 mg 投与群の 1 例及び 4 mg 投与群の 2 例に抗体が検出されたが、この 3 例の PK 測定値にも安全性評価にも影響は認められなかった。

病理組織学的変化は脳の海馬下部にのみ観察され、主な所見は軽微から軽度の神経細胞の空胞化であった（表 2）。空胞化は、集中的な投与スケジュールで実施した 14 週間試験で多く認められた（最高用量群の累積投与量が 14 週間では 45 mg、53 週間試験では 52 mg）（表 3）。さらに、薬物動態の要約に記載したとおり、最高濃度は 14 週間試験の 3 mg 週 1 回投与群で報告されている（腰髄及び大脳皮質でそれぞれ 169 及び 166 µg/g）。

病理組織学的所見の程度の 5 段階評価では、海馬の空胞化の所見は軽微から軽度と判定されており、本試験の病理評価者の見解として、これらの所見が一般状態又は動物の運動能力に有害な影響を与えるとは考えられない。これらの動物で神経行動学的評価に対する影響が認められなかったことからも、この病理組織学的所見の程度に基づく解釈が裏付けられている。

海馬の空胞化が臨床的に有意でないことの裏付けは、カニクイザルを用いて週 1 回 6 週間の IT 投与を行った探究試験（396443-AS11 試験）でも得られている。被験動物の脳切片を 10%中性緩衝液ホルマリン（10% NBF、毒性試験で標準的に用いられる固定法）で浸漬固定、若しくは他の方法により固定（カルノア液に浸漬し固定、カルノフスキー固定の変法で灌流固定、及び凍結による固定）した。10% NBF を用いて処理した脳切片では、海馬に空胞化を認めた。これに対して他の方法により固定した切片では顕微鏡下に空胞化は認められなかった。この探究試験の結果に基づき、海馬の空胞化は有害な影響を与えるものではなく、腎臓での報告（Engelhardt, 2016）と同様、組織の固定･処理方法やエンドソーム又はリソソーム内に ASO が存在することに関係していると考えられる。

表 2　　サルにおける海馬の空胞変性（終了時剖検）の累積投与量別比較

試験期間	1 回用量（mg）	累積投与量	海馬空胞変性の発現
14 週間	0.3	3 mg	なし
	1	10 mg	7 例中 1 例
	3	45 mg	7 例中 7 例
53 週間	0.3	3.9 mg	なし
	1	13 mg	10 例中 2 例
	4	52 mg	10 例中 5 例 [a]

[a] 回復評価動物 4 例中 3 例（4 mg 投与群）で海馬内にニューロンの空胞変性が認められ、病理組織学的評価は終了時剖検での報告と同程度であった。
Data source: M4.2.3.2-1_Appendix J_Pathology Report
Data source: M4.2.3.2-2_Text Table 6

14 週間試験では、高用量群（3 mg を週 1 回）の 7 例中 1 例で海馬内にニューロン壊死も 1 個観察され、この所見に基づき当該試験の NOAEL（1 mg/回）が推定された。高用量群の 7 例中 1 例で数個のグリア細胞壊死が観察されており、高用量群の回復評価動物 1 例でも壊死性グリア細

胞が認められた。14 週間試験におけるこれらの病理組織学的変化は機能的又は臨床的な変化と関連しなかった。53 週間試験では、中用量群の雄 1 例及び高用量群の雄 7 例中 3 例で海馬内に細胞残屑を伴う細胞壊死が観察されたが、細胞壊死はニューロンではなかった（細胞壊死残屑の由来細胞を特定できなかった）。評価を行った神経病理学者の見解として、海馬に認められた空胞化及びまれな細胞壊死が一般状態又は動物の運動能力に有害な影響を与えるとは考えられないと述べている。これらの幼若サルで神経行動学的影響や学習能力の障害を示唆する所見が認められなかったことからも、この見解が裏付けられた。しかしながら、他の 2'-MOE ASO では、腎臓の空胞化、尿細管変性、及び腎機能への影響が認められていることから（Henry 2012）、海馬の空胞化における毒性学的意義は否定できない。したがって、53 週間の毒性試験における NOAEL（無毒性量）は 0.3 mg/回と判断された。

