

2.4 非臨床試験の概括評価

目 次

2.4 非臨床試験の概括評価	1
目 次	2
表 目 次.....	3
略号と用語の定義.....	4
1 非臨床試験計画概略	7
1.1 疾患の背景.....	7
1.2 パチシラン-LNPの特徴.....	7
1.3 作用機序.....	8
1.4 規制ガイドライン及びGLP基準.....	9
1.5 薬理試験.....	9
1.6 薬物動態.....	10
1.7 毒性.....	12
2 薬理試験.....	15
2.1 効力を裏付ける試験	16
2.1.1 <i>In vitro</i> 薬理試験.....	16
2.1.2 <i>In vivo</i> 薬理試験	17
2.2 副次的薬理試験.....	18
2.3 安全性薬理試験.....	19
3 薬物動態試験	19
3.1 吸収.....	20
3.2 分布.....	21
3.3 代謝.....	22
3.4 排泄.....	23
3.5 薬物動態学的薬物相互作用	23
3.6 その他の薬物動態試験.....	24
4 毒性試験.....	25
4.1 単回投与毒性	25

2.4 非臨床試験の概括評価
パチシランナトリウム

4.2	反復投与毒性	26
4.3	遺伝毒性	28
4.4	がん原性	28
4.5	生殖発生毒性	29
4.5.1	受胎能及び初期胚発生	29
4.5.2	胚・胎児発生	30
4.5.3	出生前及び出生後の発生並びに母体の機能	31
4.5.4	幼若動物を用いた試験	32
4.6	局所刺激性	32
4.7	その他の毒性試験	32
5	総括及び結論	34
5.1	薬理試験	34
5.2	薬物動態	36
5.3	毒性試験	39
5.4	安全域	43
5.5	結論	43
6	参考文献	44

表 目 次

表 1 - パチシラン-LNPの組成	8
表 2 - 主要な薬理学的特性	16
表 3 - ラット及びサルにパチシラン-LNPを単回投与したときのALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG ₂₀₀₀ -C-DMGのPKパラメータ	20

略号と用語の定義

略号、用語	定義
AD-1955	昆虫ルシフェラーゼ遺伝子を標的とする siRNA
AD-18534	げっ歯類サロゲート siRNA
ADA	抗薬物抗体 (Anti-drug antibody(ies))
AF-011	パチシランに用いられた第二世代脂質ナノ粒子処方。脂質添加剤である DLin-MC3-DMA、DSPC、コレステロール及び PEG ₂₀₀₀ -C-DMG が脂質ナノ粒子を形成している。
AF-011-1955	AD-1955 (昆虫ルシフェラーゼ遺伝子を標的とする siRNA) を AF-011 で製剤化した、薬理的に非活性な対照 (媒体対照)
ALN-18328	ALN-TTR01 及び ALN-TTR02 に内包されるパチシラン siRNA 原薬
ALN-TTR01	TTR mRNA を標的とする siRNA の ALN-18328 を内包する (ALN-TTR02 と同様) 第一世代の SNALP 処方で、等張リン酸緩衝生理食塩水に脂質ナノ粒子として製剤化されている。
ALN-TTR02	AF-011 処方の第二世代の RNAi 医薬品であるパチシラン製剤で、2 mg/mL のパチシラン原薬 (TTR mRNA を標的とする siRNA の ALN 18328)、脂質添加剤である DLin-MC3-DMA、DSPC、コレステロール及び PEG ₂₀₀₀ -C-DMG により、等張リン酸緩衝生理食塩水中に脂質ナノ粒子として製剤化されている。
ApoE	アポリポタンパク質 E (Apolipoprotein E)
AUC	血中濃度-時間曲線下面積 (Area under the curve)
¹⁴ C	原子量 14 の炭素同位体 (Carbon isotope with atomic weight of 14)
C _{max}	最高血漿中濃度 (Maximum (peak) concentration)
CYP	シトクロム P450 (Cytochrome P450)
DLin-MC3-DMA	(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino) butanoate
DMBA	4-ジメチルアミノ酪酸 (4-(dimethylamino)butyric acid)
DNA	デオキシリボ核酸 (Deoxyribonucleic acid)
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
ELISA	酵素結合免疫吸着検査法 (Enzyme-linked immunosorbent assay)
EMA	欧州医薬品庁 (European Medicines Agency)
FDA	食品医薬品局 (Food and Drug Administration)

2.4 非臨床試験の概括評価
パチシランナトリウム

略号、用語	定義
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 (Good Laboratory Practice)
hATTR	遺伝性異型トランスサイレチン (Hereditary Atypical Transthyretin)
HED	ヒト等価用量 (Human equivalent dose)
hERG	ヒト <i>ether-à-go-go</i> 関連遺伝子 (human <i>ether-à-go-go</i> related gene)
HSF-1	熱ショック転写因子 1 (Heat shock factor 1)
hTTR	ヒトトランスサイレチン (Human transthyretin)
IC ₅₀	50%阻害濃度 (Half maximal (50%) inhibitory concentration)
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (International Council for Harmonisation)
LDLR	低比重リポタンパク質受容体 (Low density lipoprotein receptor)
LNP	脂質ナノ粒子 (Lipid nanoparticle)
mRNA	メッセンジャーRNA (Messenger RNA)
MNU	N-メチル-N-ニトロソ尿素 (N-Methyl-N'-nitrosourea)
■	■
NOAEL	無毒性量 (No observed adverse effect level)
OECD	経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development)
OLT	同所性肝移植 (Orthotopic liver transplantation)
PBS	リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline)
PD	薬力学 (Pharmacodynamic(s))
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	(R)-2,3-bis(tetradecyloxy)propyl 1-(methoxy poly(ethylene glycol)2000)propyl carbamate
PK	薬物動態 (Pharmacokinetic(s))
PMDA	医薬品医療機器総合機構 (Pharmaceuticals and medical devices agency)
q2w	2週に1回投与 (Once every 2 weeks)
q3w	3週に1回投与 (Once every 3 weeks)
q4w	4週に1回投与 (Once every 4 weeks)
QWBA	定量的全身オートラジオグラフィー (Quantitative whole body autoradiography)
RBP	レチノール結合タンパク (Retinol binding protein)
RHD	推奨ヒト用量 (Recommended human dose)
RISC	RNA誘導サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex)
RNA	リボ核酸 (Ribonucleic acid)
RNAi	RNA干渉 (RNA interference)

2.4 非臨床試験の概括評価
パチシランナトリウム

略号、用語	定義
siRNA	低分子干渉 RNA (Small interfering RNA)
SNALP	安定核酸-脂質粒子 (Stable nucleic acid lipid particle)
SNP	一塩基変異多型 (Single nucleotide polymorphism)
Tg	トランスジェニック (Transgenic)
TK	トキシコキネティクス (Toxicokinetic(s))
TTR	トランスサイレチン (Transthyretin)
UTR	非翻訳領域 (Untranslated region)
V30M	ヒトトランスサイレチン遺伝子の 30 番バリンからメチオニンへの置換変異

1 非臨床試験計画概略

パチシラン脂質ナノ粒子製剤（パチシラン-LNP）の非臨床試験の方針及び計画の概略について述べる。パチシラン-LNP はトランスサイレチン型家族性アミロイドーシス（hATTR アミロイドーシス）の成人患者に対する治療薬である。推奨臨床投与レジメンは、3週に1回、パチシラン-LNP 0.3 mg/kg を静脈内持続投与するものである。

1.1 疾患の背景

遺伝性トランスサイレチン型アミロイドーシスは、トランスサイレチン（*TTR*）遺伝子の変異による、常染色体優性の生命を脅かす全身性の希少疾患である。*TTR* 遺伝子の変異により、*TTR* タンパク質四量体の形成が不安定化して二量体及び単量体に解離し、続く野生型及び変異型単量体のミスフォールディングによって、末梢神経系、心臓及び消化管へのオリゴマー及びアミロイド線維の組織沈着が引き起こされる(1)(2)。これは成人発症の疾患であり、hATTR アミロイドーシスの主要な臨床症状は多発性神経障害と心筋症である。

1.2 パチシラン-LNP の特徴

パチシラン-LNP は世界初のリボ核酸干渉 (RNAi) を利用した治療薬であり、表 1 に示すように、水性緩衝液中の 2 mg/mL のパチシラン原薬 (ALN-18328)、すなわち野生型及び変異型 *TTR* メッセンジャー RNA (mRNA) を標的とした低分子干渉 RNA (siRNA) と、4 種の脂質添加剤からなる無菌製剤である。(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino) butanoate (DLin-MC3-DMA) 及び(R)-2,3-bis(tetradecyloxy)propyl 1-(methoxy poly(ethylene glycol)2000)propyl carbamate (PEG₂₀₀₀-C-DMG) は、これまでどの既承認医薬品製剤にも用いられたことのない新規脂質である。コレステロールは複数の公定書(米国、欧州及び日本)に収載されている。1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) は合成ホスファチジルコリンであり、天然ホスファチジルコリンと非常に似通っている。また米国食品医薬品局 (FDA) の既承認医薬品不活性成分 (添加剤) リストにも記載され、現在米国及び欧州で承認されている 2 つの医薬品 (DaunoXome® [リポソームダウノルビシン] 及び ONIVYDE® [イリノテカンリポソーム注射剤]) の成分でもある。パチシラン-LNP には、ヒト由来あるいは動物由来成分は含まれていない (2.6.1 「諸言」参照)。

パチシラン-LNP を静脈内投与すると、その siRNA 成分である ALN-18328 が肝臓における野生型及び変異型 *TTR* の発現をともに減少させるよう設計されており、その結果として循環血中 *TTR* タンパク質が減少し、hATTR アミロイドーシス患者において病因となる *TTR* アミロイドの形成と沈着が減少する(3)(4)。パチシラン原薬 (ALN-18328) は天然ヌクレオシド (非修飾塩基及び 2' O メチル化リボース修飾塩基) のみを用いて化学合成された二本鎖 RNA である。全ての試験を通して、パチシラン-LNP の投与量又は使用量は siRNA ナトリウム塩の量として示す。遊離型等量への変換は 0.94 を乗ずる。

2.4 非臨床試験の概括評価
パチシランナトリウム

表 1 - パチシラン-LNP の組成

成分	1 mL あたり含量 (mg/mL)	1 バイアルあたり の量 (mg)	機能
Patisiran drug substance (ALN-18328, sodium salt)	Patisiran 2.0 (equivalent to 2.1 patisiran sodium)	Patisiran 10.0 (equivalent to 10.5 patisiran sodium)	Active ingredient
DLin-MC3-DMA (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-heptatriaconta-6, 9, 28, 31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino) butanoate)	13.0	65.0	Excipient [REDACTED]
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG (R)-2,3-bis(tetradecyloxy)propyl 1-(methoxypoly(ethylene glycol)2000)propyl carbamate	1.6	8.0	Excipient [REDACTED]
DSPC 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	3.3	16.5	Excipient [REDACTED]
Cholesterol (5-Cholesten-3β-ol; 3β-hydroxy-5-cholestene)	6.2	31.0	Excipient [REDACTED]
PBS Sodium phosphate, dibasic, heptahydrate	2.32	11.6	[REDACTED]
Potassium phosphate, monobasic, anhydrous	0.18	0.9	[REDACTED]
Sodium chloride	8.77	43.9	[REDACTED]
Water for injection	quantum sufficit	quantum sufficit	[REDACTED]

Abbreviations: DSPC=1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine; LNP=lipid nanoparticles; PBS=phosphate buffered saline.

