スピンラザ髄注 12 mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

1 緒言 3
2 参考文献 5

1 緒言

Biogen 及び IONIS Pharmaceuticals は、脊髄性筋萎縮症（SMA）を治療する目的で ISIS 396443 を共同開発した。ISIS 396443 は、2’位を 2’-*O*-(2-メトキシエチル)（2’-MOE）で化学修飾したアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）である。

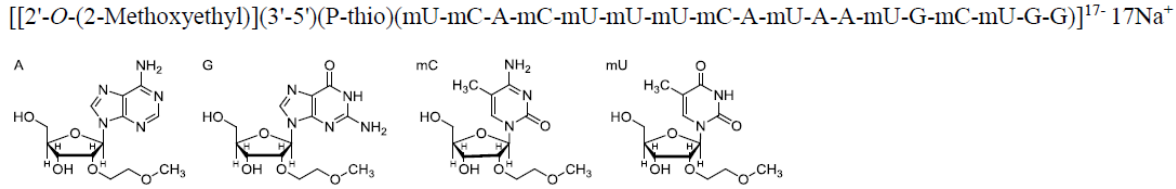
ISIS 396443 は、18 個の核酸からなるオリゴヌクレオチドのホスホジエステル結合（ホスホロチオエート）を有する 17 ナトリウム塩である。ヌクレオチド間は、核酸の 3’位から 5’位へのホスホロチオエートによるジエステル結合である。18 個の核酸における糖残基 2’位すべてが 2’-*O*-(2-メトキシエチル)（2’-MOE）で化学修飾されている。また、シトシン塩基の 5 位は、すべてがメチル基で修飾されている。ISIS 396443 の核酸配列は、次のように表記することができる：

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

下線で示した核酸の糖残基は 2’-MOE で化学修飾されている。また、2’-MOE メチル化ウリジン（2’-MOE ^{Me}U）は、2’-MOE リボチミジン（2’-MOE T）とも呼ばれている。

その分子式は $C_{234}H_{323}N_{61}Na_{17}O_{128}P_{17}S_{17}$ であり、分子量は 7500.89 である。ISIS 396443 の構造式を図 1 に示す。

図 1 ISIS 396443 の構造式



ISIS 396443 は、SMA の治療のためには、中枢神経組織に直接薬剤を届けるために髄腔内投与される。ほとんどの SMA 症例は、*Survival Motor Neuron 1*（*SMN1*）遺伝子産物である SMN タンパク質の機能の喪失に起因している。SMN タンパク質の欠如は、運動ニューロンの機能障害及び最終的には死を引き起こす。*SMN1* 遺伝子は第 5 染色体の逆位重複領域内に存在し、*SMN1* 遺伝子と相同の *SMN2* 遺伝子も存在する。両方の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するが、*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一つは *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 を選択的にスキッピング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鎖タンパク質を産生する（Cho 2010）。

SMN2 遺伝子からの完全長転写物の量を増加させると、SMA 患者における SMN タンパク質の増加をもたらすことが予測される（Hua 2010）。SMA 患者の治療方法のアプローチは、*SMN2* 遺伝子の mRNA 前駆体から mRNA へのプロセシングを調節することで、*SMN2* 遺伝子から産生さ

れる完全長の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。この部位は、通常、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 A1/ A2（hnRNPs）により占有されており、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)。イントロンスプライシングサイレンサーN1 部位に hnRNP A1/ A2 が存在することにより、mRNA 前駆体から mRNA のプロセッシング中に、エクソン 7 が排除されることになる。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 含有が促進され、完全長転写物の産生が増加する。

ISIS 396443 は、SMA 患者における長期間反復投与による治療を裏付ける網羅的な非臨床プログラム（薬理、薬物動態、安全性）により評価されている。ISIS 396443 の *in vivo* における有効性は遺伝子組換えマウスにおいて証明され、複数のマウスモデルにおいて、その機能及び生存についての有用性が示されている。ヒトは *SMN2* 遺伝子を有することが知られている唯一の種であるため、ISIS 396443 の毒性評価を薬理学的に反応する動物種で実施することは不可能である。一方、*SMN2* 転写物のスプライシングを調整することの結果は、全長 SMN タンパク質の産生を増加させることである。健常人では SMN タンパク質は産生されているため、オンターゲットの安全リスクは非常に少ない。したがって、毒性評価は、ISIS 396443 への曝露に関連する非アンチセンス効果（オフターゲット）に焦点を当てた。毒性試験プログラムは、ISIS 396443 のヒトでの長期髄腔内投与をサポートするようにデザインされた。重要な単回及び反復投与毒性試験の動物種として、ASO の組織分布、代謝、及びクラス効果の感受性の観点から、ヒトの代替として最も適切であるカニクイザルを使用した。

ISIS 396443 は、2 歳（24 月齢）を越える患者にはヌシネルセンとして 1 回 12 mg（5 mL）を腰椎穿刺により髄腔内投与する。2 歳（24 月齢）以下の乳児には、脳脊髄液量に応じて、投与量を 9.6～12 mg の範囲で月齢に応じて調節する。脊髄性筋萎縮症の治療薬としての製造販売承認を取得するため、上記の ISIS 396443 の薬理、薬物動態、安全性プロファイルを、動物及び *in vitro* 試験で適切に評価した。また、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となる。

ISIS 396443 のこれらの非臨床試験成績を以下の概要文並びに概要表に示す。

2 参考文献

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.

Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett 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.

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): 1634-44.

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

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.

スピンラザ髄注 12 mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

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 まとめ 6
2 効力を裏付ける試験 8
2.1 序文 8
2.2 *In vitro* 薬理試験 9
2.2.1 ISIS 396443 の発見 (ISIS 396443-NP01 試験, ISIS 396443-NP02 試験) 9
2.2.1.1 SMN2 遺伝子のイントロン 6 及び 7 のエクソン領域に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドの *in vitro* スクリーニング (ISIS 396443-NP01 試験) 9
2.2.1.2 ISS-N1 を標的とする 2'-OMe 及び morpholino ASO と ISIS 396443 の活性の比較（ISIS 396443-NP05 試験） 11
2.2.1.3 ASO による *SMN* スプライシングの修正に起因する SMA 患者の線維芽細胞における SMN タンパク質の増加（Hua 2008） 12
2.2.1.4 SMA 患者の線維芽細胞における Gems の産生に及ぼす ISIS 396443 の効果（ISIS 396443-NP02 試験） 13
2.2.1.5 *SMN2* エクソン 7 含有増加における ISIS 396443 の作用機序（ISIS 396443-NP03 試験、Rigo 2012） 14
2.3 *In vivo* 薬理試験 16
2.3.1 軽症 SMA トランスジェニックマウスモデル（SMN2 及び C/C トランスジェニックマウス）におけるエクソン 7 含有率及び SMN タンパク質の増加 16
2.3.1.1 SMN2 マウスモデルの CNS 組織中における PK/PD（ISIS 396443-NP04 試験） 16
2.3.1.2 SMN2 マウスモデルを用いた ISS-N1 を標的とする ISIS 39644 並びに 2'-OMe 及び morpholino ASO の活性の比較（ISIS 396443-NP05） 20
2.3.1.3 SMA C/C マウスモデルにおける ISIS 396443 の CNS での効果（ISIS 396443-NP04 試験） 25
2.3.2 SMN2 マウスモデルでの作用持続時間 25
2.3.3 SMN2 マウスモデルの末梢組織中での PK/PD（ISIS 396443-NP04 試験） 30
2.3.4 SMN2 マウスモデルにおける ISIS 396443 の CNS への投与の有効性 31
2.3.5 重症マウスモデルの運動機能及び生存期間への影響 32
2.3.5.1 Δ7 SMA マウスモデルの運動機能及び生存期間への影響 32
2.3.5.2 Hung 2 SMN2 copy モデルの症状と生存率に対する ISIS 396443 の影響 38
3 副次的薬理試験 44
3.1 SMA マウスモデル（SMN2 マウスモデル及び Hung 2 SMN2 copy マウス）における末梢組織の壊死に対する作用 44
3.1.1 SMN2 マウスモデルにおける末梢組織の壊死に対する作用 44
3.1.2 Hung 2 SMN2 copy マウスモデルにおける末梢組織の壊死に対する作用 45

3.1.3 SMN 転写産物に対する ISIS 396443 の特異性 45
4 安全性薬理試験 48
4.1 呼吸器系及び心血管系への影響 48
4.1.1 アルビノラットを用いた ISIS 396443 の持続 IT 投与による呼吸系及び心血管系の安全性評価（396443-AS04 試験） 48
4.1.2 サルを用いた単回投与毒性試験（396443-AS01 試験） 49
4.1.3 幼若サルを用いた 14 週間複数回腰部 IT ボーラス投与毒性試験（396443-AS03 試験） 50
4.2 心血管系への影響 51
4.2.1 幼若サルを用いた 53 週間反復投与毒性試験（396443-AS06 試験） 51
4.3 中枢神経系への影響 52
4.3.1 サルを用いた単回投与毒性試験（396443-AS01 試験） 52
4.3.2 幼若サルを用いた 14 週間複数回腰部 IT ボーラス投与毒性試験（396443-AS03 試験） 53
4.3.3 幼若サルを用いた 53 週間反復投与毒性試験（396443-AS06 試験） 54
4.4 腎臓への影響 59
4.4.1 サルを用いた単回投与毒性試験（396443-AS01 試験） 59
4.4.2 幼若サルを用いた 14 週間複数回腰部 IT ボーラス投与毒性試験（396443-AS03 試験） 59
4.4.3 幼若サルを用いた 53 週間反復投与毒性試験（396443-AS06 試験） 60
5 薬力学的薬物相互作用 61
6 考察及び結論 62
7 図表 65
8 参考文献 66

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
BUN	Blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CSF	Cerebrospinal fluid	脳脊髄液
DAPI	4’-6-daimidino-2-phenylindole	4'-6-ジアミジノ-2-フェニルインドール
EC_{50}	Effective concentration, 50%	50%有効濃度
ECG	Electrocardiograms	心電図
ED_{50}	Effective dose, 50%	50%有効用量
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
HELISA	Hybridization enzyme-linked immunosorbant assay	ハイブリダイゼーション酵素免疫測定法
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質
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
IGF1	Insulin-like growth factor 1	インスリン様成長因子 1
Igfals	IGF acid labile subunit	IGF 酸不安定サブユニット
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
KCl	Potassium chloride	塩化カリウム
NAV2	Neuron navigator 2	－

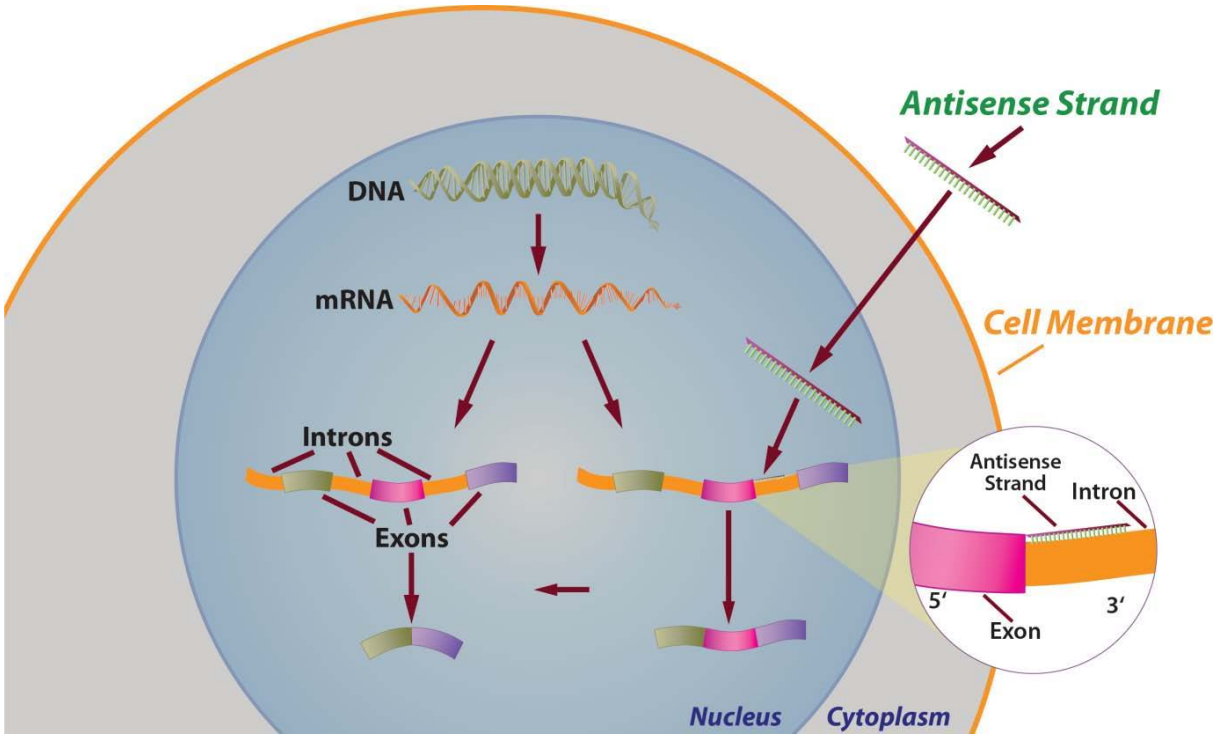
略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
NE	Nuclear extract	核抽出液
NMJ	Neuromuscular junction	神経筋接合部
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
pAb	Polyclonal antibody	ポリクローナル抗体
PK/PD	Pharmacokinetic/pharmacodynamic	薬物動態／薬力学
PND0	Post natal day 0	生後 0 日目
RNA	Ribonucleic acid	リボ核酸
SC	Subcutaneous	皮下
SMA	Spinal Muscular 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
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
ZMAT4	Zinc finger matrin-type 4	－
Δ7 SMA	Severe SMA mouse model	重症 SMA マウスモデル

1 まとめ

アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）は、ワトソン・クリック型の塩基対を形成して、標的 RNA に結合し、その機能を干渉、又は調整するように設計された合成核酸アナログである（Bennett and Swayze 2010）。ASO による RNA 機能への干渉に共通する機序は、RNase H や Ago 2 などの内因性酵素を介した RNA の特異的分解の促進である（RNA 干渉）。これらの酵素が触媒活性を補助するには固有の構造が必要となる。したがって、RNA 分解酵素の活性を補助せずに、高い親和性をもって、塩基配列特異的に RNA に結合する ASO を設計することも可能である。標的 RNA に結合する一方、それを切断しないように設計された ASO は、RNA の機能及び代謝過程（タンパク質への翻訳、スプライシング、ポリアデニル化など）に干渉することが可能である。我々を含め多くの研究者らにより、ASO の設計に際して、mRNA 前駆体と結合した後、mRNA 前駆体から成熟 mRNA へのスプライシングを修正することが可能であることが示されている（Bauman 2009; Dominski and Kole 1993; Hua 2010; Hua 2007; Kole 1991; Taylor 1999; Vickers 2006）。mRNA 前駆体スプライシングの修正は、タンパク質変異体の発現を増加させる、あるいは、サラセミアや早老などで起こる mRNA 前駆体スプライシングの変化による遺伝的欠陥を修正するための唯一の方法である（Dominski and Kole 1993; Fong 2009）。

脊髄性筋萎縮症（SMA）は、*SMN2* 転写産物のスプライシングの修正により治療することが可能な遺伝性疾患である（Hua 2008; Passini 2011; Singh 2007）。SMA は、survival motor neuron 1（*SMN1*）遺伝子のホモ接合性の欠失に起因している（Lefebvre 1995; Spiegel 1996）。ヒトのみが、survival motor neuron 2（*SMN2*）と呼ばれる *SMN1* と相同の遺伝子を有しているが、*SMN2* の 11 塩基が *SMN1* と異なっている。異なる塩基のうち、1 塩基がエクソン 7 のエクソンスプライシングエンハンサー領域で認められ、その結果、選択的スプライシングにおいてはエクソン 7 がスキップされる場合と含まれる場合とがある（Monani 1999）。成熟転写産物の約 90%はエクソン 7 を欠失し、速やかに分解される短縮タンパク質に翻訳される（Lefebvre 1995）。*SMN2* のコピー数とその翻訳によって得られる全長 SMN タンパク質の量が SMA の重症度と相関していることから、*SMN2* のコピー数は疾病表現型決定の重要な因子である（Coovert 1997; Lefebvre 1997; Feldkotter 2002; Prior 2004）。このことを踏まえると、スプライシング機構がエクソン 7 を認識する前に *SMN2* 転写産物に結合するよう、ASO を設計することで、エクソン 7 が多く含まれるように mRNA 前駆体のスプライシングを調整することが可能である（図 1）。この戦略での開発を成功させるためには、設計された ASO が RNase H や RNA 干渉機構を介した mRNA 前駆体の切断を促さないことが重要であった。したがって、以下に示す薬理試験で使用された ASO は、このようないずれの機構の基質にもならないよう設計された。ほとんどの試験においては、2'-*O*-メトキシエチル修飾により均一に修飾されており、RNase H や RNA 干渉機構を補助しない ASO を使用した（Altmann 1996; Lima 2009; McKay 1999）。

図 1　　ASO を用いた *SMN2* mRNA 前駆体のスプライシングの修正



SMN2 転写産物は選択的スプライシングを受ける。即ちエクソン 7 が、スキップされる場合（左側の経路）と、含有される場合（右側の経路）がある。エクソン 7 がスキップされると、不完全な短縮タンパク質が産生される。ASO を用いない場合、*SMN2* 遺伝子由来の転写産物はほとんどエクソン 7 を含まない。本 ASO は、mRNA 前駆体のイントロン 7 と結合し、エクソン 7 が含有されることにより、全長 SMN タンパク質の産生を促すよう設計されている。

ISIS 396443 は、*SMN2* mRNA 前駆体のエクソン 7 に近接するイントロン 7 と結合するよう設計された完全修飾 2'-*O*-(2-メトキシエチル)（2'-MOE）ASO である（図 1 及び図 2）。ISIS 396443 は、エクソン 7 の含有を阻害する mRNA 前駆体上のヘテロ核リボヌクレオタンパク質（hnRNP）と置き換わり、エクソン 7 上でのスプライシング因子の生成を可能にし、エクソン 7 の含有を促す（Hua 2008; Rigo 2012; 396443 NP-03 試験参照）。細胞培養試験及び動物試験では、ISIS 396443 が *SMN2* エクソン 7 含有の効果的なモジュレーターであること、及び SMA のマウスモデルにおいて有効であることが示されている（Hua 2010; Hua 2011; Hua 2008; Passini 2011）（2.3.5 項）。

ICH ガイドラインに従い、ISIS 396443 の持続髄腔内（IT）投与によるラットでの呼吸系及び心血管系への影響について、安全性薬理試験を実施した。予定臨床投与経路である腰部 IT ボーラス投与によるサルを用いた急性及び亜慢性毒性試験では、腎臓及び中枢神経系（CNS）に対する安全性を評価した。サルで評価した安全性パラメータは、心血管系に対する安全性を評価するための心電図（ECG）、腎臓に対する安全性を評価するための血液生化学的検査及び尿検査、CNS に対する安全性を評価するための一般感覚及び運動機能、並びに脳反射及び脊髄反射のパラメータが含まれた。

2 効力を裏付ける試験

2.1 序文

非臨床試験において、ISIS 396443 の薬理作用は、SMA 患者の線維芽細胞及びマウスモデルを用いて検討した。患者の線維芽細胞を用いた試験において、ISIS 396443 は、SMN2 エクソン 7 含有率を濃度依存的に増加し、全長転写産物の発現率は 90%を上回った。ヒトのみが SMN2 遺伝子を有するため（Rochette 2001）、正常動物を用いた ISIS 396443 の薬理作用の評価は実施不可能である。しかしながら、ヒト SMN2 遺伝子をマウスゲノムに組み込み SMA の病態を示す数種のトランスジェニックマウスモデルが開発されている。軽症 SMA のマウスモデルを用いて、ISIS 396443 を全身投与したときは様々な末梢組織で（Hua 2008）、また、側脳室にボーラス投与又は持続投与（インフュージョン）したときには、脊髄を含む CNS 組織において（Hua 2010; Rigo 2014）、SMN2 導入遺伝子転写産物中のエクソン 7 含有が促進されることが示され、その作用機序が検証された。hSMN2 トランスジェニックマウスにおいて、ISIS 396443 を脳室内（ICV）に持続投与すると、エクソン 7 の含有率は 90%以上となり、運動ニューロンの SMN タンパク質量が増加した。その結果、運動ニューロンに SMN タンパク質を含有する点状の核構造物（すなわちコイル小体対又は Gems）が形成された。

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、SMN2Δ7 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）。

重症 SMA のトランスジェニックマウスモデル（Δ7 SMA）において、ISIS 396443 を、生後 0 日目に単回 ICV ボーラス投与すると、*SMN* 中のエクソン 7 の含有率及び SMN タンパク質産生量は用量依存的に増加し、生存期間も用量に依存して延長した（Passini 2011）。ISIS 396443 を投与した Δ7 SMA マウスでは、非投与群のマウスに比べて、体重増加量の改善、筋形態、筋力、運動協調性の改善、さらに運動ニューロン接合部の形態の改善が認められた。達成目標とした組織中薬物濃度 2～10 μg/g は、脊髄組織におけるエクソン 7 の含有率を 50～90%増加させるのに十分な濃度であった（396443 NP-04 試験）。ISIS 396443 を子宮内投与した試験結果（Hua 2010）と上記の試験結果から、ISIS 396443 を出生前、又は出生後早期の投与により、SMA マウスモデルの病態を改善すること、並びに正常マウスの発育には影響を及ぼさないことが示された。以上のデータから、ISIS 396443 は細胞培養及び SMA げっ歯類モデルにおける *SMN2* のスプライシングに頑健な効果を示し、エクソン 7 含有の促進により SMA げっ歯類モデルに有用な効果をもたらすことが示された。

SMA マウスモデルにおいて、ISIS 396443 の全身投与は、顕著な生存期間延長及び治療効果を示した（Hua 2011）。この重症マウスモデルでみられた死亡は、運動ニューロンの障害によるものではなく、心臓障害などの他の全身性症状に起因している可能性が高いと考えられる（Mentis 2011; Park 2010）。一方、ヒト疾患の主な臨床的特徴は、運動ニューロン消失による筋力低下と萎

縮である。ヒト SMA では心臓障害を強く示すエビデンスはみられないこと（Iascone 2015）や既存の SMA の自然経過に関するデータから、SMA の治療法に対して上記のマウスモデルでの全身投与のデータの意義は不明であるが、CNS 組織における治療、特に脊髄の運動ニューロンにおける SMN タンパク質の増加による治療の適切性が強く裏付けられる。

2.2 *In vitro* 薬理試験

2.2.1 ISIS 396443 の発見 (ISIS 396443-NP01 試験, ISIS 396443-NP02 試験)

参考資料［4.2.1.1-1］ISIS 396443-NP01, 参考資料［4.2.1.1-2］ISIS 396443-NP02, 参考資料［4.2.1.1-3］ISIS 396443-NP03, 参考資料［4.2.1.1-5］ISIS 396443-NP05, 参考資料［4.3-35］Hua 2008, 参考資料［4.3-65］Rigo 2012

ISIS 396443 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、500 を超える 2'-MOE ASO を広範囲にスクリーニングした結果、見いだされた（Hua 2007; Hua 2008; 396443-NP01 試験）。最初に、ASO を *in vitro* スプライシング試験でスクリーニングし（Cartegni 2006）、ASO の結合により修正される mRNA 前駆体転写産物上の領域を特定した（Hua 2007）。最初に行ったこれらの試験では、*in vitro* スプライシング試験及び SMA 患者の線維芽細胞を用い、ASO の結合によりエクソン 7 の含有を促進するエクソン 7 の 2 領域が特定された。これらの試験の対象領域をエクソン 7 に隣接するイントロンにも広げたところ（Hua 2008）、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 上に（図 2）、細胞培養試験でエクソン 7 の含有を促進する新規の領域が特定された。ASO がエクソン 7 の含有を促進することから、この領域が有効な *SMN2* mRNA 前駆体領域であることが、他施設の研究グループによって確認された（Singh 2007）。この *SMN2* mRNA 前駆体領域は、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。

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。

2.2.1.1 SMN2 遺伝子のイントロン 6 及び 7 のエクソン領域に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドの *in vitro* スクリーニング (ISIS 396443-NP01 試験)

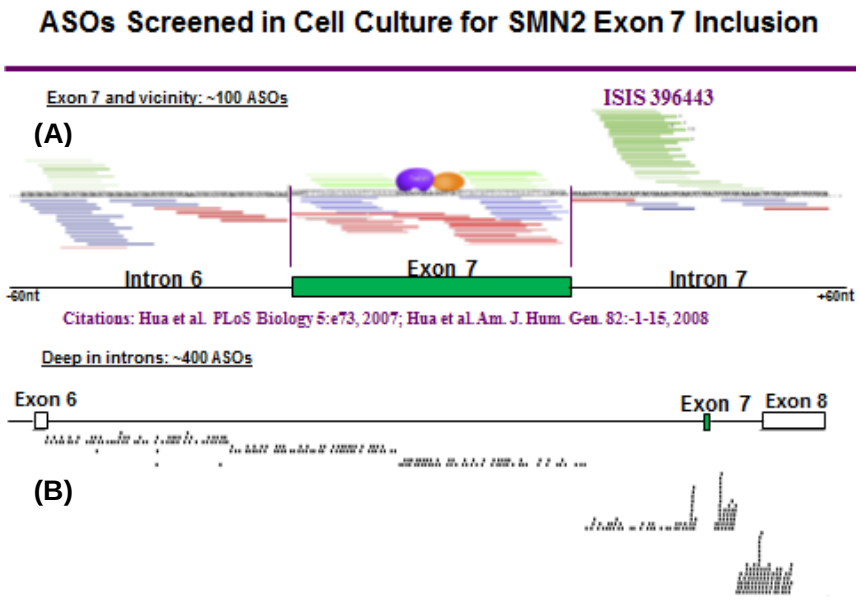
本試験は、ヒト SMN2 のイントロン 6 及び 7 のエクソン領域に結合するように設計した数百種の 2'-MOE ASO をスクリーニングし、ISIS 396443 より高い活性を有する ASO が存在するか否かを明確にする目的で実施した。

SMA 患者の線維芽細胞を用い、イントロン 6 及び 7 の深遠部、及びエクソン 8 の 5'末端を標的とする約 400 種の non-RNase H ASO（15 塩基残基［15-mers］のすべては 2'-MOE で均一に修飾されておりホスホジエステル骨格を有する）を評価した。陽性対照としては、ISS-N1 領域を標的と

する ASO（ホスホジエステル骨格［393608］又はホスホロチオエート骨格［396449］を有する 15-mer ASO、及び ISIS 396443 と同一の塩基配列を有するがホスホジエステル骨格を有する 18-mer ASO［438362］）を用いた（図 2）。単一濃度（100 nM）の各 ASO をリポフェクタミンを用いて SMA 患者の線維芽細胞に 4 時間取り込ませ、ASO なしの培地に置換した後さらに 20 時間培養後、RNA を *SMN2* スプライシングアッセイのために単離した。エクソン 7 を含有する、又は含有しない転写物量を RT-PCR 法により測定した。

ISSN-1 を標的とする ASO は、エクソン 7 の含有促進と整合して、エクソン 7 を含有する転写物を増加させ、一方、エクソン 7 を含有しない転写物を減少させた。対照的に、*SMN2* 転写物を標的としない ASO は、*SMN2* エクソン 7 のスプライシングの修正に対して最小限の効果しか示さなかった。結果として、ISS-N1 を標的とする ASO と同程度にエクソン 7 の含有を促進する他の ASO は見いだされなかった。

図 2　　スクリーニングされた ASO による *SMN2* mRNA 前駆体上の結合領域



上のパネル（A）は、*SMN2* mRNA 前駆体のエクソン 7 周辺を拡大して示したものである。色付きの線は、イントロン 6、エクソン 7 及びイントロン 7 に結合するよう設計された様々な ASO を表す。緑色の線は、これらのうちエクソン 7 含有率の増加を促進した ASO を表す。赤色の線は、これらのうちエクソン 7 のスキップを促進した ASO を示す。青色の線は、エクソン 7 のスプライシングを修正する作用を示さなかった ASO を表す。スプライシング因子 Tra2/B1 が結合するエクソン 7 内の領域を示した。ISIS 396443 は、イントロン 7 内の ISS-N1 と呼ばれる領域に結合する。下のパネル（B）は、その他の ASO の結合標的であり、SMA 患者の線維芽細胞を用いた試験で評価された、より広範囲の *SMN2* mRNA 前駆体を示す。
Data source: M4.2.1.1-1_Figure 1

さらに、単一濃度において SMN2 エクソン 7 の含有を促進した ASO について、用量反応試験で評価した。SMA 患者の線維芽細胞を複数濃度（0.3～100 nM）の ASO で単一濃度試験と同様に処置し、RNA を *SMN2* スプライシングアッセイのために単離した。ISS-N1 を標的とする ASO は用量依存的にエクソン 7 含有転写物を増加させ、それに伴ってエクソン 7 非含有転写物を減少させた。ISS-N1 を標的とする ASO と同程度に *SMN2* エクソン 7 のスプライシングを修正する他の如何なる ASO も見いだされなかった。

SMN2 エクソン 7 及びそれに隣接するイントロン配列の外部領域を標的とする ASO は、ISS-N1 を標的とする ASO と比較してエクソン 7 の含有を効果的に促進しなかった。

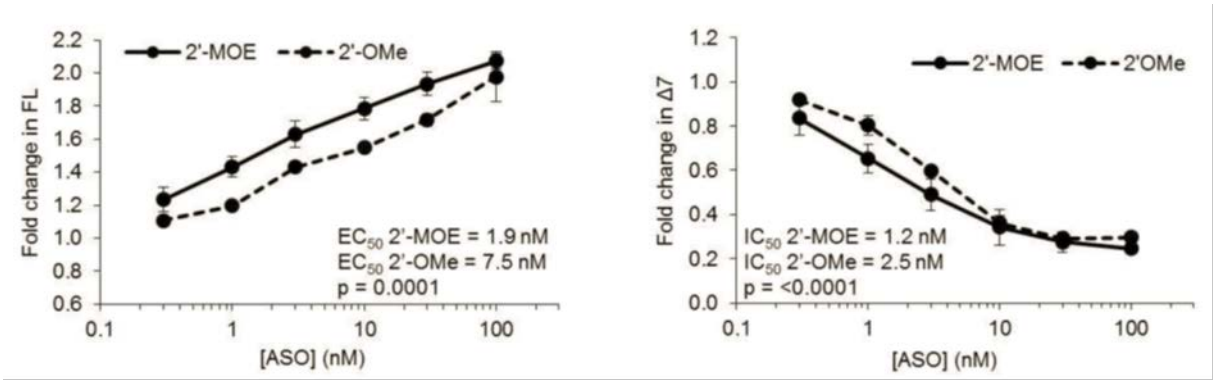
2.2.1.2　　ISS-N1 を標的とする 2’-OMe 及び morpholino ASO と ISIS 396443 の活性の比較（ISIS 396443-NP05 試験）

本試験では、SMN2 スプライシングを修正する最適な ASO の化学構造を明確にするため、ISIS 396443 の活性を、ISIS 396443 と同様に ISS-N1 を標的とする 2’-O-メチル糖（20-mer 2’-OMe）で均一に修飾した既知のオリゴヌクレオチド（Singh 2006; Williams 2009）（2’-OMe ASO）及び phosphorodiamidate morpholino（PMO）ASO の活性を比較した。

SMA 患者の線維芽細胞に複数濃度（0.3～100 nM）の ISIS 396443（2’-MOE）及び 2’-OMe ASO をサイトフェクチンを用いて 4 時間取り込ませ、ASO 不含の培地に置換した後さらに 20 時間培養後、*SMN2* スプライシング解析のため、細胞より RNA を単離した。エクソン 7 を含有する、又は含有しない転写物量は RT-PCR 法により測定した。

その結果、ISIS 396443 は、2’-OMe ASO よりも、強力かつ効果的にエクソン 7 の含有率を促進させ、それに応じて *SMN*Δ7 転写産物を減少させた（図 3）。同様の結果は、SMA マウスモデルにおいてもみとめられた（Hua 2010）。PMO ASO は中性の骨格を有するため、カチオン性脂質では効率的に細胞に取り込ませることが困難であることから、電気穿孔法を用いて線維芽細胞を処置した。ISIS 396443 及び PMO-20（20-mer）ASO はほぼ同程度に用量依存的にエクソン 7 の含有を促進した。

図 3　　ISIS 396443 と 2’-O-メチルで修飾したオリゴヌクレオチドによる SMA 患者由来の線維芽細胞におけるエクソン 7 含有率の上昇



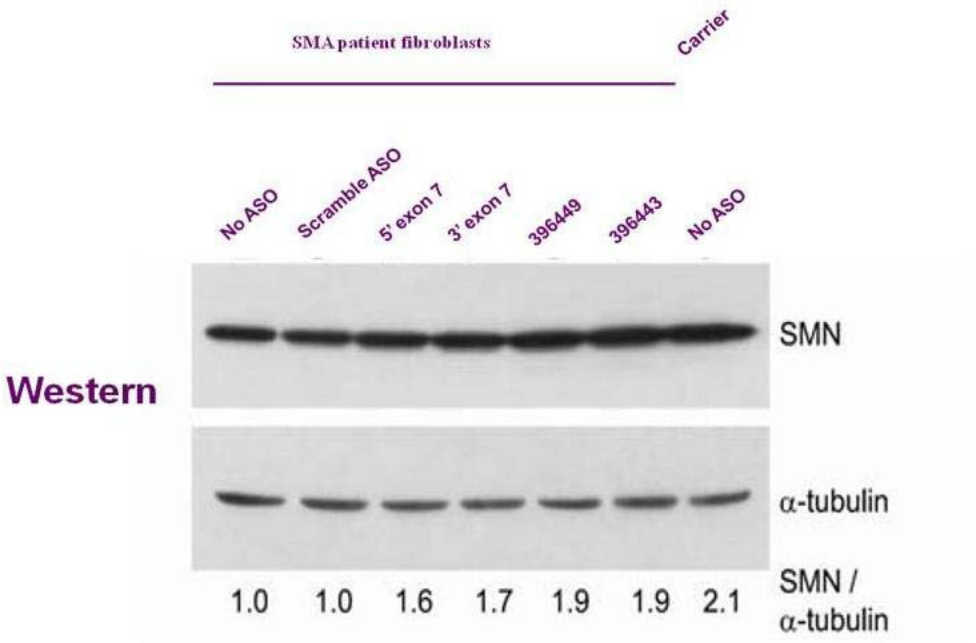
脂質を用いて SMA 患者の線維芽細胞に低濃度から高濃度までの ISIS 396443（2'-MOE）又は 2’-OMe ASO を導入した後に単離されたエクソン 7 を含む *SMN2* 転写産物（左パネル）及びエクソン 7 を含まない *SMN2* 転写産物（右パネル）のリアルタイム RT-PCR を実施した。2’-MOE ASO についてのエラーバーは 4 重測定の標準偏差を表す。2'-OMe ASO についてのエラーバーは 2 重測定の範囲を表す。
Data source: M4.2.1.1-5_Figure 1B