長期曝露による海馬の病理組織学的所見の進展や新たな毒性発現の有無を検討するため、サルを用いた 53 週間試験を実施した。53 週間試験で海馬下部にニューロン空胞化が認められたが、14 週間試験と比べてこうした病理組織学的変化の重症度に進展はみられず､53 週間試験ではニューロン壊死は観察されなかった。53 週間試験の回復期間後に、回復試験動物 4 例中 3 例（4 mg 投与群）で海馬にニューロン空胞化が認められ、病理組織学的所見の程度は投与終了時剖検での程度と同様であった。回復試験の結果は、この所見の残存又は消失には回復期間が不十分であったことを示す（影響を受けた細胞中に ISIS 396443 が存在する可能性がある）。

サルを用いた 14 週間毒性試験及び 53 週間毒性試験並びにラットを用いた持続 IT 投与による 25 日間試験において安全性薬理評価項目の検討も行った。これらの試験で、ISIS 396443 に起因すると考えられる安全性薬理評価項目への影響は認められなかった（2.2）。

4.2.3 その他の毒性試験

各種不純物を多量に含有する ISIS 396443（親 ASO）の全身作用を評価するため、成熟 CD-1 マウスを用いた 13 週間 SC 投与毒性試験を実施した（396443-AS13 試験）。投与開始時のマウスは 7～8 週齢であった。3 種の不純物増量ロットを調製し、5 又は 25 mg/kg/週で投与した。これらの不純物増量被験物質で得られた結果を、ISIS 396443 を 5 又は 25 mg/kg/週で投与した群及び生理食塩水を投与した対照群の結果と比較した。各群に雄雌 6 例ずつを割付けた。この試験で使用した ISIS 396443 のロット（　　002*　　）の純度（全長 ASO の含有率）は [redacted]%であった。これに対し、不純物増量ロットの純度（親 ASO の含有率）は 49.5%～61.8%、各不純物の含有率は 4.1%～6.7%であった。

瀕死率、死亡率、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、剖検時の肉眼的観察、又は臓器重量について、被験物質の影響は認められなかった。いずれの投与量でも血液生化学的検査項目に投与群間で意味のある差異は認められなかった。発現頻度は低いが、AST 及び ALT が軽度に増加する動物が散見された。これら所見は肝臓の病理組織学的所見（マクロファージ空胞化/顆粒化等）と関連しており、被験物質と関連していると考えられた。

全被験物質群のマウスにおいて、全身組織にマクロファージ空胞化/顆粒化が認められ、腎臓の尿細管上皮内の好塩基性顆粒の蓄積が病理組織学的に認められた。これら所見はオリゴヌクレオチドの細胞取込み、又はオリゴヌクレオチドの炎症誘発作用による細胞活性化及びサイトカイン

＊新薬承認情報提供時に置換えた

産生と一致しており、これらが有害であるとは判断されなかった。不純物増量 ASO ロットを投与された動物に新たな病理組織学的所見は認められなかった。

要約すると、本試験に認められた変化はオリゴヌクレオチドをげっ歯類に SC 投与した場合の炎症誘発作用として既知の所見である。被験物質投与群間に差異は認められず、不純物増量被験物質ロットの投与に関連した新たな毒性は認められなかった。したがって、製剤中の不純物に起因する大きな問題はないと考えられる。

4.2.4 遺伝毒性（396443-IS02、-IS03、-AS10 試験）

評価資料［4.2.3.3.1-1］396443-IS02、評価資料［4.2.3.3.1-2］396443-IS03、

評価資料［4.2.3.3.2-1］396443-AS10

ISIS 396443 の遺伝毒性を *in vitro* の、細菌を用いた復帰突然変異試験（エームス試験）、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞の染色体異常試験、及び *in vivo* ではマウスを用いた小核試験で検討した。遺伝毒性試験の結果はすべて陰性であった。