1.3 作用機序

パチシラン-LNP は静脈内投与後、血漿から、有窓内皮を有し大量の血液が灌流する肝臓内に急速に分布、蓄積する。循環血中で、PEG₂₀₀₀-C-DMG 脂質は LNP から急速に放出され、循環性リポタンパク質及び血球に移行する(5)。PEG₂₀₀₀-C-DMG コーティングが除去されると内因性アポリポタンパク質 E (ApoE) が LNP に結合する。そして肝細胞に発現する低比重リポタンパク質受容体 (LDLR) や他の ApoE 結合受容体といった ApoE 依存的機構を介して肝細胞へ取り込まれる(6)。特に、イオン化可能な陽イオン性脂質を用いた LNP 製剤は、内因性 ApoE を吸着し、ApoE をリガンドとする複数の受容体を介して肝細胞に取り込まれるカイロミクロンと同じように処理される(7)。エンドサイトーシスにより肝細胞内に取り込まれると、LNP の主要成分であるイオン性

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

DLin-MC3-DMA 脂質は、エンドソーム内の pH が低下するにつれてプロトン化される（正に帯電する）(8)(9)。LNP 中の正に帯電した DLin-MC3-DMA 脂質は、負に帯電したエンドソーム脂質と相互作用し、LNP の崩壊、エンドソーム膜の不安定化及び細胞質への siRNA 放出が生じる(8)(9)(10) (2.6.1 「諸言」参照)。

細胞質内へ放出されると、二本鎖の siRNA である ALN-18328 は RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) と呼ばれる酵素複合体に取り込まれる。RISC に取り込まれる中で合成 siRNA の二本鎖が解かれ、アンチセンス鎖が、野生型及び変異型の両 TTR mRNA 間で遺伝的に保存されている 3'側非翻訳領域 (UTR) の相補的配列と特異的に結合する。RISC/siRNA 酵素複合体中の Argonaute-2 エンドヌクレアーゼが野生型・変異型 TTR mRNA を触媒的に切断し、野生型・変異型 TTR タンパク質合成を抑制する(11)(12) (2.6.1 「諸言」参照)。

1.4 規制ガイドライン及び GLP 基準

パチシラン-LNP の非臨床試験プログラムは、薬理試験、薬物動態試験、探索的試験及び GLP 準拠毒性試験からなる。サルでの GLP 適用安全性薬理試験とラットの定量的全身オートラジオグラフィ (QWBA) 試験を除き、薬理試験、薬物動態試験及び探索的毒性試験は GLP 非適用下で実施した。これらの試験は試験施設の手順書に従って実施され、試験結果の信頼性又は結果の解釈に影響を及ぼすような不測の事態はなかった。パチシラン-LNP を用いた GLP 適用毒性試験は、ICH M3(R2) (医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス) に記載された一般原則に準拠して実施した。GLP 適用試験は全て経済協力開発機構 (OECD) 加盟国で実施され、また欧州、米国 (FDA)、日本 (厚生労働省) 及び他の OECD 相互承認データ協定の締結国の規制当局全てに受け入れられている OECD の試験ガイドライン及び GLP 原則に従った。

パチシラン-LNP の開発中、製造承認申請のための品質、非臨床、臨床薬理及び臨床開発計画について Alnylam 社が助言を受けた保険規制当局は以下のとおりである：日本医薬品医療機器総合機構 (PMDA)、米国 FDA、欧州医薬品庁 (EMA)、仏国医薬品・医療製品安全庁 (ANSM)、英国医薬品・医療製品規制庁 (MHRA)、ポルトガル National Authority of Medicines and Health Products (INFARMED) 及びスウェーデン Medicinal Products Agency (MPA)。

非臨床開発計画に関する助言を含む規制当局との通信記録は Module 1 に要約されている (米国承認申請：Module 1.6.3；欧州承認申請：Module 1.2 Annex 5.14)。

1.5 薬理試験

パチシラン-LNP を用いた非臨床薬理試験の詳細なリストは 2.6.3, 1 項「薬理試験一覧表」に、各試験の概要は 2.6.2 「薬理試験の概要文」に記載する。

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

一連の *in vitro* 試験及びバイオインフォマティクス解析により、野生型及び変異型ヒト *TTR* 遺伝子の中でも民族的・地理的に異なる集団を超えて 100% 保存されている部位を標的とする、強力で特異性の高い、かつ目的外のオフターゲット作用の可能性の低い siRNA を選択した。

ALN-18328 はマウス、ラット又はウサギのいずれに対しても薬理学的活性を持たない。イヌ *TTR* 遺伝子の標的配列とは部分的に相同性があり、サル *TTR* 遺伝子の標的配列とは 100% の相同性を有するため、カニクイザル (以降、サルと表記) では薬理活性を示す。以上の理由から、ALN-18328 の薬理試験はサルを用いた。サルの *in vivo* 試験では、第一世代 LNP 製剤の ALN-TTR01 あるいはパチシラン-LNP のいずれかで ALN-18328 の薬理作用を評価した。更に ALN-TTR01 製剤では、hATTR アミロイドーシスモデルであるヒト化トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 試験も実施した。

TTR はレチノール結合タンパク (RBP)、レチノール (ビタミン A) 及びサイロキシンの担体であることが知られている。ALN-18328 (ALN-TTR01 製剤) のサル単回投与試験で血清 *TTR* 及び RBP 量を評価した。またパチシラン-LNP を用いた GLP 適用サル反復投与毒性試験でも血清 *TTR*、ビタミン A 及びサイロキシンを測定した。また、GLP 適用サル単回投与及び反復投与試験を実施し、異なる製造スケール (■、■、又は ■ kg) で製造されたパチシラン-LNP について薬力学的作用 (血清トランスサイレチン濃度) を比較した。

hERG チャネルへの LNP の影響を検討するため、薬理的に非活性な (すなわち昆虫ルシフェラーゼを標的とする) siRNA をパチシラン-LNP と同じ処方製剤化した AF-011-1955 を使い、非 GLP 探索的試験を実施した。更に、GLP 適用の安全性薬理試験において、テレメトリー留置サルにパチシラン-LNP の単回投与を行い、心血管系、呼吸系及び中枢神経系への影響を検討した。

薬理的相互作用試験は実施していない。

1.6 薬物動態

パチシラン-LNP を用いた非臨床薬物動態試験の詳細なリストは、2.6.5, 1 項「薬物動態試験一覧表」を参照とする。個々の試験の概要については、2.6.4「薬物動態試験の概要文」を参照とする。

GLP 試験において、複数の生物学的分析法が FDA 及び EMA の生物学的分析法バリデーションガイドライン、白書及び業界の慣習に基づきバリデートされた。重要な毒性試験及び安全性薬理試験では、血漿中の ALN-18328 並びに 2 つの新規脂質である DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の定量にバリデートされた生物学的分析法が用いられた。げっ歯類に特異的なサロゲートの siRNA である AD-18534 の血漿中濃度測定は、用量設定試験に対しては qualified method を用い、重要な生殖発生毒性試験においてはバリデートされた分析法を用いた。サルの血清 *TTR* は、バリデートされた分析法を用いて測定した。ラット及びサル血清の抗薬物抗体 (ADA) は、パチシラン-LNP の表面に露出している PEG₂₀₀₀-C-DMG に対して特異的な抗体を検出する qualified method もしくはバリデートされた分析法を用いて測定した。ポリエチレングリコール (PEG) は、ヒトで PEG 化された生物製剤、PEG を含んだ食品添加物又は化粧品などに曝露されたとき抗体産生が誘発されることがあることが知られている (13)。開発初期では、ELISA による非 GLP 適用 qualified method

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

を用いて、ラット及びサルにおける PEG₂₀₀₀-C-DMG に対する IgG 及び IgM を分けて ADA の評価を行っていた。ラット及びサルの 6 週間毒性試験においては、投与前の吸光度に比べて 2 倍以上の吸光度が平均で認められたとき、ADA 陽性とした。これらの IgG 及び IgM の ADA 分析法は、スクリーニング試験、確認試験及び抗体価測定を段階的に行うカットポイントに基づいた手法に改善した。ラットの 4 週間毒性試験においては、プレート特異的な変動カットポイントを超える吸光度が認められたとき、ADA 陽性とした。ラットの 26 週間毒性試験、サルの 39 週間毒性試験及びサルの PK/PD と安全性の同等性/同質性を評価する単回投与試験においては、規制当局のガイドライン、白書及び業界の慣習に従ってバリデートされた GLP に準拠した ELISA による ADA 分析法を用いて PEG₂₀₀₀-C-DMG に対する IgG と IgM の総量を測定することで、先の吸光度に基づいた IgM の分析法上の制限を改善した。これらの ADA 分析法はプレート特異的なカットポイントをスクリーニング試験、確認試験（過剰な薬物で競合阻害させる確認試験の%阻害率のカットポイント）及び抗体価測定に用いた。

血漿中の補体（補体因子 B の分解生成物 [Bb]、補体の分解生成物 3a [C3a]）、サルの血漿中又は血清サイトカイン（IFN- α 、インターロイキン-1 ベータ [IL-1 β]、IL-1RA、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12/23、IL-17、顆粒球コロニー刺激因子 [G-CSF]、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 [GM-CSF]、IFN- γ 及び腫瘍壊死因子アルファ [TNF- α]）及び血清 C 反応性タンパク（CRP）をバリデートされた方法で測定した。全ての生物学的分析法の詳細については、2.6.5.2.A 項及び 2.B 項に記載した。

反復投与毒性試験で評価した主要な動物種（Sprague Dawley ラット及びサル）において、パチシラン-LNP の単回投与 PK 試験を実施した。サルにおいて、製剤化していない ALN-18328 を単回投与したときの血漿中のトキシコキネティクス（TK）を評価した。ラットにおける 4 週間（q4w x 2）の ALN-18328 の TK のみを評価した試験を除き、サルにおける単回投与の安全性薬理試験、並びにラット及びサルにおける反復投与毒性試験において、パチシラン-LNP 投与後の ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中の TK を評価した。開発期間中、パチシラン-LNP の製造工程の変更として、製造場所及び製造スケール（ \blacksquare 、 \blacksquare 及び \blacksquare kg）の変更、並びに、LNP 製剤化前に ALN-18328 を溶解させる製造工程で用いられる緩衝液の変更があった。 \blacksquare kg と \blacksquare kg の製造スケールでそれぞれ製造されたパチシラン-LNP をサルに単回投与したときの ALN-18328 の PK を比較した。また、サル反復投与試験において、 \blacksquare kg と \blacksquare kg の製造スケールでそれぞれ製造されたパチシラン-LNP を用いて ALN-18328、DLin-MC3-DMA、及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の PK/TK を比較した（3.6項参照）。ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の全身曝露量をマウスにおける用量設定試験及び TgRasH2 マウスにおける 26 週間のがん原性試験で評価した。パチシラン-LNP は、げっ歯類及びウサギで薬理学的な活性を持たないため、パチシラン-LNP に加えて、げっ歯類に特異的な TTR を標的とした siRNA を含み、パチシラン-LNP と同じ LNP で製剤化したサロゲート製剤（AF-011-18534）を用いて、げっ歯類の生殖発生毒性試験を実施した。すべての生殖発生毒性試験において、ALN-18328、AD-18534（ラットのみ）、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中の TK を評価した。ラット及びウサギでの受胎能及び胚・胎児発生期複

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

合的用量設定試験において、胎盤及び胎児中の ALN-18328、AD-18534（ラットのみ）、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の濃度を評価した。パチシラン-LNP 投与後のこれらの分析対象物の乳汁中濃度を、ラットの出生前又は出生後の発生試験で測定した。

非標識のパチシラン-LNP 及び DLin-MC3-DMA に ¹⁴C で標識したパチシラン-LNP を用いて、ラット及びサルにおける分布試験を実施した。*In vitro* でパチシラン-LNP のタンパク結合試験も実施した。

DLin-MC3-DMA に ¹⁴C で標識したパチシラン-LNP を用いて、ラット及びサルにおける単回投与の代謝試験及びマスバランス試験を実施した。ラットに非標識のパチシラン-LNP を単回投与した後の ALN-18328 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の *in vivo* 代謝も評価した。

マウス、ラット、サル及びヒトの血清及び肝臓の S9 画分中における ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の *in vitro* 代謝安定性及び代謝プロファイリング試験を実施した。ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG によるシトクロム P450 (CYP) の誘導及び阻害（時間依存的な阻害を含む）、並びにトランスポーターを介した相互作用に関する *in vitro* 試験を実施した。トランスポーターを介した相互作用については、DLin-MC3-DMA の主代謝物である 4-(dimethylamino)butyric acid (DMBA) を用いた *in vitro* 試験も実施した。