このような ASO の効果は、塩基配列特異的であり、配列中の 6 塩基を配置換えすることにより、その効果は失われた（図 4）。

2.2.1.3　　ASO による *SMN* スプライシングの修正に起因する SMA 患者の線維芽細胞における SMN タンパク質の増加（Hua 2008）

患者の線維芽細胞を ISIS 396443 で処置すると、*SMN2* 転写産物中のエクソン 7 含有率が増加するだけでなく、細胞内での SMN タンパク質産生も増加した（図 4）。図 3 に示すように、全長 *SMN2* 転写産物にはわずかにベースライン濃度が存在し、この全長 *SMN2* 転写産物のベースライン濃度が、SMN タンパク質発現量でのベースライン量に相当する（図 4）。

図 4　　ASO により修飾された *SMN* スプライシングによる SMA 患者線維芽細胞における SMN タンパク質の増加



最も高い効果を示した 15-mer ASO（ISIS 396449）及び 18-mer ASO（ISIS 396443）を、エクソン 7 を標的とする 2 種類の最適化 ASO（それぞれ 5' exon 7 及び 3' exon 7）と比較した。陰性対照 ASO としてターゲットの異なる ASO（Scramble ASO）を用いた。リポフェクチンを用いて患者の線維芽細胞に 100 nM ASO を導入した後、内因性 SMN2 タンパク質を分析した。2 日後、タンパク質試料を回収した。SMN タンパク質をウエスタンブロット法で検出し、同一ブロットをローディングコントロールの抗 α チューブリン抗体でリプローブした。SMN/α チューブリン比は患者線維芽細胞における No ASO（バッファーコントロール）の値に対する相対値として算出した。Carrier は患者の母親の線維芽細胞を示す。
Data source: M4.3-35_Hua 2008 Supplemental_Figure S1 より改変

ISIS 396443 の処置により、ウエスタンブロット法で測定した SMN タンパク質量がさらに増加した。

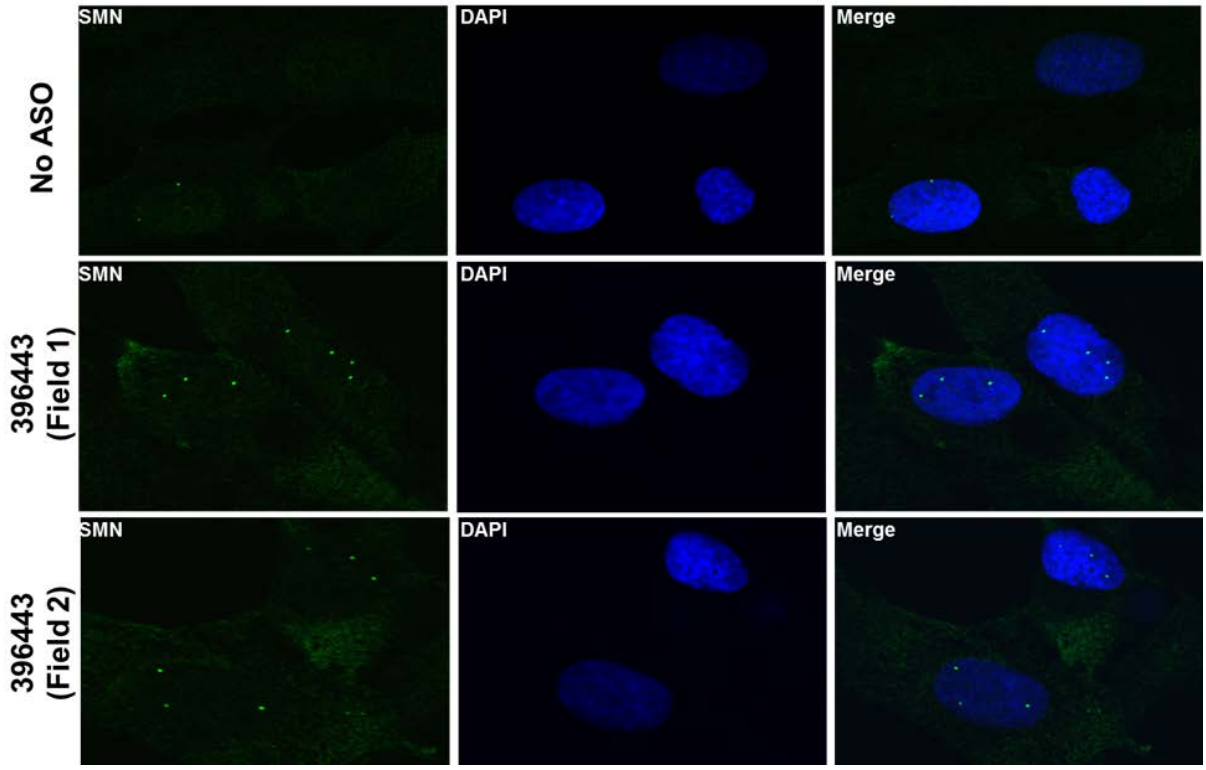
2.2.1.4　　SMA 患者の線維芽細胞における Gems の産生に及ぼす ISIS 396443 の効果（ISIS 396443-NP02 試験）

本試験は、SMA 患者の線維芽細胞を ISIS 396443 で処置することにより、SMN タンパク質を含む核構造物（Gems）の数が増加するかを in vitro で評価する目的で実施した。SMA 患者の線維芽細胞に 50 nM の ISIS 396443 を 4 時間サイトフェクチンを用いて取り込ませた後、ISIS396443 又はサイトフェクチン不含の培地に置換し、さらに 44 時間培養した。その後固定した細胞を抗 SMN 抗体で染色し、さらに細胞核を可視化するため 4'-6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）で対比染色し、ISIS 396443 無処置細胞と比較した。SMA 患者の線維芽細胞を ISIS 396443 で処置後、SMN 抗体で固定した細胞を染色し、ISIS 396443 無処置細胞と比較した。

SMA 患者の線維芽細胞を ISIS 396443 で処置すると、Gems と呼ばれる SMN タンパク質を含む点状の核構造物の数が増加した（図 5）。なお、これらの構造物は、SMN タンパク質のほか、snRNP の生成に関与していると考えられる他の 6 種類の gemin タンパク質を含んでいる（Feng 2005; Liu

1996; Wan 2005）。

図 5　　ISIS 396443 処置による SMA 患者の線維芽細胞での Germs の数の増加（396443-NP02 試験）



患者の線維芽細胞を ISIS 396443 で処置後、固定し、SMN タンパク質を染色した（緑色染色）。細胞を 4’-6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）で対比染色することにより、細胞核を可視化した。
Data source: M4.2.1.1-2_Figure 1

2.2.1.5　　*SMN2* エクソン 7 含有増加における ISIS 396443 の作用機序（ISIS 396443-NP03 試験、Rigo 2012）

ISIS 396443 は、*SMN2* 転写産物のエクソン 7 の 3’側に隣接するイントロン 7 の特定の配列と結合する。この領域は、イントロンスプライシングサイレンサー領域（ISS-N1）と呼ばれる。この mRNA 前駆体領域は、通常 hnRNP A1/2 タンパク質で占められ、それがエクソン 7 の 5’側のエクソン-イントロン接合部の U1 snRNA 結合部位を覆い隠している（Hua 2008）。U1 snRNA は 5’-スプライス部位を規定する配列と塩基対合し、これがイントロンのスプライシングを開始する最初のステップの 1 つと考えられる（Matera and Wang, 2014）。

ISIS 39643-NP03 試験では、ISIS 396443 のエクソン 7 の含有を促進する活性が hnRNP A1 及び A2 の結合と競合することに起因するかを 3’-ビオチンで標識した ISS-N1 を含む 23-mer SMN2 inron 7 RNA 断片を用いた RNA pull-down 実験により検討した（図 6）。

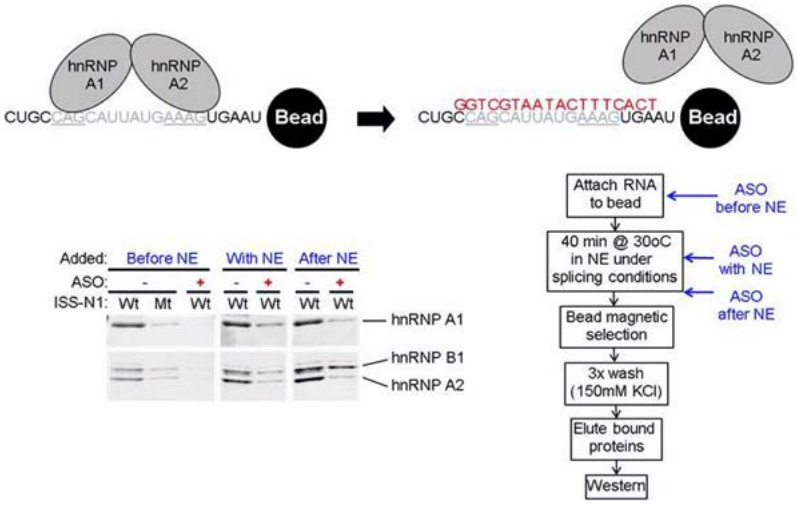
その結果、ISIS 396443 の非存在下で、hnRNP A1 及び A2/B1 は RNA へ結合した。すでに報告されているように（Hua 2008）、hnRNP A1 の認識に必須な 23-mer SMN2 inron 7 RNA 断片における 2 つの AG ジヌクレオチドの変異は、hnRNP A1 及び A2/B1 の結合を減弱させた。また、ISIS 396443 を添加すると ISIS 396443-RNA 二量体が形成され、それは、hnRNP の RNA への結合を阻

害した。次に、ISIS 396443 は、HeLa 細胞の核抽出液（NE）と共に添加したときに hnRNP の RNA への結合を阻害するか、及び hnRNP がいったん RNA に結合した後に NE を添加すると結合体から hnRNP を離脱させるかを検討した。両実験条件において、ISIS 396443 は hnRNP の RNA への結合を減弱させた。

同様の結果は、エクソン 7 含有に対する 2'-MOE ASO と 2'-F ASO 効果の違いが、mRNA 前駆体への hnRNP A1 及び A2 の結合に及ぼす ASO の作用の違いにより説明可能かを検討した試験からも報告されている（Rigo 2012）。本試験では、ISIS 396443-NP03 試験と同様に、3'-ビオチンで標識した ISS-N1 を含む 23-mer SMN2 inron 7 RNA 断片と 2'-MOE 又は 2'-F ASO のいずれかとの二量体を用いた RNA pull-down 実験が行われた。その結果、両 ASO に関して、ASO の非存在下で、hnRNP A1 及び A2/B1 は RNA と結合した。また、hnRNP A1 の認識に必須な 2 つの AG ジヌクレオチドの変異は hnRNP A1 及び A2/B1 の結合を減弱した。2'-MOE 又は 2'-F ASO との ASO-RNA 二量体の形成は、hnRNP の RNA への結合を阻害した。さらに、HeLa 細胞の核抽出液（NE）と共に添加したときに hnRNP の RNA への結合を阻害するか、及び hnRNP がいったん RNA に結合した後に NE を添加すると結合体から hnRNP を離脱させるかを検討した実験においても、2'-MOE 及び 2'-F ASO はいずれも hnRNP の RNA への結合を減弱させた。以上の結果に基づき、2'-MOE ASO は、ISS-N1 から hnRNP A1/A2 を離脱させることにより *SMN2* エクソン 7 の含有を生起させると結論された。

ISIS 396443 は mRNA 前駆体結合部位で hnRNP A1/2 タンパク質を置換することにより、U1 snRNA のエクソンーイントロン接合部への結合及びスプライセオソーム複合体の形成を可能にする（Rigo 2012; 396443-NP03 試験）。これによりエクソン 7 の含有が促進され、全長 SMN タンパク質が産生される（図 6）。ISIS 396443 が結合する ISS-N1 領域は、RNA スプライシング時に成熟 mRNA から取り除かれるため、ISIS 396443 は成熟 mRNA の翻訳に対し影響を及ぼさないと考えられる。

図 6　　ISIS 396443 による ISS N1 領域の hnRNP A1 及び A2/B1 タンパク質の置換



ISS-N1 領域を含む RNA 断片をビオチンで標識し、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズに結合させた。HeLa 細胞の核抽出液（NE）と共にこれらのビーズを、ISIS 396443 の存在下又は非存在下でインキュベートした。ISIS 396443 は、NE の前、NE と同時、又は NE の後にインキュベート反応液へ添加した。ビーズを洗浄し、結合タンパク質を溶出させた。ISIS 396443 添加時に ISS-N1 に結合した hnRNP A1 及び hnRNP A2/B1 を、ウエスタンブロット法で確認した。Wt：野生型 ISS-N1、Mt：変異型 ISS-N1

Data source: M4.2.1.1-3_Figure 3, M4.3-65_Rigo 2012 Supplemental Figure 14 より改変

2.3 *In vivo* 薬理試験

In vivo の非臨床薬理試験は、マウスモデルでの ISIS 396443 と SMN2 発現との PK/PD、投与経路の影響、及び CNS 組織中と末梢組織中の曝露量を比較検討する複数の試験から構成されている。これらの試験データから総合的に評価すると、ISIS 396443 は、SMA マウスモデルで *SMN2* のスプライシングを *in vivo* で適切に修正することにより、SMN タンパク質濃度を増加させ、生化学的、組織学的、及び機能的評価項目を改善することが強く裏付けられた。

2.3.1 軽症 SMA トランスジェニックマウスモデル（SMN2 及び C/C トランスジェニックマウス）におけるエクソン 7 含有率及び SMN タンパク質の増加

ヒトは、*SMN2* 遺伝子を有することが知られている唯一の種である。したがって、非臨床試験で標準的に用いられる動物種を用いて、ISIS 396443 の薬理作用を評価することは不可能である。しかしながら、内因性のマウス遺伝子を欠失させ、ヒト *SMN2* 遺伝子を発現するよう改変された数種類の SMA マウスモデルが開発されている。これらのマウスモデルの 1 つに、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 SMN2 マウスモデル（$SMN^{-/-}$; $hSMN2^{2TG/2TG}$）がある（Hsieh-Li 2000）。このマウスモデルを用いて、ISIS 396443 の PK/PD を種々検討した。

2.3.1.1 SMN2 マウスモデルの CNS 組織中における PK/PD（ISIS 396443-NP04 試験）

参考資料［4.2.1.1-4］ISIS 396443-NP04

ASO は血液脳関門を通過しにくいため、CNS に直接注入する必要がある。マウスでは脳室内（ICV）投与により、ASO を CNS へ直接注入することが可能である（Hua 2010）。非臨床試験動物種における ISIS 396443 と異なる ASO を用いた試験で、持続 ICV 投与の速度が ASO の分布及び取り込みに影響を及ぼすことが明らかとなっている。

本試験では、雌雄の成熟 SMN2 トランスジェニックマウス（SMA type III マウス［$SMN^{-/-}$; $hSMN2^{2TG/2TG}$］）を用いて、ICV7 日間持続投与法と単回 ICV ボーラス投与法を比較した。ISIS 396443 の用量は持続投与においては、3～100 µg/日/マウス（総投与量 21～700 µg/マウス）、ボーラス投与においては 6～350 µg/マウスとした。持続投与終了後 2 日目、又はボーラス投与後 9 日目に脊髄及び脳組織中での *SMN2* スプライシングを RT-PCR 法により解析した。

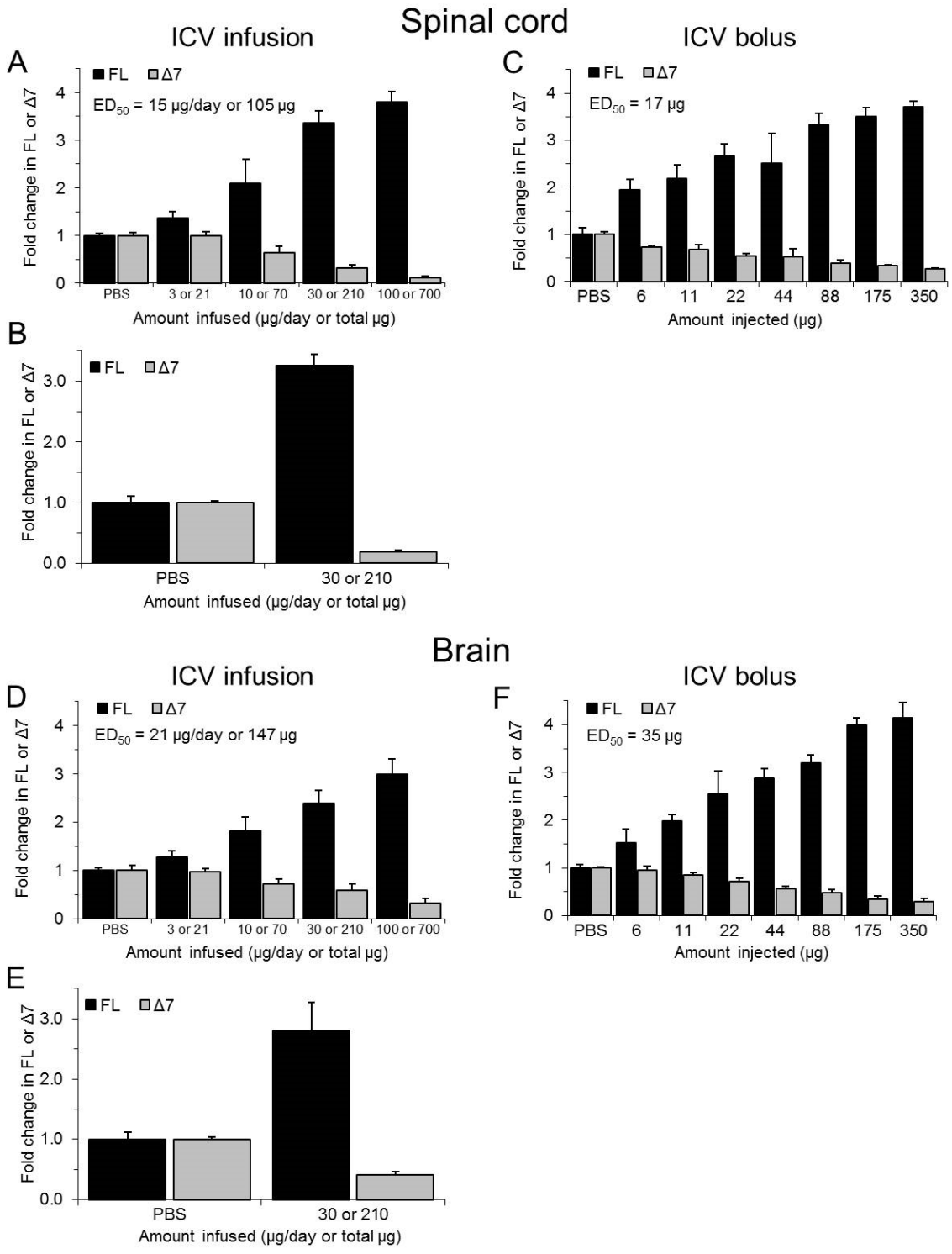
その結果、これらのドラッグデリバリー方法では、いずれの方法でも、脊髄及び脳の両方において用量依存的に *SMN2* の適切なスプライシングを増加させ、同時にエクソン 7 欠失の転写産物を減少させた（図 8 A、C、D、F）。ISIS 396443 30 µg/日の ICV 持続投与の終了後 71 日目での *SMN2* スプライシングを評価したところ、71 日目でのスプライシング修正程度は、脊髄及び脳の両方において 2 日目に認められた程度と同程度であった（図 7B 及び E）。

脊髄での ED_{50} は、CSF への ICV の持続投与では 105 µg であったが、ICV ボーラス投与では 17 µg と効果の増加がみられた。

この効果の増加は、脊髄及び脳組織中の ASO 濃度を定量し、これを SMN2 スプライシングの

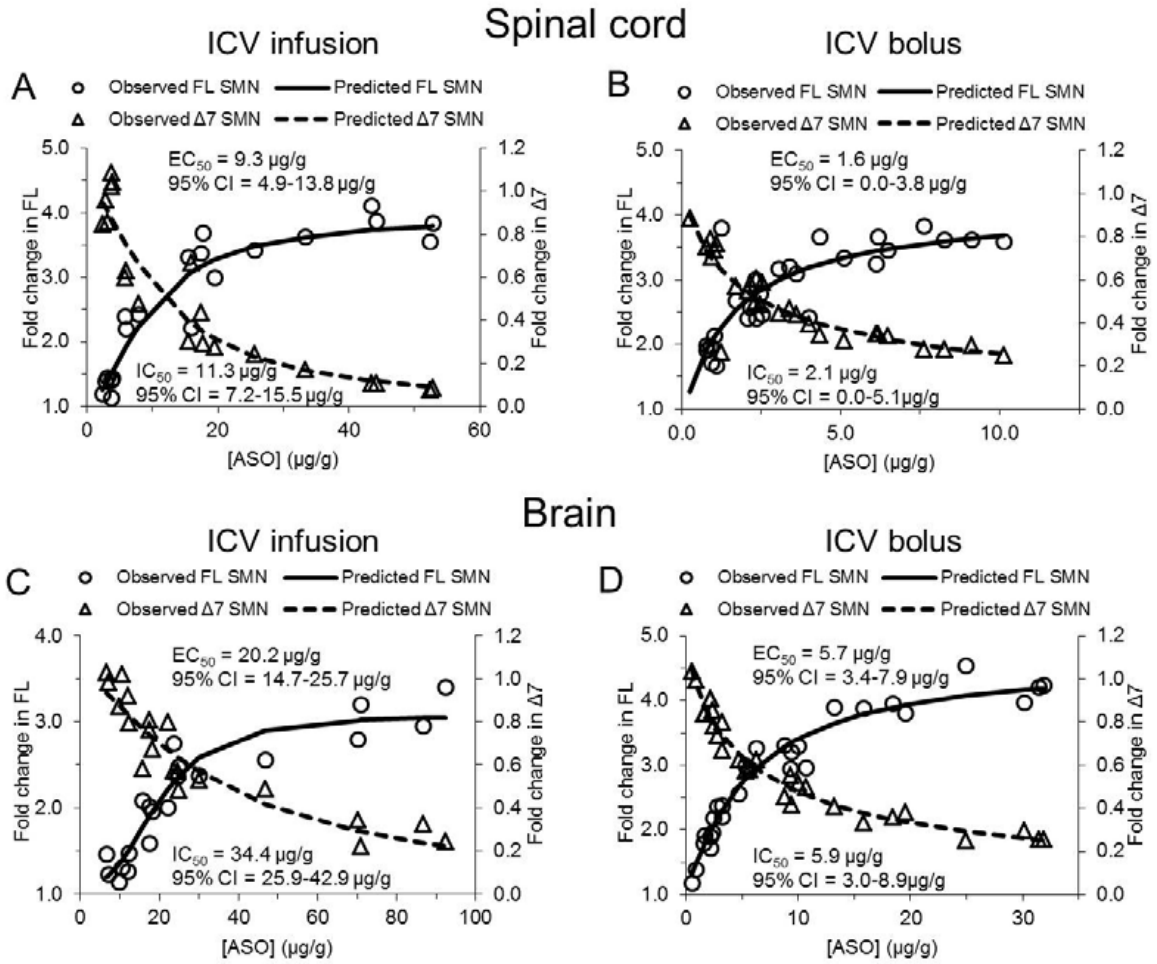
結果と対応させることにより確認された（図 7）。組織中の ASO 濃度は、HPLC-UV 法又はハイブリダイゼーション-ELISA（HELISA）法により測定した。この解析により、濃度反応曲線を作成し EC_{50} を算出することが可能である。上記の ED_{50} の推定値と同様に、脊髄（図 7、A 対 B）及び脳（図 7、C 対 D）の両方で、ICV ボーラス投与により EC_{50} が有意に改善した。これらの知見は、今までの ASO に関する研究と一致しており、投与方法として持続投与よりもボーラス投与が適切な投与方法であることが裏付けられた。

図 7　　ISIS 396443 の ICV 持続投与、又はボーラス投与による効果の比較



（A）持続投与量は、1 日あたりの投与量又は 7 日間の累積投与量（例：3 µg/日を 7 日間 ＝21 µg）で示した。図は ICV 持続投与により ISIS 396443 を 7 日間投与した 2 日後の、腰髄におけるエクソン 7 含有（FL）又は非含有（Δ7）*SMN2* 転写産物のリアルタイム RT-PCR 分析結果を示す。各用量で n = 5。エラーバーは、標準偏差を表す。ED_{50} の算出値を示す。（B）*SMN2* スプライシングは、A の 30 µg/日の ICV 持続投与終了から 71 日後に評価した。（C）単回 ICV ボーラス投与により ISIS 396443 を投与した 9 日後の、腰髄における FL 及び Δ7 の *SMN2* 転写産物のリアルタイム RT-PCR 分析結果。各用量で n = 4。エラーバーは、標準偏差を表す。ED_{50} の算出値を示す。（D～F）脳についての分析であることを除き、A～C と同じ。
Data source: M4.2.1.1-4_Figure 1

図 8　　ISIS 396443 の ICV 持続投与、又はボーラス投与した後の CNS 組織中における PK/PD



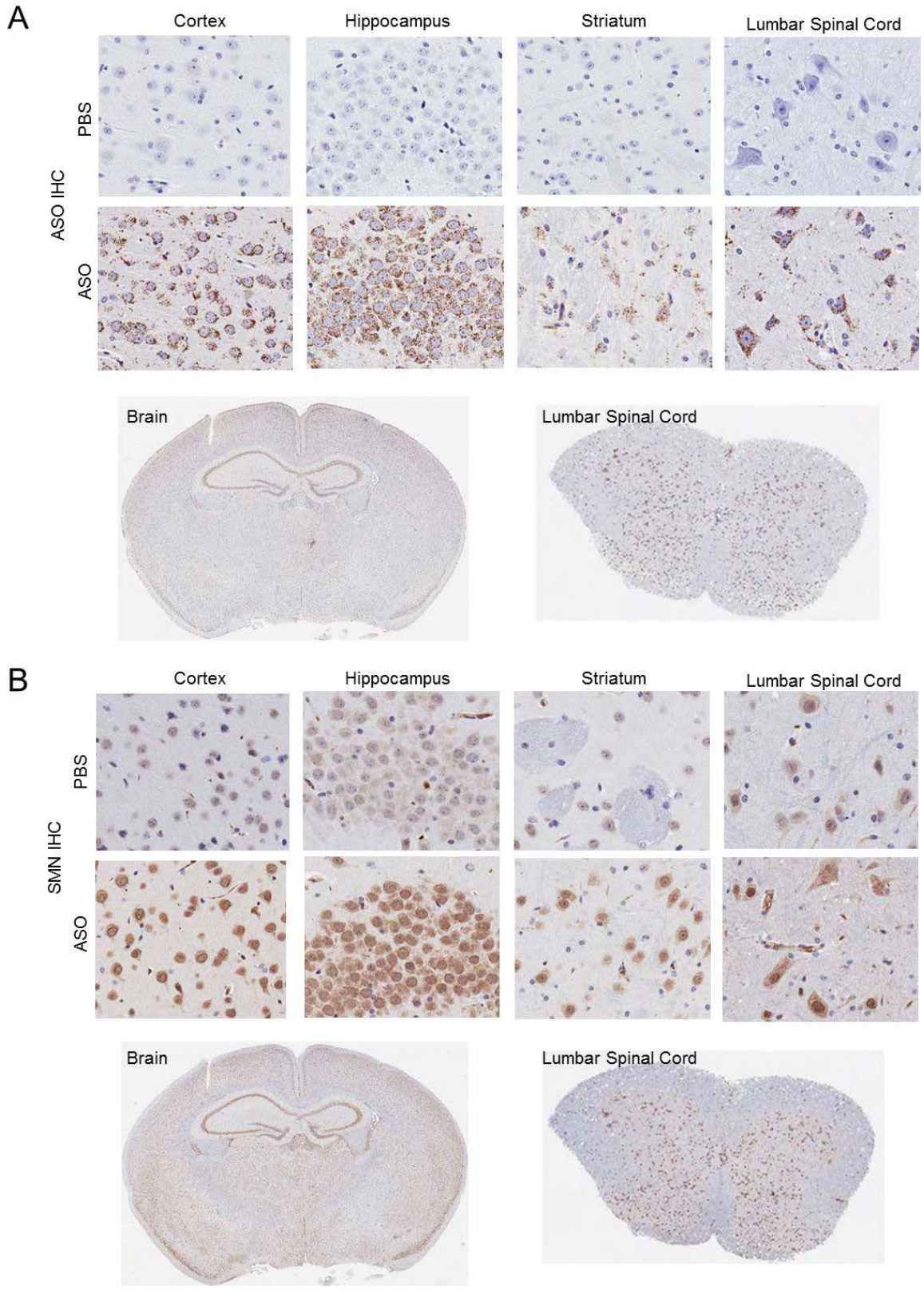
（A）図 7A の投与された各マウスについて、胸髄での ISIS 396443 濃度を HPLC-UV で測定し、その結果を同一マウスの腰髄で測定された FL 又は Δ7 の *SMN2* 転写産物濃度に対してプロットした（それぞれ○及び△）。EC_{50} 及び IC_{50} の算出値を示す。（B）図 7C の投与を受けた各マウスの胸髄の ISIS 396443 濃度を HELISA で測定したことを除き、A と同様。（C、D）脳についての分析であることを除き、A 及び B と同じ。
Data source: M4.2.1.1-4_Figure 2

CNS 組織中の薬物濃度の定量的分析に加え、免疫組織化学的検査により薬物の分布を可視化した。ICV ボーラス投与を受けたマウスの脳及び脊髄組織を、ISIS 396443 と類似した ASO のホスホロチオエートに特異的な抗体で標識した（Butler 1997; Hung 2013）。ISIS 396443 は、脊髄及び脳全体に広く分布し、皮質、線条体、海馬領域に蓄積していた。

その結果、ISIS 396443 濃度が最も高かったのは、腰髄の運動ニューロンをはじめとするニュー

ロンであった（図 9 A）。この所見と一致して、ASO 投与マウスでは PBS 対照と比較して、SMN タンパク質の染色で、より高い発現が示された（図 9 B）。

図 9　　ISIS 396443 350 µg の ICV ボーラス投与後の CNS における ISIS 396443 の分布と SMN2 タンパク質産生

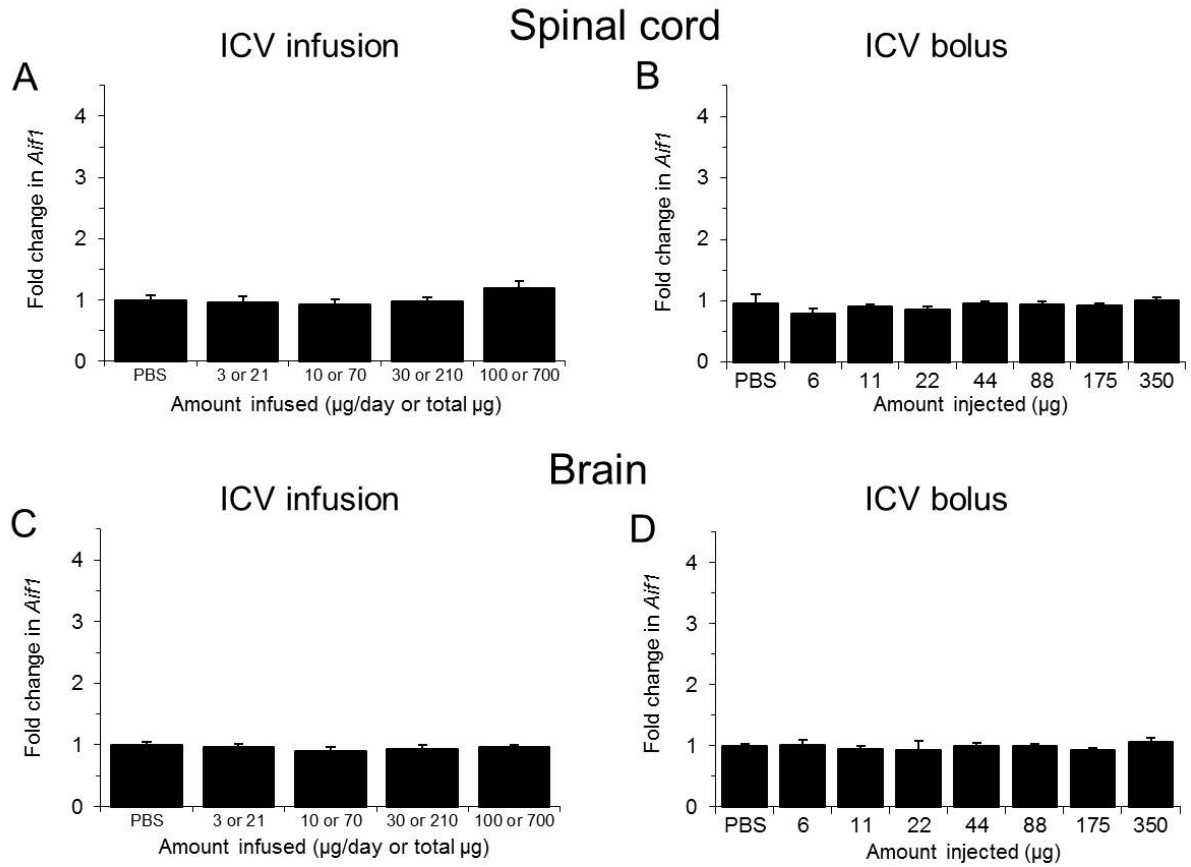


（A）ASO のホスホロチオエート骨格を特異的に認識するポリクローナル抗体（pAb）及び（B）ヒト SMN に特異的なモノクローナル抗体（mAb）を用いた免疫組織化学的検査。核は、ヘマトキシリンで対比染色した。
Data source: M4.2.1.1-4_Figure 3

ISIS 396443 の忍容性の予備的分析として、マウスでのアログラフト炎症因子-1（*Aif1*）の誘導を RT-PCR 法により測定した。*Aif1* は、単球/ミクログリア活性化のマーカーである。

その結果、ISIS 396443 は 700 µg（ICV 持続投与）及び 350 µg（ボーラス投与）の用量まで、*Aif1* 転写産物濃度を増加させなかった（図 10）。このことから、ISIS 396443 による CNS 組織中の常在ミクログリアへの刺激作用はほとんどないことが示唆された。

図 10　ISIS 396443 の ICV 持続投与、又はボーラス投与後の CNS における *Aif1* 転写産物の発現量



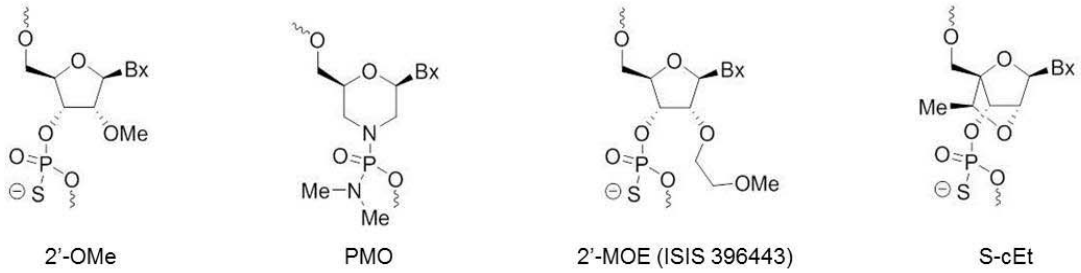
（A）持続投与量は、1 日あたりの投与量又は累積投与量（例：3 µg/日を 7 日間 = 累積投与量 21 µg）で示した。図は、ICV 持続投与により ISIS 396443 を 7 日間投与した 2 日後の、腰髄における *Aif1* 転写産物のリアルタイム RT-PCR 分析結果を示す。各用量で n = 5。エラーバーは、標準偏差を表す。（B）図に示した用量の ISIS 396443 単回 ICV ボーラス投与後 9 日時点での、腰髄における *Aif1* 転写産物のリアルタイム RT-PCR 分析結果を示す。各用量で n = 4。エラーバーは、標準偏差を表す。（C、D）脳についての分析結果であることを除き、A 及び B と同様。
Data source: M4.2.1.1-4_Figure 4 より改変