4.2.5 がん原性

ISIS 396443 のがん原性試験は実施しておらず、また、現時点で実施を予定していない。ICH S6 に従い、科学的根拠のに基づく重要性（WOE）アプローチを用いて、ヒトでの ISIS 396443 の発がんリスクを評価した。発がん性評価に対する原則に基づき、この WOE 評価では、げっ歯類を用いてがん原性試験を実施する場合の技術的な制約として投与経路が IT であること、ターゲットとする薬理作用（SMN タンパク質の産生）、ISIS 396443 の作用機序（*SMN2* 遺伝子から転写される mRNA のスプライシング修正）、及び遺伝毒性作用、増殖反応、内分泌かく乱又は免疫抑制作用の可能性を示す既存の毒性データの精査を考慮に入れた。ヒトでは本来、*SMN1* 遺伝子から全長 SMN タンパク質が産生されるばかりでなく、割合としては低いが、*SMN2* 遺伝子からも全長 SMN タンパク質が産生されている。ISIS 396443 の薬理作用は、SMA 患者における内因性の SMN タンパク質産生を増加させることである。

サルの IT 投与反復投与毒性試験の結果では免疫及び内分泌障害を示唆する所見は認められていない。さらに、サルを用いた 14 週間及び 53 週間試験では増殖反応、前がん病変又は腫瘍病変を認めていない。

ISIS 396443 について、SC 投与による標準的なげっ歯類の 2 年間がん原性試験を実施することが臨床的に意義のある結果をもたらすとは考えられない。げっ歯類には *SMN2* 遺伝子が欠失しており、被験物質の薬理作用はラットでは評価できない（ラットでは *SMN1* 遺伝子のみで SMN タンパク質が生産される）。反復投与による腰部 IT ボーラス投与後の動物において、全身性曝露は測定可能であるが、この曝露量は SC 投与に比べて低い（IT 投与経路では投与量が低いことによる）。SC 投与によるげっ歯類のがん原性試験を実施することにより、患者に IT 投与した場合の曝露量を大幅に上回る全身組織での曝露量が評価可能と思われるが、患者に対する発がん性リスク評価としてはほとんどあるいは全く関係のない結果となると考えられる。

以上、IT 投与によるがん原性試験をげっ歯類で実施する上での技術的制約、ASO の作用機序、

SMN タンパク質の薬理作用、げっ歯類の *SMN* 遺伝的特徴、反復投与毒性試験の結果、並びに生殖発生毒性試験及び遺伝毒性試験の結果を考慮に入れて、発がん性リスクの綿密な評価を行った。これらの評価に基づくと、ISIS 396443 の IT 投与により治療される患者にとって重要な発がん性リスクを示す証拠は存在しないと考える。潜在的な発がんリスクを評価するため、*in vitro* 又は *in vivo* の追加試験（SC 投与による）を行うことが、SMA 患者における ISIS 396443 の IT 投与に関する臨床的リスク評価に付加的な価値をもたらすとは考えられない。

4.2.6 生殖発生毒性試験

SC 投与による 2 つの生殖発生毒性試験の結果、受胎能又は胚･胎児発生に対する ISIS 396443 関連の影響は認められなかった。両試験（マウスを用いた受胎能／胚･胎児発生毒性試験［396443-AS08 試験］及びウサギを用いた胚･胎児発生毒性試験［396443-AS09P/AS09 試験］）とも、最高用量群では 87.5 mg/kg を週 1 回投与した。生体内分布を測定した結果、ISIS 396443 は胎盤を通過せず、したがって母体が曝露しても発生中の胎児に毒性学的に問題となる曝露を生じない。さらに、マウスを用いて出生前及び出生後の発生に及ぼす影響を評価した（396443-AS12 試験）。当該試験では、妊娠マウスに ISIS 396443 を最高 60 mg/kg/週までの用量で妊娠 6 日目から授乳 18 日目まで投与した。F1 出生児は、妊娠中に子宮内で被験物質に曝露され、出生後、授乳期間中に間接的に被験物質に曝露された。母動物では、生存率、一般状態、妊娠中及び授乳期間中の体重、摂餌量、妊娠率及び妊娠・分娩データ（妊娠期間、生存児数、出生児数等）に ISIS 396443 の投与による有害な影響は認められなかった。また、離乳前の F1 出生児では、生存率、一般状態、体重、性比、身体的発達、感覚及び反射検査、及び肉眼所見に被験物質の影響は認められなかった。さらに、試験を継続した F1 動物では、生存率、一般状態、体重、性成熟、行動評価、交配率/出産率、妊娠 13 日目の妊娠黄体、器官重量、及び肉眼所見に有害な影響は認められなかった。ISIS 396443 は、授乳中の母動物の乳汁中に、全身曝露量の指標となる肝臓中濃度と比較して極めて低濃度で検出された。要約すると、マウスの出生前・出生後発生試験では、ISIS 396443 は最高 60 mg/kg/週までの用量範囲で有害な影響を示さなかった。