放射能標識した ALN-18328 又は PEG₂₀₀₀-C-DMG を用いた試験は実施しなかった。薬理的な活性を持たない siRNA を含む LNP 製剤とパチシラン-LNP の毒性プロファイルは類似していたことから、毒性の多くは LNP 製剤に関連したものであり、陽イオン化した脂質成分 (DLin-MC3-DMA) によるものと考えられる。肝臓に取り込まれるまでは、ALN-18328 とともに DLin-MC3-DMA は残存する一方、PEG₂₀₀₀-C-DMG 脂質は急速に LNP から放出され、循環血中のリポタンパク及び血液細胞に移行する。また、ALN-18328 は天然に存在するヌクレオチドのみが含まれており、LNP から放出された後は、速やかに代謝されて、循環血中から消失する。したがって、DLin-MC3-DMA の分布、代謝及び排泄は、この製剤を構成する複数の成分の中で最も重要なものとして検討され、パチシラン-LNP の分布を理解するのに最も関連した情報を提供している。

1.7 毒性

パチシラン-LNP を用いた非臨床毒性試験の詳細なリスト (GLP 適用の有無に関する表記を含む) は、2.6.7, 1 項「毒性試験一覧表」を参照。個々の試験の概要については、2.6.6「毒性試験の概要文」を参照。

パチシラン-LNP を用いて実施された毒性試験のプログラムには、GLP 適用の単回投与毒性（被験物質は ALN-18328 のみ）、反復投与毒性、遺伝毒性、がん原性及び生殖発生毒性、並びに添加剤及び免疫刺激を評価するための補足的な試験が含まれる。これらの試験をサポートする目的で、必要に応じて、TK 測定が合わせて実施された。

パチシラン-LNP による単回投与試験は、臨床では間欠投与スケジュールが使用されることから実施不要と考えた。反復投与サル毒性試験では 2 試験とも、パチシラン-LNP の最初の投与の 24

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

1997年)に沿ったものである。更に、2種の新規添加剤の DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG を用いて、*in vitro*での細菌を用いる突然変異及び染色体異常試験を行った。

パチシラン-LNP は慢性的に使用されることが意図されていることから、がん原性について評価した。ラットで局所血管刺激性を有するパチシラン-LNP の長期静脈内投与は技術的に困難であること、並びに及びラット 26 週間反復投与毒性試験で免疫原性 (ADA の発現) による全身曝露の低下が認められたことから、2 年間のラットがん原性試験は実施しなかった。更にラットがん原性試験の代替投与経路として皮下投与を検討したが、忍容性が認められず、曝露は不十分であった。そのため、それに代わるものとして TgRasH2 マウスの 6 ヶ月間静脈内投与試験のみを実施した。このがん原性試験方針については、FDA () 及び EMA () の同意が得られている。

パチシラン-LNP は、Sprague-Dawley ラット及び New Zealand White ウサギにおける完全なバッテリーの生殖発生毒性試験で評価されている。GLP 試験は、ICH S5(R2)「医薬品の生殖発生毒性試験に係るガイドライン」(ICH、2000 年)に基づき、生殖過程の適切な段階を評価するためにデザインされた。全てのラット試験において、主 (TTR の低下) 又は副次的 (ビタミン A 及びサイロキシンの減少) 薬理作用が生殖発生に及ぼす潜在的な影響を評価するため、薬理的に活性な、げっ歯類サロゲート製剤 AF-011-18534 を使用した。hATTR アミロイドーシスは主に成人で発生する疾患であることから、独立した幼若動物試験は実施しなかった。なお、)。また、パチシランは ATTR アミロイドーシスの治療のためのオーファンドラッグ指定を有するので (米国番号 12-3711)、米国における小児対象試験は免除された。

パチシラン-LNP の局所刺激性を、ラット及びサル of 反復静脈内投与毒性試験における投与部位の病理組織学的検査によって評価した。ラット及びサルの反復投与毒性試験において、免疫毒性及び免疫原性を評価した。ALN-18328 の免疫刺激能 (サイトカイン放出) を *in vitro* で評価した。パチシラン-LNP 投与後の免疫刺激性 (サイトカイン放出又は補体活性化) を、CD-1 マウス及びサルにおける単回及び反復投与毒性試験で評価した。動物試験と臨床試験との間の主な相違点として、LNP 製剤で起こることが知られている輸液関連反応のリスクを最小限に抑えるために、治験参加者にパチシラン-LNP を投与する前に抗炎症剤を投与しているが、非臨床試験のいずれにおいても前処置は実施していないことに留意すべきである。臨床試験で使用された前処置には、コルチコステロイド (デキサメタゾン)、パラセタモール/アセトアミノフェン、H₁ ブロッカー (ジフェンヒドラミン) 及び H₂ ブロッカー (ラニチジン) が含まれた。これらの薬剤は、動物の毒性試験で観察された炎症性及び免疫刺激性変化を著しく減少させると予想される。パチシラン-LNP がヒト血液中で溶血及び凝集を起こす可能性を *in vitro* で評価した。

一次容器及び施栓系並びに製剤バルク保存バッグからの溶出物及び浸出物について評価した。

ALN-18328、DLin-MC3-DMA、PEG₂₀₀₀-C-DMG 中の一般的な不純物及び潜在的な遺伝毒性不純物を評価した。コレステロールは複数の公定書 (米国薬局方、欧州薬局方及び日本薬局方) に記載されている添加物で、市販されており、承認済みの医薬品に使われていることから、不純物の

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

2.1 効力を裏付ける試験

ALN-18328 及びパチシラン-LNP の主要な薬理学的 *in vitro* 及び *in vivo* 特性を表 2 に示す。

表 2 - 主要な薬理学的特性

試験系	薬理活性
<i>In vitro</i> 試験 (ALN-18328)	
HepG2 細胞	IC ₅₀ =0.003~0.004 nmol/L ^a
Hep3B 細胞	IC ₅₀ =0.006 nmol/L ^a
<i>In vivo</i> 試験 (パチシラン-LNP)	
サル、単回静脈内投与	ED ₉₀ =0.3 mg/kg ^b

略語：ED₉₀=血清 TTR タンパク質をベースラインから 90%低下させるパチシラン-LNP の用量; ELISA=酵素結合免疫吸着検査法; Hep3B=ヒト肝がん由来細胞株 Hep3B; HepG2=ヒト肝がん由来細胞株 HepG2; IC₅₀=50%阻害濃度; LNP=脂質ナノ粒子; qPCR=定量ポリメラーゼ連鎖反応; bDNA=分岐デオキシリボ核酸。

a qPCR 又は bDNA アッセイでの TTR mRNA 濃度により決定

b パチシラン-LNP (0.03、0.1、0.3 mg/kg) を雄サル (1群3匹) に 15 分かけて静脈内投与した。血清 TTR タンパク質濃度は ELISA にて測定。

2.1.1 *In vitro* 薬理試験

バイオインフォマティクスにより 種 の siRNA 候補を特定し (BIO09003 試験; 2.6.3, 2 項「効力を裏付ける試験」参照)、ヒト由来 HepG2 及び Hep3B 細胞を用いた *in vitro* スクリーニング試験により、TTR 遺伝子の 3'非翻訳領域 (UTR) でヒト及びサルの間で高度に保存されている配列を標的とする強力かつ特異性の高い siRNA、すなわち ALN-18328 を特定した。その後、siRNA 選択及びオフターゲット同定について、Alnylam 社のアルゴリズムと公的に入手し得た siRNA 選択ツール (siDirect 2.0) との間で新たな比較を行った結果、ALN-18328 がヒト TTR に対する極めて特異的かつ適切な siRNA であることが裏付けられた。

続いて、siRNA の標的部位に一塩基変異多型 (SNP) が存在しないかどうか、民族的に異なる背景を持つ 名分の遺伝子についてバイオインフォマティクス解析により検討した (BIO09004 試験; 2.6.3, 2 項「効力を裏付ける試験」参照)。ALN-18328 の標的部位にはいずれの SNP も認められず、この結果から、ALN-18328 はあらゆる地理的及び民族的背景を有する患者で TTR mRNA を阻害することが予想された。

ALN-18328 のアンチセンス鎖と相同性が高い 候補のヒト転写産物に対し、オフターゲット作用の可能性を *in vitro* にて Hep3B 細胞を用いて検討した (BIO09025 試験; 2.6.2, 2.1.1.3 項参照)。ALN-18328 の試験した最高濃度において、転写産物のうち ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1, motif 6 で唯一 mRNA 発現量の低下がみられたが、これを TTR mRNA の低下と比較すると効力に 10,000 倍を超える差がみられた。COS-7 細胞を使った *in vitro* レポーターアッセイ試験も実施したところ、一致する結果が得られ (BIO09025 試験; 2.6.3, 2 項「効力を裏付ける試験」参照)、ALN-18328 の TTR mRNA に対する特異性が示された。siDirect 2.0 を用いたコンビ

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

続くサル試験では、パチシラン-LNP を 0.03、0.1 及び 0.3 mg/kg の用量で 15 分間かけて単回静脈内投与したところ、投与 48 時間後の肝臓内 TTR mRNA は、同じ LNP で製剤化した薬理的に非活性な陰性対照と比較してそれぞれ 43%、84% 及び 94% 低下した (BIO10026 試験 ; 2.6.3, 2 項「効力を裏付ける試験」参照)。更に、血清 TTR タンパク質濃度が用量依存的に低下し、最大変化 (0.03 mg/kg で約 50%、0.3 mg/kg で約 90%) は投与 7 から 14 日後の間にみられた。投与 28 日後の血清 TTR タンパク質濃度は、0.03 mg/kg ではベースラインまで回復したが、0.1 及び 0.3 mg/kg ではそれぞれ約 40% 及び 70% 低下のままであった。初回の健康成人対象単回漸増用量臨床試験では、この試験結果も考慮して、パチシラン-LNP の用量設定を行った。

パチシラン-LNP を様々な投与量及び投与スケジュール (3 週に 1 回 [q3w] 又は 4 週に 1 回 [q4w]、60 分間の静脈内投与) でサルに反復投与する試験を実施した (■ 20031783 試験 ; 2.6.3, 2 項「効力を裏付ける試験」参照)。TTR 低下の程度は反復投与するに従って増大し、やがて見かけ上の定常状態に達し、投与インターバル間の循環血中 TTR タンパク質の低下が 80% 以上に維持された。血清 TTR タンパク質濃度は、最終投与後 8 週間ではほぼベースラインまで戻った。パチシラン-LNP の 0.3 mg/kg/q3w 群と 0.5 mg/kg/q4w 群はいずれも、ベースラインと比較した最大血清 TTR タンパク質濃度低下率は 95% 超であり、また投与 2 回目以降は最小でも 80% 超の血清 TTR タンパク質濃度減少を次回投与までの間維持したが、q4w 投与よりも q3w 投与のほうが低下作用を維持できていた。これらの結果と、サル 39 週間反復投与毒性試験 (投与量 0.3、1、3/2 mg/kg/q3w ; TTR02-NCD12-001 試験 ; 表 2.6.7.7.F 参照) 及び第 I 相試験と第 II 相試験における有効性及び安全性の結果から、第 III 相臨床試験では 0.3 mg/kg/q3w 投与法が選択された。

■ kg 又は ■ kg の製造スケール (TTR02-NCD13-001) で製造されたパチシラン-LNP 1.0 mg/kg を単回投与した後、サルにおける薬力学的作用 (血清トランスサイレチン濃度減少) は同様であり、ベースラインからの最大平均減少率が 90% 超であった (表 2.6.7.17.B 参照)。その後のサルを用いた 0.3 又は 2.0 mg/kg 反復投与試験 (TTR02-GLP17-007 ; 表 2.6.7.17.C 参照) において、同様の血清トランスサイレチン濃度減少率が、■ kg 又は ■ kg の製造スケールで製造されたパチシラン-LNP を投与した後に認められた (ベースラインからの最大平均減少率 : 0.3 mg/kg と 2.0 mg/kg でそれぞれ 80.4% と 95.1%)。