2.3.1.2　SMN2 マウスモデルを用いた ISS-N1 を標的とする ISIS 39644 並びに 2’-OMe 及び morpholino ASO の活性の比較（ISIS 396443-NP05）

参考資料［4.2.1.1-5］ISIS 396443-NP05

本試験は、雌雄の成熟 SMN2 トランスジェニックマウス（SMA type III マウス（*SMN*$^{-/-}$; *hSMN2*$^{2TG/2TG}$））用いて、*SMN2* エクソン 7 のスプライシングにおいて最も活性が高く、かつ忍容性に優れた ASO 構造を決定するために実施した。2′-*O*-methoxyethyl ASO（ISIS 396443）、2′-*O*-methyl ASO（2’-OMe）、phosphorodiamidate morpholino ASO（PMO）及び 2’,4’-constrained 2’-*O*-Methyl ASO (cEt)（構造は下図参照）は、段階的に増量（2’-MOE、3～300 μg/mouse; 2’-OMe、10～100 μg/mouse; PMO、10～300 μg/mouse; 2’-MOE/cEt、10～100 μg/mouse）して SMN2 トランスジェニックマウス（各 n=4）へ ICV 単回ボーラス投与した。

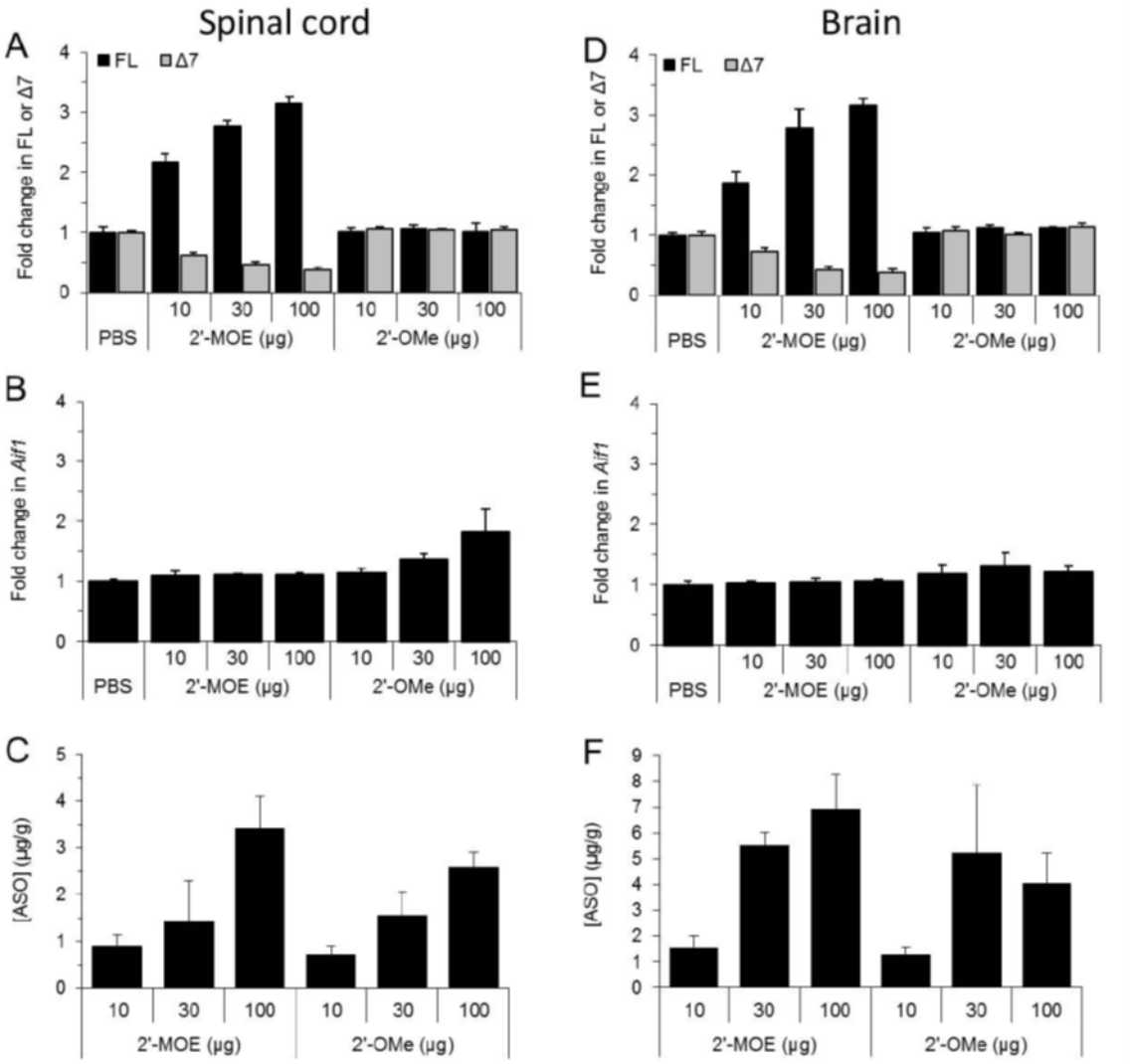
図 11　2'-*O*-methoxyethyl ASO（ISIS 396443）、2'-*O*-methyl ASO（2’-OMe）、phosphorodiamidate morpholino ASO（PMO）及び 2’,4’-constrained 2’-*O*-Methyl ASO (cEt)の構造式



中枢神経系組織中での *SMN2* スプライシングの修正程度は、投与後 9 日目に RT-PCR 法により測定した。*Aif1* の発現量は RT-PCR 法により測定した。各 ASO の組織中濃度はハイブリダイゼーション-ELISA（HELISA）法により測定した。

その結果、先行試験（Hua 2010）と同様に、2’-OMe ASO の投与により、*SMN2* スプライシングの修正は認められなかった（図 12A 及び B）。2’-OMe ASO の投与により脊髄では *Aif1* 発現の増加が認められたが、脳では認められなかった（図 12B 及び E）。脊髄及び脳において、ISIS 396443 と同程度の 2’-OMe ASO の蓄積が認められた（図 12C 及び F）。

図 12　　SMN2 マウスモデルの中枢神経系における ISIS 396443 と 2'-OMe ASO の比較

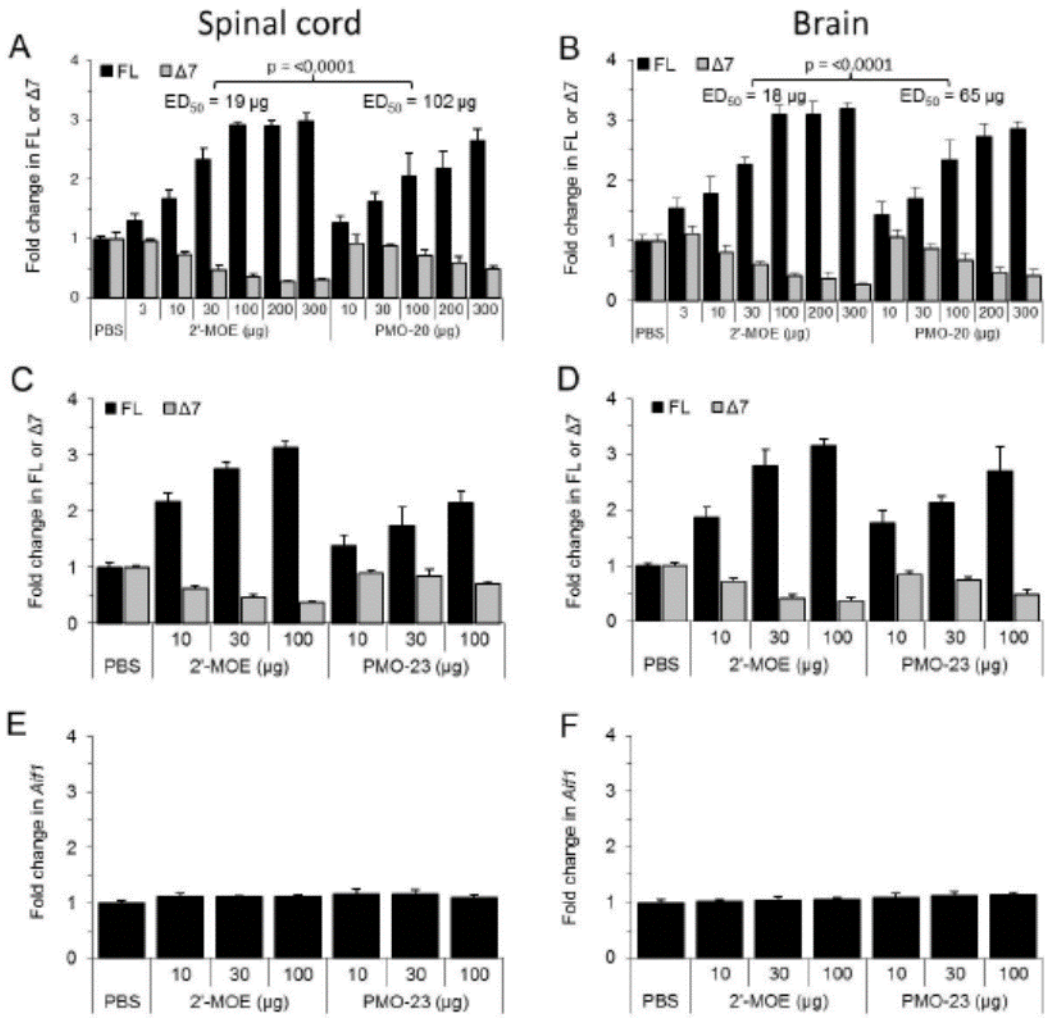


(A)　ISIS 396443 又は 2'-OMeASO を図に示す用量で単回 ICV ボーラス投与後 9 日目時点での腰髄中の全長（FL）及び Δ7 SMN 転写物の RT-PCR 分析結果。各用量で n= 4。エラーバーは標準偏差を示す。
(B)　*Aif1* 転写物に関する RT-PCR 分析結果。他は（A）と同一。
(C)　(A)で投与を受けた各マウスの胸髄中の ISIS 396443 及び 2'-OMe 濃度を HELISA により測定した。各用量で、n= 4。エラーバーは標準偏差を示す。
(D-F)　脳に関する分析結果であることを除き、(A-C)と同じ。

Data source: M4.2.1.1-5_Figure 2

一方、PMO-20（20-mer）ASO を成熟 SMN2 トランスジェニックマウスに投与したとき、用量依存的な *SMN2* スプライシング修正の増加が認められたが、PMO-20 ASO の活性は ISIS 396443 の活性より低かった（図 13A～D）。PMO-20 ASO に関して、*SMN2* エクソン 7 含有活性の ED_{50} は、脊髄で 102 μg 及び脳で 65 μg であった（図 13A）。同一の実験で求められた ISIS 396443 の ED_{50} は ICV ボーラス脊髄及び脳でそれぞれ 19 μg 及び 18 μg であり（図 13B）、このことは PMO-20 ASO の活性は ISIS 396443 より 3～5 倍低いことを示している。ISIS 396443 と同様に、PMO-20 ASO は *Aif1* の発現を増加させなかった。

図 13　　SMN2 マウスモデルの中枢神経系における ISIS 396443 と PMO ASO との比較

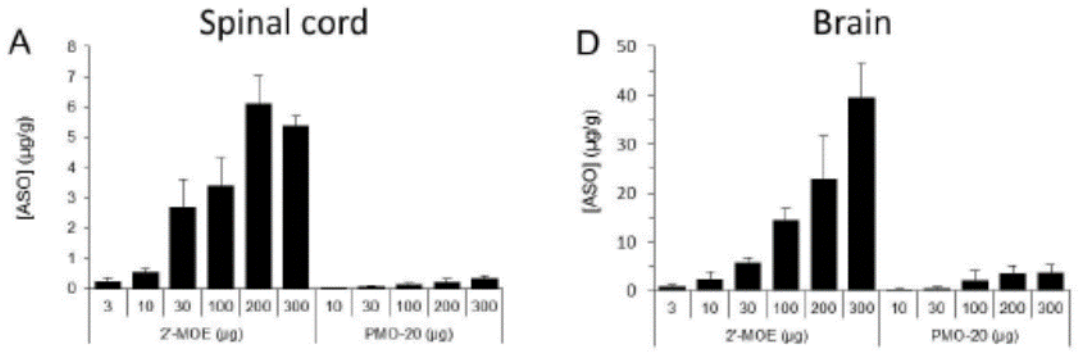


(A) ISIS 396443 又は PMO-ASO を図に示す用量で単回 ICV ボーラス投与後 7 日目時点での腰髄中の全長（FL）及び Δ7 SMN 転写物の RT-PCR 分析結果。各用量で、n= 4。エラーバーは標準偏差を示す。
(B) 脳に関する RT-PCR 分析結果であることを除き、（A）と同一。
(C) 図に示す用量で ICV ボーラス投与後 9 日目時点での腰髄中のエクソン 7 含有（FL）又は非含有（Δ7）転写物の RT-PCR 分析結果。各用量で、n= 4。エラーバーは標準偏差を示す。
(D) 脳に関する分析結果であることを除き、(C)と同一。
(E) *Aif1* 転写物に関する分析結果であることを除き、(C)と同一。
(F) 脳に関する分析結果であることを除き、(E)と同一。

Data source: M4.2.1.1-5_Figure 3

PMO-20 ASO の ISIS 396443 に比して低い活性が、CNS 組織での蓄積の減少に起因するかを明らかにするため、脊髄及び脳組織中での濃度を測定した。PMO-20 ASO の中枢神経系組織での蓄積量は、脊髄中での ISIS 396443 の濃度に比して低かった（図 14）。

図 14　SMN2 マウスモデルの中枢神経系における ISIS 396443 と PMO-ASO との蓄積量の比較

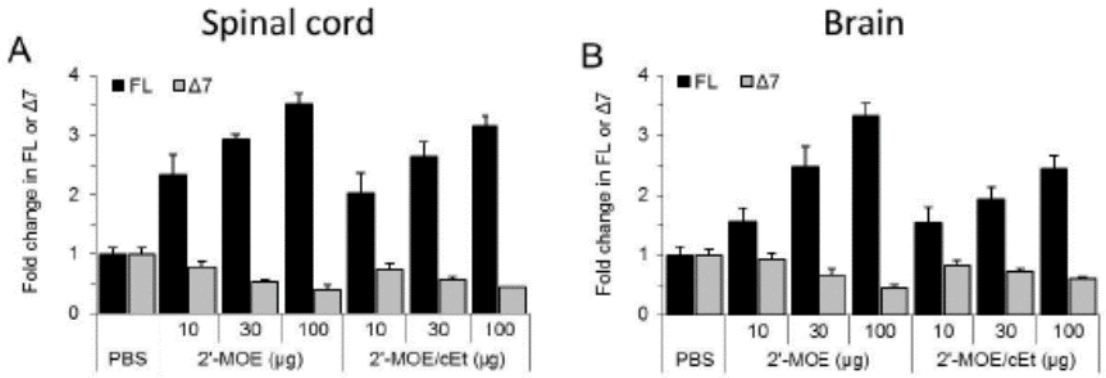


(A) 図 14(A)における各マウスの胸髄中の ISIS 396443 及び PMO-20 ASO 濃度は HELISA により測定した。各用量で n= 4。エラーバーは標準偏差を示す。(D) 脳に関する分析結果であることを除き、(A)と同一。

Data source: M4.2.1.1-5_Figure 4

結合親和性が ISIS 396443 より高い cEt mixmer（2'-MOE/cEt）ASO の *SMN2* スプライシングの修正活性を検討した。cET mixmer は核酸残基での 2', 4'架橋構造の組み入れを行ったものである。その結果、cEt mixmer は ISIS 396443 と同様の活性を示し、結合親和性をこれ以上上昇させても *SMN2* スプライシングの修正活性の増強にはつながらないことが判明した。

図 15　SMN2 マウスモデルの中枢神経系における ISIS 396443 と cEt Mixmer との *SMN2* スプライシング修正活性の比較



(A) ISIS 396443 及び 2'-MOE/cEt ASO を図に示す用量で単回 ICV ボーラス投与後 7 日目時点での腰髄中の全長及び Δ7 転写物の RT-PCR 分析結果。各用量で n= 4。エラーバーは標準偏差を示す。
(B) 脳に関する分析結果であることを除き、(A)と同一。
Data source: M4.2.1.1-5_Figure 5

以上の結果より、ISIS 396443 は、2'-OMe 及び morpholino 化学修飾 ASO を含めて検討した ASO の中で中枢神経系での *SMN2* スプライシングの修正に関して最も高い活性を有することが判明した。

2.3.1.3 SMA C/C マウスモデルにおける ISIS 396443 の CNS での効果（ISIS 396443-NP04 試験）

参考資料［4.2.1.1-4］ISIS 396443-NP04

上記の 2 つの試験は、内因性 *Smn1* を欠失し、ヒト *SMN2* の 4 つのコピーを発現しているマウスモデル（*SMN*$^{-/-}$; *hSMN2*$^{2TG/2TG}$）を用いた。同様の一連の試験を、マウス *Smn1* アレルにおいて、エクソン 6 の後にヒトゲノムの *SMN2* 配列を有し、なおかつ 42 kb のヒト *SMN2* 遺伝子座も有する別のマウスモデルを用いて行った。このアレルは C アレルと称されるため、ホモ接合性のマウスは C/C マウスモデルと呼ばれる。

SMN2 マウスモデルで認められた ISIS 396443 のスプライシング修正活性が、他のトランスジェニックマウスモデルでも認められるかを検討する目的で、SMN2 マウスへの投与と同様の条件で C/C マウス（各 4 例）へ段階的に増量した ISIS 396443（11～350 µg/マウス）を単回 ICV ボーラス投与した（2.3.1.1 項参照）。投与後 11 日目に組織中の *SMN2* スプライシングを RT-PCR 法により測定した。

C/C マウスモデルにおいて、ISIS 396483 の ICV ボーラス投与により、用量依存的に *SMN2* の発現量が増加した。脊髄及び脳の各 ED_{50} は、それぞれ 28 µg 及び 40 µg であり、EC_{50} は、それぞれ 1.2 µg/g 及び 3.7 µg/g であった。同一の試験で求められた、SMN2 マウスモデルでの脊髄及び脳の各 ED_{50} は、それぞれ 17 µg 及び 35 µg、並びに EC_{50} は、それぞれ 1.6 µg/g 及び 5.7 µg/g であり、SMN2（*SMN*$^{-/-}$; *hSMN2*$^{2TG/2TG}$）マウスモデルと C/C 両マウスモデルで同等であった（ISIS 396443-NP04 試験）。前述の試験結果（図 10）と同様に、C/C マウスモデルに ISIS 396443 を投与しても脊髄及び脳における *Aif1* 発現量の著しい増加はみられなかった。これらのデータから、ISIS 396443 の *SMN2* スプライシングに及ぼす影響は、使用したモデルに依存しないことが示された。

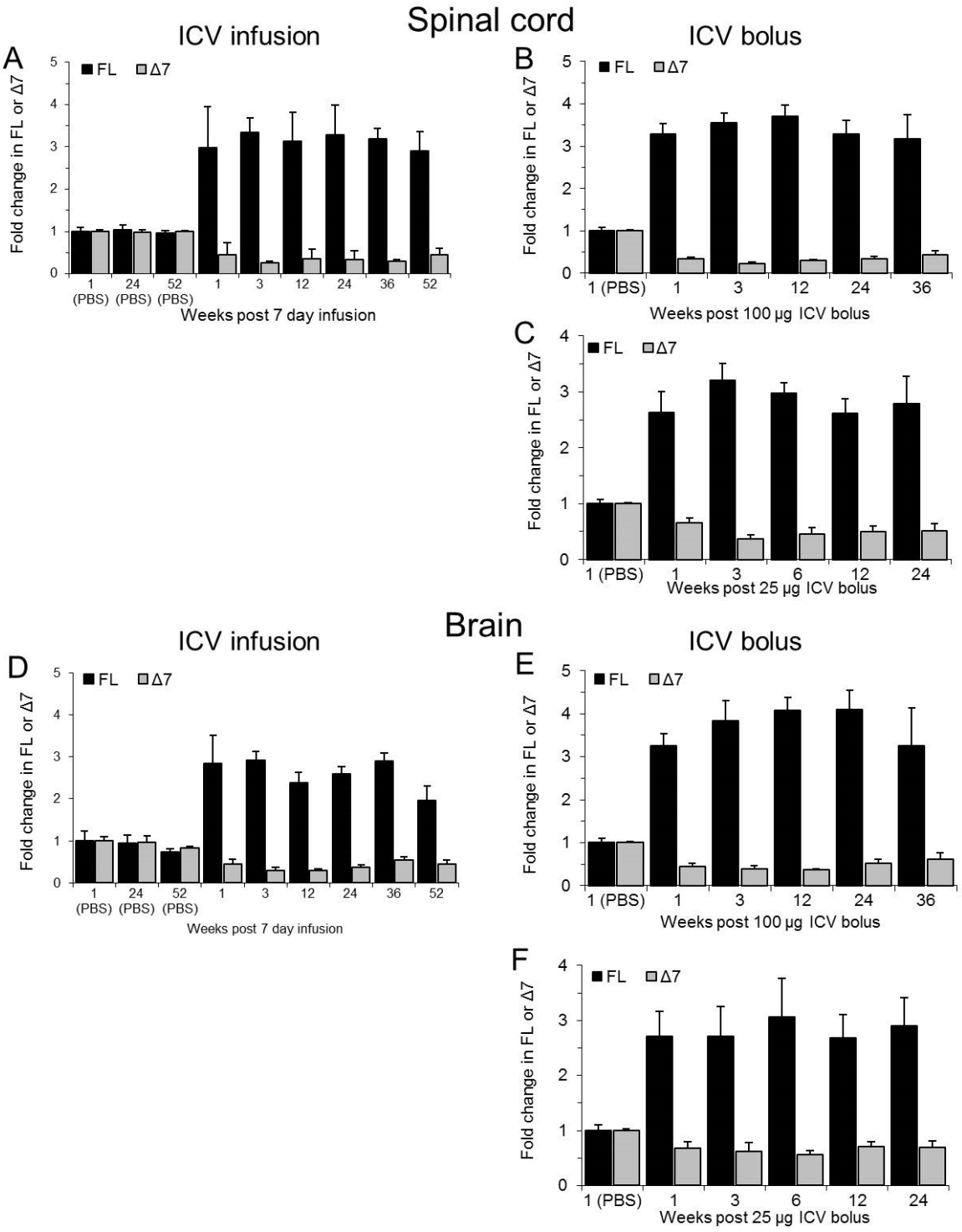
2.3.2 SMN2 マウスモデルでの作用持続時間

参考資料［4.2.1.1-4］ISIS 396443-NP04

ISIS 396443-NP04 試験では、さらに SMN2 マウスモデルを用いて ISIS 396443 の *SMN2* スプライシング修正作用の持続時間を検討した。ICV 持続投与により ISIS 396443 50 µg/日を 7 日間投与、又は ISIS 396443 25 µg 及び 100 µg を単回 ICV ボーラス投与した後の、脊髄及び脳におけるエクソン 7 含有（FL）及び非含有（Δ7）*SMN2* 転写産物量を RT-PCR 法により測定した。

作用持続期間の詳細な検討のため、SMN2 マウスモデル（*SMN*$^{-/-}$; *hSMN2*$^{2TG/2TG}$）に ICV 持続投与を 7 日間行い、脳及び脊髄における *SMN2* スプライシングを 1 年間観察した（図 16、A 及び D）。ICV ボーラス投与でも作用持続期間は同様であり、脳及び脊髄で少なくとも 24～36 週であった（図 16）。

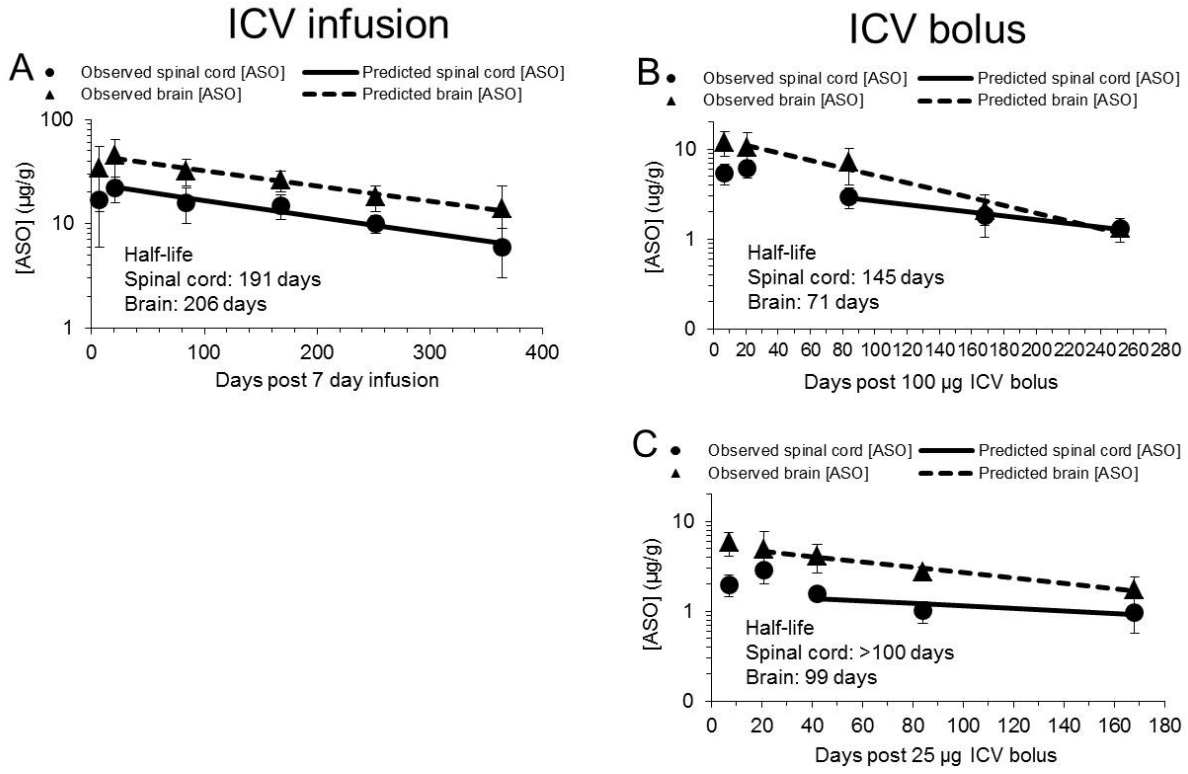
図 16　　ISIS 396443 の ICV 持続投与、又はボーラス投与後の作用持続期間



（A）ICV 持続投与により ISIS 396443 50 µg/日を 7 日間投与した後の、腰髄におけるエクソン 7 含有（FL）及び非含有（Δ7）*SMN2* 転写産物のリアルタイム RT-PCR 分析結果。PBS、n = 4; 1 及び 3 週、n = 5; 12 週、n = 6; 24 週、n = 7; 36 週、n = 6; 52 週、n = 7。エラーバーは標準偏差を表す。（B）単回 ICV ボーラス投与により ISIS 396443 100 µg を投与した後の、腰髄における FL 及び Δ7 *SMN2* 転写産物のリアルタイム RT-PCR 分析結果。24 週群で n = 4 であったことを除き、各時点で n = 5。エラーバーは標準偏差を表す。（C）ISIS 396443 25 µg を投与したことを除き、B と同じ。（D～F）脳についての分析であることを除き、A～C と同じ。
Data source: M4.2.1.1-4_Figure 6

ICV ボーラス投与試験では長期間の検討を行わなかったが、*SMN2* のスプライシングは最終測定時点まで維持されていると考えられた。持続投与後の脊髄及び脳での ISIS 396443 の半減期は、組織及び投与方法に応じて 70～200 日と推定され、スプライシングが ISIS 396443 に依存するという解釈を裏付けた（図 17）。免疫組織化学的手法により、ISIS 396443 の滞留を直接可視化することもできる。脳及び脊髄の両方で、投与方法と関わりなく染色された ISIS 396443 が滞留している（図 17A）。さらに、SMN2 タンパク質の直接染色では、24～52 週にわたり発現の持続が示された（図 17B）。PBS 投与マウスでも SMN2 の染色が認められ、これが、マウスで正しくスプライシングされる 4 コピーの *SMN2* のベースラインレベルに相当すると考えられる。

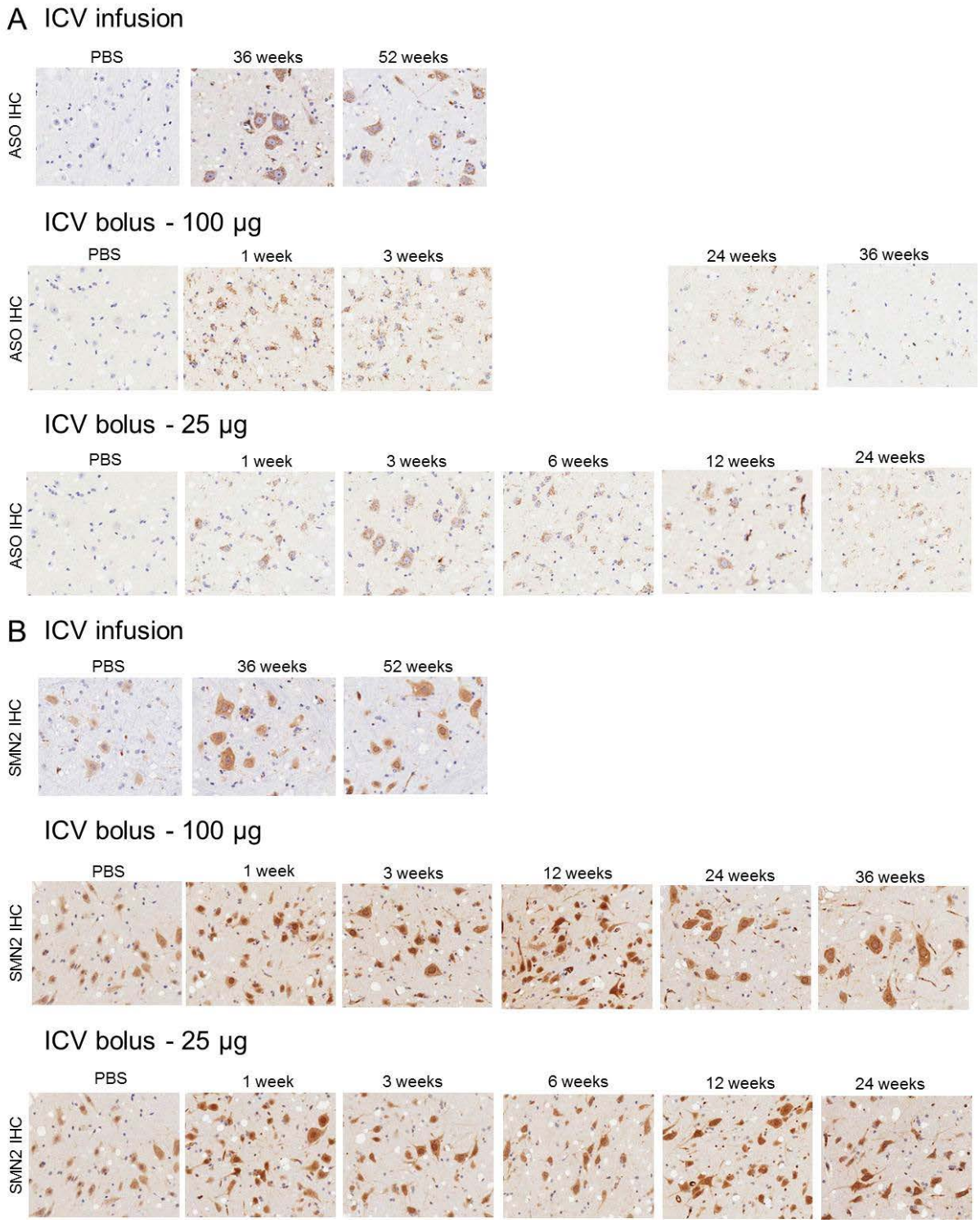
図 17　　ISIS 396443 の ICV 持続投与、又はボーラス投与後のマウス CNS（脊髄及び脳）組織中の滞留期間



（A）図 11A 及び図 11D の各マウスの胸髄及び脳における ISIS 396443 の量を各時点で HPLC-UV により測定した。1 及び 3 週、n = 5; 12 週、n = 6; 24 週、n = 7; 36 週、n = 6; 52 週、n = 7。エラーバーは標準偏差を表す。ISIS 396443 の組織中での半減期の算出値を示す。（B）図 11 B 及び図 11E の各マウスの胸髄及び脳での ISIS 396443 の量を HELISA により測定した。24 週群で n = 4 であったことを除き、各時点で n = 5。エラーバーは標準偏差を表す。（C）図 11 C 及び図 11F の各マウスの胸髄及び脳における ISIS 396443 の量を HELISA により測定したことを除き、B と同様。
Data source: M4.2.1.1-4_Figure 7

他のマウスモデルでの試験と同様に、単球/ミクログリア反応のマーカーとして *Aif1* の発現量を観察した。試験期間中、*Aif1* の有意な増加は認められなかった。このことは、当該マウスモデルで ISIS 396443 の忍容性が良好であったこと（ISIS 396443-NP04 試験、図 9）と合致する。