4.2.7 局所刺激性試験

ISIS 396443 の独立した局所刺激性試験は実施していない。局所刺激性はカニクイザルを用いた単回投与及び反復投与毒性試験で評価した。腰部 IT 投与後、被験物質投与と関連した予期されない肉眼的及び病理組織学的変化は認められなかった。

4.2.8 免疫毒性試験

ISIS 396443 の独立した免疫毒性試験は実施していない。カニクイザルを用いた 53 週間 IT 投与毒性試験で抗 ISIS 396443 抗体の産生が認められたが、T 細胞依存性抗体産生（TDAR）試験では陰性の結果が得られた。また、免疫系の組織にも異常は認められなかった。以上の結果から、ISIS 396443 は免疫能に影響しないと考えられる。

4.2.9 光毒性試験

ISIS 396443 は、化学構造にヌクレオチド部分を含むことから予測されるとおり、約 260 nm の

波長にピークを有する UV 吸収性を示す。髄腔内投与によるドラッグデリバリー及び低用量の投与では、皮膚濃度は低いと考えられる。カニクイザルに 53 週間 IT 投与した毒性試験で、皮膚に光毒性を示唆する所見は認められなかった（39644-AS06 試験）。よって、ISIS396443 は光毒性の懸念がないことが確認された。

4.2.10 薬物乱用に関する試験

投与経路（IT）及び目的とする作用機序を踏まえると、ISIS 396443 は乱用を生じる可能性は無視できる程度と考えられ、したがって薬物乱用が生じる可能性を評価する試験は実施しなかった。本剤（ASO）は血液脳関門を通過せず、よって間違って IV 又は SC 投与しても薬物乱用につながる可能性はない。*SMN2* 遺伝子のスプライシングを修正する mRNA に対する結合の特異性に基づき、ISIS 396443 は薬物乱用への関与が知られている受容体には結合しない。サルを用いた反復投与毒性試験では、神経行動学的評価は正常範囲内であり、乱用の可能性はないことを裏付けている。臨床試験では、気分の高揚や幻覚といった薬物乱用に典型的な有害事象は認められなかった（M 2.7.4）。したがって、ISIS 396443 は薬物乱用の可能性が低く、規制薬物とする必要はないと考えられる。

4.2.11 安全域

一定期間の累積投与量に基づいて、サル毒性試験の結果と患者の投与量とを比較し安全域を評価した。53 週間試験の累積投与量は 3.9、13、及び 52 mg であった（表 3）。サルの試験における累積投与量を脳重量の差異（体重 3.4 kg のサルで約 70 g、体重 70 kg のヒトで約 1400 g［Dobbing and Sand 1973］の脳重量には約 20 倍の差異がある）に基づいて、ヒト等価用量（HED）に換算した。

表 3 投与 1 年目及び長期（維持）投与期における安全域の算出

毒性試験期間	1 回用量（mg）	毒性評価	累積用量	HED[a]	安全域：成人用量に対する NOAEL の比	
					最初の 1 年間の総投与量[b]（72 mg）	長期の年間維持投与量[c]（36 mg）
53 週間	0.3	NOEL	3.9 mg	78 mg	1.1 倍	2.2 倍
	1.0	－	13 mg	260 mg		
	4.0	－	52 mg	1040 mg		

[a] ヒト等価用量（HED）はサルにおける累積投与量の 20 倍（脳重量が約 20 倍の差）
[b] SMA 患者は 1、15、29 及び 64 日目に負荷投与を受け、その後 4 ヵ月ごとに維持投与を受ける（最初の 1 年間で 72 mg、成人と同等量）
[c] 維持投与量は 1 年間で 36 mg（4 ヵ月ごとに 12 mg）