2.2 副次的薬理試験

副次的薬理試験では、サルを用いて RBP、レチノール (ビタミン A) 及びサイロキシンに対する TTR 減少の影響を評価した。ALN-18328 (ALN TTR01 製剤) の 3 mg/kg 投与により、投与後の血清 TTR 減少と RBP 減少の間に直接的相関が認められた (BIO16041 試験 ; 2.6.3, 3 項「副次的薬理試験」参照)。また、パチシラン-LNP のサル 6 週間反復投与 (4 回投与) 毒性試験 (0.3、1 及び 3 mg/kg/q2w、TTR02-NCD10-011 試験 ; 2.6.7.7.E 項参照) 及びサル 39 週間反復投与 (14 回投与) 毒性試験 (0.3、1 及び 3/2 mg/kg/q3w、TTR02NCD12-001 試験 ; 表 2.6.7.7.F 参照) において、ビタミン A 濃度をモニタリングした。投与期間を通して血清 TTR タンパク質濃度が低下し (ベースラ

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

インからの最大平均減少率は98%)、それに伴ってビタミンA濃度が低下した(ベースラインからの最大平均減少率は90%)。これらの変化は投与終了60日後には部分的あるいは完全に回復し、13週間の回復期間終了時には完全な回復が認められた。循環血中ビタミンAが低下したにもかかわらず、これらの動物でパチシラン-LNPに関連した眼の変化は認められなかった。ヒト及びサルを含む高等哺乳類において、TTRはサイロキシンのマイナーな担体である(18)。両方のサルの試験で、パチシラン-LNPの薬理作用と一致して、TTRタンパク質の減少に伴い、循環血中サイロキシンの可逆的な低下が認められた(ベースラインからの最大平均減少率は41%)。これらの試験において、この変化に伴う甲状腺の病理組織学的変化はみられなかった。

2.3 安全性薬理試験

昆虫ルシフェラーゼを標的とするsiRNAをパチシラン-LNPと同じLNPで製剤化したAF-011-1955を用いて、*in vitro*のフィージビリティ試験を実施したところ、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞のhERGチャンネル電流の阻害は認められなかった(阻害率は $\leq 1.1\%$; LD-NCD10-016試験; 2.6.3, 4項「安全性薬理試験」参照)。いずれの濃度においても顕微鏡で視認可能な粒子が認められ、このLNP製剤はアッセイ緩衝液に適合しないことが示唆されたことから、パチシラン-LNPのhERG試験は実施しなかった。

ICH-S7Aガイドラインに基づくパチシラン-LNPの*in vivo*コアバッテリー安全性薬理試験(心血管系、呼吸器系及び中枢神経系)は、GLP適用下でテレメトリー装着サルへの60分間の静脈内単回投与にて実施した(TTR02-NCD10-003試験; 2.6.3, 4項「安全性薬理試験」参照)。この試験では、6 mg/kgまでの用量において、QTc延長や他の心電図の量的(心拍数による補正值)又は質的変化は認められなかった。3 mg/kg以上において、遷延的な心拍数増加及び体温上昇がみられた。心血管系及び体温への影響は1 mg/kg以下の用量では認められず、3 mg/kgの用量で呼吸器系パラメータ及び神経学的検査結果の変化はみられなかった。3 mg/kgの用量におけるALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG₂₀₀₀-C-DMGの曝露量推定値は、それぞれ推奨ヒト用量(RHD、0.3 mg/kg)のAUCに基づくヒト曝露量推定値の7.3、3.4及び2.8倍であった。

サルを用いた反復投与毒性試験では、中枢神経系若しくは呼吸系に関連した一般状態の変化又は体温の上昇は認められなかった。

総合して、安全性薬理試験の結果、RHDにおける臨床での安全性に関連する変化は認められなかった。

3 薬物動態試験

パチシラン-LNPを用いた非臨床薬物動態試験の詳細なリストを2.6.5, 1項に、個々の試験の要約については2.6.4「薬物動態試験の概要文」に、これらの試験に用いたバリデートした分析法の概要を1.6項にそれぞれ示した。これらの試験から、パチシラン-LNPを構成するALN-18328及び

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

2つの新規脂質成分（DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG）の PK、分布、代謝及び排泄の特徴を評価した。パチシラン-LNP に含まれる他の脂質成分（DSPC 及びコレステロール）の循環血中への曝露については次の理由から評価しなかった。コレステロールは内因性物質であり、DSPC は自然界に存在するホスファチジルコリンと非常に類似した構造をもち、FDA による承認製剤の不活性成分として収載されており、安全性への懸念がないと考えられる。

3.1 吸収

全体として、マウス、ラット及びサルにパチシラン-LNP を単回投与したときの PK 及び TK の傾向は、全ての動物種において類似していた；3種類の分析対象物質（ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG）において、曝露量（C_{max} 及び AUC）に性差はなく、用量比例性が認められた。概して全ての動物種において、ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中濃度は初回試料採取時点（大部分は投与終了直後）に最高値に達し、その後、多相性の濃度推移を示して低下した。3種類の全ての成分において、主に肝臓への分布によるものと考えられる早い初期分布相がみられた。この初期分布相の後に消失相がみられ、特に DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG では比較的長い消失相半減期が認められた。概して3種類の全てのパチシラン-LNP 成分について、サルでの曝露量はマウス及びラットに比べて高値を示し、消失相半減期は長かった。ラット及びサルにパチシラン-LNP を単回投与したときの ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の PK パラメータの比較を表 3 に示す。

表 3 - ラット及びサルにパチシラン-LNP を単回投与したときの ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の PK パラメータ

Species	Study	Dose (mg/kg)	t _{1/2β} (h)	AUC _{0-t} (µg•h/mL)	V _{ss} (mL/kg)	CL (mL/h/kg)
ALN-18328						
Rat	TTR02-NCD10-006	0.3	0.29 ^a	3.71	27.5 ^a	88.2 ^a
Monkey	TTR02-NCD10-018	0.3	8.44	4.54	447	46.3
DLin-MC3-DMA						
Rat	TTR02-NCD10-006	1.9 ^b	192	69.0	4310	29.4
Monkey	TTR02-NCD10-018	1.9 ^b	610	684	1530	3.08
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG						
Rat	TTR02-NCD10-006	0.76 ^c	21.3 ^d	22.0	304 ^d	36.5 ^d
Monkey	TTR02-NCD10-018	0.76 ^c	161	222	134	3.48

Abbreviations: AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; CL=total body clearance; t_{1/2β}=terminal elimination half-life; V_{ss}=volume of distribution at steady state.

Pooled data from males & females (no sex differences observed).

^a Represents values from males only.

^b The corresponding dose of ALN-18328 was 0.3 mg/kg

^c The corresponding dose of ALN-18328 was 1 mg/kg

^d Represents values from females only.

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

マウス、ラット及びサルに反復投与したとき ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中への蓄積性はほとんどなく、それらの曝露量には性差は認められず、また、用量に比例した。ただし、ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験 (q2w で 14 回投与) では、最終投与後 (183 日目) の ALN-18328 及び 2 種類の脂質の血漿中濃度は、初回投与後に比べて著しく低かった (TTR02-NCD12-003 試験 ; 2.6.5.4.F 項参照)。曝露量の減少の原因として ADA によりパチシラン-LNP のクリアランスが亢進した可能性が考えられた。

3.2 分布

ラット血清アルブミン、ヒト血清アルブミン及びヒト α_1 -酸性糖タンパク質への *in vitro* 結合率は、それぞれ約 0.89%、0.46% 及び 2.07% と低かったことから、パチシラン-LNP の分布がタンパク結合の影響を受ける可能性は低いと考えられる (BA11010 試験 ; 表 2.6.5.6.A 参照)。パチシラン-LNP の PEG₂₀₀₀-C-DMG 成分は、ヒト血漿中で脂質又はリポ蛋白に強固に結合し、高いタンパク質結合率を示した (97% 結合)。パチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与したとき、非標識 ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は、肝臓 (ラット及びサル) 及び脾臓 (ラット) に高濃度に分布した (TTR02-NCD10-006 試験 ; 表 2.6.5.5.A 参照) 及び TTR02-NCD10-018 試験 ; 表 2.6.5.5.C 参照)。ラットでは、肝臓及び脾臓中の ALN-18328 濃度は投与後 1~4 時間に最高値に達し、肝臓中の投与量に対する分布率は脾臓に比べて約 100 倍高かった。肝臓及び脾臓中での最高組織中分布率 (対投与量%の平均値) は、ALN-18328 でそれぞれ、25.6% 及び 0.242%、DLin-MC3-DMA で 77.7% 及び 0.98%、PEG₂₀₀₀-C-DMG で 48.9% 及び 0.82% であった。

雄 Sprague-Dawley ラット及び雄 Long Evans ラットを用いた QWBA 試験では、¹⁴C-DLin-MC3-DMA を用いて製剤化したパチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与したとき、肝臓、脾臓、リンパ節及び副腎で高い放射エネルギーが認められた (■ 319-1103 試験 ; 表 2.6.5.5.D 参照)。肝臓中の放射エネルギーが最も多く、投与後 4 時間で投与量の約 90% が検出された。中枢神経系及び心臓組織の放射エネルギーは極わずかであったことから、パチシラン-LNP は筋肉に蓄積せず、脳組織に移行しないことが示唆された。更に、¹⁴C-パチシラン-LNP 由来放射能はメラニンに結合しなかった。以上をまとめると、TTR タンパク質の合成及びパチシラン-LNP の薬力学的作用の主要部位は肝臓であり、以上の結果は、パチシラン-LNP が ApoE を介して肝臓に取り込まれるという予想された生体内分布と矛盾がなかった。

妊娠ラット及びウサギにおいて、ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の胎児又は胎盤組織への分布は認められないか、ほんのわずかであった。妊娠してから授乳期間を通してラットに高用量 (1.5 mg/kg) のパチシラン-LNP を 6 日に 1 回静脈内投与したとき (計 6 回投与)、ALN-18328 は乳汁中には検出されず、他の 2 つの脂質成分も低濃度であり、授乳開始 12 日目で AF-011-18534 又はパチシラン-LNP の 5 回目投与の 2 時間後に、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG がそれぞれ血漿中濃度の 8.3% 及び 6.6% が検出された (TTR02-GLP16-003 試験参照)。

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

3.3 代謝

肝 S9 画分中でのパチシラン-LNP (ALN-18328 の安定性として評価) 及び各成分 ALN-18328、DLin-MC3-DMA、PEG₂₀₀₀-C-DMG の *in vitro* での代謝安定性は、試験に用いた全ての動物種 (マウス、ラット、サル及びヒト) において類似していた (BA16027 試験; 2.6.5.10.D 項 [ALN-18328]、■■■■319N-1001 試験; 表 2.6.5.10.E [DLin-MC3-DMA] 及び ■■■■319N-1305 試験; 表 2.6.5.10.G [PEG₂₀₀₀-C-DMG] 参照)。パチシラン-LNP はヒト以外の血清中ではやや不安定であったが (24 時間後の残存率 42~71%)、ヒト血清中では非常に安定であった (残存率 102%) (TTR-ST10-002 試験)。また、パチシラン-LNP は動物由来の肝サイトゾル中で安定であり (6 時間後の残存率 77~88%)、ヒト肝サイトゾル中ではより安定であった (残存率 100~102%) (TTR-ST10-001 試験; 表 2.6.5.10.C 参照)。遊離型 ALN-18328 は、4 種のいずれの動物種においても、肝サイトゾル中では安定であるものの、肝 S9 画分及び血清中では速やかに代謝され、この代謝にはエキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼが関与していると推定された(19)。これらの試験から、LNP 中に封入されていない場合、ALN-18328 は全身循環血中で速やかに消失/分解することが示され、循環血中で ALN-18328 が LNP から遊離した場合、ALN-18328 は速やかに消失/分解されるため、薬理活性である RNAi 作用を示さないと考えられる。なお、LNP を破壊せずに遊離型 siRNA のみを透過させる Amicon Ultra-4 フィルターを用いて *in vivo* 試験におけるパチシラン-LNP 投与後のラット血漿試料をろ過した結果、全身循環血中の siRNA の 98.5%以上が LNP 封入型であったことから、循環血中の遊離型 ALN-18328 は極わずかであった (TTR02-NCD10-006 試験; 表 2.6.5.5.A 参照)。更に、非製剤化 ALN-18328 をサルに単回投与した試験では、いずれの試料採取時点 (投与後 15~360 分) においても血漿中に ALN-18328 は検出されなかった (TTR-NCD09-004 試験; 表 2.6.5.3.A 参照)。パチシラン-LNP を投与後の *in vivo* 代謝プロファイリングにおいて、ラット血漿及び肝臓中に認められた主要なピークは、ALN-18328 の完全長センス鎖及びアンチセンス鎖であった (TTR02-DSM17-002 試験; 表 2.6.5.9.A 参照)。