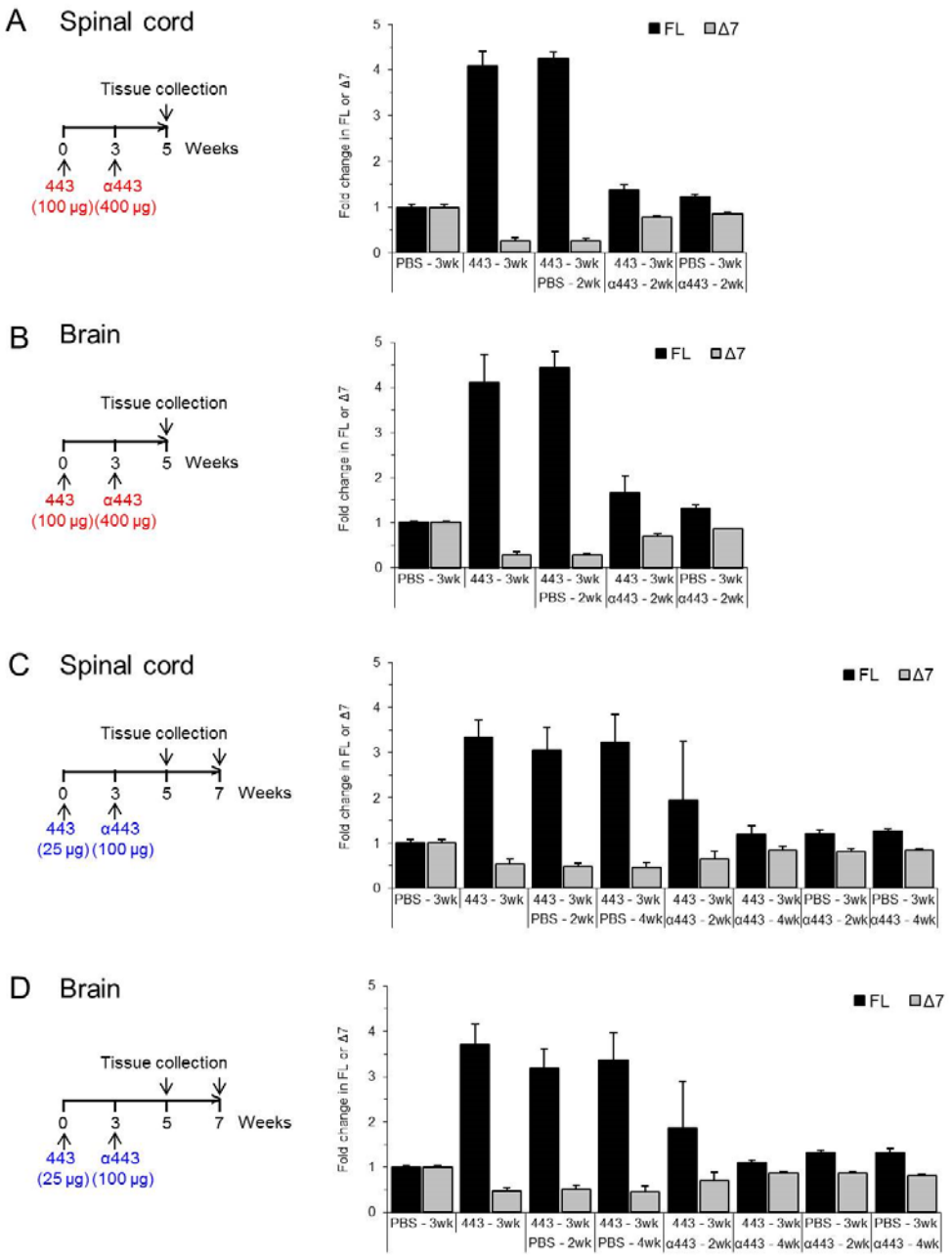
図 18　ISIS 396443 50 µg/日の ICV 持続投与（7 日間投与）、又は 100 及び 25 µg の ICV ボーラス投与後の種々の測定時点における脊髄中の ISIS 396443 分布及び SMN2 タンパク質産生



（A）ASO のホスホロチオエート骨格を特異的に認識する pAb 及び（B）ヒト SMN に特異的な mAb を用いた免疫組織化学的検査。核は、ヘマトキシリンで対比染色した。
Data source: M4.2.1.1-4_Figure 8

SMN2 の長期間の誘導が ISIS 396443 により直接引き起こされていることを示すもう 1 つの証拠として、ISIS 396443 と完全に相補的な ASO（α443）（ISIS 396443 デコイ）を用いた試験がある。この試験では、ISIS 396443（25 又は 100 μg）を単回 ICV ボーラス投与してから 3 週後に α443（100 又は 400 μg）を投与すると、2 週間以内に *SMN2* スプライシングが完全にベースラインに戻った（図 19）。この結果は、脳と脊髄の両方で認められ、異なる 2 用量で示された（ISIS 396443-NP04 試験、図 10）。

図 19　　ISIS 396443 による *SMN2* スプライシング修正後の ISIS 396443 デコイ投与の効果



（A）ISIS 396443（443）100 μg を単回 ICV ボーラス投与し、その 3 週後にデコイ（α443）400 μg を投与した後の、腰髄におけるエクソン 7 含有（FL）又はエクソン 7 非含有（Δ7）*SMN2* 転写産物のリアルタイム RT-PCR 分析結果。マウスは、α443 投与の 2 週後に安楽死させた。各群 n = 5。エラーバーは、標準偏差を表す。（B）RNA を脳から単離したことを除き、A と同様。（C、D）α443 25 μg 及び α443 100 μg を投与したことを除き、それぞれ A 及び B と同様。α443 投与の 2 及び 4 週後、マウスを安楽死させた。

Data source: M4.2.1.1-4_Figure 10

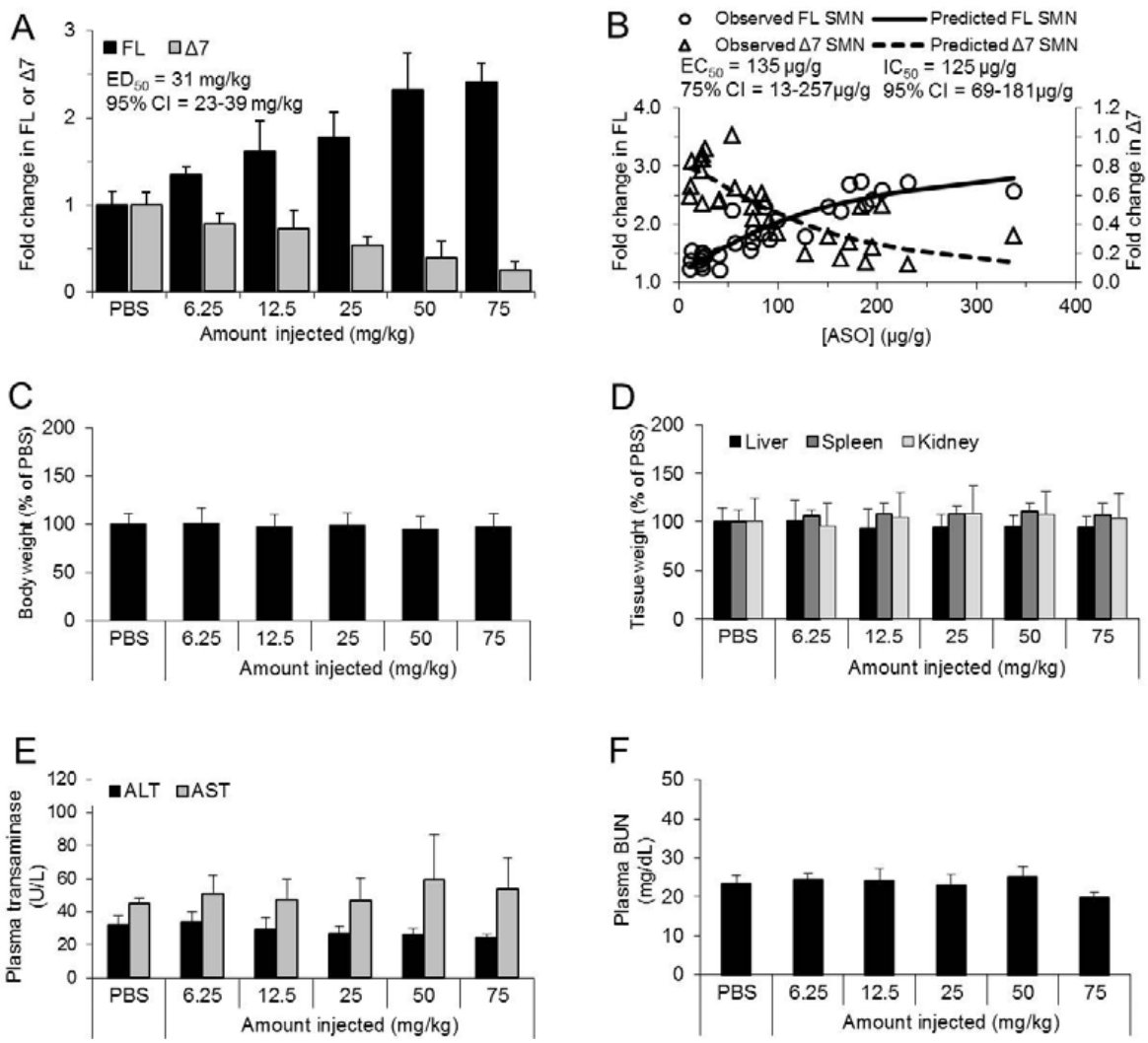
2.3.3 SMN2 マウスモデルの末梢組織中での PK/PD（ISIS 396443-NP04 試験）

参考資料［4.2.1.1-4］ISIS 396443-NP04

ISIS 396443 は血液脳関門を通過しにくいため、末梢組織への投与での有用性は高くない。しかし、SMA マウスモデルでは実際に末梢組織での病態が認められる。末梢組織での ISIS 396443 の薬理作用は、SMN2 マウスモデルを用いた試験で確認された。

段階的用量の ISIS 396443（6.25～75 mg/kg）を腹腔内（IP）ボーラス投与で SMN2 マウス（各 6 例）に 2 日毎に計 4 回投与した。ISIS 396443 の投与により、肝臓で *SMN2* のスプライシングの修正が用量依存的に増加し、ED_{50} は 31 mg/kg であった（図 20A）。肝臓での EC_{50}（図 20B、135 µg/g）は、脊髄（図 8 B、1.6 µg/g）及び脳（図 8D、5.7 µg/g）での EC_{50} よりも高かった。ISIS 396443 の全身投与では、体重（図 20C）、臓器重量（図 20D）、ALT と AST 値（図 20E）及び BUN 値（図 20F）に変化は認められず、忍容性は良好であった。

図 20 IP ボーラス投与による ISIS 396443 の効果

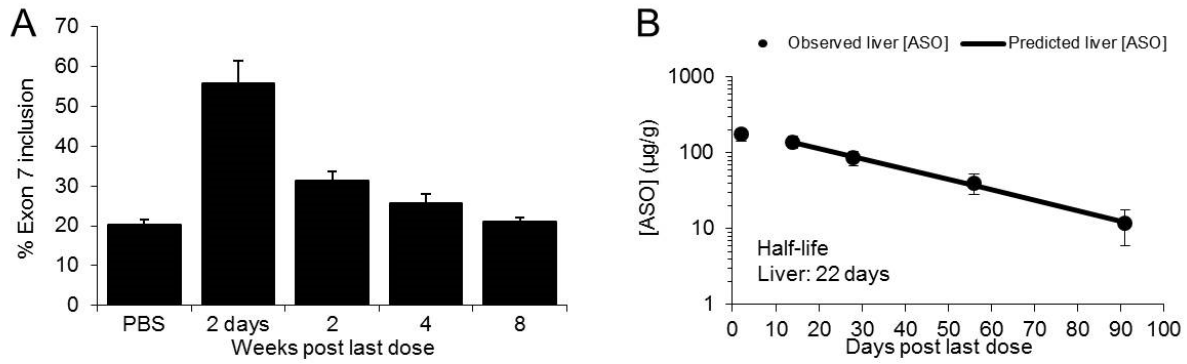


（A）ISIS 396443 を IP 投与後の肝臓におけるエクソン 7 含有（FL）又はエクソン 7 非含有（Δ7）*SMN2* 転写産物のリアルタイム RT-PCR 分析結果。マウスに対し 2 日毎に計 4 回投与を行い、最終投与の 48 時間後にマウスを安楽死させた。各用量で n = 6。エラーバーは、標準偏差を表す。（B）A で投与を受けた各マウスの肝臓における ISIS 396443 濃度を CGE-UV で測定し、その結果を同じマウスの肝臓で測定された FL 又は Δ7 *SMN2* 転写産物濃度に対してプロットした（それぞれ◯及び△）。EC_{50} 及び IC_{50} の算出値を示す。マウスの安楽死後、（C）体重、（D）臓器重量、（E）ALT と AST、及び（F）BUN を測定した。n = 6 であり、エラーバーは標準偏差を表す。
Data source: M4.2.1.1-4_Figure 11

次に、ISIS 396443 IP 投与後の肝臓での作用持続時間を検討した。ISIS 396443 50 mg/kg を SMN2 マウス（5 例）に 2 日毎に計 4 回投与後、肝臓でのエクソン 7 含有 *SMN2* 転写産物を RT-PCR 法を用いて定量した。

その結果、CNS 組織で認められた ISIS 396443 の長期間の作用持続（図 21）とは対照的に、IP ボーラス投与の肝臓での ISIS 396443 の作用持続期間は大幅に短く、投与 8 週後にごくわずかな *SMN2* スプライシングの修正を認めるのみであった（図 21A）。*SMN2* スプライシングの修正が認められた期間の短さと整合して、肝臓での ISIS 396443 の半減期は約 20 日であった（図 21B）。肝臓よりも神経細胞における効果が高い傾向は、ISIS 396443 以外の ASO でも同様に認められた。CNS 組織の方が ASO に対する感受性が高い理由は、完全には明らかになっていないが、筋肉などその他の分裂終了組織でも、同様に ASO の効果は肝臓に比べて比較的長いようである（Wheeler 2012）。

図 21　　ISIS 396443 IP 投与後の肝臓における作用持続期間



（A）ISIS 396443 50 mg/kg を 2 日毎に計 4 回 IP 投与した後の肝臓でのエクソン 7 含有 *SMN2* 転写産物を放射性 RT-PCR で定量した。各用量において n = 5。エラーバーは、標準偏差を表す。（B）各時点で、肝臓での ISIS 396443 濃度を HPLC-MS/MS により測定した。各時点で n = 5。エラーバーは、標準偏差を表す。ISIS 396443 の組織中での半減期の算出値を示す。
Data source: M4.2.1.1-4_Figure 12

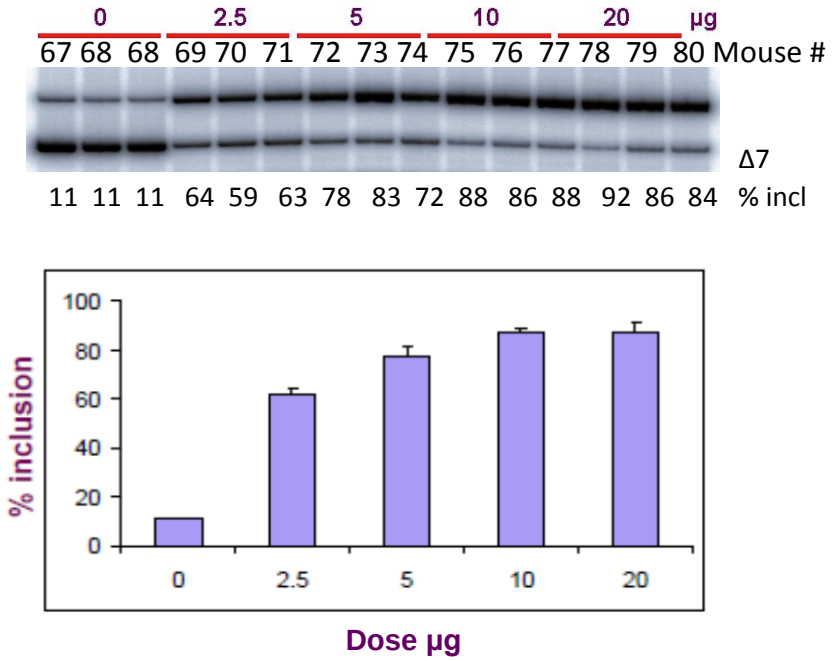
ここでは、SMA マウスモデルでの ISIS 396443 の基本的な PK/PD プロファイルを示す。ASO は、2 種類の SMA マウスモデルで *SMN*2 スプライシングを誘導し、ヒト臨床試験で達成可能な組織中濃度（2～10 µg/g）で薬理作用を示した。ICV 持続投与に比べ ICV ボーラス投与の方が CNS 組織中での ISIS 396443 の分布及び作用持続期間において効果が高かったことは、臨床試験で使用された投与方法の裏付けとなっている。

2.3.4　　SMN2 マウスモデルにおける ISIS 396443 の CNS への投与の有効性

参考資料［4.3-32］Hua 2010

上述のように、ISIS 396443 を投与した結果、SMA モデルマウスの CNS 組織中において正常な *SMN2* mRNA スプライシング及び SMN タンパク質産生が認められた。*SMN2* 増加による機能的な有用性は、様々な重症度の SMA マウスモデルを用いた一連の実験により確認された。薬力学的特性は、マウス *Smn1* を欠失しているが 4 コピーのヒト *SMN2* を持つ SMN2 マウスモデル（*SMN*$^{-/-}$; *hSMN2*$^{2TG/2TG}$）で検討した。このマウスモデルを用い、胎生期約 15 日目（E15）の子宮内の胎児 ISIS 396443 を ICV ボーラス投与した。ISIS 396443 は生後 7 日目の新生児のエクソン 7 含有率に用量依存的な効果を示し、20 µg の用量で効果は最大となった（含有率 92%）（図 22）。

図 22　ISIS 396443 投与によるマウス胎児の脊髄組織における *SMN2* エクソン 7 含有率の用量依存的増加



ガラス製マイクロピペットを使用し、2 µL の ISIS 396443 溶液を E15 の各マウスの側脳室内に投与した。脊髄組織における *SMN* エクソン 7 の含有率増加に対する ISIS 396443 の効果は、RT-PCR を用いて生後 7 日目に分析した。
Data source: M4.3-32_Hua 2010_Figure 5A, 5B より改変

2.3.5　重症マウスモデルの運動機能及び生存期間への影響

2.3.5.1　Δ7 SMA マウスモデルの運動機能及び生存期間への影響

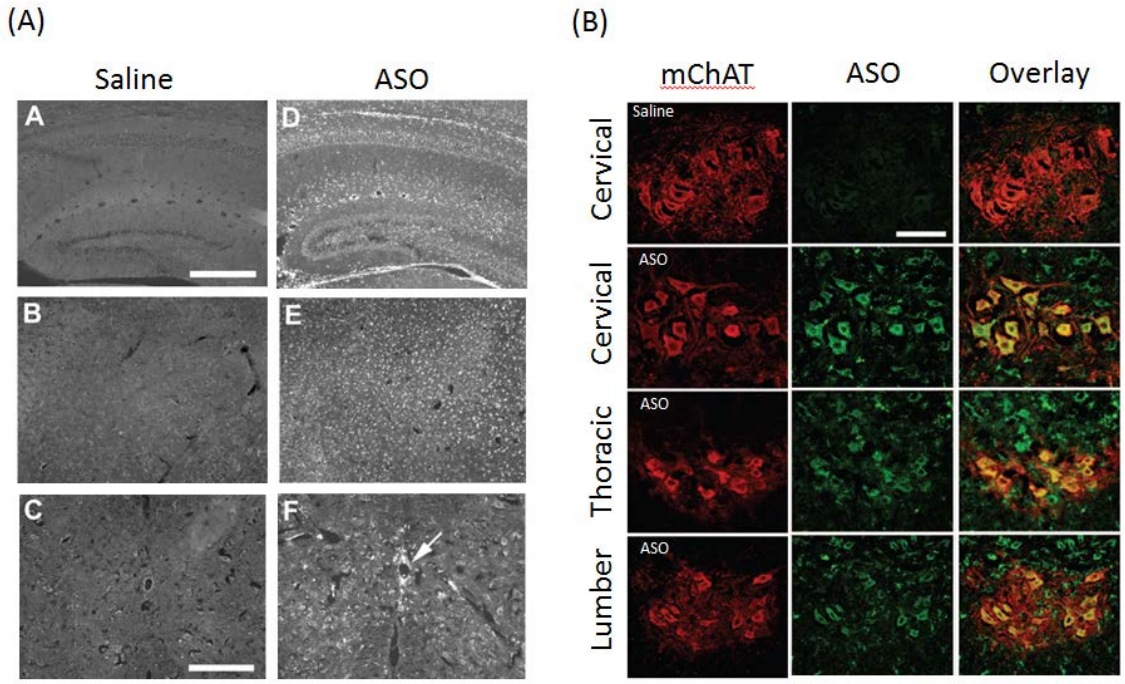
参考資料［4.3-61］Passini 2011

ISIS 396443 の投与は、重症 SMA マウスモデル（Δ7 SMA）における行動、運動能力及び生存期間に有意な効果をもたらした。この Δ7 SMA マウスモデルは出生前又は重症 I 型 SMA の病態の一部を再現している（Le 2005）。本モデルでは、マウス *SMN* 遺伝子を欠失させ、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。このような *SMN2*Δ7 導入遺伝子は cDNA から調製されるためスプライシングが起こらない。このため、ヒト *SMN2* 遺伝子の 2 つのコピーのみが全長 SMN タンパク質を産生することができる。このようなマウスは急速に病態が進行するため、

マウスの生存日数は生後約 16 日間である。

生後 0 日目（PND 0）の新生児に 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 の単回 ICV 投与で、脊髄組織におけるエクソン 7 含有率に対する効果が最大となり、忍容性も良好であった。8 μg 以上の投与量では良好な忍容性は示されず、新生児の 10～20%が投与後 24 時間以内に死亡した（Passini 2011）。本試験のマウスは上述の試験で使用した軽症 SMA マウスよりもストレスに対する感受性が高い。ISIS 396443 は、マウス新生児への ICV ボーラス投与後、脊髄中の運動ニューロンを含む CNS 組織中に広く分布した（図 20）。

図 23　　重症 SMA マウス（Δ7 SMA）の CNS における ISIS 396443 の分布



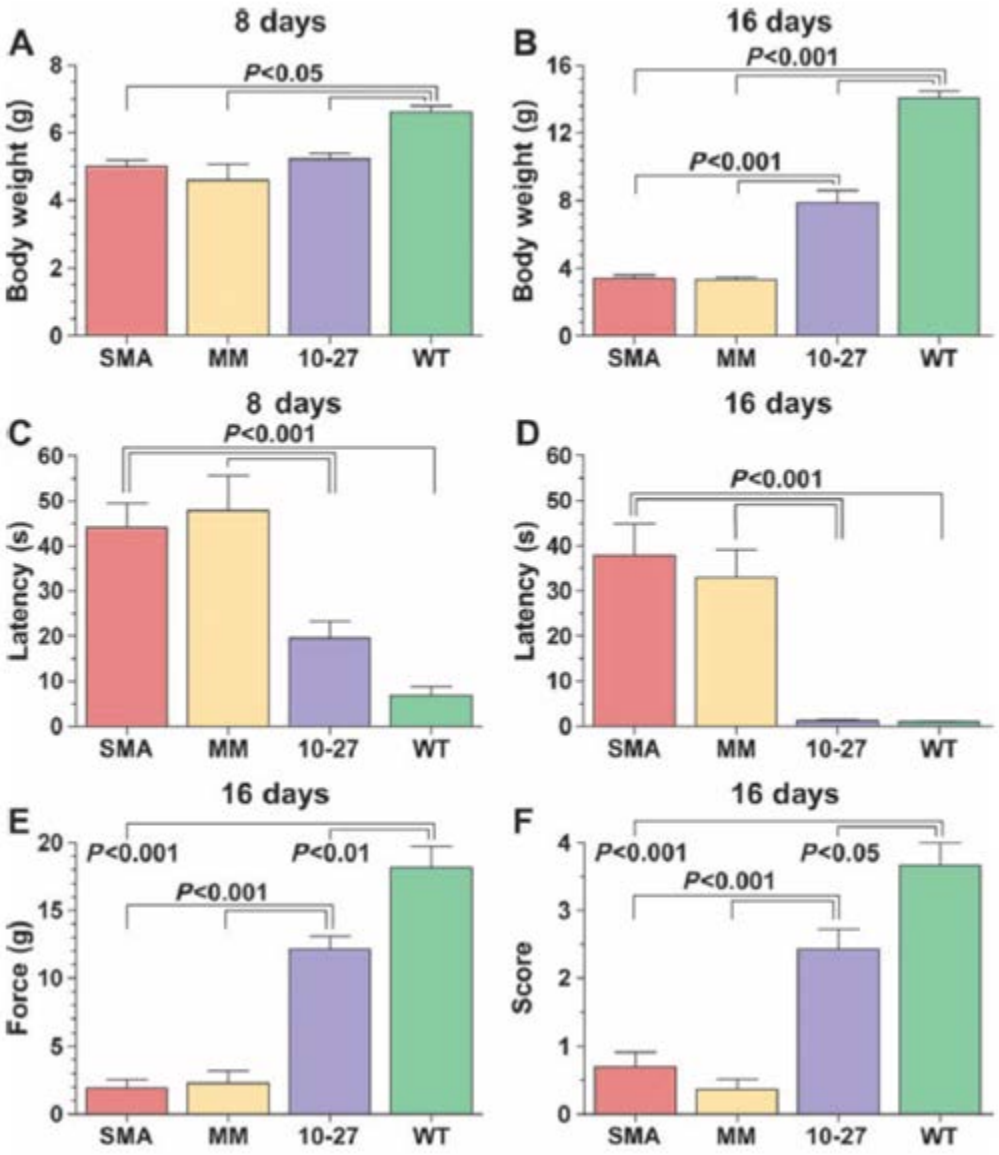
脳室内投与後の ISIS396443 の脳における分布。14 日齢のマウスに ISIS 396443 を投与すると脳及び脊髄の広範囲に被験物質の分布が認められた（Le 2005）。オリゴヌクレオチドのホスホロチオエート骨格に対する免疫染色の結果を示す。（生理食塩水投与群：A, B, C,　ISIS 396443 投与群：D, E, F）また、A, D は海馬を B, E は脳幹を C, F は腰髄を示す。体軸に沿って上衣細胞が陽性に染色されたことから、脊髄に効率的に移行した理由の一部は、新生児の開いたままの脊髄中心管に CSF がスムーズに流れることによると考えられる。スケールバーは 400 μm (A, B, D, E)、200 μm (C, F)。

(A) PND 0 及び PND 5 に、Δ7 SMA マウス（Le 2005）へ ISIS 396443（8 μg）を単回 ICV ボーラス投与した。PND 14 にマウスを屠殺し、脳組織を回収した。組織を固定し、ホスホロチオエート修飾オリゴヌクレオチドを認識するウサギ pAb を使用して組織中に存在する ISIS 396443 を染色した。運動ニューロンを識別するため、脊髄組織のコリンアセチルトランスフェラーゼ（mChAT）染色も実施した（赤色）。スケールバーは 100 μm。

Data source: M4.3-61_Passini 2011_Figure S1, Figure 1 より改変

PND 0 に 4 μg の ISIS 396443 を単回 ICV 投与すると、非投与動物や対照オリゴヌクレオチド投与動物と比較して PND 16 における体重が有意に増加したが（$p < 0.001$）、PND 8 では増加は認められなかった（図 21）。ISIS 396443 投与マウスでは、正向反射、握力、後肢開脚などの運動機能も顕著に改善した（図 21）。上記の結果から ISIS 396443 投与は Δ7 SMA マウスにおいて行動及び運動機能を顕著に改善することが示された。

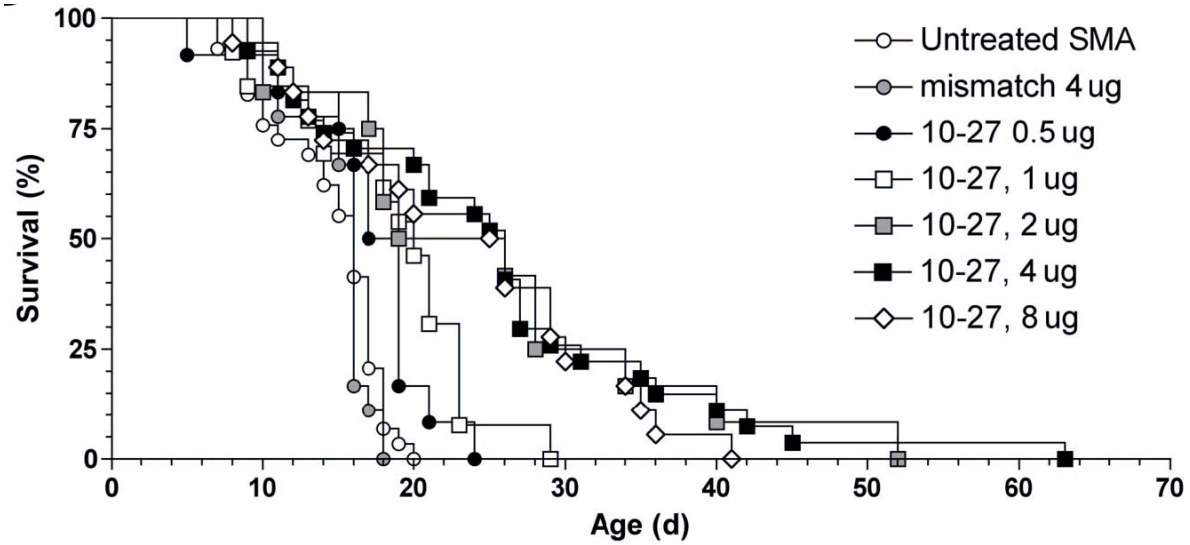
図 24　　ISIS 396443 投与による重症 SMA マウス（Δ7 SMA）の体重及び運動機能の改善



ISIS 396443（4 µg）を PND 0 の Δ7 SMA マウスの新生児に単回 ICV ボーラス投与した。体重及び様々な運動機能検査を PND 8 及び 16 に実施したところ、ISIS 396443 により体重（A 及び B）、正向反射（C 及び D）、握力（E）及び後肢開脚（F）の測定値が有意に改善しており、野生型動物（WT）のそれらとほぼ等しかった。
SMA; 無処置 SMA 動物群（n=8）、MM; 4 µg ミスマッチオリゴヌクレオチド投与 SMA 動物群（n=8）、10-27; 4 µg ISIS 396443 投与 SMA 動物群、WT; 野生型動物群
統計解析手法：投与群間の検定は一元配置分散分析の実施後、Bonferroni 解析により行った。
数値は平均値 ± 標準誤差を表す。
Data source: M4.3-61_Passini 2011_Figure 5A-F

ISIS 396443 の単回 ICV ボーラス投与は、Δ7 SMA マウスの生存期間を用量依存的に延長した（図 25）。非投与マウス及び対照オリゴヌクレオチド投与マウスの生存日数の中央値は、生後 16 日であった。ISIS 396443 0.5 µg を投与すると生存日数は 20 日まで延長し、最大効果は 4 µg 投与で認められた（生存日数の中央値は 26 日）（Passini 2011）。ISIS 396443 2 µg 群及び 4 µg 群では 50 日を超えて生存した動物が認められた（図 25）。

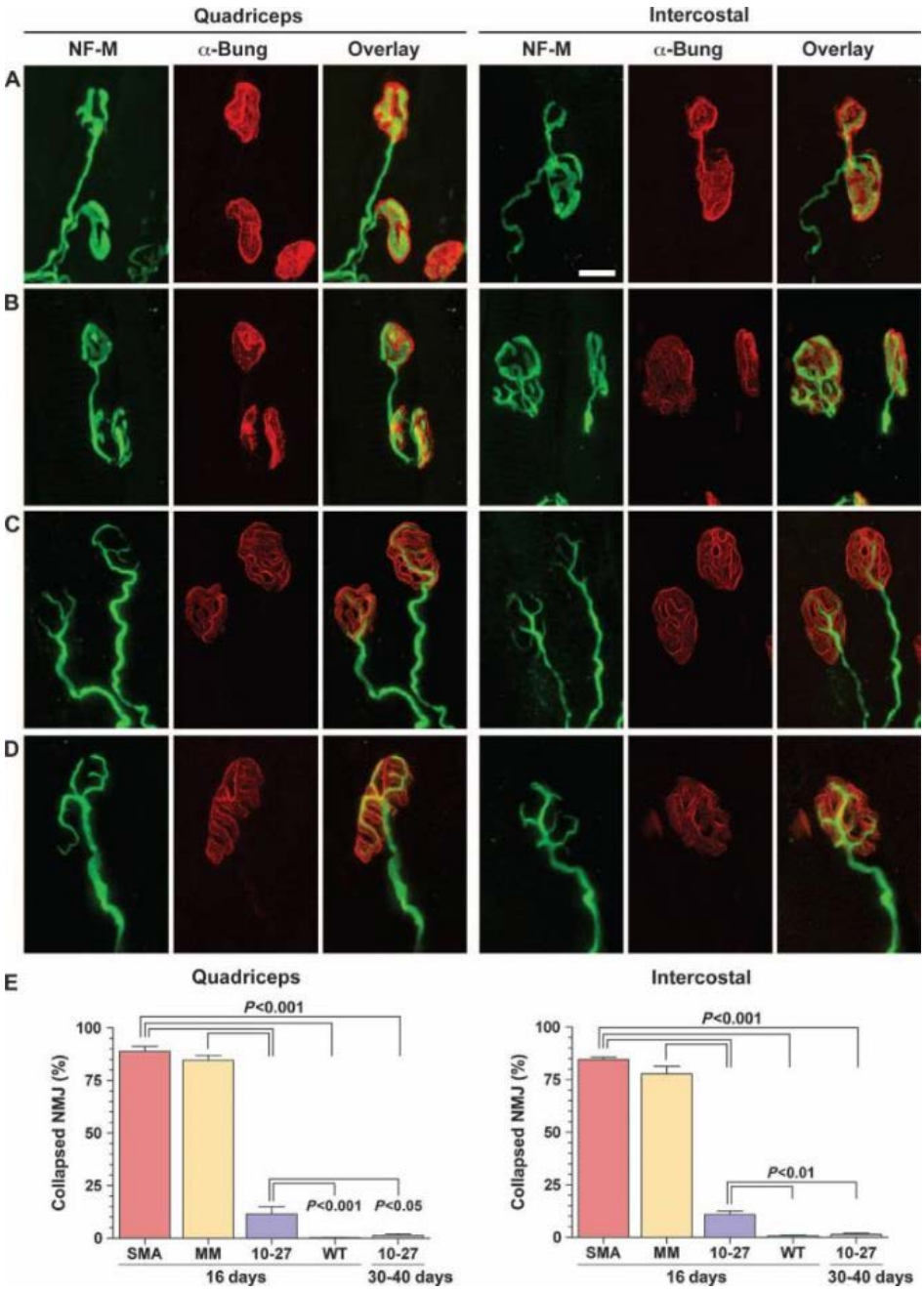
図 25　　ISIS 396443 投与による重症 SMA マウス（Δ7 SMA）の生存率の改善



PND 0 の Δ7 SMA マウスの新生児に ISIS 396443（0.5～8 μg）又はミスマッチオリゴヌクレオチド（4 μg）を単回 ICV 投与した。生存状況を毎日観察し、投与群を代表する生存日数の中央値を求めた。
SMA; 無処置群、MM; ミスマッチオリゴヌクレオチド投与群、10-27; ISIS 396443 投与群
生存日数中央値：無処置群（16 日）、ミスマッチオリゴヌクレオチド投与群（16 日）、ISIS 396443, 0.5 μg 投与群（17 日）、ISIS 396443, 1 μg 投与群（20 日）、ISIS 396443, 2 μg 投与群（23 日）、ISIS 396443, 4 μg 投与群（26 日）、ISIS 396443, 8 μg 投与群（23 日）
統計解析：無処置群を対照に Mantel-Haenszel テストにより生存曲線を解析した。p = 0.5081（ミスマッチオリゴヌクレオチド投与群）, p = 0.0237 (ISIS 396443, 0.5 μg 投与群), p = 0.007（ISIS 396443, 1 μg 投与群）, p = 0.0001（ISIS 396443, 2 μg 投与群）, p < 0.0001（ISIS 396443, 4 μg 投与群）, p = 0.0004（ISIS 396443, 8 μg 投与群）
Data source: M4.3-61_Passini 2011_Figure 5G より改変