SMA と診断された患者は、可能な限り早期に CNS 組織中濃度が定常状態になるように最初の 1 年間に 4 回の負荷投与を行い、その後、維持期投与として 4 ヵ月に 1 回の投与を受ける。最初の 1 年間の治療の累積投与量は 72 mg であり、安全域は 1.1 倍（78 mg / 72 mg）となる。その後の維持投与量に基づく安全域は 2.2 倍となる（78 mg / 36 mg）。

要約すると、毒性プログラムの結果に基づき、動物及び in vitro の試験により ISIS 396443 の安全性プロファイルの特徴が適切に明らかにされた。ヒトの IT 投与量とサルの IT 投与量を比較し得られた安全域は、2 つの動物種間での脳重量の差に基づく（2 歳以上のヒトにおける脳重量はサルの約 20 倍量である）。非臨床の安全性プログラムは臨床プログラムを裏付け、また承認申請及び ISIS 396443 の適切な添付文書の裏付けとなる安全性データと考えられた。

5 総括及び結論

SMA 患者の治療薬としての ISIS 396443 の妥当性を示すため、包括的な非臨床プログラムで ISIS 396443 の評価を行った。これには薬理、PK 及び組織分布、非臨床安全性を評価する試験が含まれる。ヒトは *SMN2* 遺伝子を有することが知られている唯一の動物種であるため、薬理反応を示す動物種で ISIS 396443 の毒性評価を行うことはできなかった。しかし、*SMN2* 遺伝子転写物のスプライシングを修正することで全長 SMN タンパク質の産生量は増加するが、健常人では全長 SMN タンパク質を産生していることから予測される薬理作用に特異的な安全性リスクは最小限である。よって、毒性評価は ISIS 396443 への曝露に関連した非特異的作用に重点を置いた。

In vitro 及び *in vivo* 薬理試験では、ISIS 396443 の作用機序、すなわち mRNA 前駆体のスプライシングを変化させることにより *SMN2* 遺伝子から産生される全長 SMN タンパク質の量が増加することを確認した。ヒト *SMN2* 遺伝子を発現する 4 種類の異なるトランスジェニックマウスモデルを用いて *in vivo* 活性を評価した。マウスモデルを使った試験では、*SMN2* 転写物へのエクソン 7 の含有及び PK/PD に関する重要な情報が得られた。具体的には、トランスジェニックマウス及び非ヒト霊長類を用いた試験により、臨床での IT 投与、患者での推奨用量、及び CNS 組織中での長い半減期を踏まえた IT 間欠投与の妥当性が示された。マウスを用いたこれらの試験から、CNS 組織中濃度が 2～10 μg/g であれば全長 SMN タンパク質の産生量が十分に増加し、重症マウスモデルで生存率及び運動機能の改善が認められることが示された。

PK 試験から、IT 投与後の薬理作用及び臨床的有益性に重要な脊髄及び脳領域への ISIS 396443 の分布及び取込みの一貫したパターンが確認された。ISIS 396443 は速やかに CSF 全体に分布し、CNS 組織に取り込まれた後に CSF ターンオーバーを介して全身循環へと移行する。IT 投与後の血漿中濃度は CSF 中濃度よりも十分に低い値に維持されたため、ASO の IV 又は SC 投与で認められる全身毒性は ISIS 396443 では認められなかった。血漿中に軽微の抗薬物抗体（ADA）反応が認められたが（53 週間毒性試験で中用量及び高用量を投与した 3 例）、ADA 陽性個体の CSF 又は CNS 組織中濃度は ADA 陰性個体と差がなかった。推定される CSF 中の終末相消失半減期はサルで 102～111 日であった。CNS 組織での終末相消失半減期が 116～174 日であることから、CSF 中濃度は CNS 組織中濃度と平衡状態にあると考えられた。複数回投与 PK 試験及び反復投与毒性試験で長い消失半減期が示されたことから、SMA 患者に対する IT 投与の長期投与間隔の妥当性が裏付けられている。

ISIS 396443 の毒性試験プログラムは、長期 IT 投与の妥当性を裏付けるために計画された。重要な単回及び反復投与毒性試験は、ASO の組織分布、代謝及びクラス作用への感受性に関してヒトに最も近い動物モデルであるカニクイザルを用いて実施した。SMA は小児領域の適応症であることから、14 週間及び 53 週間毒性試験には幼若動物を使用した。小児患者での安全性データを補足するため、幼若 CD-1 マウスでの 13 週間反復全身投与試験を実施した。