対照的に、ラット尿中では完全長センス鎖及びアンチセンス鎖は認められず、主要代謝物としてセンス鎖由来の代謝物^{c*} 及び 代謝物^{d*}、並びにアンチセンス鎖由来の 代謝物^{g*} が認められた (TTR02-DSM17-002 試験; 表 2.6.5.9.A 参照)。ラット及びサルの尿中並びにサルの糞中に ALN-18328 が検出されなかったことから、ALN-18328 は未変化では排泄されないことが示唆された (TTR02-DSM16-013 試験; 表 2.6.5.13.B 参照)。特定した ALN-18328 の代謝物から、ALN-18328 はヌクレオチド単位で切断されることが示され、その結果により生成する個々のヌクレオチドは、排泄されずにサルベージ経路に利用される可能性が示唆された。

DLin-MC3-DMA は試験に用いた全ての動物種において類似した *in vitro* 代謝を示し、主要代謝物として一酸化体又は二酸化体が同定された。標識体である ¹⁴C-DLin-MC3-DMA を用いて製剤化したパチシラン-LNP をラット (■■■■319N-1201 試験; 表 2.6.5.9.B 参照) 及びサル (TTR02-DSM16-013 試験; 表 2.6.5.9.C 参照) に投与したマスバランス試験から、一酸化、二酸化及び加水分解経路により生成する DLin-MC3-DMA の代謝物が特定された。胆汁 (ラットのみ)、糞 (ラット及びサル) 及び尿 (ラット及びサル) 中には、¹⁴C-DLin-MC3-DMA 由来の放射能は、主にその加水分解代謝

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

物である DMBA として回収された。ラット血漿中の放射能の多くは、未変化体である ^{14}C -DLin-MC3-DMA 由来であり、AUC の約 81% を占めていた。血漿中の DMBA は未変化体に比べて少なく、投与量の 3% 未満であった。また、ラット及びサルいずれにおいても、投与量の 10% 以上に相当する他の DLin-MC3-DMA の代謝物も検出されなかった。ヒト CYP3A4 Supersome を用いた *In vitro* 試験では、DLin-MC3-DMA はわずかに代謝され、酸化体の生成が認められた (■ 319D-1304 試験; 表 2.6.5.10.I 参照)。しかし、ラット及びサルを用いた *in vivo* 試験では、CYP を介さずに加水分解により DMBA を生成する経路が主要な代謝経路であることが示された。

PEG₂₀₀₀-C-DMG は、*in vitro* でのマウス、ラット、サル及びヒト由来の肝ミクロソーム及び S9 画分中で比較的安定であった (■ 319N-1305 試験; 表 2.6.5.10.G 参照)。*In vitro* での代謝は極わずかであり、サル及びヒトで唯一の代謝経路として *O*-脱テトラデシル化が特定されたが、CYP を介したものではないと考えられた。PEG の代謝は分子量に依存し、PEG₂₀₀₀-C-DMG と同程度の分子量をもつ PEG はほとんど又は代謝されない(20)。ラット及びサルでは PEG₂₀₀₀-C-DMG は投与後 168 時間まで尿中に検出されず、サルでは PEG₂₀₀₀-C-DMG の約 44% が糞中に排泄された (TTR02-DSM16-013 試験; 表 2.6.5.13.B 参照)。これらの代謝及び排泄の結果から、PEG₂₀₀₀-C-DMG は主に代謝されず、肝胆道系を介して未変化体として糞中に排泄されることが示唆された。

3.4 排泄

全体として、 ^{14}C -DLin-MC3-DMA を用いて製剤化したパチシラン-LNP の排泄プロファイルは、ラット及びサルで類似していた。いずれの動物種においても、放射能は主に尿中に回収され (ラットで約 49%、サルで約 50%)、一部は糞中に排泄された (ラットで約 24%、サルで約 10%) (■ -319-1103 試験及び TTR02-DSM16-013 試験)。尿及び糞中のいずれについても、放射能は主に DLin-MC3-DMA の代謝物である DMBA として検出された。非カニューレ処置ラットと胆管カニューレ処置 (BDC) ラットにおいて、尿中排泄率 (対投与量%) は非カニューレ処置ラットで約 33% であったのに対して、BDC ラットでは約 12% であり、尿中排泄に差が認められた。このことから、DLin-MC3-DMA 関連成分が胆汁中に排泄され、再吸収された後、腎排泄を受けることが示唆された。ラット及びサルでは、ALN-18328 としては、ほとんど尿中及び糞中には排泄されず、また PEG₂₀₀₀-C-DMG も尿中には排泄されなかった。サルでは、PEG₂₀₀₀-C-DMG の約 44% が糞中に排泄され、肝胆道系を介して未変化体として糞中に排泄されることが示唆された (TTR02-DSM16-013 試験)。

3.5 薬物動態学的薬物相互作用

パチシラン-LNP が薬物動態学的薬物間相互作用を惹起する、又はその影響を受ける可能性は低いと考えられる。ALN-18328 は、主要な CYP 分子種 (1A2、2C8、2C9、2C19、2D6、又は CYP3A4) の直接的阻害剤や時間依存的阻害剤ではなかった一方、CYP2B6 に対する直接的及び時間依存的な阻害を認めた。ただし、その濃度が臨床効果につながる可能性は低かった (■ 319N-1807 試

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

■■■■■ を用いていたのに対し、■■ kg スケールでは■■■■■ に変更された。

■■ kg スケール (■■■■■) 又は■■ kg スケール (Alnylam) で製造されたパチシラン-LNP をそれぞれサルに 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき、 C_{max} 及び AUC は概ね類似していた。ALN-18328 の C_{max} 、 AUC_{0-t} 及び $AUC_{0-\infty}$ の比 (Alnylam/■■■■■) はそれぞれ、1.14、0.94 及び 0.92 であり、2 製剤投与後の ALN-18328 のサルの PK に明らかな違いは認められなかった (TTR02-NCD13-001 試験; 表 2.6.7.16.A 参照)。

■■ kg スケール又は■■ kg スケールで製造されたパチシラン-LNP による反復投与試験 (サル) において、血漿中 ALN-18328 の曝露量に変動がみられ、平均 AUC_{0-t} 値は■■ kg スケール (Day 1 から Day 43 では 0.3 mg/kg、Day 43 では 2.0 mg/kg) でより低かった。こうした相違はあっても、2 ロット間の薬力学的作用 (血清トランスサイレチン濃度減少) に差はなかった。血漿中 DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の曝露量は、Day 1 及び Day 43 において、■■ kg スケールと■■ kg スケールとの間で同程度であった (TTR02-GLP17-007 試験; 表 2.6.7.17.C 参照)。

4 毒性試験

パチシラン-LNP を用いた非臨床毒性試験の詳細なリスト (GLP 適用の有無に関する表記を含む) は、2.6.7.1 項「毒性試験一覧表」を参照。個々の試験の概要については、2.6.6「毒性試験の概要文」を参照。

パチシラン-LNP を用いて実施された毒性試験のプログラムには、単回投与毒性 (被験物質は siRNA のみ)、反復投与毒性、遺伝毒性、がん原性及び生殖発生毒性、並びに添加剤及び免疫刺激を評価するための補足的な試験が含まれる。これらの試験をサポートする目的で、必要に応じて、TK 測定が合わせて実施された。

これらの毒性試験により、パチシラン-LNP の懸念される標的器官が特定され、無毒性量 (NOAEL) が確立し安全域が確認された。0.3 mg/kg/q3w の投与レジメンでのパチシラン-LNP の安全性が確立することにより臨床試験が適切にサポートされ、パチシラン-LNP の製造販売申請がサポートされた。

4.1 単回投与毒性

単回投与毒性は、反復投与毒性試験の一部として評価した。ラット及びサルの反復投与毒性試験が間欠的な投与スケジュール (2 週に 1 回、3 週に 1 回又は毎月 1 回) で実施され、そこから用量選択を行うための十分な安全性データが得られることから、これは科学的に正当であると考えられた。2 つのサル反復投与毒性試験は、パチシラン-LNP の最初の投与の 24 時間後 (2 日目) 又は 72 時間後 (4 日目) の臨床病理パラメータの評価を含んでいた。これらの試験結果は 4.2 項に記載されている。

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

サルへの製剤化していない ALN-18328 siRNA の単回投与では、100 mg/kg（検討した最高用量）以下において忍容性が良好であった（TTR-NCD09-004；表 2.6.7.5.A 参照）。唯一の ALN-18328 関連の所見は、3 日目及び 15 日目の ≥ 30 mg/kg での血清トリグリセリドの減少であったが、有害とはみなされなかった。C4d に ALN-18328 関連の変化は認められず、補体分解産物 Bb 濃度あるいは機能的補体（CH₅₀）値、又はサイトカイン（IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 及び IFN- α ）に毒性的に関連する作用は認められなかった。NOAEL は 100 mg/kg と判断されたが、ALN-18328 の全身曝露量は投与 15 分後（初回試料採取時点）には観察されず、これは製剤化していない siRNA の既知の迅速な代謝と一致する。

4.2 反復投与毒性

パチシラン-LNP を用いた反復投与毒性試験では、マウス（4.4項参照）、ラット及びサルにおいて同様の毒性標的器官が観察された。毒性の主な標的器官は肝臓及び脾臓であった。ラットは最も感受性の高い動物種であった。観察された毒性は、製剤中に内包された siRNA とは無関係に類似していることから、LNP によるものである可能性が高い。更に、製剤化していない siRNA を用いたサルの静脈内単回投与試験では、最高用量でも毒性は認められなかった（4.1項参照）。

ラットの 6 週間（q2w \times 4）毒性試験においてパチシラン-LNP の全ての用量で、相関する循環肝酵素の上昇を伴う用量制限肝毒性（壊死を含む）が観察され、NOAEL は確立されなかった（TTR02-NCD10-005；表 2.6.7.7.A 参照）。この試験における他の毒性標的器官には、脾臓、副腎、リンパ節、投与部位及び精巣が含まれた。脾臓の所見（白脾髄でのリンパ球枯渇／萎縮／壊死及び組織球増加）は免疫抑制の兆候と関連がなく、副腎の所見（皮質肥大）は発現頻度及び重症度が低いと有害ではないと考えられた。リンパ節及び投与部位の変化は本質的に炎症性であった。肝臓、脾臓、副腎及びリンパ節における所見は、60 日間の回復期間後に部分的又は完全に回復した。しかし、精巣所見（精上皮の変性／萎縮）は、少数の回復動物でも観察された。AF-011-1955（パチシラン-LNP と同じ LNP の中に昆虫ルシフェラーゼに対する siRNA を内包する）を投与したラットで毒性は同様であり、毒性は siRNA 特異的なものではなく、LNP 製剤に関連していることが示唆された。パチシラン-LNP 及び AF-011-1955 投与ラットの両方に、ADA（PEG₂₀₀₀-C-DMG に対する IgG）が存在し、42 日目よりも 14 日目で反応が高かった。IgM 反応は、ベースライン値が高いため決定できなかった。ADA の存在は、この 6 週間（q2w \times 4）のラットの毒性試験において、血漿中薬物曝露に明らかな影響を及ぼさなかった。

その後に実施したラットの 4 週間（q4w \times 2）試験でも、0.3 mg/kg/q4w 以上の雄において血清肝酵素の変化を伴う有害な肝毒性（壊死を含む）が認められた（TTR02-NCD11-002；表 2.6.7.7.B 参照）。これらの肝臓所見は亜急性炎症を伴っていた。この試験では、脾臓における病理組織学的所見（白脾髄におけるリンパ球枯渇／萎縮／壊死及び組織球増加）も全ての用量で認められた。副腎、リンパ節、投与部位又は精巣に所見は認められなかった。重篤度が低く、相関する血液学的変化が認められなかったことから、脾臓の所見は有害であるとはみなされなかった。対照動物