一般状態の改善と整合して、ISIS 396443 投与は非投与動物と比較して神経筋接合部の形態を保持することが認められた（図 26）。

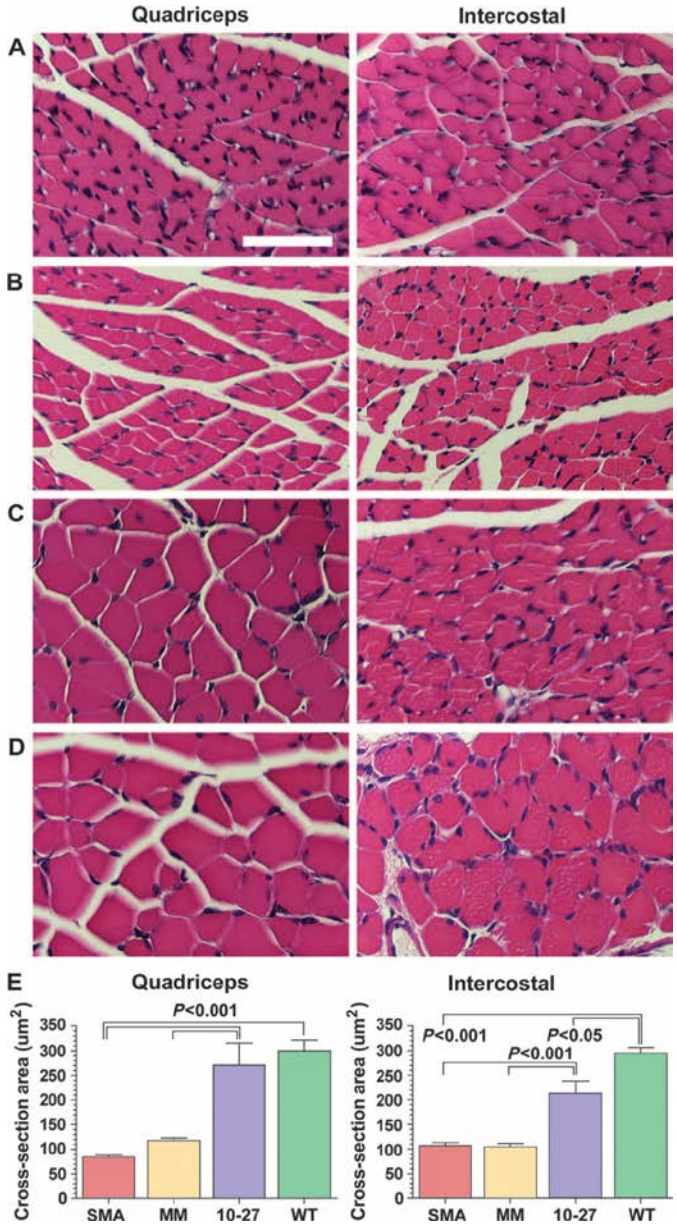
図 26　ISIS 396443 投与による重症 SMA マウス（Δ7 SMA）の神経筋接合部の組織形態の改善



PND 0 の Δ7 SMA マウスに 4 μg の ISIS 396443 又はミスマッチ対照オリゴヌクレオチドを単回 ICV ボーラス投与した。投与後 16 日目（A～E）及び 30 から 40 日目（E）にマウスを屠殺した。大腿四頭筋及び肋間筋を分離して固定した後、ニューロフィラメントタンパク質（緑）又はアセチルコリン受容体（赤）を染色した。緑及び赤の重ね合わせ像（黄）は運動終板における筋肉と神経の支配を示す。構造崩壊の特徴が認められる神経筋接合部の割合を測定し、大腿四頭筋及び肋間筋についてプロットした。
A; 無処置 SMA 動物群、B; 4 μg ミスマッチオリゴヌクレオチド投与 SMA 動物群、C; ISIS 396443 投与 SMA 動物群、D; 無処置野生型動物群
SMA; 無処置 SMA 動物群、MM; ミスマッチオリゴヌクレオチド投与 SMA 動物群、10-27; ISIS 396443 投与 SMA 動物群、WT; 無処置野生型動物群
統計解析手法：投与群間の検定は一元配置分散分析の実施後、Bonferroni 解析により行った。
数値は平均値±標準誤差を表す。
Data source: M4.3-61_Passini 2011_Figure 4

ISIS 396443 は、Δ7 SMA マウスにおいて、神経筋接合部の形態の改善に加え、筋線維の太さも増大した（図 27）。これらの結果より、ISIS 396443 は、単回 ICV ボーラス投与により、Δ7 SMA マウスモデルの運動能力及び生存期間に有意な効果をもたらすことが示された（Passini 2011）。

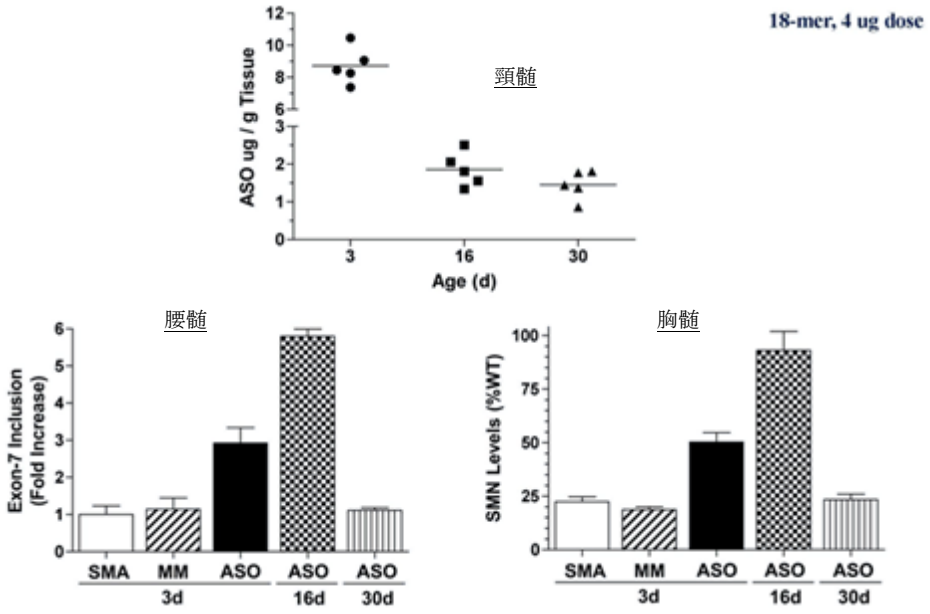
図 27　　ISIS 396443 投与による重症 SMA マウス（Δ7 SMA）の筋線維の太さの増大



PND 0 の Δ7 SMA マウスに 4 μg の ISIS 396443 又はミスマッチオリゴヌクレオチドを ICV ボーラス投与した。投与後 16 日目にマウスを屠殺した。大腿四頭筋及び肋間筋を分離、固定し、切片とした後、ヘマトキシリン及びエオジンを用いて染色した。
A; 無処置 SMA 動物群、B; 4 μg ミスマッチオリゴヌクレオチド投与 SMA 動物群、C; ISIS 396443 投与 SMA 動物群、D; 無処置野生型動物群、E; 各群の筋線維の断面面積を測定した。
SMA; 無処置 SMA 動物群、MM; ミスマッチオリゴヌクレオチド投与 SMA 動物群、10-27; ISIS 396443 投与 SMA 動物群、WT; 無処置野生型動物群
ISIS 396443 を投与した動物の大腿四頭筋及び肋間筋の筋線維の太さは、野生型動物のそれらとほぼ同じである。
統計解析手法：投与群間の検定は一元配置分散分析の実施後、Bonferroni 解析により行った。
数値は平均値 ± 標準誤差を表す。スケールバー（A 内白バー）は 50 μm を表す。
Data source: M4.3-61_Passini 2011_Figure 3

ISIS 396443 の作用持続期間は、PND 0 の Δ7 SMA マウスに 4 μg の単回 ICV ボーラス投与後 3、16 及び 30 日目に脊髄組織中の ISIS 396443 濃度及び *SMN2* エクソン 7 含有率を測定して求めた。投与後 3 日目に、ISIS 396443 は脊髄組織中のエクソン 7 含有率を増加させ、投与後 16 日目に効果は最大となった（図 28）。ISIS 396443 の作用は単回投与後 30 日目までに消失した（Passini 2011）。同用量での生存日数の中央値は 26 日となり、作用持続期間と一致した。4 μg の ISIS 396443 単回 ICV ボーラス投与により脊髄中濃度は投与後 3 日で約 8～10 μg/g、最大の効果が観察された投与後 16 日目では 2 μg/g であった（図 28）。投与後 30 日目の組織中濃度は 2 μg/g を下回った。上記の結果から、本マウスモデルで有効性を発揮するには、2～10 μg/g の組織中濃度が必要であると予測された。PND 0 のマウスに ICV ボーラス投与したときの作用持続期間は成熟マウスに ICV 持続投与したときの結果と異なる。有効性を示す組織中濃度は類似した範囲内であったが、作用持続期間は成熟マウスでは 6 ヵ月を超えていた。その原因は、新生児の発育により体組織が大きくなることに伴う希釈効果に加え、組織中からの ISIS 396443 の急速なクリアランスによる可能性がある。

図 28　　ISIS 396443 の新生児マウス（重症 SMA マウス［Δ7 SMA］）における PK/PD



PND 0 の Δ7 SMA マウスに 4 μg の ISIS 396443 を生後 0 日目に ICV ボーラス投与した。投与後 3、16 及び 30 日の時点でマウスを屠殺し、頸髄領域中の ISIS 396443 の絶対濃度（キャピラリーゲル電気泳動法）、無処置野生型動物と比較した胸髄領域中の SMN タンパク質の相対量（Western Blotting 法）、及び無処置 SMA 動物と比較した腰髄領域中のエクソン 7 含有 SMN2 mRNA の相対量（RT-PCR 法）をそれぞれ求めた。
SMA; 無処置 SMA 動物群（n=5）、MM; 4 μg ミスマッチオリゴヌクレオチド投与 SMA 動物群（n=5）、ASO; 4 μg ISIS 396443 投与 SMA 動物群（n=5）
Data source: M4.3-61_Passini 2011_Figure 2C より改変

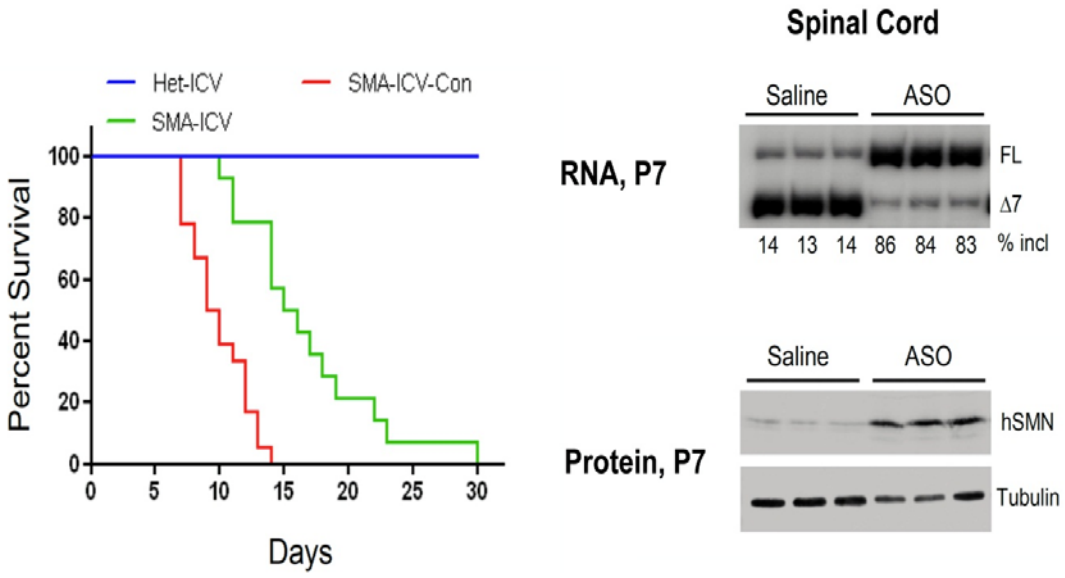
2.3.5.2　　Hung 2 SMN2 copy モデルの症状と生存率に対する ISIS 396443 の影響

参考資料［4.3-33］Hua 2011, 参考資料［4.3-31］Hua 2015

SMA の重症マウスモデルにおける指及び耳の壊死、心臓の異常及び自律神経の異常を含む非運動ニューロンの病態に関する複数の試験が公表されている（Heier 2010; Hsieh-Li 2000; Shababi

2010)。重症マウスモデルでみられる死亡は、運動ニューロン障害のみによるものではないと考えられ、実際には、重症 SMA マウスモデルに存在する運動ニューロンの欠損はわずかである。その代わり、心臓障害などの他の病理が本モデルの症状及び死亡率に寄与している（Mentis 2011; Park 2010)。指の壊死と心臓伝導障害が認められた SMA の報告がごく少数あるものの（Arai 2005; Araujo 2009; Hachiya 2005; Rudnik-Schoneborn 2008)、これはヒトの SMA の自然経過の特徴とは考えられない。そのことを考慮に含めた上で、ISIS 396443 の投与が重症 SMA マウスの末梢効果に有益な効果を示すかどうかを検討した。試験には、内因性のマウス *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[Hung 2 SMN2 copy model]（Hsieh-Li 2000）を用いた。当該試験では、対照として、マウス *SMN* 遺伝子がヘテロ接合性の同腹児を使用した。ホモ接合性の内因性 *SMN* を欠失し、2 コピーのヒト *SMN2* 遺伝子を導入したマウスでは、未処置での生存期間の中央値は約 10 日である（図 29)。ISIS 396443 20 µg の単回 ICV 投与により、生存期間の中央値は 16 日に延長した（図 29)（Hua 2011)。ISIS 396443 投与により、脊髄組織においてエクソン 7 を含む *SMN2* 転写産物量比が増加し、未投与マウスの転写産物量比が約 14%に対して、投与マウスでは 85%となり、さらに SMN タンパク質量も増加した（図 29)。これらの結果は、ISIS 396443 による CNS 組織における SMN タンパク質発現の著しい増加が、この重症マウスモデルの生存期間にわずかな影響を及ぼしたことを示している（Hua 2011)。

図 29　新生児マウス（重症 SMA マウスモデル［Hung 2 SMN2 copy モデル］）に対する ISIS 396443 の単回 ICV 投与による SMN タンパク質の増加及び生存期間の延長

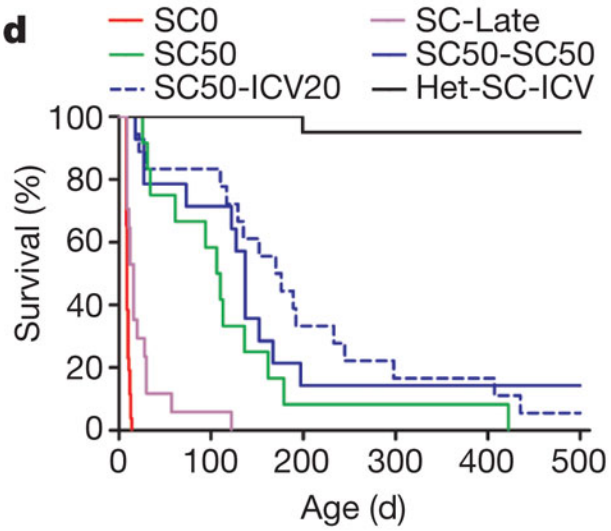


2 コピーのヒト *SMN2* 遺伝子を発現したマウスに対し、PND 1 に ISIS 396443 20 µg の単回 ICV 投与を行った。生理食塩水（SMA-ICV-Con 群、n=18）及び ISIS 396443（SMA-ICV 群、n=14）を投与されたマウスの平均生存日数は、それぞれ 10 及び 16 日であった。ISIS 396443 投与により、エクソン 7 を含む *SMN2* 転写産物量の割合は、投与後 7 日目のマウスから単離した RNA からの定量的放射性 RT-PCR による測定値で 14～85%に増加した。SMN タンパク質発現量は、ウエスタンブロット分析により投与後 7 日目のマウスで測定した。
Data source: M4.3-33_Hua 2011_Figure 1a-c

同一モデルにおいて、新生児マウスに、PND 0 及び PND 3 の 2 回に ISIS 396443 50 µg/g の皮下（SC）投与による全身投与を行った結果、生存期間の中央値は 108 日となった（図 30)。PND 0、3、5 及び 7 に、ISIS 396443 を 4 回 SC 投与したところ、生存期間がさらに延長した。SC 投与と単回 ICV 投与を併用した結果、生存期間の中央値は 173 日となった（図 30)。ISIS 396443 の全

身投与の効果は用量依存的であった（Hua 2011）。SC 投与を PND 5 まで遅らせると、生存期間の延長がわずかであったことから（16 日、Hua 2011）、生存期間を著しく延長するためには早期投与が非常に重要であることが示唆された。

図 30　ISIS 396443 の皮下投与による重症 SMA［Hung 2 SMN2 copy モデル］マウスの生存曲線



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（Hsieh-Li 2000）に生理食塩水（SC0 群、n=26）又は ISIS 396443 を SC 投与、又は SC 及び ICV 投与した。SC 投与では、ISIS 396443 50 µg/g を PND 0 及び 3（SC50 群、n=12）、又は PND 0、3、5 及び 7（SC50-SC50 群、n=14）に投与した。SC-Late（n = 17）は、PND 5 及び 7 に 2 回 SC 投与された SMA マウスであった。SC 投与に加え、SC50-ICV20 群のマウス（n=18）には、PND 0 及び 3 に 2 回 SC 投与、及び PND 1 に 20 µg の ICV 投与を 1 回実施した。SC 及び ICV 併用投与の忍容性を評価するため、マウス *SMN* がヘテロ接合性であるマウスにも同処置を施した（Het-SC-ICV 群、n=13）。SC-Late 群が $p < 0.05$ であるのを除き、すべての治療群で SC0 群に対する有意差は $p < 0.0001$ であった。
統計解析手法：Kaplan-Meier の生存データを解析するために Mantel-Cox テストを用いた。
Data source: M4.3-33_Hua 2011_Figure 1d

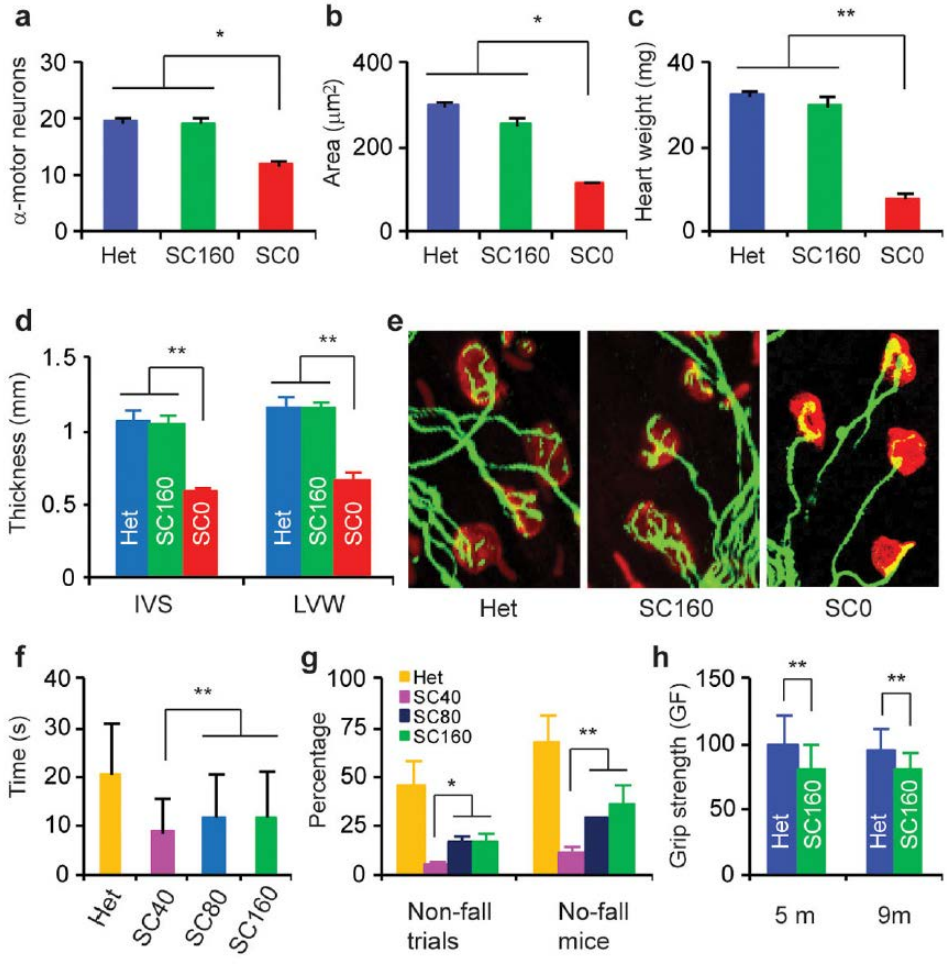
ISIS 396443 のようなアンチセンス薬を成熟動物に全身投与すると、種々の末梢組織に分布するが、血液脳関門は通過しにくい（Hua 2010、Yu 2009）。ISIS 396443 の全身投与による *SMN* スプライシングに及ぼす影響が、新生児マウスのいくつかの組織で確認された。ISIS 396443 は、心臓、筋肉、肝臓及び腎臓での *SMN2* エクソン 7 の含有率を用量依存的に増加させた（Hua 2011）。ISIS 396443 の全身投与は、脳及び脊髄組織においても SMN2 のエクソン 7 含有率も用量依存的にわずかに増加させた。これは、投与時（PND 0）のマウスでは、血液脳関門が完全に発達していないことが影響していると考えられる。組織中の ISIS 396443 を染色したところ、ISIS 396443 が末梢組織及び脊髄の運動ニューロンに蓄積していることが確認された（Hua 2011）。肝臓組織では効果が一過性であり、*SMN2* エクソン 7 転写産物の発現量は、PND 10 で最大となり、PND 30 でベースラインに戻った（Hua 2011）。これは、肝臓での半減期が 22 日であったことと整合している。

投与を受けたマウスのサイズは様々であり、標準サイズのヘテロ接合性同腹児から小型サイズまでが含まれた。投与を受けたマウスでは、受けなかったマウスに比べて体重増加が大きかったが、マウス *SMN* 遺伝子がヘテロ接合性であるマウスよりも平均サイズは小さかった（Hua 2011）。指及び尾の末梢壊死は、SMA マウスモデルに特徴的な所見である（Hsieh-Li 2000、Le 2005）。ISIS 396443 の全身投与により、重症 SMA マウスで尾の長さが保持されたが、マウス *SMN* がヘテロ接

合性であるマウスと比較して短かった（Hua 2011）。同様に耳介の保持も認められた（Hua 2011）。

PND 9 に行われた Hung 2 SMN2 copy マウスの異常組織の組織学的検査では、ISIS 396443 の投与により、著明な改善が示された（図 31）。脊髄中の α 運動ニューロン数は、ヘテロ接合性同腹児対照群と同等であった（図 31a）。筋線維横断面積はヘテロ接合体の面積の 80%を上回り、生理食塩水投与を受けたマウスよりも有意に大きかった（$p < 0.01$）（図 31b）。心重量、心室中隔厚及び左室壁厚は、ヘテロ接合性同腹児と ISIS 396443 投与マウスとの間で同等であり、生理食塩水投与マウスに比べて有意に改善された（図 31c、d）。神経筋接合部（NMJ）の染色により、非投与マウスに比べて NMJ の完全性が保持されていることが示された（図 31e）。生後 3 ヵ月時点で、ISIS 396443 投与マウスは活動性を維持しており、同一ケージ内の動物と相互に働きかけあっていたが（Hua 2011）、ISIS 396443 投与マウスでは、ヘテロ接合性マウスと比較して、ロータロッド上での滞在時間及び握力による評価で軽度の運動機能障害を認めた（図 31f、g、及び h）。

図 31　ISIS 396443 の重症 SMA マウスモデル［Hung 2 SMN2 copy モデル］における障害組織及び運動機能に対する作用



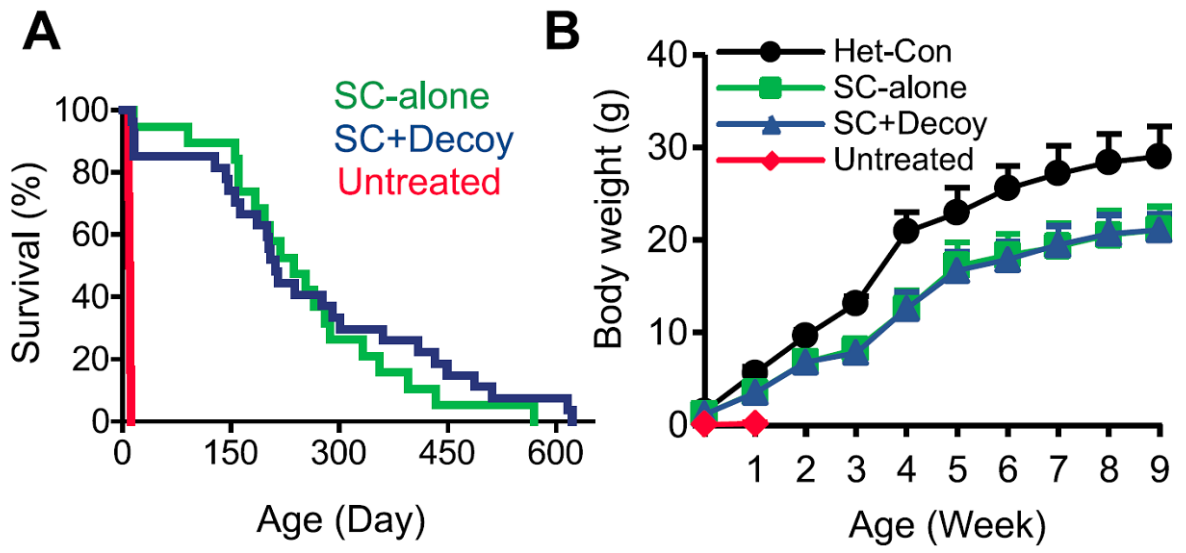
ISIS 396443 の投与を受けた SMA マウス（SMA+ASO、n=6、PND 0～3 に ISIS 396443 160 μg/g/回の SC 投与 2 回）から PND 9 に採取した組織を H&E 染色した後、生理食塩水投与対照群（SMA、n=6）及び非投与ヘテロ接合性群（Het、n=6）の同様の組織と比較した。生理食塩水投与を受けた SMA マウスは、安楽死当日（PND 9）も歩行可能であり、その後さらに 3～5 日間生存可能と予想された。L1～L2 腰髄の各横断切片の α 運動ニューロンの総数（a）、大腿直筋線維の平均横断面積（200 本）（b）、心臓重量（c）、心室中隔（IVS）厚及び左室壁（LVW）厚（d）

が、ISIS 396443 投与マウスで有意に改善した。ISIS 396443 投与マウスでは、NMJ の神経分枝の複雑さが回復した（e）。生後 3 ヵ月の SC40 マウス（PND 0～3 に ISIS 396443 40 μg/g/回の SC 投与 2 回、n=12、試行回数 124）、SC80 マウス（PND 0～3 に ISIS 396443 80 μg/g/回の SC 投与 2 回、n=13、試行回数 137）、SC160 マウス（PND 0～3 に ISIS 396443 160 μg/g/回の SC 投与 2 回、n=11、試行回数 117）及び非投与のヘテロ接合性マウス（Het、n=12、試行回数 135）をロータロッドで 1 種類の加速プロファイルを用いて 3 回試験した。1 回の試験で、3～4 回試行した。回転ロッド上での平均滞在時間（f）、及び転落しなかった試行数と、転落なしの試行数が 1 回以上のマウス数（g）を示す。生後 5 ヵ月（5 m）及び 9 ヵ月（9 m）の評価で握力 15（グラム）であった SC160 マウス（n=6）は、ヘテロ接合性マウス（n=6）の約 80%であった（h）。
統計解析手法：両側 Student's t-test *p < 0.05; **p < 0.01。
Data source: M4.3-33_Hua 2011_Figure 3

Hung 2 SMN2 copy モデルマウスは、インスリン様成長因子 1（IGF1）が欠失したときの病態と類似する複数の表現型特性を有し（McMullen 2004; O'Kusky 2000; Wu 2009）、血中 IGF1 の主な産生源は肝臓（被験物質を全身投与した後に最大の効果が得られる臓器でもある）であることから（Wu 2009）、Hung 2 SMN2 copy モデルマウスの血中 IGF1 濃度を測定した。PND 6 及び 9 に採取したマウスの血清中で IGF1 は著しく減少しており、数匹のマウスでは検出限界以下までの減少が認められた（Hua 2011）。ISIS 396443 の全身投与により、血清 IGF1 濃度はヘテロ接合性マウスと同程度まで増加した。PND 1 及び 5 にマウスから採取した肝臓中の IGF1 及び IGF 結合タンパク質 3 の転写産物の発現量は、ヘテロ接合性マウスとホモ接合性マウスとの間で同等であったことから（Hua 2011）、上記の血清 IGF1 の変化は、IGF1 転写産物の発現の変化によるものではない。しかし、IGF 酸不安定サブユニット（*Igfals*）の発現量はホモ接合性マウスの肝臓で減少していた。*Igfals* は、IGF1 と IGF 結合タンパク質 3 との複合体を安定させ、血中の活性化 IGF1 を維持する（Firth 1998）。ISIS 396443 を Hung 2 SMN2 copy モデルマウスに全身投与すると、肝臓中の *Igfals* 遺伝子発現量が増加する（Hua 2011）。これらの結果は、Hung 2 SMN2 copy モデルマウスに ISIS 396443 を全身投与したときの血中 IGF1 の増加が薬効に部分的に寄与している可能性を示唆している。

ISIS 396443 のデコイを Hung 2 SMN2 copy モデルマウスの CNS に投与し、及び ISIS 396443 を末梢に投与した一連の試験では、SMA マウスモデルの末梢に SMN を十分に補充することの重要性がさらに示された（Hua 2015）。ISIS 396443 のデコイであるオリゴヌクレオチドは、ISIS 396443 の正確な相補鎖であり、CNS 組織での ISIS 396443 による SMN タンパク質発現を効果的に遮断した（Hua 2015）。しかし、ISIS 396443 の末梢投与及びデコイの CNS 投与を受けたマウスでは、末梢組織への ISIS 396443 投与のみを受けたマウスと同程度に体重及び生存期間が改善した（図 32、Hua 2015）。

図 32　　ISIS 396443 デコイの CNS への投与による ISIS 396443 の末梢組織投与の効果



末梢組織での SMN の増加のみで、重症 SMA マウス（Hung 2 SMN2 copy モデル）の病態は著しく改善した。皮下投与（SC-alone）群は、PND 0～PND 2 に ISIS 396443 120 mg/kg の SC 投与を 3 回受けた。SC+decoy 群は、SC-alone と同様の投与に加え、PND 0～PND 2 にデコイ 30 mg の ICV 投与を受け、生理食塩水の SC 及び ICV 投与を受けたマウスを対照（untreated）として使用した。（A）生存曲線。SC-alone 群（n = 19）又は SC+decoy 群（n = 27）のいずれも、untreated 群（n = 18）との比較で $p < 0.001$。SC-alone 群と SC+decoy 群との比較では $p = 0.5496$。（B）体重曲線は、SC-alone 群と SC+decoy 群とで同様であった。投与を受けなかったヘテロ接合性同腹児の Het-Con 群（n = 12）は、陽性対照として用いた。
Data source: M4.3-31_Hua 2015_Figure 6a, b

これらの結果から、ISIS 396443 全身投与は Hung 2 SMN2 copy モデル重症 SMA マウスにおいて顕著な生存及び臨床効果を示すことが判明した。これらの傾向がヒトの疾患でも認められるか、また認められるのであればどのタイプの SMA で認められるかは明らかでない。ヒト疾患の主な臨床的特徴は、運動ニューロンの喪失による筋力低下及び萎縮である。SMA 患者の剖検で確認される主な病理学的変化は、脊髄前角及び脳幹運動核での運動ニューロンの喪失である（Ince 2003）。SMA 患者での IGF1 の欠乏は報告されていない。心臓の異常及び血流障害の報告はまれであり、多くの SMA 患者に共通する特徴ではない。したがって、この最も有力なエビデンスにより、CNS に焦点を当てた治療、特に脊髄組織中の SMN タンパク質を増やす治療が裏付けられた。

3 副次的薬理試験

3.1 SMA マウスモデル（SMN2 マウスモデル及び Hung 2 SMN2 copy マウス）における末梢組織の壊死に対する作用

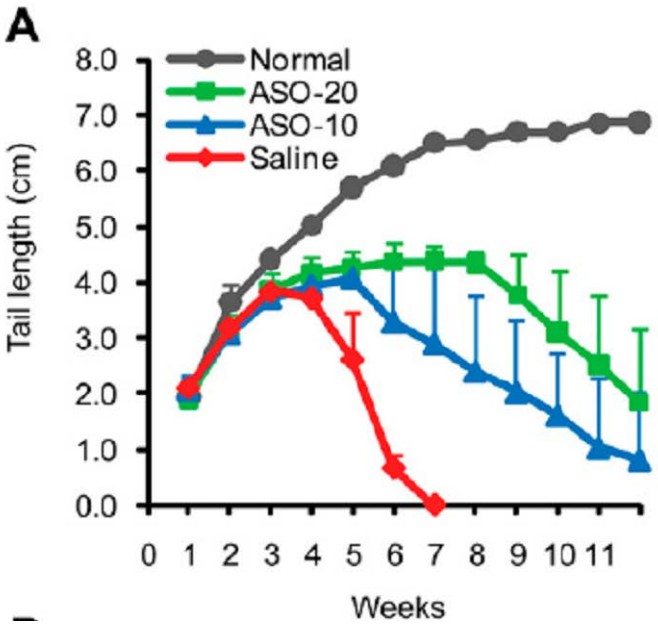
3.1.1 SMN2 マウスモデルにおける末梢組織の壊死に対する作用

参考資料［4.3-32］Hua 2010

末梢組織の壊死に対する作用を、マウス *Smn1* を欠失しているが 4 コピーのヒト *SMN2* を持つ SMN2 マウスモデル（$SMN^{-/-}$; $hSMN2^{2TG/2TG}$）で検討した。このマウスモデルは、軽度の表現型のみを示し、認識された変化は生後 3～4 週から始まる尾の欠落と耳の壊死でのみであった（Hsieh-Li 2000）。末梢組織の壊死は SMA 患者で通常発現する病態ではない。組織壊死は生後間もなく発現するため、胎生期約 15 日目（E15）の子宮内の胎児に ISIS 396443 を ICV ボーラス投与した。

ISIS 396443 の 20 µg 投与により、非投与マウスで生後 3 週目に観察される尾の壊死（図 33）及び耳の壊死の発現時期を 9 週目まで有意に遅らせた（Hua 2010、図 33）。10 µg 投与では組織の壊死に対し中程度の効果を示した。E15 での ICV 投与では、14 日目に測定した尾の組織における *SMN2* スプライシングに対して効果を示さなかったことから、尾の組織の壊死の発現抑制作用は、アンチセンス薬としての直接的な効果によるものではないことが示唆された。生後 1 又は 2 日目の新生児に対して ISIS 396443 を 20 µg 投与すると尾の壊死は約 2 週間遅れた（Hua 2010、図 33）。上記の結果からは、疾患早期に SMN タンパク質の修復治療を行えば、本マウスモデルの組織壊死に対し、より顕著な効果があることが示された。

図 33 胎生期約 15 日目（E15）に ISIS 396443 を単回 ICV 投与したときの SMN2 マウスの尾の長さの保持



ISIS 396443 を胎生期約 15 日目（E15）あるいは生後 1 又は 2 日目の新生児に単回 ICV 投与したときの SMN2 マウスの尾の長さを 1 週間間隔で生後 7 日目～9 週目まで測定した。E15 の胚に ISIS 396443 10 µg（Embryonic、n=11）又は生後 1 又は 2 日目の新生児に 20 µg（Neonatal、n=16）を容量 2 µL で投与した。対照として無処置の SMN2 マウス（No treatment、n=12）あるいは正常マウスを使用した（Normal、n=10）。
Data source: M4.3-32_Hua 2010_Figure S8