最高用量（単回投与試験の 7 mg/回、14 週間試験の 3 mg/回、53 週間試験の 4 mg/回；成人ヒト等価用量に換算するとそれぞれ 70、30 及び 40 mg/回）では急性で一過性の脊髄下部反射低下が認められた以外、サルを用いた単回及び反復投与試験での ISIS 396443 の忍容性は良好であった。全般に、脊髄下部反射低下は投与後数時間内に発現して投与後 48 時間以内に回復し、53 週間まで反復投与を行っても重症化しなかった。

14 週間試験及び 53 週間試験では、身体検査、臨床病理学的評価、眼科学的検査、心血管系の評価、骨格系の成熟度及び免疫系のパラメータはこの年齢の動物の正常範囲内であった。全身の器官に病理組織学的な影響は認められず、このことは IT 投与後の全身曝露量が低いことと一致した。特に、神経行動学又は学習パラメータについては薬物投与と関連した影響はみられず、幼若動物の成長や発育にも影響は認められなかった。

病理組織学的変化は脳の海馬下部に限られ、主な所見は軽微から軽度の神経細胞の空胞化であった。この変化は、薬物存在下での組織固定方法及び標本処理方法と関連すると考えられ、有害な所見を表すとは考えられない。14 週間試験では、高用量群（3 mg/回）の 7 例中 1 例で海馬内にニューロン壊死が 1 個観察され、この所見によって当該試験の NOAEL（1 mg/回）が推定された。高用量群の 7 例中の別の 1 例では数個のグリア細胞壊死が観察されており、高用量群の回復評価動物 1 例でもグリア細胞壊死が認められた。14 週間試験におけるこれらの病理組織学的変化は機能的又は臨床的な変化と関連しなかった。

53 週間試験では、中用量群の雄 1 例及び高用量群の雄 7 例中 3 例で海馬内に細胞残屑を伴う細胞壊死が観察されたが、壊死細胞はニューロンではなかった。本試験の神経病理評価者の見解として、海馬に認められた空胞化及びまれな細胞壊死が一般状態又は動物の運動能力に有害な影響を与えるとは考えられない。この見解は、幼若サルに神経行動学的作用の欠如又は学習能力の障害を示唆する所見が認められていないことからも裏付けられた。したがって、53 週間試験では高用量（4 mg/回、成人等価用量 40 mg）を NOAEL とした。

長期間の曝露により海馬での病理組織学的所見の進展や新たな毒性が認められるかを検討するため、サルを用いた 53 週間試験を実施した。53 週間試験でも海馬下部にニューロンの空胞化が認められたが、14 週間試験と比べて組織学的変化の重症度や頻度に進展は認められなかった。

反復投与毒性試験又はラットの持続 IT 投与試験で、安全性薬理のパラメータへの影響は認められなかった。マウスの反復投与試験で、ISIS 396443 の SC 投与と関連する有意な毒性所見は認められなかった。マウス及びウサギを用いた生殖発生毒性試験の結果は陰性であった。一連の遺伝毒性試験で ISIS 396443 の評価を行い、陰性の結果が得られた。ISIS 396443 のがん原性試験は実施しておらず、また実施の予定はない。WOE 評価に基づき、ISIS 396443 はヒトで発がん性を示す可能性は低いと考えられ、患者に対する有意な発がんリスクを有さないと考えられる。

14 週間試験及び 53 週間試験で得られた NOAEL から、SMA 患者での推奨用法･用量の適切な安全域が示されている。推奨用法･用法では、1、15、29 及び 64 日目に成人等価用量 12 mg を負荷投与し、その後は 4 ヵ月に 1 回の維持投与を行う。この用法･用量による投与 1 年目の安全域は 7.2 倍、年間維持用量の安全域は 14.4 倍である。

以上、非臨床プログラムの結果に基づき、ISIS 396443 の薬理、PK 及び安全性プロファイルは動物試験及び *in vitro* 試験で適切に特徴付けられた。サルの IT 投与量に対するヒトの IT 投与量の安全域は、負荷投与期又は維持投与期の累積投与量及び CSF 量の種差（成人の絶対 CSF 量はサルの約 10 倍）に基づいて求めた。ISIS 396443 の非臨床安全性プログラムの結果は、臨床プログラムの妥当性を裏付けており、SMA 治療薬としての承認申請の裏付けとなる適切な安全性データが得られた。

6 参考文献

Artru AA. Spinal cerebrospinal fluid chemistry and physiology. In: Spinal Drug Delivery, Tony I. Yaksh (ed). Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 1999. Chapter 8; p 177-237.