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

のいずれも 14 日目又は 28 日目に IgG 又は IgM の ADA 陽性反応を示さなかった。IgM 陽性反応の発現頻度は、パチシラン-LNP 投与全群で 28 日目より 14 日目の方が高く、力価は 20~80 の範囲であった。IgG 陽性反応の発現頻度は、1.0 mg/kg/q4w 以下の用量の群で 28 日目より 14 日目の方が高いか同等で、力価は 20~640 の範囲であった。ADA の存在は、この試験における血漿薬物曝露に影響しなかった。NOAEL は 0.1 mg/kg/q4w と判断された。

パチシラン-LNP を投与したラットの 26 週間 (q2w×14) 試験では、生理食塩水対照群及びパチシラン-LNP 投与群において、投与部位 (後大静脈の留置カテーテルの先端) に軽微~重度の血管/血管周囲炎が観察された (TTR02-NCD12-003 試験; 表 2.6.7.7.C 参照)。パチシラン-LNP 投与群では重症度のわずかな増加を伴っていた。ラット 26 週間 (q2w×14) 試験の NOAEL は 0.3 mg/kg/q2w (試験された最高用量) と判断された。しかし、ALN-18328 に対する全身曝露は、全投与群で投与期間終了時に検出されず、試験動物の約 50% に検出可能な ADA (PEG₂₀₀₀-C-DMG に対する IgG 抗体と IgM 抗体の合計) が投薬期間終了時に認められ、その力価は <10 から 640 の範囲であった。DLin-MC3-DMA の血漿曝露は、1 回目の投与時と比較して投与期間終了時には全ての群で低かった。更に、PEG₂₀₀₀-C-DMG の TK プロファイルは、初回投与後と比較して、投与期間終了時に全ての群において変化していた。投与期間終了時の ALN-18328 の曝露の減少及び DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の曝露の変化は、この試験において有害な標的器官所見が認められなかった一因であると考えられた。

肝臓及び脾臓は、サルでも主な毒性標的器官であった。他の標的器官には、副腎及び投与部位が含まれていた。6 週間 (q2w×4) の試験では、3 mg/kg/q2w (検討した最高用量) で肝酵素の上昇と関連する有害な肝毒性 (壊死を含む) が観察された (TTR02-NCD10-011 試験; 表 2.6.7.7.E 参照)。試験 2 日目 (投与後約 24 時間) に、血清肝酵素の可逆的増加が、雄では 0.3 mg/kg (検討した最低用量)、雌では 1 mg/kg 以上で観察された。パチシラン-LNP 関連の脾臓、副腎、投与部位の所見も 3 mg/kg/q2w で認められた。ラットとは対照的に、サルにおける脾臓所見 (赤脾髄における細胞充実性の低下) は、白脾髄ではなく赤脾髄に限定され、免疫機能への影響又は関連する血液学的変化は認められなかった。副腎の所見 (皮質肥大及び変性/壊死) は軽微で、有害なものではなかった。ラットで観察されたように、血管/血管周囲の炎症が投与部位で観察された。同様の標的器官毒性が、AF-011-1955 の 3 mg/kg/q2w で観察され、毒性が製剤の LNP 成分に起因している可能性が高いことが再び実証された。標的器官毒性は、部分的 (肝臓及び脾臓) 又は完全 (副腎及び投与部位) に可逆的であった。全てのパチシラン-LNP 投与群において、一時的な血清 IL-1RA 及び IL-6 濃度増加と同様に一過性の補体活性化 (Bb 断片又は C3a の増加によって測定) が観察された。同様の補体及びサイトカインの変化は、AF-011-1955 の 3 mg/kg でも認められた。対照群の動物には、14 日目及び 42 日目に IgG 又は IgM ADA は認められなかった。パチシラン-LNP の全用量にわたり 14 日目の IgG 陽性反応発現頻度は 42 日目よりも高かった。IgM 陽性反応はパチシラン-LNP の全ての用量で 14 日目に観察された。IgM 陽性反応は 42 日目には認められなかった。同様の IgG 及び IgM 反応が AF-011-1955 の 3 mg/kg/q2w でも観察された。ADA 産生は血漿中薬物曝露に影響を与えなかった。NOAEL は 1 mg/kg/q2w と判断された。

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

その後実施したサル 39 週間 (q3w×14) 毒性試験では、計画されていた試験 4 日目の測定において血清肝酵素値が増加していたことから、初回投与後、高用量を 3 から 2 mg/kg/q3w (以下 3/2 mg/kg/q3w と呼ぶ) へ下げた (TTR02-NCD12-001 試験; 表 2.6.7.7.F 参照)。高用量の雌 (2 mg/kg) は、2 回目の投与を受けてから約 18 時間後、23 日目に死亡しているのが見つかった。死因は特定できなかったが、パチシラン-LNP の静脈内持続投与に関連する反応の可能性は否定できなかった。肝臓及び脾臓は 39 週間の投与期間終了時の毒性標的器官であり、6 週間 (q2w×4) の試験で観察されたのと同様であった。1 mg/kg/q3w 以上で肝臓に病理組織学的所見が認められ、3/2 mg/kg/q3w での肝酵素の増加と関連し、13 週間の回復期間終了時には完全に又は部分的に回復した。脾臓では、赤脾髄における可逆性のパチシラン-LNP 関連の病理組織学的所見が 3/2 mg/kg/q3w で認められた。39 週間の試験では、副腎又は投与部位の所見は認められなかった。パチシラン-LNP の長期投与により、補体生成物 (B 因子、総 C3 及び CH₅₀) は影響を受けず、一過性の補体活性化による長期の補体枯渇はないことが示された。0.3 mg/kg/q3w の 2 匹の雌において、ADA (PEG₂₀₀₀-C-DMG に対する IgG と IgM の合計) 陽性反応が 22 日目のみ観察された (力価 ≤ 40)。この試験の NOAEL は 1 mg/kg/q3w と判断された。サルにパチシラン-LNP を 6 週間の試験で 2 週に 1 回 (q2w) に、又は 39 週間の試験で 3 週に 1 回 (q3w) 投与したときの NOAEL は 1 mg/kg であった。パチシラン-LNP の長期投与で毒性は進行しなかった。

パチシラン-LNP の主薬理作用及び副次的薬理作用に起因する明らかな毒性は認められなかった (2.2 項参照)。サル 6 週間 (q2w×4) 及び 39 週間 (q3w×14) の試験では、循環血中 TTR タンパク質濃度の低下に関連する毒性学的変化又は循環血中ビタミン A 又はサイロキシンレベルの長期的な低下を経験した動物での眼の変化 (網膜電図を含む) や甲状腺の変化は認められなかった。

4.3 遺伝毒性

パチシラン-LNP は、細菌を用いる復帰突然変異試験 (TTR02-NCD10-015 試験; 表 2.6.7.8.A 参照)、哺乳類細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験 (ヒトリンパ球) (TTR-NCD10-016 試験; 表 2.6.7.8.B 参照)、*in vivo* マウス小核試験 (TTR02-NCD12-006 試験; 表 2.6.7.9.A 参照) からなる一連の遺伝毒性試験で評価した。全ての *in vitro* 試験は、細胞傷害性又は溶解性で制限されるまでの濃度を用いて、外因性代謝活性化の存在下及び非存在下で実施した。パチシラン-LNP は、*in vitro* 又は *in vivo* 試験のいずれにおいても遺伝毒性を示さなかった。

4.4 がん原性

TgRasH2 マウスにおける 26 週間の反復投与試験でパチシラン-LNP のがん原性は認められなかった。ラットにおけるパチシラン-LNP の 2 年間のがん原性試験は実施されなかった (1 項参照)。

重要な TgRasH2 マウスの 26 週間がん原性試験 (TTR02-GLP15-024 試験; 表 2.6.7.10.C 参照) の用量選択のために、パチシラン-LNP を用いた 2 回の反復投与用量設定試験をマウスで行った

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

(TTR02-NCD14-003 ; 表 2.6.7.10.A 及び TTR02-NCD14-004 試験 ; 表 2.6.7.10.B 参照) 。 26 週間が
ん原性試験でパチシラン-LNP は 6 mg/kg/q2w (検討した最高用量) 以下でがん原性を示さなかつ
た。TgRasH2 マウスに血液学的悪性腫瘍は認められず、パチシラン-LNP 関連の腫瘍所見も認めら
れなかった。様々な器官及び組織で認められた新生物は、この系統及び齢のマウスで一般的に観
察されるものであり、生理食塩水投与対照群とパチシラン-LNP 投与群で発生率が類似していたた
め、起源は自然発生的なものであると考えられた。これには、パチシラン-LNP の 0、0.5、2 及び
6 mg/kg/q2w 投与した雄でそれぞれ雄 0/25、2/25、4/25、3/25 匹、雌でそれぞれ 1/25、0/25、0/25、
0/25 匹で観察された肺の腫瘍所見 (気管支肺胞癌及び腺腫) が含まれる。この所見は、N-メチル
-N-ニトロソ尿素 (MNU) 75 mg/kg を投与した雄 5/25、雌 3/25 にも認められた。この雄マウスで
認められた肺の腫瘍所見は、用量相関及び前腫瘍性病変 (細気管支肺胞過形成) の用量相関的な
増加が認められないこと、雄において肺腫瘍の多重性が認められないこと、両方ともこのマウス
の系統で一般的に認められる腫瘍であることから、パチシラン-LNP との関連はないとみなされた。
肺の細気管支肺胞腺腫及び癌腫の発生率は試験施設の背景値及び文献値と同等であった(22)(23)。
上記のように、陽性対照である MNU を投与した TgRasH2 マウスは、生理食塩液投与対照マウス
と比較して期待される反応、低い生存率、並びに高いリンパ腫及び胃腫瘍発生率を示した。これ
らの所見は、このアルキル化発がん物質を投与した TgRasH2 マウスの公表されたデータと同等で
あった。公表されたデータと同様、MNU の投与は、自然発生のバックグラウンド腫瘍の直接比例
的增加をもたらさなかった。

4.5 生殖発生毒性

パチシラン-LNP は、雌雄 Sprague Dawley ラット及び雌ニュージーランドホワイトウサギにおけ
る生殖発生毒性試験の完全なバッテリーで評価されている。全てのラット試験において、生殖発
生に対する主薬効 (TTR の低下) 又は副次的薬理作用 (ビタミン A の減少) の影響を評価するた
め、薬理的な活性を有するげっ歯類サロゲート AF-011-18534 (パチシラン-LNP と同じ LNP に
げっ歯類動物の TTR を標的とする siRNA [AD-18354] を内包したもの) を使用した。

4.5.1 受胎能及び初期胚発生

雄雌ラットの受胎能、性成熟した雄サルの雄性生殖能に対するパチシラン-LNP 関連作用は認め
られなかった。

精巣毒性は、ラットの 6 週間 (q2w×4) 毒性試験でのみ認められ、その後の試験では認められ
なかった (4.2 項参照) 。雄受胎能試験 (TTR02-GLP15-035 試験 ; 表 2.6.7.12.A 項参照) では、無
処置雌との同居前にパチシラン-LNP を 10 週間 (すなわち、精子形成の全サイクル) 、2 週に 1 回
投与した。パチシラン-LNP の最大 0.3 mg/kg/q2w (検討した最高用量) まで、雄の生殖発生パラ
メータ又は受胎能に及ぼす影響は認められなかった。パチシラン-LNP のサロゲートである
AF-011-18534 の 0.1 mg/kg/q2w 投与により血清 TTR (約 90%) 、ビタミン A (79%) 及びサイロキ
シン (68%) が減少したにもかかわらず、雄の受胎能及び生殖発生能力は影響を受けなかったこ

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

とから、雄ラットにおいてパチシラン-LNP サロゲートは受胎能及び生殖発生能力に対する薬理的な作用を有していないことが示された。雄ラットでのパチシラン-LNP の生殖発生 NOAEL は 0.3 mg/kg/q2w (検討した最高用量) であった。

更に、パチシラン-LNP が雄受胎能に及ぼす影響を十分に評価するために、39 週間のサルの毒性試験 (q3w×14) (TTR02-NCD12-001 試験; 表 2.6.7.7.F 参照) において性成熟した雄を使用した。パチシラン-LNP の 3/2 mg/kg/q3w (検討した最高用量) 以下で、雄性生殖評価 (精液の量、色及び外観、精子濃度、運動能及び形態並びに精巣体積測定) 又は顕微鏡で観察された精巣精子形成サイクルにおいて、変化は認められなかった。