3.1.2 Hung 2 SMN2 copy マウスモデルにおける末梢組織の壊死に対する作用

参考資料［4.3-33］Hua 2011

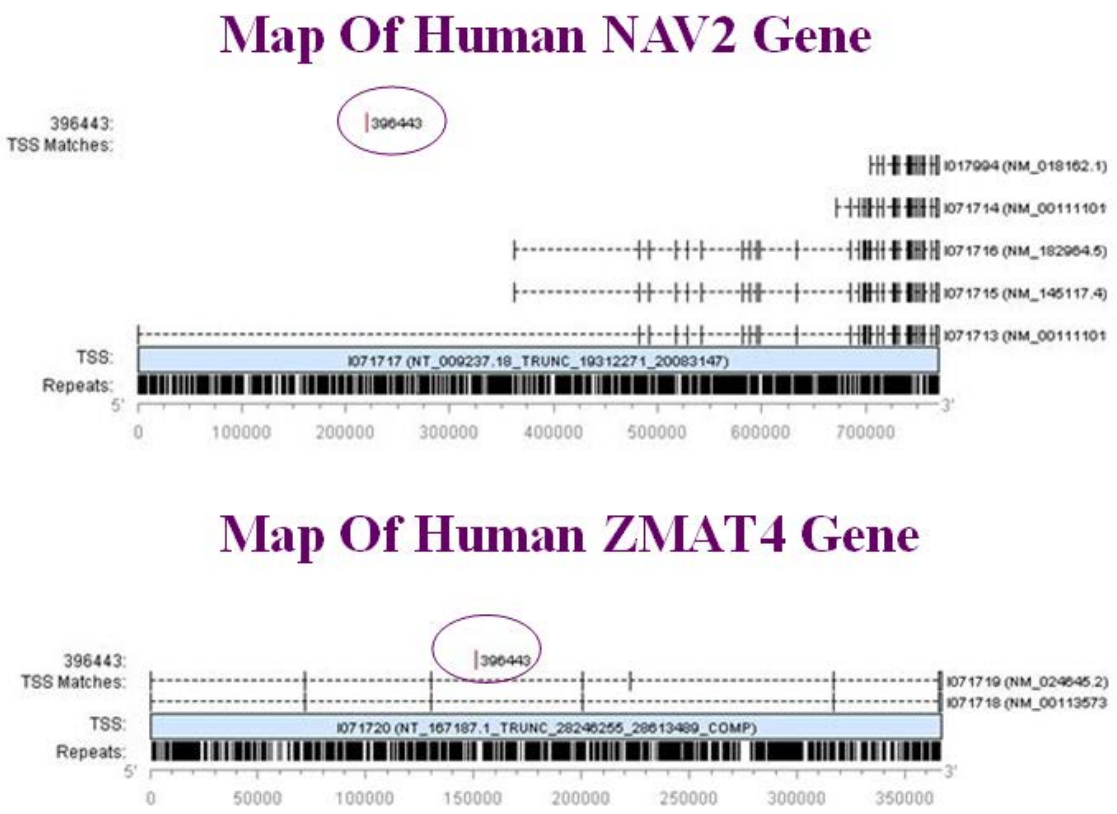
SMA の Hung 2 SMN2 copy マウスモデルにおける指及び耳の壊死に関する試験が公表されている（Hsieh-Li 2000）。指の壊死が認められた SMA の報告がごく少数あるものの（Araujo 2009）、これはヒトの SMA の自然経過の特徴とは考えられない。そのことを考慮に含めた上で、ISIS 396443 の投与が重症 SMA マウスの末梢効果に有益な効果を示すかどうかを検討した。指及び尾の末梢壊死は、Hung 2 SMN2 copy マウスモデルにおいても特徴的な所見である（Hsieh-Li 2000、Le 2005）。Hung 2 SMN2 copy マウスに ISIS 396443 の 40、80 及び 160 µg の SC 投与（P0 と P3 の間に 2 回投与）したところ、尾の長さが保持されたが、マウス SMN がヘテロ接合性であるマウスと比較して短かった（Hua 2011）。同様に耳介の保持も認められた（Hua 2011）。

3.1.3 SMN 転写産物に対する ISIS 396443 の特異性

参考資料［4.3-41］Langmead 2009, 参考資料［4.2.1.1-7］396443-NP07

バイオインフォマティック解析として、2011 年に、ヒトトランスクリプトームの BLAST による解析を実施したところ、18 塩基のアンチセンス薬である ISIS 396443 は、*SMN1* 及び *SMN2* mRNA 前駆体転写産物にのみ存在する ISS-N1 領域に特異的に結合すると予測された。さらに、ISIS 396443 には、ヒトトランスクリプトームで、他の領域と 17 又は 16 連続ヌクレオチドで一致する相同性は認められていない。ハイブリダイゼーションで要求される連続するヌクレオチド数を 15 に減らすと、相補的なハイブリダイゼーション領域を持つ 3 つの遺伝子、zinc finger matrin-type 4（*ZMAT4*）、neuron navigator 2（*NAV2*）及び仮説的遺伝子 *LOC643542* が同定された。前者の 2 遺伝子では、予測されたハイブリダイゼーション領域が、スプライシングに関与する既知の制御配列の遠位に存在するイントロン領域に位置することから（図 34）、これらの遺伝子のスプライシングが修正される可能性は低い。また、*LOC643542* が転写される証拠を見いだせなかったことから、ISIS 396443 がその推定上の転写産物に及ぼす影響は評価できない。

図 34　　ISIS 396443 が部分的に同じ配列の領域を示した NAV2 と ZMAT4 の遺伝子マップ



Zinc finger, matrin-type 4（ZMAT4）及び neuron navigator 2（NAV2）遺伝子の予想されるゲノム構造が示されている。下に示されたスケールはヌクレオチドの数を表す。 Repeats は、各遺伝子の反復エレメントを同定している。 TSS は予測される転写された配列、すなわち mRNA 前駆体を示す。 TSS の一致は、様々なデータベースの検索によって転写物が存在するという証拠がある転写物配列を示す。 TSS 上のハッシュマークはエクソン部位を表し、点線はイントロン配列を表す。右側の注記は、各転写物の Genebank 受託番号を示す。

20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日に、ヒト細胞中に存在する可能性のある転写産物に対する ISIS 396443 の相同性を、基準ゲノムに対する短配列のアラインメントに適したもう 1 つの配列アラインメントアルゴリズムである Bowtie 分析を用いて再分析した（Langmead 2009）。その結果、ISIS 396443 との相同性を示す潜在的転写産物がさらに 3 つ同定された。これらすべては、特性が不明な転写産物であり、マニュアルでの情報収集は行われておらず、自動的に収集解析された情報のみから予測されたモデル遺伝子である。*LOC102724356* は、*SMN2* 遺伝子座と重複することから、ISIS 396443 と 100%相補的なモデル遺伝子である。*LOC105373684* は、特性が不明な ncRNA のモデル遺伝子であり、*LOC105371082* は、特性が不明なモデル ncRNA である。モデル遺伝子の存在を裏付ける確固たる根拠がないため、それ以上の追跡は行わなかった。

表 1　　ISIS 396443 が標的以外に結合する可能性のある転写産物（Bowtie 分析による同定）

NCBI 遺伝子 ID	正式な記号	転写産物	Position	Max Contig[1]
6606	*SMN1*	NT_034772.7_TRUNC_20815134_20843208	27064	18
6607	*SMN2*	NT_034772.7_TRUNC_19939716_19967788	27062	18
102724356	*LOC102724356*	NT_034772.7_TRUNC_19869210_20363713	97568	18
105373684	*LOC105373684*	NT_005403.18_TRUNC_55673476_55857330	125793	17
643542	*LOC643542*	NT_010966.15_TRUNC_46605340_46988413	377504	15
89797	*NAV2*	NT_009237.19_TRUNC_19285247_20061601	226128	15
79698	*ZMAT4*	NT_167187.2_TRUNC_28246245_28613479_COMP	150963	15
105371082	*LOC105371082*	NT_010393.17_TRUNC_11239046_11386486	128321	15

[1] ISIS 396443 と標的 mRNA との間で相同な連続配列の最大長

4 安全性薬理試験

ISIS 396443 の投与が呼吸器系及び心血管系へ影響を評価することを目的として、ラットを用いた ISIS 396443 の持続 IT 投与による安全性薬理試験（396443-AS04 試験）を実施した。呼吸器系及び心血管系への影響は、サルを用いた ISIS 396443 の単回（396443-AS01 試験）及び反復投与毒性試験（396443-AS03 又は 396443-AS06 試験）でも評価した。これらの安全性薬理試験及び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 以上の IT スローボーラス投与したとき、脊髄下部反射に一過性の低下が認められた。カニクイザルで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。

ISIS 396443 と類似構造を有する 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 et al., 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。

4.1 呼吸器系及び心血管系への影響

呼吸器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心拍数、呼吸数、又は ECG 及び血圧（反復投与試験のみ）を評価した。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。

4.1.1 アルビノラットを用いた ISIS 396443 の持続 IT 投与による呼吸系及び心血管系の安全性評価（396443-AS04 試験）

評価資料［4.2.1.3-1］396443-AS04

本試験は、被験物質 ISIS 396443 を腰部 IT 投与したときの呼吸系及び心血管系への影響を評価した。雄ラットを 4 投与群に割付けた（表 2）。

表 2　　ISIS 396443 の持続 IT 投与を受けたラットでの安全性薬理試験のデザイン

群	用量（mg/日）	用量（mg/週）	動物数
1	0（溶媒）[a]	0	8 M
2	0.02	0.14	8 M
3	0.06	0.42	8 M
4	0.2	1.4	8 M

[a] 溶媒は人工脳脊髄液

6 µL/日（0.25 µL/時間）の被験物質あるいは溶媒を浸透圧ポンプで最長 25 日間、すべてのラットに投与した。

肺機能（呼吸数、1 回換気量及び毎分換気量）を本試験の Day 11、12 又は 22 に 4 時間以上観察した。血圧（収縮期血圧、拡張期血圧、及び平均動脈圧）並びに心拍数を、本試験の Day 19、22、23 又は 25 に 30 分間以上測定した。試験終了時、心血管パラメータを観察後、すべてのラットから腰髄を採取した。採取腰髄は追加の評価を行うことなく廃棄した。

ラットの ISIS 396443 への曝露量は、用量依存的に増加した。脊髄組織中の平均濃度は、0.02、0.06 及び 0.2 mg/日の投与を受けたラットでそれぞれ 73、170 及び 389 µg/g であった。

ISIS 396443 の最長 25 日間の持続 IT 投与では、死亡例は認められず、体重、呼吸数、1 回換気量、毎分換気量、血圧又は心拍数にいかなる影響も認められなかった。一般症状として後肢の障害が中用量（0.06 mg/日）の投与を受けた 1 例のラットで認められたが、この障害がカテーテル操作でなく被験物質と関連しているかどうかは明確ではなかった。投与と関連のあるその他の一般症状は認められなかった。

要約すると、ISIS 396443 は、最高用量 0.2 mg/日までの持続 IT 投与後、心血管系及び呼吸系の評価項目に対しいかなる影響も認められなかった。

4.1.2　　サ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

本試験は成熟カニクイザルに ISIS 396443 を腰部 IT 内に単回ボーラス投与した後の局所及び全身性の毒性を評価する目的で行った。投与量は 1、3 及び 7 mg/回とし、本薬を 3 mg 投与したときの CNS 組織取込み及び全身性の薬物動態（PK）を詳細に評価した。本試験には 32 例の動物を使用し、10 例（雌雄各 5 例）を TK 解析用動物とした。被験物質投与群又は対照群の各群に 2 又は 3 例/性を割り当てた。本試験デザインには詳細な身体検査及び神経学的検査を含めた。身体検査では心拍数、呼吸数、体温、歩行、性質、及び全身状態を含めた。神経学的検査では一般感覚機能、運動機能、脳反射、及び脊髄反射を評価した。

血漿、CSF（以上[M2.6.4.3.1]）、CNS 組織、及び肝臓組織（以上[M2.6.4.4.1.1]）における ISIS 396443 曝露は用量依存的であった。IT 投与後、オリゴヌクレオチドは CSF から脳・脊髄内に分布し、正常な CSF ターンオーバーを介して全身循環へ移行した。ISIS 396443 の血漿中曝露量は CSF 中曝露量に比べて相対的に低値であった。

ISIS 396443 に起因する毒性所見は認められなかった。死亡例はなく、体重への影響は認められなかった。

ISIS 396443 の単回 IT 投与において良好な忍容性が認められたが、試験 1 日の 7 mg 群では 6 例中 1 例（高用量投与群、雄 1 例）に急性で一過性の変化が認められた。具体的には、これらの変化は、薬物投与 2 時間後の右体側での皮膚反射及び尾の反射の低下であった。投与 4 時間後、右後肢に固有受容器反射の反応低下が認められた。しかし、これらの神経学的症状は投与 6 時間後までに完全に回復した。7 mg 群のほかの動物又は低用量の 2 群の動物には、薬物投与と関連した一般状態及び神経学的症状は観察されなかった。試験 1 日の投与 4 時間後の予定評価時点で、心拍数及び呼吸数に被験物質投与と関連した影響は認められなかった。

4.1.3 幼若サルを用いた 14 週間複数回腰部 IT ボーラス投与毒性試験（396443-AS03 試験）

評価資料［4.2.3.2-1］396443-AS03

本試験の目的は、幼若カニクイザルに ISIS 396443 を腰部 IT ボーラス投与した場合の局所及び全身性の毒性を評価することであった。初回投与時のカニクイザルの月齢は 9～10 ヵ月齢、体重は 1.0～1.6 kg であった。投与量は 0.3、1 及び 3 mg/回であり、投与には留置したカテーテルを介したスローボーラス投与を用いた。本試験には合計 66 例（雄 31 例、雌 35 例）のサルを使用し、3 つの被験物質投与群又は溶媒対照群の各群に各剖検時点で 2～4 例/性を割り当てた。最低用量である 0.3 mg 群の脊髄中薬物濃度は、マウスモデル（SMN2 トランスジェニックマウス）を用いた薬理試験で観察された薬理活性濃度と類似すると予測された。最高用量（3 mg）は、成熟サルを用いた単回投与毒性/PK 試験（4.2.1 項参照）の 7 mg 投与で認めた急性で一過性の症状により、制限された。毒性発現の可能性のある曝露量に達するよう、臨床予定用法より頻回に投与した。0.3 mg 及び 1 mg 投与動物には、週 1 回を 5 回の負荷用量を投与し、その後 IT 投与を隔週で 5 回以上行った。最高用量である 3 mg/回群動物には、週 1 回を 15 週間で 45 mg の総投与量を IT 投与した。

毒性学的評価には、生存期間中の観察（体重、摂餌量、一般状態、眼科学的検査及び心電図検査）、臨床病理学的検査及び剖検時の評価（肉眼的観察、臓器重量、病理組織学的検査）を含めた。また、本試験デザインには詳細な身体及び神経学的検査を含めた。身体検査には心拍数、呼吸数、体温、歩行、性質、一般状態を含めた。神経学的検査には、一般感覚（意識レベル、追跡）及び運動機能、脳反射（瞳孔反射、眼輪筋反射、角膜反射）、及び脊髄反射（膝蓋腱反射、皮膚反射、固有受容器反射、足の感覚反射・尾の反射）の評価を含めた。

CSF（腰部及び大槽）、血漿、CNS 組織、及び肝臓中の ISIS 396443 曝露量を確認した（M 2.6.4）。CSF 中薬物濃度は、2 回の IT 投与（4 週又は 14 週の投与）の 7 日後に測定した。CSF 中濃度測定は投与後 7 日目に実施したため、CSF 中濃度は予想されたピーク値以下に十分低下しており、単回 IT 投与試験における試験 7 日での CSF 値と同様であった（M2.6.6. 2.1 項、図 1 参照）。

血漿中濃度は 1 回目、5 回目及び最終投与後（0.3 及び 1 mg 群では 10 回目の投与、3 mg 群では 15 回目）に測定した。単回投与毒性試験/PK 試験でみられたように、血漿中 T_{max} は IT ボーラス投与後、約 2～5 時間後であった。血漿中濃度は全測定時点で CSF 中濃度に比べて低値を示し

た。血漿曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-24}）は投与量に対しほぼ線形を示し、投与量に依存して増加した。

脊髄及び脳組織中薬物濃度は 4 又は 14 週間の複数回投与により増加した。CNS 組織中薬物濃度は回復期間終了後も高濃度のままであった。組織における ISIS 396443 の長い半減期を反映して蓄積と低クリアランスが認められた。

ISIS 396443 を 10 回（0.3、及び 1 mg）又は 15 回（3 mg）の IT 投与したところ、良好な忍容性が認められた。

身体検査は、カテーテル留置前、投与開始前（術後）、試験 1、29、及び、99 日（投与終了時）、並びに試験 183 日（回復期）に全動物について行った。身体検査の各パラメータに被験物質投与と関連した影響は認められなかった。

ECG（I、II 及び III 誘導）は投与開始前及び剖検前に行った。剖検前の ECG に被験物質投与と関連した明らかな影響は認められなかった。

4.2 心血管系への影響

4.2.1 幼若サルを用いた 53 週間反復投与毒性試験（396443-AS06 試験）

評価資料［4.2.3.2-2］396443-AS06

本試験は幼若カニクイザルを用いて ISIS 396443 を 53 週間腰部 IT 反復投与した後の本薬の局所及び全身性の毒性を評価する目的で実施した。本試験には 48 例のサルを使用した（M2.6.6 3.3 項、表 9 参照）。投与開始時の動物は約 9～11 ヵ月齢、体重は 1.0～2.0 kg（雌雄）であった。群構成は溶媒対照（7 例/性）、0.3（5 例/性）、1.0（5 例/性）、及び 4.0（7 例/性）mg/回群とした。

試験デザインには、臨床試験をサポートするため 2 種類の安全域の評価、すなわち、高用量（CSF 容積で補正した mg/回単位の用量）及び累積投与量に基づく評価を含めた。本試験では用法・用量を臨床用法・用量に類似させて、負荷投与期（週 1 回、5 回投与）とその後の維持投与期（6 週間ごとに 8 回投与）から構成し、これにより、より早期に定常状態の組織濃度を確立し、その後、その曝露レベルを維持するよう計画した。動物の場合には負荷投与期及び維持投与期とも臨床用法・用量（負荷投与期での投与は Day 1、15、85、及び維持投与期での投与はほぼ 18 週間ごと）より高頻度で投与した。毒性試験の投与頻度を臨床試験より多くした理由は、サルでの最高用量は、急性の脊髄下部反射の低下で制限されるためであった。

毒性評価項目は、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 中の細胞数及び生化学検査、CSF 中の補体検査）、心血管系の検査（ECG、血圧）、骨格系の成熟度（骨密度の評価、骨塩量、X 線による大腿骨長）、T 細胞依存性抗体反応（TDAR）であった。剖検時の評価として肉眼的観察、臓器重量測定、病理組織学的検査を行った。

CSF（腰部）、血漿、及び CNS 組織について、ISIS 396443 の曝露を確認した（M 2.6.4）。投与期間中、投与前に CSF 中の ISIS 396443 のトラフ値を測定した。最初の 4 回の週 1 回負荷投与の

7 日後、及び各維持投与（6 週間ごとの投与）の 42 日後に濃度を測定した。6 ヵ月間の回復期間中にも、腰椎穿刺により CSF 中濃度を 4 回測定した。

CSF 中薬物濃度は投与後 7 日又は 42 日に測定したため、CSF 中濃度は予想されるピーク値を十分に下回っていた。負荷投与期中に測定された CSF 中濃度推移は、CSF における多相性の分布パターンの終末（M2.6.6 2.1 項、図 1 参照）を表している可能性が最も高かった。いずれの投与群でも、投与後 42 日に測定した CSF 中濃度は投与後 7 日の測定値より低かった。投与された ASO は分布相を完了していると考えられることから、このような CSF 中濃度の推移は、CSF 中に残存する ASO が CNS 組織との間で平衡状態に達している可能性が最も高いことを表している。投与終了後（試験 372 日）、CSF 中平均終末相半減期（111 日）は CNS 組織中の平均半減期（117～195 日）と同等であり、このことは投与後の CSF 中濃度と CNS 組織中濃度とが平衡状態に到達していることを示唆している。

初回及び最終 IT 投与後に血漿中濃度を測定した。血漿中の平均 T_{max} は、先行試験でもみられたように IT 投与の 1～2 時間後であった。投与後 7 日目の時点で、血漿中濃度は CSF 中濃度より低値であり、このこともまた先行試験の結果と一致していた。初回及び最終 IT 投与後の血漿中曝露量は、投与量に対してほぼ線形であった。

回復期間中、ISIS 396443 は CNS 組織、CSF、及び血漿中からそれぞれ、約 174、111、及び 56 日の半減期で消失した（M2.6.6、3.3 項、図 2 参照）。回復期間中の全測定時点で、CNS 組織中濃度（試験 364 日、約 40～100 µg/g）は CSF 中濃度（≤ 0.1 µg/mL）に比べて大幅に高値を示し、また血漿中濃度（≤ 0.01 µg/mL）よりも高かった。全身組織（肝臓及び腎臓）における消失半減期は CNS 組織に比べてより急速であった。

幼若カニクイザルに ISIS 396443 を 53 週間 IT 投与したところ、忍容性は良好であった。死亡例はみとめられず、体重、摂餌量、又は一般状態に影響は認められなかった。身体検査、心血管系(心電図、血圧)の評価について、対照群及び投薬群の動物ともにこれらの検査項目は同年齢の動物の正常範囲内の値であった。身体検査は、投与前、試験 1 及び 29 日（投与前、投与 4 及び 8 時間後）、試験 11、29 及び 53 週（投与前、並びに投与 4 及び 8 時間後）、並びに回復試験の最後の週に行った。身体検査には、腹部触診、目・耳・鼻の検査、体温、心臓及び肺の聴診を含めた。身体検査に被験物質と関連した影響は認められなかった。心血管系の評価（心拍数を含む ECG 及び血圧）は、投与前に 1 回、投与期間中の試験 53 週（投与 24 時間後 ± 60 分）及び回復試験の最後の週に、無麻酔で保定した動物に行った。試験期間を通じて、心血管系の評価項目に被験物質投与と関連した影響は認められなかった。

4.3 中枢神経系への影響

4.3.1 サ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

投与量は 1、3 及び 7 mg/回とした。32 例の動物を 3 つの投与群又は溶媒対照群の各群に 2 又は 3 例/性で割付けた。本試験デザインには詳細な身体検査及び神経学的検査を含めた。身体検査では心拍数、呼吸数、体温、歩行、性質、及び全身状態を含めた。神経学的検査では一般感覚機能、

運動機能、脳反射、及び脊髄反射を評価した。

本試験では、身体検査に含められた体温、歩行、性質、及び全身状態、並びに神経学的検査で評価された一般感覚機能、運動機能、脳反射、及び脊髄反射には、ISIS 396443 投与に関連する影響は認められなかった。7 mg/回群の 6 例中 1 例に、脊髄反射に対する急性で一過性の影響が認められた。具体的には、これらの変化は、薬物投与 2 時間後の右体側での皮膚反射及び尾の反射の低下であった。投与 4 時間後、右後肢に固有受容器反射の反応低下が認められた。しかし、これらの神経学的症状は投与 6 時間後までに完全に回復した。7 mg/回群のほかの動物又は低用量の 2 群の動物には、被験物質投与と関連した一般状態及び神経学的症状は観察されなかった。

運動量、行動変化、協調性、感覚/運動反射反応、体温について以下に示す。

運動量：運動機能は、試験 1（投与 4 時間後）及び 8 日の剖検前の神経学的検査で評価した。各動物の歩行、ケージの挟体（スクイーズバー）による刺激に対する反応（正常な移動等）も評価した。本試験では、投与に関連する運動機能への影響は認められなかった。

行動変化：行動変化は、試験前、試験1（投与の4時間後）及び8日の剖検前の身体検査で評価した。いずれのサルの性質に変化は認められなかったことから、本薬は行動に影響を及ぼさないことが示唆された。

協調性：身体検査は、試験1（投与の4時間後）及び8日の剖検前に実施した。各サルの歩行を観察することにより協調性を評価したところ、本試験ではいずれのサルでも、すべての所見が正常範囲内であった。

感覚／運動反射反応：神経学的検査は、試験1（投与4時間後）及び 8日の剖検前に行った。これらの検査では、意識、頭部と目での追跡能力、及び脳・脊髄反射を評価した。これらの評価の結果は、高用量群（7 mg）の雄1例を除き、いずれのサルでも正常範囲内であった。この雄は投与2時間後、後肢筋力低下を伴う傾眠として観察された。この雄では、皮膚反射（右側）及び尾の反射における反応が陰性であった。投与4時間後、この雄では右後肢の固有受容器反射における反応が陰性であった。このサルは、試験8日の回復期間の剖検時では正常な反応を示した。

体温：本試験では、サルに本薬を単回IT投与した。計画観察時点である投与4時間後に、投与に関連する体温への影響は認められなかった。ただし、高用量群の雄1例（動物011）の投与2時間後に脊髄下部反射の一過性の減弱が認められ、その時点での体温は98.9～99.8ºF（37.2～37.7°C）であった（雄の正常範囲は38.7～39.8°C）。

4.3.2 幼若サルを用いた 14 週間複数回腰部 IT ボーラス投与毒性試験（396443-AS03 試験）

評価資料［4.2.3.2-1］396443-AS03

初回投与時のカニクイザルの月齢は 9～10 ヵ月齢、体重は 1.0～1.6 kg であった。投与量は 0.3、1 及び 3 mg/回とし、投与には留置したカテーテルを介したスローボーラス投与を用いた。66 例の動物（雄 31 例、雌 35 例）を 3 つの投与群又は溶媒対照群の各群に各剖検時点で 2～4 例/性で割付けた。0.3 mg 及び 1 mg 投与動物には、週 1 回を 5 回の負荷用量を投与し、その後 IT 投与を

隔週で 5 回以上行った。最高用量である 3 mg/回群動物には、週 1 回を 15 週間で 45 mg の累積投与量を IT 投与した。

本試験デザインには詳細な身体及び神経学的検査を含めた。身体検査には心拍数、呼吸数、体温、歩行、性質、一般状態を含めた。神経学的検査には、一般感覚（意識レベル、追跡）及び運動機能、脳反射（瞳孔反射、眼輪筋反射、角膜反射）、及び脊髄反射（膝蓋腱反射、皮膚反射、固有受容器反射、足の感覚反射・尾の反射）の評価を含めた。

本試験では、身体検査に含められた体温、歩行、性質、及び一般状態、並びに神経学的検査で評価された一般感覚（意識レベル、追跡）及び運動機能、脳反射（瞳孔反射、眼輪筋反射、角膜反射）、及び脊髄反射（膝蓋腱反射、皮膚反射、固有受容器反射、足の感覚反射・尾の反射）には、ISIS 396443 投与に関連する影響は、試験期間を通じて全用量群で認められなかった。

運動量、行動変化、協調性、感覚/運動反射反応、体温について以下に示す。

運動量：運動機能は、試験1、29、99（投与終了時）及び183日（回復期間）の神経学的検査で評価した。各サルの歩行を評価したほか、ケージの挟体（スクイーズバー）による刺激に対する反応（正常な移動等）も評価した。本試験では、投与に関連する運動機能への影響は認められなかった。

行動変化：行動変化は、試験前、試験1、29、及び99（投与終了時）及び183日（回復期間）の身体検査で評価した。いずれのサルの性質に変化は認められなかったことから、本薬は行動に影響を及ぼさないことが示唆された。

協調性：身体検査は、試験1、19、及び99日（投与終了時）並びに試験183日（回復期間）に実施した。各サルの歩行を観察することにより協調性を評価したところ、本試験ではいずれのサルでも、すべての所見が正常範囲内であった。

感覚／運動反射反応：神経学的検査は、試験1、19、及び99日（投与終了時）の投与4時間後、並びに試験183日（回復期間）に行った。試験中、脳反射及び感覚応答に変化は認められなかった。脊髄下部反射の一過性の減弱が、最高用量である3 mg群動物の一部に認められた。これらの作用には、皮膚反射（左側及び右側）、足の感覚反射（左右）、及び尾の反射における陰性反応が含まれた。発現率は、試験1、29、及び99日でそれぞれ高用量群の17例中2例、17例中6例、及び11例中2例（6例は試験36日の計画中間剖検で屠殺）であった。

体温：本試験では、サルに本薬を反復IT投与した。体温測定を含む身体検査は、試験前、試験1、29、及び99日の投与4時間後、並びに回復期間中（試験183日）に行った。投与に関連する体温への影響は認められなかった。

4.3.3 幼若サルを用いた 53 週間反復投与毒性試験（396443-AS06 試験）

評価資料［4.2.3.2-2］396443-AS06

本試験には 48 例のサルを使用した。投与開始時の動物は約 9～11 ヵ月齢、体重は 1.0～2.0 kg（雌雄）であった。群構成は溶媒対照群（7 例/性）、0.3（5 例/性）、1.0（5 例/性）及び 4.0（7 例/性）mg/回群とした。用法・用量は、負荷投与期（週 1 回、5 回投与）とその後の維持投与期（6

週間ごとに 8 回投与）から構成した。CNS の評価は特に注意し、神経学的検査（一般感覚運動、脳反射、脊髄反射、膝蓋腱反射、足の把握反射）、及び Wisconsin General Testing Appratus（WGTA）を用いた学習能力の試験を含めた。さらに末梢及び中枢神経系への影響を評価するため、Irwin の変法（Irwin 1968）を用いた神経行動学的観察を行った。

本試験では、中枢神経系における急性の毒性所見として、ISIS 396443 の投与に関連する神経学的検査パラメータにおける変化が全般的に 4 mg 群にのみに認められ、当該投与群では脊髄下部反射（膝蓋腱及び足の把握反射）への影響のみが認められた。最も顕著な所見は 4 mg の初回投与後（Day 1）に観察され、4 mg 群の雌 7 例中 4 例、雄 7 例中 1 例に反射の減弱、又は反射の消失が認められた。これら所見はほとんどの場合投与後 48 時間以内に回復した。試験実施期間の後半では、このような神経学的所見は、個々の動物にのみ認められた。

神経行動学的及び学習パラメータに対する ISIS 396443 投与の影響は認められなかった

運動量、行動変化、協調性、感覚/運動反射反応、体温について以下に示す。

運動量：53週間の本試験中の神経行動学的観察で自発運動を評価した（下記「行動変化」で記載した）。

行動変化：神経行動学的影響は、試験前、投与期間の試験29及び53週、及び回復期間の最後の週に評価した。神経行動学的影響は、末梢神経系及び中枢神経系の両活動を評価することができる標準的observation battery（Irwinの変法）を使用して評価した。評価したパラメータは、発声とコミュニケーション、敏捷性、常同行動（頭部を左右に揺らす、旋回行動、繰り返しひっかく等）、グルーミング発現率、攻撃的及び防御的攻撃性姿勢、平衡／協調性、自発運動、振戦／けいれん／筋攣縮、新規視覚刺激に対する追跡、筋緊張、並びに握力であった。

本試験では、投与に関連する神経行動学的変化は認められなかった。

協調性：平衡及び協調性は、53週間の本試験中の神経行動学的観察で評価した（「行動変化」で記載した）。

感覚／運動反射反応：神経学的検査は、試験前、試験1、29、71、197、及び365日（投与の4及び8時間後）、並びに回復期間の最後の週に行った。脊髄下部反射の一過性の減弱が、高用量群（4 mg 投与群）にのみ認められ、影響を受けた脊髄下部反射は、膝蓋腱反射、把握反射、及び肛門反射であった。最も顕著な所見は、試験1日の初回投与後に4 mg投与群の雌7例中4例及び雄7例中1例で認められた反射の消失又は減弱であった。全般に、これらの変化は投与後48時間以内に回復した。

体温：体温測定を含む身体検査は、試験前、試験1、29、71、197、及び365日の投与4及び8時間後、並びに回復期間の最後の週に行った。投与に関連する体温への影響は認められなかった。

学習／記憶能力：各テスト時点（試験25～28週及び試験49～52週）で雌雄のいずれでも学習能力に被験物質投与関連変化は認められなかった。学習テスト結果の要約を表 3、個体別の結果を図35に示す。

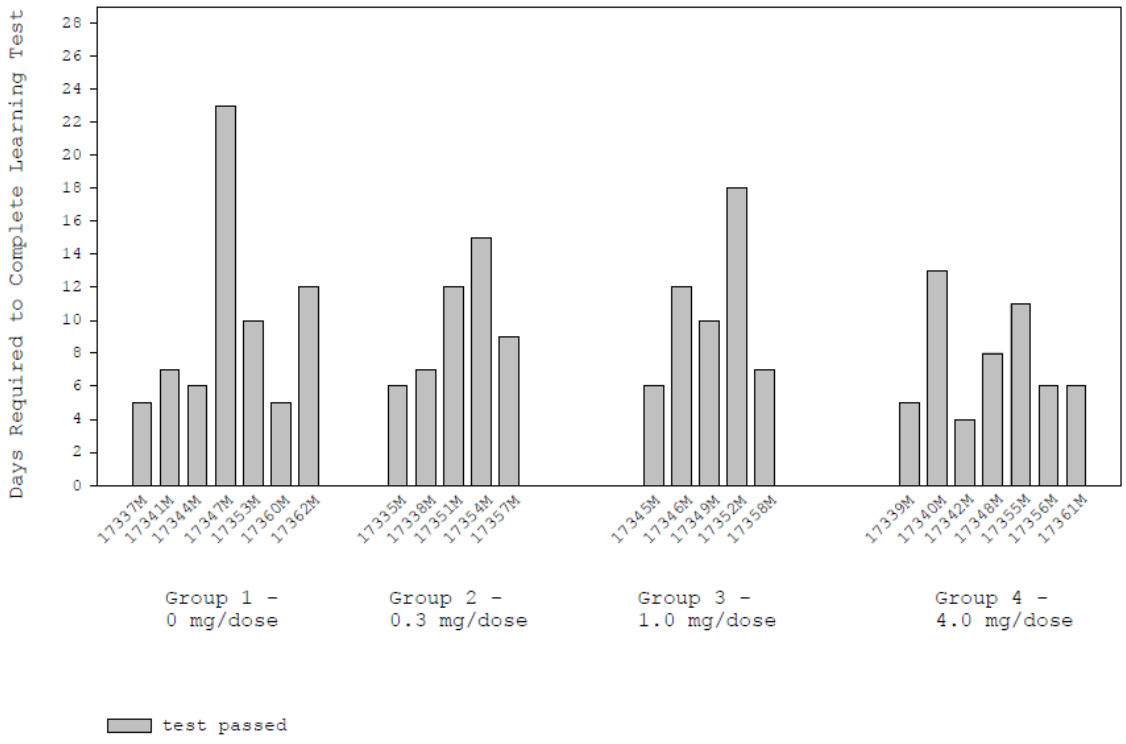
表 3　　学習テストの要約（学習テストの完了に要した日数）

用量	投与前		中間（試験 25～28 週)		投与終了時(試験 49～52 週)	
（mg/回）	雄	雌	雄	雌	雄	雌
0	9.7 (6.4) N=7	12.0 (4.7) N=5	10.4 (5.6) N=7	12.1 (3.3) N=7	6.0 (2.8) N=7	5.3 (2.6) N=7
0.3	9.8 (3.7) N=5	16.8 (6.0) N=4	12.2 (6.8) N=5	11.0 (1.4) N=4	7.4 (3.0) N=5	5.0 (1.0) N=5
1.0	10.6 (4.8) N=5	16.0 (4.4) N=4	16.3 (6.8) N=4	16.8 (3.2) N=4	7.0 (1.9) N=5	4.6 (1.5) N=5
4.0	7.6 (3.3) N=7	11.0 (4.2) N=5	7.3 (2.7) N=6	12.2 (5.6) N=6	9.1 (4.6) N=7	7.2 (3.4) N=6