Chan JHP, Lim S, Wong WSF. Antisense Oligonucleotides: from Design to Therapeutic Application. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006;33(5-6):533-40.

Cho S, Dreyfuss G. A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. Genes Dev. 2010;24(5):438-42.

Dobbing J and J Sand. Quantitative Growth and Development of Human Brain. Arch Dis Child. 1973;48: 757-67.

Engelhardt JA. Comparative Renal Toxicopathology of Antisense Oligonucleotides. Nucleic Acid Ther. 2016;26(4):199-209.

Geary RS, Yu RZ, Siwkowski A, Levin AA. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Properties of Phosphorothioate 2'-O-(2-Methoxyethyl)-Modified Antisense Oligonucleotides in Animals and Man. In: Crooke ST, editor. Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Applications. Boca Raton: Taylor and Francis; 2008. p. 305-26.

Henry SP, Kim T-W, Kramer-Stickland K, Zanardi TA, Fey RA, Levin AA. Toxicologic Properties of 2'-O-Methoxyethyl Chimeric Antisense Inhibitors in Animals and Man. In: Antisense Drug Technology (Second Edition), Ed: Stanley T. Crooke, New York: CRC Press; 2008. pp. 327-62.

Henry SP, Johnson M, Zanardi TA, Fey R, Auyeung D, Lappin PB, et al. Renal uptake and tolerability of a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide (ISIS 113715) in monkey. Toxicology. 2012;301:13-20.

Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH. et al. A mouse model for spinal muscular atrophy. Nat Genet. 2000;24(1):66-70.

Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF, et al. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. Genes Dev. 2010;24(15):1574-9.

Hua Y, Vickers TA, Baker BF, Benett CF, Krainer AR. Enhancement of SMN2 exson 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. PLoS Biol. 2007;5(4):e73.

Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Benett CF, Krainer AR. Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. Am J Hum Genet. 2008;82(4):834-48.

Kim TW, Kim KS, Seo JW, Park SY, Henry SP. Antisense oligonucleotides on neurobehavior, respiratory, and cardiovascular function, and hERG channel current studies. J Pharmacol Toxicol Methods. 2014;69(1):49-60.

Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coovert DD., et al. SMNDelta7, the major

product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. Hum Mol Genet. 2005;14(6):845-57.

Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. Cell. 1995;80(1):155-65.

Ogino S, Leonard DG, Rennert H, Ewens WJ, Wilson RB. Genetic risk assessment in carrier testing for spinal muscular atrophy. Am J Med Genet. 2002;110(4):301-7.

Osborne M, Gomez D, Feng Z, McEwen C, Beltran J, Cirillo K, et al. Characterization of behavioral and neuromuscular junction phenotypes in a novel allelic series of SMA mouse models. Hum Mol Genet. 2012;21(20):4431-47.

Passini MA, Bu J, Richards AM, Kinnecom C, Sardi SP, Stanek LM, et al. Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy. Sci Transl Med. 2011;3(72):72ra18.

Pearn JH. The gene frequency of acute Werdnig-Hoffmann disease (SMA type I). A total population survey in North-East England. J Med Genet 1973;10(3):260-5.

Rigo F, Hua Y, Chun SJ, Prakash TP, Krainer AR, Benett CF. Synthetic oligonucleotides recruit ILF2/3 to RNA transcripts to modulate splicing. Nat Chem Biol. 2012;8(6):555-61.

Rigo F, Chun SJ, Norris DA, Hung G, Lee S, Matson J, et al. Pharmacology of a central nervous system delivered 2'-O-methoxyethyl-modified survival of motor neuron splicing oligonucleotide in mice and nonhuman primates. J Pharmacol Exp Ther. 2014;350(1):46-55.