ラットの 3 つの毒性試験のうちの一つのみ (0.15 mg/kg/q2w 以上) で精巣毒性が発生したが、ラットの雄受胎能 (検討した最高用量である 0.3 mg/kg/q2w 以下) 及び成熟サルでの雄性生殖能 (検討した最高用量である 3/2 mg/kg/q3w 以下) でパチシラン-LNP の影響は認められておらず、6 週間のラット試験における精巣毒性の所見は、男性患者に対する臨床的な関連性はないと考えられた。

2 つの雌ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生期複合的用量設定試験 (TTR02-NCD13-003 試験及び TTR02-DSM15-015 試験; 表 2.6.7.11 参照) でパチシラン-LNP を無処置雄との同居 15、8、1 日前、及び妊娠 6、13、19 日に投与したところ、最低母動物毒性用量は 1.5 mg/kg と判断された。胎児への ALN-18328、AD-18534、PEG₂₀₀₀-C-DMG 曝露は認められなかったが、極めてわずかな DLin-MC3-DMA の胎児曝露が認められた。重要な雌ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生複合的試験 (TTR02-GLP15-031 試験; 表 2.6.7.13.A 参照) では、パチシラン-LNP を無処置雄との同居 15、8、1 日前、及び妊娠 6、13、19 日に 1.5 mg/kg 以下の用量で投与したが、発情周期、交配又は受胎能に影響は認められなかった。

4.5.2 胚・胎児発生

ラット又はウサギにおいて、母動物毒性を伴わない用量でパチシラン-LNP の胚・胎児への影響は認められなかった。

重要なラットの受胎能及び胚・胎児発生複合的試験 (TTR02-GLP15-031 試験; 表 2.6.7.13.A 参照) では、パチシラン-LNP 又は AF-011-18534 を雌ラットに、無処置雄と同居させる 15、8、1 日前及び妊娠 6、13、19 日に静脈内投与した。母動物におけるパチシラン-LNP に関連する影響としては、妊娠 21 日に 1.5 mg/kg において軽微な母動物毒性と一致して、肝臓トランスアミナーゼの増加及び血液学的変化が認められた。薬理的に予想された血清 TTR 及びビタミン A 濃度の減少が、AF-011-18534 の 1.5 mg/kg で観察された。これらのデータに基づき、雌母動物毒性に対する NOAEL はパチシラン-LNP が 0.5 mg/kg、AF-011-18534 が 1.5 mg/kg (この用量のみで評価) であった。パチシラン-LNP 又は AF-011-18534 の投与による、妊娠、胚・胎児の生存、胎児の体重への影響や、胎児の外表面、内臓、骨格の奇形又は変異は認められなかった。AF-011-18534 の 1.5 mg/kg 投与により、血清 TTR 濃度のベースラインからの顕著な減少 (95% 超の減少) 及び血清ビタミン A 濃度の減少 (コントロールから 88%) が認められたことに留意すべきである。したがって、パチシラン-LNP 及び AF-011-18534 の生殖及び発生の NOAEL は、パチシラン-LNP では検討した最

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

高用量、AF-011-18534 では用いられた唯一の用量である 1.5 mg/kg であり、器官形成中に肝臓の TTR 産生を本質的に阻害した。

雌のウサギの用量設定試験 (TTR02-DSM15-012 ; 2.6.7, 11 項参照) では、パチシラン-LNP を 1 及び 2 mg/kg の用量で妊娠 7、13 及び 19 日に静脈内投与した結果、有害な一般状態の変化の発現頻度の増加、母動物の体重増加量減少及び摂餌量の減少によって示される母動物毒性が認められた。妊娠中の肝臓トランスアミナーゼの増加が妊娠 29 日に観察された。自然流産、早期胚吸収及び着床後死亡の増加、並びに同腹児数、胚・胎児生存及び胎児体重の減少が 1 及び 2 mg/kg で観察されたが、この用量で生じた母動物毒性による二次的なものと考えられた。パチシラン-LNP 関連の外表面異常は認められなかった。胎児への ALN-18328 取り込みは 2 mg/kg での 1 例の胎児 (胎児 ALN-18328 濃度は母動物血漿 C_{max} の 0.10% 未満) を除き認められなかった。DLin-MC3-DMA (母動物血漿 C_{max} の 0.04~0.18%) 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG (母体血漿 C_{max} の 0~0.42%) のわずかな胎児曝露が認められた (3.2項参照)。

その後に実施した重要なウサギの胚・胎児発生試験 (TTR02-GLP15-034 試験 ; 表 2.6.7.13.B 参照) においてパチシラン-LNP を妊娠 7、13、19 日に静脈内投与したところ、0.6 mg/kg (検討した最高用量) で死亡 (雌 1/20 匹)、有害な一般状態の変化の発現頻度の増加、体重増加量の減少、摂餌量の減少が認められた。これらの結果に基づき、パチシラン-LNP の母動物毒性の NOAEL は 0.3 mg/kg と判断された。卵巣及び子宮パラメータ、同腹児数、性比、胚・胎児の生存率、胎児体重又は胎児の形態学的検査 (外表、内臓及び骨格) においてパチシラン-LNP 関連の影響は認められなかった。したがって、パチシラン-LNP の胚・胎児発生に対する NOAEL は 0.6 mg/kg と判断された。

4.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能

パチシラン-LNP によるラットの出生前又は出生後の発生への影響は認められなかった。

パチシラン-LNP を 1.5 mg/kg 以下及び AF-011-18534 を 1.5 mg/kg の用量で、ラットの妊娠 7、13、19 日、授乳 6、12、18 日に静脈内投与したが、AF-011-18534 群で血清 TTR (ベースラインから 90~100%)、ビタミン A (ベースラインから 67~82%)、サイロキシン (ベースラインから 66%) が大幅に減少したにもかかわらず、妊娠、分娩、授乳又は母動物の行動に影響は認められなかった (TTR02-GLP16-003 試験 ; 表 2.6.7.14.A 参照)。母動物毒性及び生殖に関する NOAEL は、試験した最高用量 (1.5 mg/kg) であった。F₁ 世代では、出生児の死亡率、成長、性成熟、行動、交配及び受胎能、又は卵巣及び子宮のパラメータにパチシラン-LNP 又は AF-011-18534 に関連する影響は認められなかった。母動物毒性並びに出生児の生存率及び成長の NOAEL はパチシラン-LNP の検討した最高用量又は AF-011-18534 の用量の 1.5 mg/kg であったが、その用量は本質的に器官形成及び授乳期間の肝臓での TTR 産生を阻害する用量であった。授乳 12 日の投与 2 時間後の乳汁中に ALN-18328 及び AD-18534 は検出されなかった。パチシラン-LNP 1.5 mg/kg 投与後のこの測定時点での乳汁中 DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は母動物血漿中濃度のそれぞれ 4.7% 以下及び 6.6% 以下であった (3.2項参照)。

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

4.5.4 幼若動物を用いた試験

幼若動物を用いた試験は実施していない（1項参照）。

4.6 局所刺激性

局所刺激性試験は実施していない。静脈内持続投与部位を、ラット及びサルにおける反復投与毒性試験で評価した（4.2項参照）。パチシラン-LNP の2年間がん原性試験の静脈内投与の代替経路として皮下投与をラットで評価したが、注射部位に有害な炎症が生じた（TTR02-NCD14-001 試験；表 2.6.7.7.D 参照）。

4.7 その他の毒性試験

免疫毒性及び免疫原性を、ラット及びサルの反復投与毒性試験で評価した（4.2項参照）。免疫刺激に関しては、ALN-18328 は、ヒト末梢血単核細胞を用いた *in vitro* 試験（BIO09006 試験及び BIO09042 試験；表 2.6.7.17.G 参照）及びサルの単回静脈内投与（4.1項参照）で、サイトカイン放出を誘発しなかった。対照的に、パチシラン-LNP を静脈内持続投与した CD-1 マウスではいくつかの血清サイトカイン（G-CSF、IL-6、インターフェロン γ 誘導性タンパク質 10 [IP-10]、ケラチノサイト化学誘引物質[KC]、ケモカイン[CXC モチーフ]リガンド 1 [CXCL1]及び単球走化性タンパク質-1 [MCP1]）が一過性に誘発され（TTR02-NCD11-001 試験；表 2.6.7.17.G 参照）、サルでは一過性の補体活性化及びサイトカイン放出が生じた（4.3項参照）。最終濃度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下のパチシラン-LNP で処置したヒト全血において、臨床的に関連する溶血又は凝集は *in vitro* で観察されなかった（TTR-NCD10-017 試験；表 2.6.7.17.A 参照）。これらの濃度は、推奨ヒト用量での ALN-18328 血漿 C_{max} （7.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を超えていた。

抗原性、毒性機序、薬物依存、代謝産物、光毒性/光安全性のための特別な試験は必要ないと考えられた（1項参照）。

GLP 毒性試験で使用されたパチシラン-LNP バッチに存在する不純物に基づいて、又は公表された情報に基づき、不純物の安全性確認を行った。安全域は、 種類の不純物原薬（ALN-18328）群のうち のみを含むものを除き、実生産用の推奨許容基準の3~63倍であった（3.2.S.3.2 参照）。 は、

 、毒性学的な懸念はないと考えられた。DLin-MC3-DMA の不純物は つを除き安全性が確認されている（3.2.A.3.3.2 参照）。 の不純物は に類似していた。 中の不純物として特定された つのうち つは、親添加剤と構造が密接に関連しており、反応性または変異原性成分を含まず、 と同様の方法で除去されると考えられる。N-ヒドロキシコハク酸イミドは 中の潜在的な低分子不純物であるが、発癌性も催奇形性もなく（24）、 に用いられている（25）。コレステロールは市販されており、既承認医薬品にも使用されている、複数の公定書（米国薬局方、欧州薬局方及び日本薬局方）に記載されている化合物であり、不純物の安全性確認は

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

必要ないと考えられた。[REDACTED]からの情報によると、DSPCには毒性不純物は含まれないと予想される。

[REDACTED]つの潜在的な突然変異誘発性/がん原性不純物がALN-18328及びDLin-MC3-DMAで同定されたが、適切な管理が実証されていること、あるいは、それぞれの合成工程内の管理において、最終的なパチシラン-LNPにおけるそれらの存在の可能性が非常に低いことが示されていることから、毒性学的な懸念はないと推察された。

コレステロールは市販されており、承認済みの医薬品に使われており、複数の公定書（米国薬局方、欧州薬局方及び日本薬局方）に記載されている添加物であるため、遺伝毒性不純物の評価は必要ないと判断した。DSPCは[REDACTED]からの情報によると、遺伝毒性はなく、遺伝毒性を有する不純物は含まれていないと予想される。

パチシラン-LNPの一次容器及び施栓系並びに製剤バルク保存バッグ中の溶出物及び浸出物については適切に評価が行われ、毒性上の懸念は認められなかった（3.2.P.2.4参照）。

パチシラン-LNPの製造場所及び製造工程の変更をサポートするために、1 mg/kgの用量でサル単回投与の比較試験を実施した（[REDACTED] kgスケールバッチと[REDACTED] kgスケールバッチの比較）（TTR02-NCD13-001試験；表 2.6.7.17.B参照）。その異なる2バッチを投与した動物間のPK、PD、ADA又は安全性プロファイルには差がなかった（3.6項参照）。製造工程の変更（[REDACTED] kgスケールバッチから[REDACTED] kgスケールバッチ [最終的に計画された市販ロットサイズ]へ）を支持するため、引き続き0.3 mg/kg（ヒト推奨投与量）及び2.0 mg/kg（無毒性量を超える用量）における反復投与の同等性/同質性試験（サル）を実施した。その異なる2バッチを投与した動物間のPD又は毒性に差はなかった。ALN-18328の曝露量は[REDACTED] kgスケールバッチで[REDACTED] kgスケールバッチよりも少なかったほか、DLin-MC3-DMA又はPEG₂₀₀₀-C-DMGにおいて[REDACTED] kgスケールバッチと[REDACTED] kgスケールバッチとの間にTKの差はなかった（3.6項参照）。毒性試験で使用されたバッチ内の[REDACTED]の詳細については、表 2.6.7.4.Aを参照のこと。