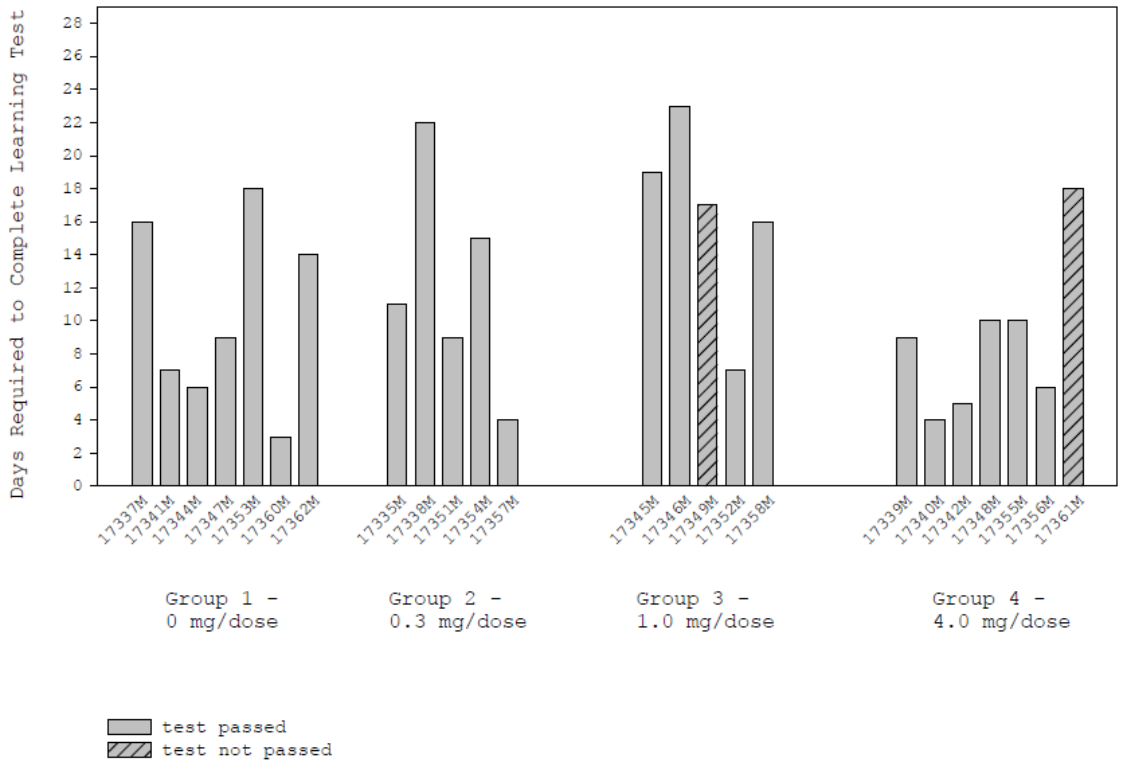
( )　標準偏差
学習テストに合格しなかった動物は要約から除外した。

図 35　　学習テストの個体別の結果

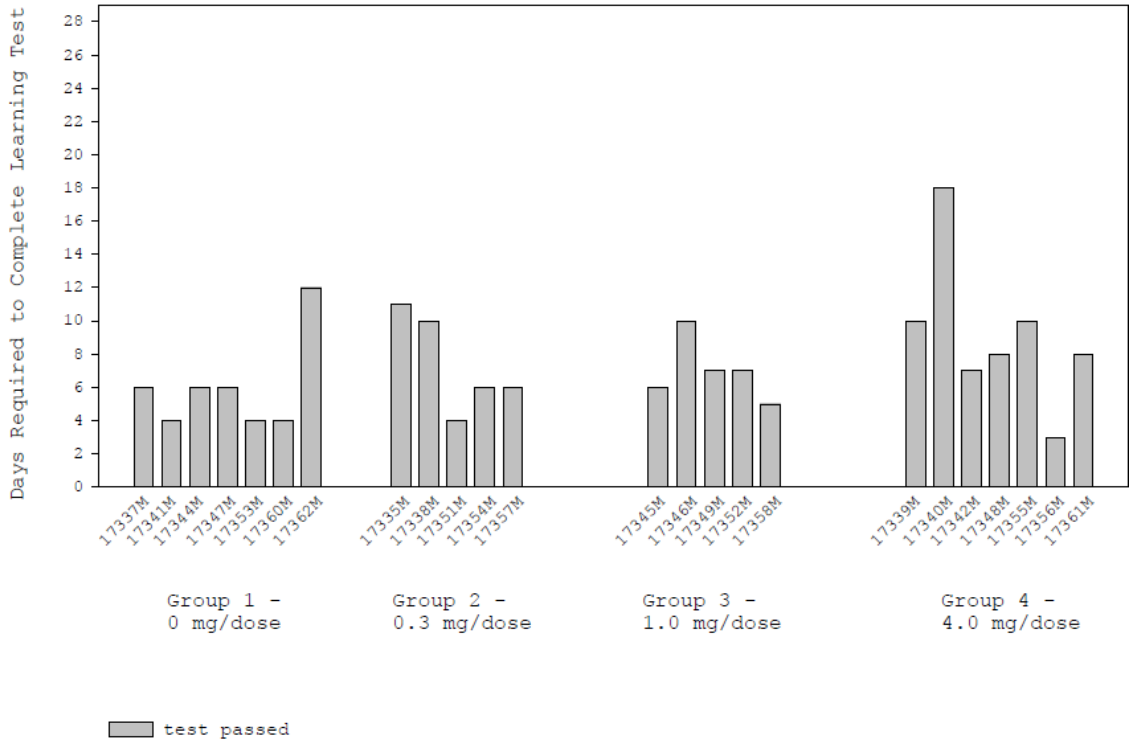
雄、投与前



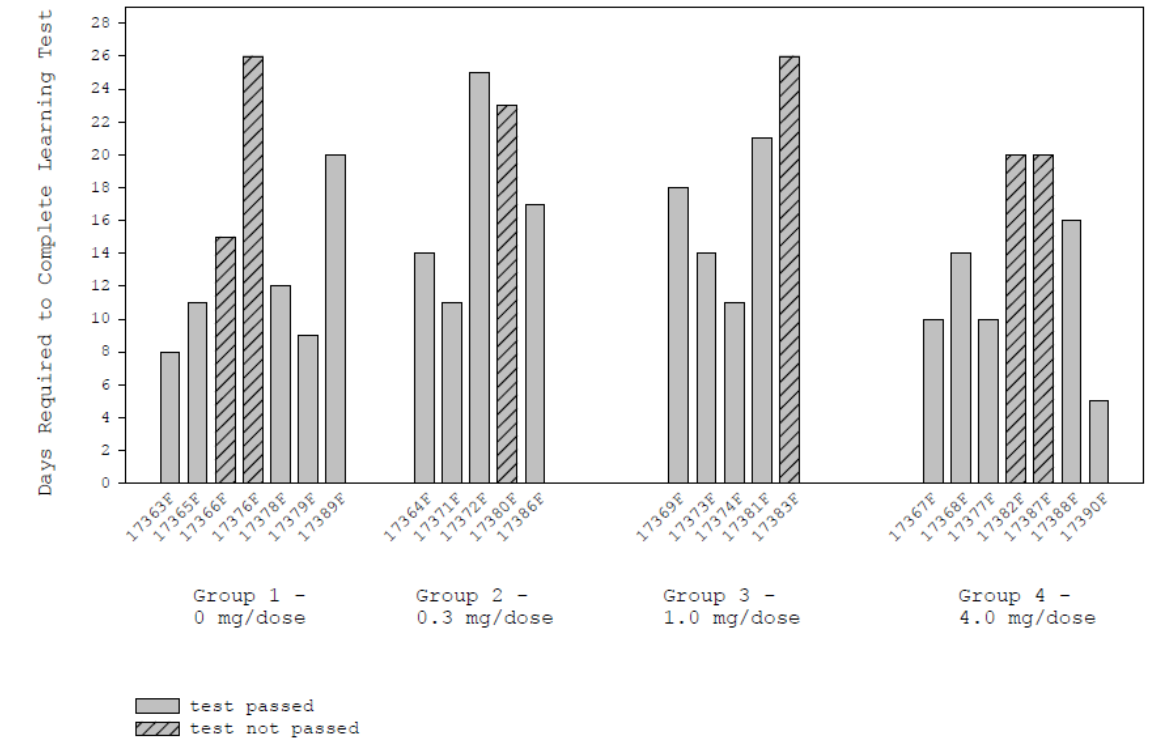
雄、試験 25～28 週



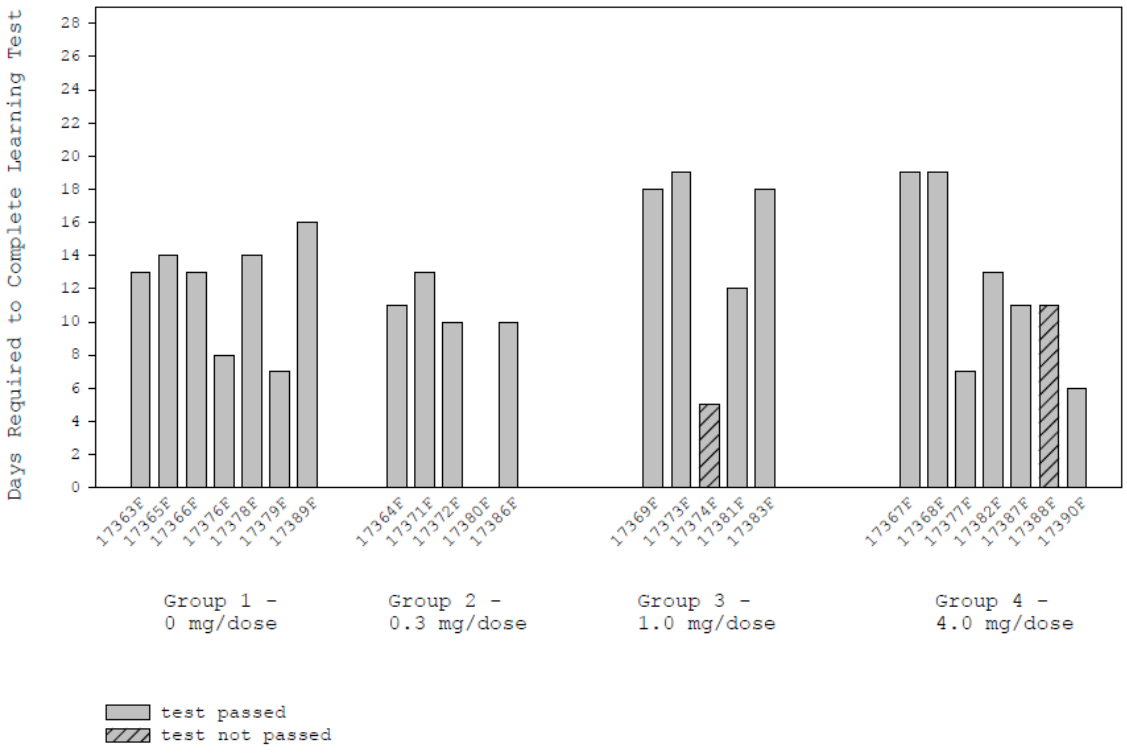
雄、試験 49～52 週



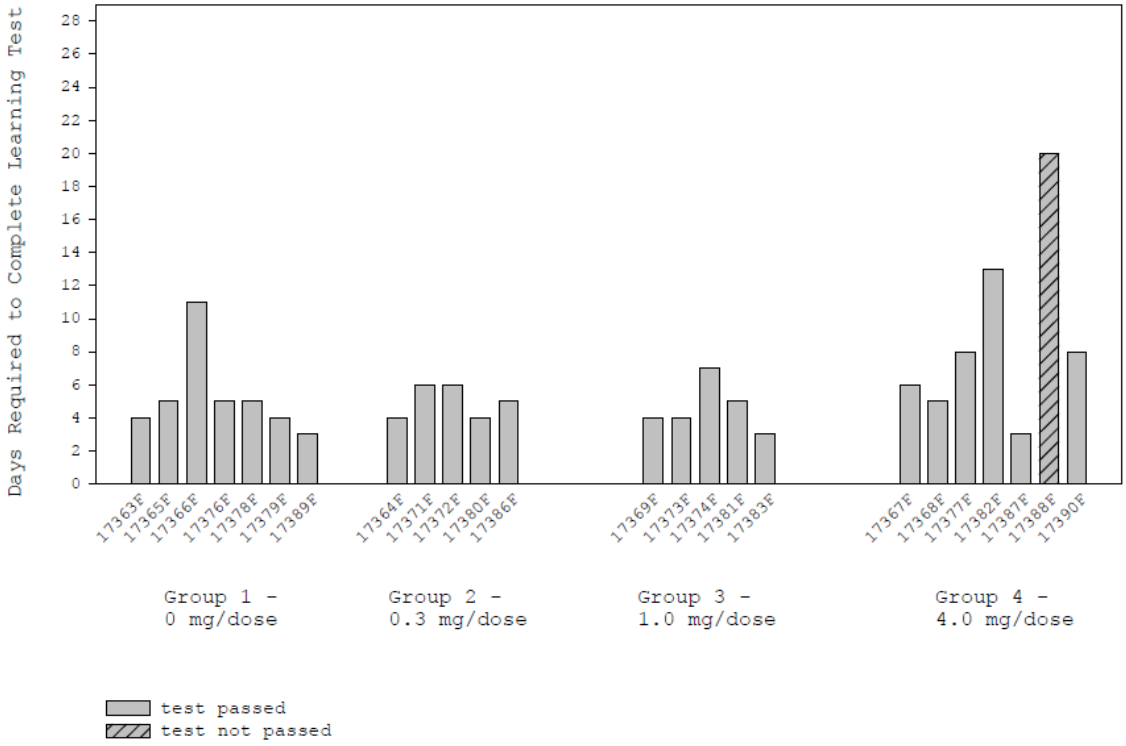
雌、投与前



雌、試験 25～28 週



雌、試験 49～52 週



Data source: M4.2.3.2-2 Figure 8.2

4.4 腎臓への影響

4.4.1 サ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

本試験では、投与量は 1、3 及び 7 mg/回とした。32 例の動物を 3 つの投与群又は溶媒対照群の各群に 2 又は 3 例/性で割付けた。血清生化学的検査の血液試料は、絶食動物の大腿静脈から採取した。血清生化学的検査には標準的な腎機能関連パラメータを含めた。

血清生化学的パラメータにはいずれの用量及び時点でも被験物質投与と関連した影響は認められなかった。試験 8 日の主試験剖検時の雌雄の血清生化学的パラメータに有意差は認められなかった。試験 3、21、57 日、あるいは 71 日に剖検した動物の血清生化学パラメータは、試験 8 日の雌雄の値と同様であった。

4.4.2 幼若サルを用いた 14 週間複数回腰部 IT ボーラス投与毒性試験（396443-AS03 試験）

評価資料［4.2.3.2-1］396443-AS03

初回投与時のカニクイザルの月齢は 9～10 ヵ月齢、体重は 1.0～1.6 kg であった。投与量は 0.3、1 及び 3 mg/回であり、投与には留置したカテーテルを介したスローボーラス投与を用いた。66 例の動物（雄 31 例、雌 35 例）を 3 つの投与群又は溶媒対照群の各群に各剖検時点で 2～4 例/性

で割付けた。0.3 mg 及び 1 mg 投与動物には、週 1 回を 5 回の負荷用量を投与し、その後 IT 投与を隔週で 5 回以上行った。最高用量である 3 mg/回群動物には、週 1 回を 15 週間で 45 mg の累積投与量を IT 投与した。血清生化学的検査の血液試料は、投与前、試験 36 日（5 回目投与の 7 日後）、試験 106 日（投与終了時の 7 日後）、及び試験 183 日（回復期）に絶食動物の大腿静脈から採取した。血清生化学的検査には標準的な腎機能関連パラメータを含めた。

血清生化学的パラメータにはいずれの用量及び時点でも被験物質投与と関連した影響は認められなかった。

尿検査試料は、投与前、試験 31 日（5 回目投与の 2 日後）、59 日（早期剖検動物のみ）、101 日（投与終了時の 2 日後）、及び試験 26 週（回復期剖検前の試験 178 日）に採取した。尿検査パラメータに被験物質投与と関連した影響は認められなかった。

4.4.3 幼若サルを用いた 53 週間反復投与毒性試験（396443-AS06 試験）

評価資料［4.2.3.2-2］396443-AS06

本試験には 48 例のサルを使用した。投与開始時の動物は約 9～11 ヵ月齢、体重は 1.0～2.0 kg（雌雄）であった。群構成は溶媒対照群（7 例/性）、0.3（5 例/性）、1.0（5 例/性）及び 4.0（7 例/性）mg/回群とした。用法・用量は、負荷投与期（週 1 回、5 回投与）とその後の維持投与期（6 週間ごとに 8 回投与）から構成した。

血清生化学的検査の血液試料は、投与開始前期間中に 1 回、投与期間中の試験 36 日（試験 29 日の投与の 7 日後）、120 日（試験 113 日の投与の 7 日後）、試験 204 日（試験 197 日の投与の 7 日後）、試験 288 日（試験 281 日の投与の 7 日後）、並びに回復期中の試験 456 及び 554 日の生存動物全例から採取した。血清生化学的パラメータに被験物質投与と関連した影響は認められなかった。

尿検査試料は、投与開始前期間中に 1 回、投与期間中の試験 6 及び 52 週、並びに回復期の最後の週の生存動物全例から採取した。尿検査パラメータに被験物質投与と関連した影響は認められなかった。

5　　薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験は、これまで実施されていない。

6 考察及び結論

非臨床薬理試験では、ISIS 396443 は *SMN2* のスプライシングを調整し、全長 SMN タンパク質をコードする mRNA を生成することが示された。ヒト *SMN2* 導入遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにおいて、ISIS 396443 は適切に SMN の発現を誘導し、その生存期間と機能を有意に改善させた。この作用から、SMN1 の喪失に起因する SMA 患者に対する ISIS 396443 の使用の妥当性が裏付けられる。

ISIS 396443 は、ヒト *SMN2* 遺伝子から転写された mRNA 前駆体のイントロン 7 の、イントロンスプライシングサイレンサー領域に特異的に結合する完全修飾オリゴヌクレオチドである。*SMN2* のエクソン 7 は、*SMN1* のエクソン 7 と 1 塩基のみが異なっている。通常、この差異がエクソン 7 の効率的な含有を阻害している。しかし、SMN2 転写産物にエクソン 7 が含まれる場合の生成タンパク質は、*SMN1* 遺伝子による生成タンパク質と同一のものである。したがって、SMN2 転写産物のエクソン 7 の効率的スプライシングが誘導できれば、細胞は十分な量の SMN タンパク質を産生すると考えられる。

前述の *in vitro* 試験では、ISIS 396443 は *SMN2* の mRNA 前駆体と効率的に結合することが示された。mRNA 前駆体に結合した ISIS 396443 は、リボ核タンパク質である hnRNPA1 を置換し、エクソン 7 の含有をもたらす。この置換により効率的にエクソン 7 が含有され、SMA 患者の線維芽細胞ではエクソン 7 含有率は 90%を上回った。さらに、ISIS 396443 で処理した細胞では SMN タンパク質の発現が増加し、SMN タンパク質を必要とする核内の構造体である Gems の形成も増加した。1 つ懸念されるのは、mRNA 前駆体に結合したオリゴヌクレオチドが効率的な翻訳を妨げる可能性である。しかし、SMN タンパク質の存在は、ISIS 396443 はスプライシングされた *SMN2* の翻訳に干渉しないことを示唆している。

ASO の特異性は、コンピューター解析（*in silico*）により評価された。オリゴヌクレオチドの結合は、主にワトソン・クリック塩基対を形成することにより生じることから、ヒトゲノムを検索することは、副次的標的を同定するための可能性の高い効率的な方法である。このような分析で同定できたのは、連続で 17 塩基未満が一致する配列のみであった。連続で 15 塩基が一致する標的と思われる配列がいくつか同定されたが、これらは、制御配列から遠いイントロン領域の深部に位置する、あるいはバイオインフォマティクスによる仮想の遺伝子であることから、これらは転写されることはないと考えられた。オリゴヌクレオチドの効力は、ミスマッチ数が増えると急速に低下する。以上のように、ヒトゲノムでさらなる標的が同定されていないことから、ISIS 396443 の特異性が裏付けられた。これらの結果は、標的以外の特異的遺伝子に起因する安全性所見が認められないこととも整合している。

非臨床 *in vivo* 試験では、ISIS 396443 が *SMN2* の発現を強力に誘導し、SMA マウスモデルに有用な作用を及ぼすことが示された。軽度 SMA のマウスモデルでは、ISIS 396443 の ICV 投与により CNS 組織でのエクソン 7 の含有率が 90%を上回り、運動ニューロンでの SMN タンパク質の産生が増加した。

ISIS 396443 の有効性は、いくつかの SMA モデルで示された。マウスをはじめ、ヒトを除くすべての動物種は *SMN2* を持たないため、有効性の評価に使用できる動物は、遺伝子組み替えマウ

スのみである。マウスにおいて SMA をモデル化するため、マウスの *Smn* 遺伝子を欠失させ、ヒト *SMN2* の様々なコピーを発現させている。各モデルには、それぞれ特定の長所がある（Edens 2015）。

ISIS 396443 の試験に使用した最も重症なマウスモデルは、Δ7 モデルである（Monani 2003）。これらのマウスは、小さく生まれ、非常に寿命が短い。当該マウスモデルの生存期間、運動機能及び体重を増加させるには、単回の ICV 投与で十分であった。生存期間は、用量依存的に延長した。生存期間の延長は、神経筋接合部（NMJ）及び骨格筋組織の組織学的所見の改善を伴っていた。SMA は主に運動系の疾患であることから、この知見は特に興味深い。

ISIS 396443 の CNS 組織への投与で観察されたすべての症状の改善において、その回復は部分的であった。投与を受けたマウスでも、生存期間は依然として短く、生存期間の中央値は 30 日未満であった。このことは、SMA マウスモデルで認められる著しい末梢組織の病態に起因する可能性が高い。実際に ISIS 396443 を末梢組織及び CNS 組織の両方に投与すると、生存期間の中央値は 150 日超まで延長した。骨格筋線維、心臓重量及び運動成績を含む複数の組織学的及び機能的測定値も同様に改善した。これらのデータは、ISIS 396443 の *in vivo* での薬理作用を強く裏付けている。しかし、ICV 投与の試験結果をヒトに外挿することについては注意が必要である。上述のとおり、重症 SMA マウスはヒトよりも多くの末梢組織における病態がみられる。特に、重症 SMA マウスは著しい心萎縮を呈するが、ヒトではこのような所見は認められない。末梢組織への投与により心臓重量が改善するが、CNS 組織への投与ではこのような効果は期待されない。よって、ISIS 396443 の薬理作用は、末梢組織への投与でも有用であることは裏付けられているが、現時点では ISIS 396443 の患者への全身投与を支持するものではない。

Δ7 モデルが重症モデルであることから、ISIS 396443 の薬動力学反応の検討試験での本モデルの有用性は少ない。これらの試験では、SMN2 トランスジェニックマウスモデル（*SMN*$^{-/-}$; *hSMN2*$^{2TG/2TG}$）及び C/C マウスモデルなど、より軽症のマウスモデルが使用された。これらのモデルは、投与経路、分布及び作用期間を検討するためにも用いられた。

非臨床薬理試験により、CNS 組織へのボーラス投与及び適切な投与手段の使用も裏付けられた。オリゴヌクレオチドは、成熟動物の血液脳関門を通過しにくいため、CNS 組織への投与が必要となる。マウスでは、CNS 組織への投与は、ICV ボーラス投与又は ICV 持続投与のいずれかにより実施可能である。より大きな動物種では、腰髄近辺での髄腔内投与が技術的に可能であるが、ボーラス投与、又は持続投与のいずれにすべきかという課題は残っている。マウスでは、ボーラス投与と持続投与間での投与速度の違いはオリゴヌクレオチドの分布にほとんど影響を及ぼさなかった。また、投与速度は SMN2 タンパク質誘導のパターンを変化させることもなかった。しかし、効力はこれら 2 つの投与法で明らかに異なる。EC_{50} は、脊髄への ICV 持続投与では 9.3 µg/g であったのに対し、ICV ボーラス投与では 1.6 µg/g であった。脳に投与した場合、及び ED_{50} 値について、同様な傾向が認められた。このことから、CNS 組織へのボーラス投与が好ましい投与経路であることが裏付けられた。

ISIS 396443 の ICV 投与により、SMN2 発現が長期間誘導される。単回 100 µg 投与では、少なくとも 36 週後までは SMN2 が検出可能であった。CNS における薬物濃度の分析から、CNS 組織中での半減期は約 70～140 日と推定され、長期的な薬理作用が裏付けられた。ISIS 396443 の薬物

動態のより詳細な分析については、薬物動態の項に記載しており、これらのデータはマウスでの作用持続期間を裏付けるものである。

安全性薬理パラメータは、サルを用いた ISIS 396443 の反復投与毒性試験（ECG 及び CNS への影響の評価）及びラットでの持続 IT 投与試験で評価した。これらの試験のいずれでも、ISIS 396443 の心血管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。安全性薬理パラメータに関する唯一の所見は、毒性試験で 3 mg 以上の IT スローボーラス投与後に認められた脊髄下部反射の一過性の低下であった。

要約すると、非臨床薬理試験の結果より、SMA 治療における ISIS 396443 を使用の妥当性が裏付けられた。ISIS 396443 は、*SMN2* mRNA 前駆体のイントロン領域に結合し、発現が失われると SMA を引き起こす SMN タンパク質の発現を増加させる。複数のマウスモデルで示されたこれらの試験結果により、臨床における投与経路、用量、及び投与頻度が裏付けられた。また、安全性薬理試験の結果により、臨床試験で使用する用量が裏付けられた。

7 図表

本文中に記載。

8 参考文献

Altmann KH, Fabbro D, Dean NM, Geiger T, Monia BP, Muller M, et al. Second-generation antisense oligonucleotides: structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors. Biochemical Society Transactions. 1996;24:630-7.

Arai H, Tanabe Y, Hachiya Y, Otsuka E, Kumada S, Furushima W, et al. Finger cold-induced vasodilatation, sympathetic skin response, and R-R interval variation in patients with progressive spinal muscular atrophy. J Child Neurol. 2005;20(11):871-5.

Araujo Ap, Araujo M, Swoboda KJ. Vascular perfusion abnormalities in infants with spinal muscular atrophy. J Pediatr. 2009;155(2):292-4.

Bauman, J., Jearawiriyapaisarn, N., and Kole, R. Therapeutic potential of splice-switching oligonucleotides. Oligonucleotides. 2009;19:1-13.

Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2010;50:259-93.

Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. Nat Rev Neurol. 2010;6(3):131-44.

Butler M, Stecker K, Bennett CF. Cellular distribution of phosphorothioate oligodeoxynucleotides in normal rodent tissues. Lab Invest. 1997;77:379-88.

Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR. Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. Am J Hum Genet. 2006;78(1):63-77.

Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet. 1997;6:1205-14.

Dominski Z, Kole R. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1993;90,:8673-7.

Edens BM, Ajroud-Driss S, Ma L, Ma YC. Molecular mechanisms and animal models of spinal muscular atrophy. Biochim Biophys Acta. 2015;1852(4):685-92.

Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time light Cycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. Am J Hum Genet. 2002; 70(2): 358-68.

Feng W, Gubitz AK, Wan L, Battle DJ, Dostie J, Golembe TJ,et al. Gemins modulate the expression and activity of the SMN complex. Hum Mol Genet. 2005;14(12):1605-11.

Firth SM, Ganeshprasad U, Baxter RC. Structural determinants of ligand and cell surface binding of insulin-like growth factor-binding protein-3. J Biol Chem. 1998;273(5):2631-8.

Fong LG, Vickers TA, Farber EA, Choi C, Yun UJ, Hu Y, et al. Activating the synthesis of progerin, the

mutant prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, with antisense oligonucleotides. Hum Mol Genet. 2009;18(13):2462-71.

Gubitz AK, Feng W, Dreyfuss G. The SMN complex. Exp Cell Res. 2004;296(1):51-6.

Hachiya Y, Arai H, Hayashi M, Kumada S, Furushima W, Ohtsuka E, et al. Autonomic dysfunction in cases of spinal muscular atrophy type 1 with long survival. Brain Dev. 2005;27(8):574-8.

Heier CR, Satta R, Lutz C, DiDonato CJ. Arrhythmia and cardiac defects are a feature of spinal muscular atrophy model mice. Human molecular genetics 2010;19, 3906-18.

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, Liu YH, Sahashi K, Rigo F, Bennett CF, Krainer AR　Motor neuron cell-nonautonomous rescue of spinal muscular atrophy phenotypes in mild and severe transgenic mouse models. Genes Dev. 2015;29(3):288-97.

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):1634-44..

Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF, et al. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. Nature. 2011;478(7367):123-6.

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

Hua Y, Vickers T., Okunola HL, Bennett 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.

Hung G, Xiao X, Peralta R, Bhattacharjee G, Murray S, Norris D, et al.Characterization of target mRNA reduction through in situ RNA hybridization in multiple organ systems following systemic antisense treatment in animals. Nucleic Acid Ther. 2013;23(6):369-78.

Iascone D., Henderson CE, Lee JC. Spinal muscular atrophy: from tissue specificity to therapeutic strategies. F1000Prime Rep. 2015 5;7:04.

Ince SW. Pathology of motor neuron disorders. In Motor Neuron Disorder, P.J. Strong, and M.J. Strong, eds. (Philadelphia, PA: Butterworth Heinemann), pp. 17-49 (2003).

Irwin S. Comprehensive Observational Assessment: 1a. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioural and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia. 1968;13: 222-257.

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;69:49-60.

Kole R, Ram Shukla RR, Akhtar S. Pre-mRNA splicing as a target for antisense oligonucleotides.

Advanced Drug Delivery Reviews, 6 1991:271-86.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. 2009;10(3):R25.

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, Burlet P, Liu Q, Bertrandy S, Clermont O, Munnich A, Dryfuss G, Melki J. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. Nat Genet 1997; 16: 265-9.

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.

Lima WF, Wu H, Nichols JG, Sun H, Murray HM, Crooke ST. Binding and cleavage specificities of human Argonaute2. J Biol Chem. 2009;284(38):26017-28.

Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. EMBO J. 1996;15(14):3555-65.

Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(2):108-21.

McKay RA, Miraglia LJ, Cummins LL, Owens SR, Sasmor H, Dean NM. Characterization of a potent and specific class of antisense oligonucleotide inhibitor of human protein kinase C-alpha expression. J Biol Chem. 1999;274(3):1715-22.

McMullen JR, Shioi T, Huang WY, Zhang L, Tarnavski O, Bisping E, et al. The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. J Biol Chem. 2004;279(6):4782-93.

Mentis GZ, Blivis D, Liu W, Drobac E, Crowder ME, Kong L, et al. Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy. Neuron.2011;69(3):453-67.

Mollenhauer B, Locascio JJ, Schulz-Schaeffer W, Sixel-Döring F, Trenkwalder C Schlossmacher MG. α-Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. Lancet Neurol. 2011;10(3):230-40.

Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. Hum Mol Genet. 1999;8(7):1177-83.

Monani UR, Pastore MT, Gavrilina TO, Jablonka S, Le TT, Andreassi C, et al. A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy. J Cell Biol. 2003;160(1):41-52.

O'Kusky JR, Ye P, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. J Neurosci. 2000;20(22):8435-42.

Park GH, Maeno-Hikichi Y, Awano T, Landmesser LT, Monani UR. Reduced survival of motor neuron (SMN) protein in motor neuronal progenitors functions cell autonomously to cause spinal muscular atrophy in model mice expressing the human centromeric (SMN2) gene. J Neurosci. 2010;30(36):12005-19.

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.

Prior TW, Swoboda KJ, Scott HD, Hejmanowski AQ. Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. Am J Med Genet Part A. 2004;130A:307-10.

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.

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

Rochette CF, Gilbert N, Simard LR. SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. Hum Genet. 2001;108(3):255-66.

Rudnik-Schöneborn S, Heller R, Berg C, Betzler C, Grimm T, Eggermann T,et al, Congenital heart disease is a feature of severe infantile spinal muscular atrophy. J Med Genet. 2008;45(10):635-8.

Shababi M, Habibi J, Yang HT, Vale SM, Sewell WA, Lorson CL. Cardiac defects contribute to the pathology of spinal muscular atrophy models. Hum Mol Genet. 2010;19(20):4059-71.

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 Acid Res. 2007;35(2):371-89.

Spiegel R, Hagmann A, Boltshauser E, Moser H. [Molecular genetic diagnosis and deletion analysis in Type I-III spinal muscular atrophy]. Schweiz Med. Wochenschr. 1996;126(21):907-14.

Taylor JK, Zhang QQ, Wyatt JR, Dean NM. Induction of endogenous Bcl-xS through the control of Bcl-x pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides. Nat Biotechnol. 1999;17(11):1097-100.

Vickers TA, Zhang H, Graham MJ, Lemonidis KM, Zhao C, Dean NM. Modification of MyD88 mRNA splicing and inhibition of IL-1beta signaling in cell culture and in mice with a 2'-O-methoxyethyl-modified oligonucleotide. J Immunol. 2006;176(6):3652-61.

Wan L, Battle DJ, Yong J, Gubitz AK, Kolb SJ, Wang J, et al. The survival of motor neurons protein determines the capacity for snRNP assembly: biochemical deficiency in spinal muscular atrophy. Mol Cell

Biol. 2005;25(13):5543-51.

Wheeler TM, Leger AJ, Pandey SK, MacLeod AR, Nakamori M, Cheng SH, et al. Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. Nature. 2012;488(7409):111-5.

Wild EJ, Boggio R, Langbehn D, Robertson N, Haider S, Miller JR, et al. Quantification of mutant huntingtin protein in cerebrospinal fluid from Huntington's disease patients. J Clin Invest. 2015;125(5):1979-86.

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. J. Neurosci. 2009;29(24):7633-8.

Winer L, Srinivasan D, Chun S, Lacomis D, Jaffa M, Fagan A, et al. SOD1 in cerebral spinal fluid as a pharmacodynamic marker for antisense oligonucleotide therapy. JAMA Neurol. 2013;70(2):201-7.

Wu Y, Sun H, Yakar S, LeRoith D. Elevated levels of insulin-like growth factor (IGF)-I in serum rescue the severe growth retardation of IGF-I null mice. Endocrinology 2009;150(9):4395-4403.

Yu RZ, Lemonidis KM, Graham MJ, Matson J.E, Crooke RM, Tribble DL, et al. Cross-species comparison of in vivo PK/PD relationships for second-generation antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein B-100. Biochem Pharmacol. 2009;77(5):910-9.