Singh NK, Singh NN, Androphy EJ, Singh RN. Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. Mol Cell Biol. 2006;26(4);1333-46.

Singh NN, Singh RN, Androphy EJ. Modulating role of RNA structure in alternative splicing of a critical exon in the spinal muscular atrophy genes. Nucleic Acids Res. 2007;35(2):371-89.

Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, Akmaev VR, Zhou Z, Rohlf EM, et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of > 72,400 specimens. Eur J Hum Genet. 2012;20(1):27-32.

Williams JH, Schray RC, Patterson CA, Ayitey SO, Tallent MK, Lutz GJ. Oligonucleotide-mediated survival of motor neuron protein expression in CNS improves phenotype in a mouse model of spinal muscular atrophy. The Journal of Neurosci. 2009;29(24):7633-8.

Wirth B, Garbes L, Riessland M. How genetic modifiers influence the phenotype of spinal muscular atrophy and suggest future therapeutic approaches. Curr Opin Genet Dev. 2013;23(3):330-8.

Yu RZ, Kim TW, Hong A, Watanabe TA, Gaus HJ, Geary RS. Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisenseligonucleotide, ISIS 301012, targeting human

apolipoprotein B-100. Drug Metab Dispos. 2007;35(3);460-8.

7 付録

付録 1 ISIS 396443 の非臨床毒性試験に用いられた被験物質一覧

Study Number	Study Type	Test Species	Vehicle/ Formulation	Drug Substance Batch Used	ISIS 396443 Lot No. (Concentration)	Artificial CSF Lot No.
396443-AS01	Single-Dose Toxicity	Cynomolgus Monkeys	artificial CSF	001*	003* (100 mg/mL)	RPACSF-001
396443-AS07	Repeat-Dose Toxicity	CD-1 Mice	0.9% NaCl	001*	004* (5.0 mg/mL)	N/A
396443-AS03	Repeat-Dose Toxicity	Cynomolgus Monkeys	artificial CSF	001*	003* (100 mg/mL)	RPACSF-001
396443-AS06	Repeat-Dose Toxicity	Cynomolgus Monkeys	artificial CSF	001*	005* (0.4 mg/mL) 006* (1.33 mg/mL) 007* (5.33 mg/mL)	RPACSF-002
396443-AS08	Reproductive Toxicity	CD-1 Mice	0.9% NaCl	001*	008* (0.3 mg/mL) 009* (1.0 mg/mL) 010* (2.5 mg/mL)	N/A
396443-AS09P	Reproductive Toxicity	Rabbits	0.9% NaCl	002*	011* (20 mg/mL) 012* (60 mg/mL) 013* (120 mg/mL)	N/A
396443-AS09	Reproductive Toxicity	Rabbits	0.9% NaCl	002*	011* (20 mg/mL) 012* (60 mg/mL) 013* (120 mg/mL)	N/A

＊新薬承認情報提供時に置換えた

付録 2　　ISIS 396443 の非臨床毒性試験に用いられた被験物質一覧（続き）

Study Number	Study Type	Test Species	Vehicle/ Formulation	Drug Substance Batch Used	ISIS 396443 Lot No. (Concentration)	Artificial CSF Lot No.
396443-AS12	Reproductive toxicity	CD1-Mice	0.9% NaCl	002*	014* (0.29 mg/mL) 015* (1.14 mg/mL) 016* (3.43 mg/mL)	N/A
396443-IS02	Genetic Toxicity	In Vitro	phosphate-buffered saline	001*	003* (100 mg/mL)	N/A
396443-IS03	Genetic Toxicity	In Vitro	phosphate-buffered saline	001*	003* (100 mg/mL)	N/A
396443-AS10	Genetic Toxicity	ICR Mice	0.9% NaCl	002*	017* (18.8 mg/mL) 018* (37.5 mg/mL) 019* (75 mg/mL)	N/A
396443-AS13	Other Toxicity	CD-1 Mice	0.9% NaCl	002*	020* (1.0 mg/mL) 021* (5.0 mg/mL)	N/A
396443-AS11	Other Toxicity	Cynomolgus Monkeys	artificial CSF	001*	022* (4 mg/mL)	RPACSF-002

＊新薬承認情報提供時に置換えた