スピンラザ髄注 12 mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

1 薬理試験：一覧表 3
1.1 薬理試験一覧表 3
2 効力を裏付ける試験 6
3 副次的薬理試験 7
4 安全性薬理試験 8
4.1 安全性薬理試験の概要 8
4.1.1 安全性薬理試験の概要（安全域） 12
4.1.1.1 中枢神経系 12
4.1.1.2 心血管系 13
4.1.1.3 呼吸系 13
4.1.1.4 腎臓系 14
4.2 アルビノラットを用いた持続髄腔内注入による ISIS 396443 の呼吸系及び心血管系に対する安全性の評価（396443-AS04 試験） 15
4.3 成熟サルを用いた単回投与毒性試験（396443-AS01） 18
4.4 幼若カニクイザルを用いた 14 週間毒性試験（396443-AS03） 20
4.5 幼若カニクイザルを用いた 53 週間毒性試験（396443-AS06 試験） 23
5 薬力学的薬物相互作用試験 28

1 薬理試験：一覧表

1.1 薬理試験一覧表

概要			被験物質：ISIS 396443		
試験の種類	試験システム（細胞種、動物種など）	投与方法	試験施設	試験番号	CTD での記載箇所
効力を裏付ける試験					
SMN2 遺伝子のイントロン 6 及び 7 のエクソン領域に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドの *in vitro* スクリーニング	*In Vitro*： SMA 患者の線維芽細胞	該当なし	Isis Pharmaceuticals	ISIS 396443-NP01	4.2.1.1-1
SMA 患者の線維芽細胞における Gems の産生に及ぼす ISIS 396443 の効果	*In Vitro*： SMA 患者の線維芽細胞	該当なし	Isis Pharmaceuticals	ISIS 396443-NP02	4.2.1.1-2
ISIS 396443 の作用機序	*In Vitro*： 非 SMA 患者の細胞（HeLa 細胞）、SMA 患者の線維芽細胞及び無細胞系	該当なし	Isis Pharmaceuticals	ISIS 396443-NP03	4.2.1.1-3
ヒト *SMN2* 遺伝子組換えマウスにおける ISIS 396443 の薬力学及び薬物動態	動物種／系統：マウス／ヒト *SMN2* 遺伝子導入	脳室内投与	Isis Pharmaceuticals	ISIS 396443-NP04	4.2.1.1-4

1.1 薬理試験一覧表（続き）

概要			被験物質：ISIS 396443		
試験の種類	試験系（細胞種、動物種など）	投与方法	試験施設	試験番号	CTD での記載箇所
ISS-N1 を標的とする 2’-OMe 及び morpholino ASO と ISIS 396443 の活性の比較	動物種／系統：SMA 患者の線維芽細胞 マウス／ヒト *SMN2* 遺伝子組換え	脳室内投与	Isis Pharmaceuticals	ISIS 396443-NP05	4.2.1.1-5
ヒト *SMN2* 遺伝子組換えマウスから得た CSF 中の SMN タンパク質に対する ASO 投与の影響	動物種／系統：マウス／ヒト *SMN2* 組換え	脳室内投与	Isis Pharmaceuticals 及び [redacted]	ISIS 396443-NP06	4.2.1.1-6
安全性薬理試験					
カニクイザルを用いた腰椎髄腔内緩徐ボーラス投与による ISIS 396443 の単回投与毒性及び薬物動態試験	動物種／系統：サル／カニクイ	腰椎髄腔内ボーラス投与 - 単回投与	[redacted]	396443-AS01	4.2.3.1-1

1.1 薬理試験一覧表（続き）

概要			被験物質：ISIS 396443		
試験の種類	動物種	投与方法	試験施設	試験番号	CTD 参照項
幼若カニクイザルを用いた ISIS 396443 の 14 週間複数回腰部 IT ボーラス投与毒性試験:4 週間中間剖検及び 12 週間回復試験	動物種／系統：サル／カニクイ	腰椎髄腔内ボーラス-反復投与	[redacted]	396443-AS03	4.2.3.2-1
アルビノラットを用いた持続髄腔内注入による ISIS 396443 の呼吸系及び心血管系に対する安全性の評価	動物種／系統：ラット／SD	持続腰部髄腔内注入	[redacted]	396443-AS04	4.2.1.3-1
幼若カニクイザルを用いた ISIS 396443 の 1 年間（53 週間）反復投与毒性試験及び26週間回復期間の試験	動物種／系統：サル／カニクイ	腰椎髄腔内ボーラス投与 - 反復投与	[redacted]	396443-AS06	4.2.3.2-2

2　　効力を裏付ける試験

当該試験概要は M 2.6.2、2 項に記載。

3　　副次的薬理試験

当該試験概要は、M2.6.2 3 項に記載。

4 安全性薬理試験

4.1 安全性薬理試験の概要

				被験物質：ISIS 396443			
評価器官系	動物種／系統	投与方法	用量	各群の雌雄動物数	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
呼吸器系／ 心血管系	ラット／SD	持続腰椎髄腔内注入	0, 0.02, 0.06, 0.2 mg/日	雄 8 匹	投与に関連した所見なし	適	396443-AS04
	サル／カニクイ	腰椎髄腔内ボーラス投与 – 単回投与	0,1,3,7 mg/回	雄 2 匹／雌 2 匹（0 mg） 雄 3 匹／雌 3 匹（1,3,7 mg）	投与に関連した所見無し	適	39644-AS01
	サル／カニクイ	腰椎髄腔内ボーラス投与 - 反復投与	0, 0.3, 1, 3 mg/回	中間評価： 雄 3 匹／雌 3 匹 毒性評価： 雄 3 匹／雌 4 匹（0, 0.3, 1 mg）； 雄 4 匹／雌 4 匹（3 mg） 回復評価： 雄 2 匹／雌 2 匹(0, 3 mg のみ)	投与に関連した所見なし	適	396443-AS03

4.1 安全性薬理試験の概要（**続き**）

				被験物質：ISIS 396443			
評価器官系	動物種／系統	投与方法	用量	各群の雌雄動物数	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
心血管系	サル／カニクイ	腰椎髄腔内ボーラス投与 - 反復投与	0, 0.3, 1, 4 mg/回	毒性評価： 雄 5 匹／雌 5 匹 回復評価： 雄 2 匹／雌 2 匹(0, 4 mg のみ)	投与に関連した所見なし	適	396443-AS06

4.1 安全性薬理試験の概要（続き）

				被験物質：ISIS 396443			
評価器官系	動物種／系統	投与方法	用量	各群の雌雄動物数	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
腎臓系	サル／カニクイ	腰椎髄腔内ボーラス投与 - 単回投与	0, 1, 3, 7 mg/回	雄 2 匹／雌 2 匹（0 mg）； 雄 3 匹／雌 3 匹（1, 3, 7 mg）	投与に関連した所見なし	適	396443-AS01
	サル／カニクイ	腰椎髄腔内ボーラス投与 - 反復投与	0, 0.3, 1, 3 mg/回	中間評価： 雄 3 匹／雌 3 匹 毒性評価： 雄 3 匹／雌 4 匹（0, 0.3, 1 mg）； 雄 4 匹／雌 4 匹（3 mg） 回復評価： 雄 2 匹／雌 2 匹(0, 3 mg のみ)	投与に関連した所見なし	適	396443-AS03
	サル／カニクイ	腰椎髄腔内ボーラス投与 - 反復投与	0, 0.3, 1, 4 mg/回	毒性評価： 雄 5 匹／雌 5 匹 回復評価： 雄 2 匹／雌 2 匹(0, 4 mg のみ)	投与に関連した所見なし	適	396443-AS06

4.1 安全性薬理試験の概要（続き）

				被験物質：ISIS 396443			
評価器官系	動物種／系統	投与方法	用量	各群の雌雄動物数	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
中枢神経系	サル／カニクイ	腰椎髄腔内ボーラス投与 - 単回投与	0, 1, 3, 7 mg	雄 2 匹／雌 2 匹（0 mg）； 雄 3 匹／雌 3 匹（1, 3, 7 mg）	急性で一過性の脊髄下部反射低下が散見	適	396443-AS01
	サル／カニクイ	腰椎髄腔内ボーラス投与 - 反復投与	0, 0.3, 1, 3 mg/回	中間評価： 雄 3 匹／雌 3 匹 毒性評価： 雄 3 匹／雌 4 匹（0, 0.3, 1 mg）； 雄 4 匹／雌 4 匹（3 mg） 回復評価： 雄 2 匹／雌 2 匹(0, 3 mg のみ)	急性で一過性の脊髄下部反射低下が散見	適	396443-AS03
	サル／カニクイ	腰椎髄腔内ボーラス投与 - 反復投与	0, 0.3, 1, 4 mg/回	毒性評価： 雄 5 匹／雌 5 匹 回復評価： 雄 2 匹／雌 2 匹(0, 4 mg のみ)	急性で一過性の脊髄下部反射低下が散見	適	396443-AS06

4.1.1　安全性薬理試験の概要（安全域）

4.1.1.1　　中枢神経系

試験番号	認められた所見	無影響量（中枢神経系）			安全域（ヒト等価量に対する比率）[a]	
		投与量	累積投与量	脳脊髄液中 C_{max}（μg/mL）	累積年間投与量（36 mg）	脳脊髄液中 C_{max} (59.6 μg/mL)[b]
396443-AS01	7 mg: 皮膚反射及び尾の反射の低下	3 mg	NA	592	NA	9.9 倍
396443-AS03	3 mg: 脊髄下部反射の低下	1 mg	10 mg	197[c]	2.8 倍 (100 mg/36 mg)	3.3 倍
396443-AS06	4 mg: 反射の減弱又は消失	1 mg	13 mg	197[c]	3.6 倍 (130 mg/36 mg)	3.3 倍

NA: not applicable (単回投与試験のため該当せず)
a ヒト等価用量は、サルとヒトでの CSF 量の違いに基づく 10 倍のスケーリングファクターを用いて算定した。
b C_{max} は母集団薬物動態モデル（4 ヵ月毎の維持投与を受けたすべての年齢群での平均値）を用いて得た定常状態での推定値。
c 単回投与試験での薬物動態の直線性に基づき外挿して得た値

4.1.1.2 心血管系

試験番号	認められた所見	無影響量（心血管系）			安全域	
		投与量	血漿中曝露量		血漿中曝露量	
			C_{max} (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (hr* μg/mL)	C_{max} (1.36 μg/ml)[a]	$AUC_{0\text{-}24h}$ (10.0 hr*μg/mL)[b]
396443-AS04	投与に関連した所見なし	0.2 mg	ND	ND	NA	NA
396443-AS01	投与に関連した所見なし	7 mg	2.6	14.6	1.9 倍	1.5 倍
396443-AS03	投与に関連した所見なし	3 mg	1.97	12	1.4 倍	1.2 倍
396443-AS06	投与に関連した所見なし	4 mg	3.74	22.8	2.8 倍	2.3 倍

ND: not determined（値は得られなかった）
NA: not applicable（該当せず）
a 平均血漿中 C_{max} (C_{max} の最大値は CS3B 試験での 0～3 ヵ月齢の乳児に認められた)。
b CS3B 試験の 0～3 ヵ月齢の乳児（N = 11）に 12 mg を初回投与後の平均血漿中 $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ 値。

4.1.1.3 呼吸系

試験番号	認められた所見	無影響量（呼吸系）			安全域	
		投与量	血漿中曝露量		血漿中曝露量	
			C_{max} (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (hr* μg/mL)	C_{max} (1.36 μg/ml)[a]	$AUC_{0\text{-}24h}$ (10.0 hr*μg/mL)[b]
396443-AS04	投与に関連した所見なし	0.2 mg	ND	ND	NA	NA
396443-AS01	投与に関連した所見なし	7 mg	2.6	14.6	1.9 倍	1.5 倍
396443-AS03	投与に関連した所見なし	3 mg	1.97	12	1.4 倍	1.2 倍

ND: not determined（値は得られなかった）
NA: not applicable（該当せず）
a 平均血漿中 C_{max} (C_{max} の最大値は CS3B 試験での 0～3 ヵ月齢の乳児に認められた)。

b CS3B 試験の 0～3 ヵ月齢の乳児（N = 11）に 12 mg を初回投与後の平均血漿中 $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ 値。

4.1.1.4 腎臓系

試験番号	認められた所見	無影響量（腎臓系）				安全域		
		投与量	累積投与量 [c]	血漿中曝露量		累積投与量 [c] (36.5 µg/g)	血漿中曝露量	
				C_{max} (µg/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (hr* µg/mL)		C_{max} (1.36 µg/ml)[a]	$AUC_{0\text{-}24h}$ (10.0 hr*µg/mL)[b]
396443-AS01	投与に関連した所見なし	7 mg	ND	2.6	14.6	ND	1.9 倍	1.5 倍
396443-AS03	投与に関連した所見なし	3 mg	ND	1.97	12	ND	1.4 倍	1.2 倍
396443-AS06	投与に関連した所見なし	4 mg	239 µg/g	3.74	22.8	6.5 倍	2.8 倍	2.3 倍

ND: not determined（値は得られなかった）
NA: not applicable（該当せず）
a 平均血漿中 C_{max} (C_{max} の最大値は CS3B 試験での 0～3 ヵ月齢の乳児に認められた)。
b CS3B 試験の 0～3 ヵ月齢の乳児（N = 11）に 12 mg を初回投与後の平均血漿中 $AUC_{0\text{-}24\ hr}$ 値。
c 値（239 µg/g）は動物の腎臓中の ISIS 396443 濃度に基づいており、この値を患者の剖検時の腎臓中に検出された最高濃度値（36.5 µg/g）と比較した。

4.2 アルビノラットを用いた持続髄腔内注入による ISIS 396443 の呼吸系及び心血管系に対する安全性の評価（396443-AS04 試験）

被験物質：ISIS 396443

報告書題名：アルビノラットを用いた持続髄腔内注入による ISIS 396443 の呼吸系及び心血管系に対する安全性の評価		試験番号：ISIS 396443-AS04
動物種／系統：CD® [Crl:CD® (SD)] ラット	投与期間：腰椎髄腔内に 0.25 μL/時間（0.6 μL/日）の速度で最長 25 日間持続髄腔内注入	CTD での記載箇所：4.2.3.1-1
開始齢：約 6～8 週齢		GLP 適用：適
実験開始日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日	投与方法：浸透圧ポンプ留置術の後で腰椎髄腔内に持続髄腔内注入。髄腔内投与カテーテルから溶媒が排除されるよう、ポンプ留置から被験物質投与開始までに 3 日の間隔を要した。	
溶媒／投与形態：100 mg/mL の ISIS 396443 無菌溶液を溶媒（人工 CSF）で 3.3、10 及び 33 mg/mL に希釈し、それぞれを 0.02、0.06 及び 0.2 mg/日の投与に用いた。		
特記事項：投与終了時に腰髄中 ISIS 396443 濃度を測定した（0.02、0.06 及び 0.2 mg/日の用量における各剖検時の併合データ）。		

用量（mg/日）：	0（対照）		0.02		0.06		0.2	
動物数：	雄：8	雌：0	雄：8	雌：0	雄：8	雌：0	雄：8	雌：0
組織中オリゴヌクレオチド濃度（μg/g）								
腰髄								
Day 19	NA		78.42 ± NA		205.11 ± NA		323.94 ± NA	
Day 22	NA		55.83 ± 41.55		160.98 ± 81.75		360.32 ± 40.18	
Day 25	NA		103.46 ± NA		213.36 ± NA		513.32 ± NA	

4.2　アルビノラットを用いた持続髄腔内注入による ISIS 396443 の呼吸系及び心血管系に対する安全性の評価（396443-AS04 試験）（続き）

試験番号：ISIS 396443-AS04								**被験物質：ISIS 396443**
用量（mg/回）：	0（対照）		0.02		0.06		0.2	
動物総数：	雄：8	雌：0	雄：8	雌：0	雄：8	雌：0	雄：8	雌：0
死亡：								
Day 11	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 12	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 19	0	-	0	-	0	-	1[a]	-
Day 22	0	-	0	-	0	-	1[b]	-
Day 23	0	-	0	-	0	-	1[c]	-
Day 25	0	-	0	-	0	-	0	-
一般状態：								
Day 11	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 12	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 19	0	-	0	-	1[d]	-	0	-
Day 22	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 23	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 25	0	-	0	-	0	-	0	-
体重：試験期間を通じて体重に群間差は認められなかった。								
Day 11	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 12	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 19	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 22	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 23	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 25	0	-	0	-	0	-	0	-

4.2　アルビノラットを用いた持続髄腔内注入による ISIS 396443 の呼吸系及び心血管系に対する安全性の評価（396443-AS04 試験）（続き）

試験番号：ISIS 396443-AS04								**被験物質：ISIS 396443**
用量（mg/回）：	0（対照）		0.02		0.06		0.2	
動物総数：	雄：8	雌：0	雄：8	雌：0	雄：8	雌：0	雄：8	雌：0
心血管モニタリング								
収縮期、拡張期及び平均動脈血圧[f]：								
Day 19	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 22	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 23	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 25	0	-	0	-	0	-	0	-
心拍数[g]：								
Day 19	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 22	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 23	0	-	0	-	0	-	0	-
Day 25	0	-	0	-	0	-	0	-

NA：該当なし。
[a]0.2 mg/日投与群の 1 匹が、Day 19 の心血管モニタリング用手術準備中に死亡した。この死亡は投与に関連しないと考えられた。
[b] 0.2 mg/日投与群の 1 匹が、Day 22 の心血管モニタリング中に明らかな麻酔合併症で死亡した。
[c] 0.2 mg/日投与群の 1 匹が、Day 23 のケージ観察中に後肢がケージに挟まっているのを発見された。
[d] 0.06 mg/日投与群の 1 匹で、Day 19 から後肢機能障害が認められた。
[e] 平均呼吸数、一回換気量及び分時換気量を測定した。試験期間を通じて呼吸器系の評価項目に系統的又は大きな変化は認められなかった。群間で呼吸器系評価項目にわずかな差又は統計的に有意な変化がみられたものの、いずれも用量依存性を示さず、よって投与に関連しないと考えられた。
[f] 試験期間を通じて動脈血圧に系統的又は大きな変化は認められなかった。群間で血圧にわずかな差がみられたものの、いずれも用量依存性を示さず、よって投与に関連しないと考えられた。
[g] 試験期間を通じて心拍数に系統的又は大きな変化は認められなかった。群間で心拍数に差がみられたものの、いずれも用量依存性を示さず、よって投与に関連しないと考えられた。

4.3 成熟サルを用いた単回投与毒性試験（396443-AS01）

被験物質：ISIS 396443

報告書題名：カニクイザルを用いた ISIS 396443 の単回スローボーラス腰部髄腔内投与毒性及び薬物動態試験							試験番号：ISIS 396443-AS01	
動物種／系統：カニクイザル		投与期間：単回投与					CTD での記載箇所：4.2.3.1-1	
開始齢：2～4 歳（成熟）		投与後期間：10 週					GLP 適用：適	
初回投与日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日		投与方法：腰椎髄腔内ボーラス投与						
溶媒／投与形態：水溶液（人工 CSF）；液量 1 mL								
特記事項：3 mg の用量でトキシコキネティクス評価（雌雄各 5 匹）								
無毒性量：NA								
用量（mg/回）：	0（対照）		1		3		7	
動物数：	雄：2	雌：2	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
トキシコキネティクス：$AUC_{0\text{-}24}$（hr·µg/mL）								
Day 1 - 血漿	NA		2.03 ± 0.408		4.50 ± 1.83		14.6 ± 4.32	
組織中オリゴヌクレオチド濃度（µg/g）- Day 8								
脊髄								
腰部	NA		8.33 ± 4.89		19.2 ± 7.55		19.6 ± 14.3	
胸部	NA		6.07 ± 4.26		10.3 ± 5.04		18.4 ± 19	
頸部	NA		2.72 ± 0.676		5.6 ± 2.91		10.7 ± 5.43	
大脳皮質	NA		2.42 ± 1.37		6.98 ± 3.63		12.8 ± 12.4	
肝臓	NA		1.89 ± 0.401		9.95 ± 8.48		36.0 ± 26.5	
特記すべき所見								
死亡又は切迫屠殺	0	0	0	0	0	0	0	0
体重（%）[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量（%）	-	-	-	-	-	-	-	-

4.3 成熟サルを用いた単回投与毒性試験（396443-AS01）（続き）

試験番号：ISIS 396443-AS01							**被験物質：ISIS 396443**	
用量（mg/回）：	0（対照）		1		3		7	
動物数：	雄：2	雌：2	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
飲水量	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
一般状態 [b]：								
ケージ床に横臥	0	0	0	0	0	0	1	0
身体検査 [b]：								
傾眠	0	0	0	0	0	0	1	0
後肢筋力低下	0	0	0	0	0	0	1	0
体温低下	0	0	0	0	0	0	1	0
呼吸数低下	0	0	0	0	0	0	1	0
神経学的検査 [c]：								
皮膚反射陰性	0	0	0	0	0	0	1	0
尾部反射陰性	0	0	0	0	0	0	1	0
固有反射（右後肢）陰性	0	0	0	0	0	0	1	0
心血管モニタリング	-	-	-	-	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし、NA：該当なし

[a] 16 匹

[b] 投与後 2、20、56 及び 70 日目にトキシコキネティクス評価動物を雌雄各 1 又は 2 匹屠殺して評価を行った（2 日目は雄 2 匹／雌 1 匹、20 及び 56 日目は雌雄各 1 匹、70 日目は雄 1 匹／雌 2 匹）。

[c] 投与後 2～4 時間に単一個体で身体検査／神経学的検査における臨床徴候及び変化が認められたが、6 時間後までに完全に回復した。

4.4 幼若カニクイザルを用いた 14 週間毒性試験（396443-AS03）

被験物質：ISIS 396443

報告書題名：幼若カニクイザルを用いた ISIS 396443 の 14 週間複数回腰部髄腔内投与毒性試験；4 週間中間剖検及び 12 週間回復試験を含む		試験番号：ISIS 396443-AS03
動物種／系統：カニクイザル	投与期間：4 又は 14 週間。3 mg/回では週 1 回投与（計 15 回）。0、0.3 又は 1 mg/回では週 1 回を 5 週間、その後は隔週 1 回投与（計 10 回）。	**CTD での記載箇所：**4.2.3.2-1
開始齢：7～8 ヵ月齢（幼若）	投与後期間：12 週齢	**GLP 適用：**適
初回投与日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日	投与方法：腰椎髄腔内ボーラス投与	
溶媒／投与形態：水溶液（人工 CSF）；液量 0.75 mL		
特記事項：幼若サルを用いた毒性評価		
無毒性量：1 mg の用量で週 1 回を 5 週間、その後は隔週 1 回（総用量 10 mg）		

用量（mg/回）：	0（対照）[e]		0.3		1		3[e]	
動物総数：	雄：8	雌：9	雄：6	雌：7	雄：6	雌：7	雄：9	雌：9
トキシコキネティクス：$AUC_{0\text{-}24}$（hr·µg/mL）								
Day 1 - 血漿	NA		1.06 ± 0.42		3.64 ± 1.09		12.0 ± 2.42	
Day 29 - 血漿	NA		1.14 ± 0.27		3.93 ± 1.38		12.7 ± 4.21	
Day 99 - 血漿	NA		1.05 ± 0.40		3.51 ± 0.67		11.1 ± 2.26	
Day 36 - 腰部 CSF（µg/mL）	NA		0.0104 ± 0.0127		0.0233 ± 0.0268		0.0572 ± 0.0655	
Day 106 - 腰部 CSF（µg/mL）	NA		0.0152 ± 0.0098		0.0108 ± 0.0085		0.0778 ± 0.0727	

4.4 幼若カニクイザルを用いた 14 週間毒性試験（396443-AS03）（続き）

試験番号：ISIS 396443-AS03							**被験物質：ISIS 396443**	
用量（mg/回）：	0（対照）[e]		0.3		1		3[e]	
動物総数：	雄：8	雌：9	雄：6	雌：7	雄：6	雌：7	雄：9	雌：9
組織中オリゴヌクレオチド濃度（μg/g）								
脊髄								
腰部 - Day 36	NA		12.9 ± 4.22		33.8 ± 7.77		62.9 ± 32.4	
腰部 - Day 106	NA		31.9 ± 15.5		78.6 ± 53.3		169 ± 54.2	
胸部 - Day 36	NA		8.43 ± 3.65		12.2 ± 4.07		23.3 ± 13.2	
胸部 - Day 106	NA		20.2 ± 4.59		38.4 ± 7.06		101 ± 46.5	
頸部 - Day 36	NA		7.15 ± 4.43		16.3 ± 7.83		26.7 ± 13.0	
頸部 - Day 106	NA		10.6 ± 6.21		26.8 ± 6.4		82.8 ± 27.8	
大脳皮質 - Day 36	NA		9.98 ± 1.56		26.3 ± 3.68		68.0 ± 39.3	
大脳皮質 - Day 106	NA		15.2 ± 3.9		35.4 ± 13.7		166 ± 45.8	
肝臓 - Day 36	NA		1.59 ± 0.41		16.4 ± 21.9		45.2 ± 23.8	
肝臓 - Day 106	NA		1.88 ± 0.38		42.5 ± 40.9		115 ± 65.1	
特記すべき所見								
死亡又は切迫屠殺 [a]	0	0	0	0	0	0	0	0
体重（%）[b]	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量（%）	-	-	-	-	-	-	-	-
一般状態：	-	-	-	-	-	-	-	-
身体検査：	-	-	-	-	-	-	-	-
神経学的検査：								
Day 1								
皮膚反射陰性	0	0	0	0	0	0	1	1
尾部反射陰性	0	0	0	0	0	0	1	0
足の感覚反射陰性	0	0	0	0	0	0	1	0

4.4 幼若カニクイザルを用いた 14 週間毒性試験（396443-AS03）（続き）

試験番号：ISIS 396443-AS03								**被験物質：ISIS 396443**
用量（mg/回）：	0（対照）[d]		0.3		1		3[e]	
動物総数：	雄：8	雌：9	雄：6	雌：7	雄：6	雌：7	雄：9	雌：9
Day 29[c]								
皮膚反射陰性	0	0	0	0	0	0	3	2
尾部反射陰性	0	0	0	0	0	0	4	1
足の感覚反射陰性	0	0	0	0	0	0	1	0
Day 99[e]								
尾部反射陰性	0	0	0	0	0	0	0	1
足の感覚反射陰性	0	0	0	0	0	0	0	1
心電図：	-	-	-	-	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし、NA：該当なし

[a] 3 mg/週の用量で 14 週間評価群に割付けた雄 1 匹が死亡したが、ISIS 396443 の投与に関連しないと判断され、この個体の代替として Day 8 に新たな雄を入れた。

[b] Day 106 の剖検時。対照群は群平均値を示す。投与群は、対照群との相対的な差（%）を示す。統計的有意性は相対的な差（%）ではなく実測値に基づいて検定した

[c] Day 1 に単一個体で認められた神経学的検査における変化は、Day 29 にも同一個体で認められた。これらの変化は投与 4 時間後に認められ、完全に回復した

[d] この用量でのみ回復評価を行った（雌雄各 2 匹）

[e] Day 1 に単一個体で認められた神経学的検査における変化は、Day 29 及び 99 にも同一個体で認められた。これらの変化は投与 4 時間後に認められ、完全に回復した

4.5 幼若カニクイザルを用いた 53 週間毒性試験（396443-AS06 試験）

被験物質：ISIS 396443

報告書題名：ISIS 396443：幼若カニクイザルを用いた 1 年（53 週間）反復投与毒性試験；26 週間回復期間を含む		**試験番号：ISIS 396443-AS06**
動物種／系統：カニクイザル	投与期間：53 週間。週 1 回を 5 週間、その後は 6 週に 1 回投与（計 13 回）。	**CTD での記載箇所：**4.2.3.2-2
開始齢：9～11 ヵ月齢	回復期間：26 週齢	**GLP 適用：**適
初回投与日：20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日	投与方法：腰椎髄腔内ボーラス投与	
溶媒／投与形態：水溶液（人工 CSF）；液量 0.75 mL		
特記事項：学習能力検査、骨格成長及び免疫系パラメータの測定		
無毒性量：0.3 mg の用量で 6 週に 1 回（総用量 3.9 mg）		

用量（mg/回）：	0（対照）[a]		0.3		1.0		4.0[a]	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
主試験動物数：	5	5	5	5	5	5	5	5
回復試験動物数：	2	2	0	0	0	0	2	2
血漿中トキシコキネティクス：								
Day 1：$AUC_{0\text{-}24hr}$（hr·μg/mL）	NA		0.983 ± 0.186		4.02 ± 0.915		22.8 ± 8.18	
C_{max}（μg/mL）	NA		0.122 ± 0.036		0.569 ± 0.2		3.74 ± 1.72	
T_{max}（hr）	NA		2 (1 - 4)		2 (1 - 4)		4 (2 - 8)	
Day 365：$AUC_{0\text{-}24hr}$（hr·μg/mL）	NA		0.626 ± 0.197		2.79 ± 1.59		9.59 ± 1.90	
C_{max}（μg/mL）	NA		0.0859 ± 0.0514		0.454 ± 0.258		1.52 ± 0.535	
T_{max}（hr）	NA		2 (1 - 6)		3 (0.5 - 6)		2 (1 - 6)	

4.5 幼若カニクイザルを用いた 53 週間毒性試験（396443-AS06 試験）（続き）

試験番号：ISIS 396443-AS06							**被験物質：ISIS 396443**	
用量（mg/回）：	0（対照）[a]		0.3		1.0		4.0[a]	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
主試験動物数：	5	5	5	5	5	5	5	5
回復試験動物数：	2	2	0	0	0	0	2	2
組織中濃度（µg/g）– Day 372 主試験動物（雌雄各 5 匹）								
小脳	NA		4.27 ± 1.39		20.8 ± 16.0		39.6 ± 19.7	
大脳皮質	NA		4.23 ± 1.89		16.6 ± 5.97		71.3 ± 29.3	
海馬	NA		10.1 ± 2.81		28.9 ± 10.3		88.9 ± 18.0	
脳橋	NA		4.14 ± 3.06		8.84 ± 3.97		34.2 ± 15.5	
頸髄	NA		6.68 ± 2.78		15.9 ± 5.14		35.1 ± 11.0	
胸髄	NA		14.0 ± 9.34		23.0 ± 10.6		59.8 ± 11.7	
腰髄	NA		21.4 ± 9.28		53.5 ± 33.6		99.0 ± 71.5	
腎皮質	NA		23.7 ± 17.6		42.8 ± 19.0		239 ± 176	
肝臓	NA		0.850 ± 0.430		2.79 ± 1.64		21.9 ± 9.16	
組織中濃度（µg/g）– Day 554 回復試験動物（雌雄各 2 匹）								
小脳	NA		NA		NA		34.5 ± 23.2	
大脳皮質	NA		NA		NA		43.8 ± 4.41	
海馬	NA		NA		NA		46.0 ± 7.75	
脳橋	NA		NA		NA		16.6 ± 4.27	
頸髄	NA		NA		NA		18.4 ± 6.05	
胸髄	NA		NA		NA		20.3 ± 5.60	
腰髄	NA		NA		NA		39.7 ± 10.8	
腎皮質	NA		NA		NA		6.17 ± 3.54	
肝臓	NA		NA		NA		0.101 ± 0.0675	

4.5 幼若カニクイザルを用いた 53 週間毒性試験（396443-AS06 試験）（続き）

試験番号：ISIS 396443-AS06								**被験物質：ISIS 396443**
用量（mg/回）：	0（対照）[a]		0.3		1.0		4.0[a]	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
主試験動物数：	5	5	5	5	5	5	5	5
回復試験動物数：	2	2	0	0	0	0	2	2
CSF 中濃度（ng/mL）：								
Day 8	NA		14.1 ± 16.9		13.4 ± 6.54		18.5 ± 11.3	
Day 29	NA		33.6 ± 36.3		32.1 ± 16.0		53.6 ± 32.5	
Day 71	NA		14.3 ± 10.4		18.8 ± 7.39		30.8 ± 10.8	
Day 281	NA		15.0 ± 15.8		28.0 ± 26.2		42.1 ± 27.5	
Day 372	NA		12.0 ± 10.6		23.3 ± 16.7		51.8 ± 37.8	
Day 554	NA		NA		NA		10.3 ± 8.86	
特記すべき所見：								
死亡又は切迫屠殺	-	-	-	-	-	-	-	-
体重（%）[b]	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量（%）[b]	-	-	-	-	-	-	-	-
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-
身体検査	-	-	-	-	-	-	-	-

4.5 幼若カニクイザルを用いた 53 週間毒性試験（396443-AS06 試験）（続き）

試験番号：ISIS 396443-AS06								**被験物質：ISIS 396443**
用量（mg/回）：	0（対照）[a]		0.3		1.0		4.0[a]	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
毒性評価動物数：	5	5	5	5	5	5	5	5
回復評価動物数：	2	2	0	0	0	0	2	2
神経学的検査：								
下部脊髄反射低下／消失 - Day 1[b]								
足の把握反射	-	-	-	-	-	-	1	4
膝蓋腱反射	-	-	-	-	-	-	1	4
下部脊髄反射低下／消失 - Day 29[b]								
肛門反射	-	-	-	-	-	-	-	1
膝蓋腱反射	-	-	-	-	-	-	-	2
下部脊髄反射低下／消失 - Day 71[b]								
足の把握反射	-	-	-	-	-	-	1	-
膝蓋腱反射	-	-	-	-	-	-	1	-
下部脊髄反射低下／消失 - Day 197[b]								
膝蓋腱反射	-	-	-	-	-	-	-	1
下部脊髄反射低下／消失 - Day 365[b]								
足の把握反射	-	-	-	-	-	-	1	-
膝蓋腱反射	-	-	-	-	-	-	1	-
学習能力（学習検査完了に要した日数 ± SD）：								
投与前	9.7 ± 6.4	12.0 ± 4.7	9.8 ± 3.7	16.8 ± 6.0	10.6 ± 4.8	16.0 ± 4.4	7.6 ± 3.3	11.0 ± 4.2
25～28 週目	10.4 ± 5.6	12.1 ± 3.3	12.2 ± 6.8	11.0 ± 1.4	16.3 ± 6.8	16.8 ± 3.2	7.3 ± 2.7	12.5 ± 5.6
49～52 週目	6.0 ± 2.8	5.3 ± 2.6	7.4 ± 3.0	5.0 ± 1.0	7.0 ± 1.9	4.6 ± 1.5	9.1 ± 4.6	7.2 ± 3.4
回復評価 22～26 週目（2 匹）	5.0	3.5	NA	NA	NA	NA	10.0	6.0

4.5　幼若カニクイザルを用いた 53 週間毒性試験（396443-AS06 試験）（続き）

試験番号：ISIS 396443-AS06								**被験物質：ISIS 396443**
用量（mg/回）：	0（対照）[a]		0.3		1.0		4.0[a]	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
毒性評価動物数：	5	5	5	5	5	5	5	5
回復評価動物数：	2	2	0	0	0	0	2	2
神経行動学的観察	-	-	-	-	-	-	-	-
動脈血圧	-	-	-	-	-	-	-	-
心電図	-	-	-	-	-	-	-	-

-：特記すべき所見なし、NA：該当なし
[a] この用量でのみ回復評価を行った（雌雄各 2 匹）
[b] これらの変化は当初投与後 4～8 時間に認められた。一般に 24～48 時間以内に回復した。

5　　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は、これまで実施されていない。