パチシラン-LNP中の添加物DLin-MC3-DMA及びPEG₂₀₀₀-C-DMGを、細菌を用いる復帰突然変異試験（PCS02-NCD10-006試験；表 2.6.7.17.D.1、TTR02-NCD10-009試験；表 2.6.7.17.D.3参照）、哺乳類細胞（ヒトリンパ球）を用いる*in vitro*染色体異常試験（PCS02-NCD10-007試験；表 2.6.7.17.D.2、TTR02-NCD10-008試験；表 2.6.7.17.D.4参照）で評価した。全ての*in vitro*試験は、細胞傷害性又は不溶性によって制限されるまでの濃度を用い、外因性代謝活性化の存在下及び非存在下で実施した。DLin-MC3-DMA及びPEG₂₀₀₀-C-DMGは遺伝毒性を示さなかった。

5 総括及び結論

hATTR アミロイドーシスは、進行性で重篤かつ生命を脅かす全身多発性の希少疾患で、*TTR* 遺伝子の変異が原因となり運動神経、感覚神経、自律神経の障害及び心筋症を引き起こす。成人に発症し、死に至ることが不可避で、診断後の生存期間の中央値は4.7年（1.3から24.8年の範囲）である(26)(27)。

この疾患の全身症状の多くはアミロイド原性を持つ肝臓由来の循環血中 *TTR* によるものであるため、現在の hATTR アミロイドーシス患者の治療には循環血中 *TTR* 量を低下させることを目的とした2つの治療アプローチがとられてきた。一つは同所性肝移植（OLT）であり、もう一つはタファミジス及びジフルニサル、すなわち *TTR* 四量体安定化薬である。タファミジスは欧州、メキシコ、日本及び南米の数か国のみではあるが hATTR アミロイドーシス治療薬として承認されている唯一の医薬品である。しかしながら、OLT 及びタファミジスが有効なのは hATTR アミロイドーシス患者のうち神経障害の早期ステージ(28)(29)に限られており、大多数の患者は神経障害と心臓疾患の進行が続き、障害の程度がより大きくなり、生活の質、歩行や日常生活の活動能力が恒常的に低下していく(30)(31)(32)(33)。

パチシラン-LNP を静脈内投与すると、*TTR* mRNA を標的とする薬理作用を示し、臨床試験でも認められてきたように、重症度の異なる神経障害及び心筋症や種々の *TTR* 変異型といった広範なスペクトラムの hATTR アミロイドーシス患者に実際的なベネフィットをもたらすことが示されている。

プラセボと比較したときのパチシラン-LNP（0.3 mg/kg/q3w）による多発性神経障害及び心筋症の改善は、安定化及びベースラインからの改善を含めて、パチシラン-LNP の投与を受けた全ての患者集団に対し、歩行、栄養状態及び生活の質に影響を与える全体的な健康状態の改善をもたらした。特定されたパチシラン-LNP のリスクは頻度が低く、限定的で、添付文書に輸液関連反応（IRR）やビタミン A 欠乏症のリスクを緩和し管理する方法を示すことで管理可能であると考えられる。パチシラン-LNP による臨床試験で肝機能検査、腎機能、血小板数の有意な変化は認められなかった(2.5 「臨床に関する概括評価」参照)。

5.1 薬理試験

独自データベース及び公表データベースによる一連の *in vitro* 試験及びバイオインフォマティクス解析により、ヒト *TTR* mRNA の 3'-UTR を標的とし、強力で特異性の高い、かつオフターゲット作用の可能性が低い siRNA である ALN-18328 を選択した。*in vitro* 試験及びバイオインフォマティクス解析により、野生型及び変異型の両 *TTR* に対する ALN-18328 の効力と特異性が確認された。更に、オフターゲット標的となる可能性の高い  候補のヒト遺伝子配列に対し、ALN-18328 は目立った活性を示さなかった。また、多様な地理的及び民族的背景を有する集団の間で ALN-18328 の標的部位は100%保存されており、ALN-18328 はあらゆる地理的及び民族的背景を有する hATTR

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

アミロイドーシス患者で同様に *TTR* mRNA 発現阻害を示すことが予想された。ALN-18328 は、天然に存在する未修飾、及びリボース 2'位の O-メチル化 [2'OMe] 修飾ヌクレオシドのみからなる。アンチセンス鎖 [REDACTED] [REDACTED] 欠失配列がヌクレアーゼによる代謝により形成される可能性が *in vivo* 試験から確認されたため、その欠失配列を有するパチシラン siRNA の薬力学的活性を *in vitro* 試験で検討し、切断型が *TTR* mRNA に対して部分活性を持つことが示された。

パチシラン-LNP は、ALN-18328 と、4種の脂質添加剤、すなわち2種の新規添加剤 (DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG) 及び 2種の既存添加剤 (DSPC 及びコレステロール) からなり、薬理学的標的である肝臓に ALN-18328 を送達するように特別に設計されている。これらの脂質は LNP の構造を保持し、粒子の凝集を防ぎ、ALN-18328 をエンドヌクレアーゼによる分解から保護し、タンパクとの結合やオプソニン化を防ぎ、LDLR 及び他の ApoE 受容体を介した ApoE 依存的な肝細胞への取り込みと、それに続くエンドソームから肝細胞質内への ALN-18328 の放出を可能にし、RNAi メカニズムによる薬理学的作用の発現に寄与する(7)。

パチシラン-LNP はサルに対し薬理活性を示すが、げっ歯類又はウサギのいずれに対しても薬理学的活性を持たない。サルを用いた単回及び反復投与による薬理試験の結果、目的とする薬効(すなわち、用量依存的な肝 *TTR* mRNA 及び循環 *TTR* タンパク質濃度の低下) が裏付けられ、血清 *TTR* タンパク質の持続的な平均的低下 (ベースラインに対し 91%の低下) を示す臨床用量及び投与スケジュールの選択をサポートした (0.3 mg/kg、q3w 投与)。この用量及びレジメンは臨床においても有効であり、実際に RHD 及び臨床投与レジメンとして選択されている。サルを用いた単回投与及び反復投与試験で、[REDACTED]、[REDACTED]、又は [REDACTED] kg の製造スケールで製造されたパチシラン-LNP 静脈内投与後の効力を裏付ける試験の結果は同様であることが示された。

hATTR アミロイドーシスは、末梢神経系、心臓及び消化管などの組織における異常なタンパク質沈着 (野生型及び変異型 *TTR* アミロイドからなる) が特徴である(2)(1)。hATTR アミロイドーシスの病態モデルである *hTTR V30M/Hsf-1 KO* マウスを用いた試験では、ALN-18328 をパチシラン-LNP より効力の弱い第一世代の LNP で製剤化した ALN-TTR01 を 3 mg/kg/q2w で 6回静脈内投与したところ、RNAi 機構により、肝臓 *TTR* mRNA 及び血清 *TTR* タンパク質が 85%超低下し、新たな *TTR* タンパク質組織沈着が予防され、また既存の *TTR* タンパク質沈着が退縮することが示され、パチシラン-LNP の治療仮説を裏付けている(4)。

TTR は RBP 及びビタミン A(34)並びにサイロキシン(18)の担体であることから、サルを用いた試験において、*TTR* 低下に伴う副次的薬理作用として、RBP (60%)、ビタミン A (90%) 及びサイロキシン (41%) がベースラインより低下したことが確認された。パチシラン-LNP の長期投与後のサルにおけるビタミン A またはサイロキシンの低下に関連する毒性所見はみられなかった。臨床においても、循環ビタミン A の減少が観察されたが、ビタミン A 欠乏の症状はみられていない。臨床試験ではビタミン A の補給を必須としており、パチシラン-LNP 治療を受ける患者には今後も推奨される。ヒトにおいてサイロキシンの 75%以上はサイロキシン結合グロブリンと結合しているが、*TTR* もまたサイロキシンのマイナーな担体である(35)。臨床試験においてはパチシラ

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

ン-LNP の甲状腺機能検査 (TFT) に対する影響はみられなかった (2.7.4, 3.5 項「甲状腺機能」参照)。

サルにおいて心血管系、呼吸系及び中枢神経系に対する毒性は認められなかった。LNP の粒子サイズは大きく (最小径 60 nm)、また ALN-18328 (14 kDa) 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG (2.5 kDa) 成分は高分子量であることから、心臓イオンチャンネルとの相互作用が生じる可能性は低く、パチシラン-LNP に関連する心室脱分極及び再分極への影響はないと考えられる。また、心臓における DLin-MC3-DMA (642 Da) の曝露量は低いことがラットで示されており、ヒトでも同様に心臓における曝露量は低いと予想される。サルを用いた安全性薬理試験において、パチシラン-LNP を最大 6 mg/kg まで単回投与したとき、QT 延長並びに心電図上のその他の異常は認められなかった。3 mg/kg において (試験した唯一の用量)、呼吸系パラメータ又は中枢及び末梢神経系への影響は認められなかった。3 mg/kg の用量における ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の曝露量推定値は、それぞれ RHD (0.3 mg/kg) の AUC に基づくヒト曝露量推定値の 7.3、3.4 及び 2.8 倍であった。サルにおける 6 週間 (最大 3 mg/kg/q2w、4 回投与) 又は 39 週間 (3.0/2.0 mg/kg/q3w、14 回投与) 毒性試験では、心電図パラメータは収集されなかったが、中枢神経系又は呼吸器系の一般状態観察結果又は体温への影響はみられなかった。

5.2 薬物動態

マウス、ラット及びサルにおける単回投与後の ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の PK 及び TK は、いずれの分析対象物も動物種間で類似しており、性差はみられず、用量に比例した血漿中の曝露 (C_{max} 及び AUC) が認められた。概して、注入直後の最初の採血時点で C_{max} が観測された後、多相性の消失を示した。3 つの分析対象成分のすべてが、肝臓への分布によると考えられる初期分布相を示し、その後、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG については、長い消失相が認められた。概して、3 つの全ての分析対象成分について、マウス及びラットに比べてサルで曝露が高く、半減期は長かった。マウス、ラット及びサルにおいて、反復投与後の血漿中の蓄積はほとんど認められず、性差も認められなかった。また ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は用量に比例した曝露が認められた。一つの例外として、ラットの 26 週間毒性試験 (q2w で 14 回投与) において、初回投与と比べて、183 日目の最終投与後に ALN-18328 と 2 つの脂質成分に顕著な血漿中濃度の低下が認められた。この血漿中濃度の低下の原因として、ADA の生成により血中からの消失が亢進された可能性が考えられた。ADA はサルの 6 週間 (q2w で 4 回投与) 及び 39 週間 (q3w で 14 回投与) 毒性試験、並びにより短期間のラット毒性試験 (q2w で 4 回投与及び q4w で 2 回投与) でも時々認められていたが、曝露に対する影響は、ラットの 26 週間試験においてのみ認められた。

緩衝液の組成が異なる ■ kg (■■■■■■■■) 及び ■ kg (■■■■■■■■) の製造スケールでそれぞれ製造されたパチシラン-LNP を 1 mg/kg (サルでの NOAEL) でサルに単回投与したとき、TK に大きな差は認められず、血漿中の曝露は 2 製剤間で同程度であった。平均血漿 ALN-18328

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

ると考えられた。これらの結果を考慮すると、ALN-18328 の代謝物の多くについて、薬理的活性がどれだけ維持されているか予測できなかった。肝臓においては、これらの代謝物の量は未変化体に比べて少ないことを考慮すると、オフターゲットの毒性の可能性は低いと考えられる。ALN-18328 の分解代謝物の単塩基は、未修飾又はリボースの 2'OMe 修飾を受けた、いずれも天然に存在するものであることから、これらはサルベージ経路により生体内プールに再利用されると考えられる。

DLin-MC3-DMA の *in vitro* での肝臓 S9 画分中の代謝安定性は、マウス、ラット、サル及びヒトで類似していた。*In vitro* での主な代謝物は、一酸化体あるいは二酸化体であった。ヒトの S9 画分で特異的な代謝物は認められなかった。¹⁴C で標識した DLin-MC3-DMA で製剤化したパチシラン-LNP をラット及びサルに投与したマスバランス試験では、一酸化体、二酸化体及び加水分解物が代謝物として認められた。胆汁中（ラットのみ）、糞中（ラット及びサル）及び尿中（ラット及びサル）では、放射能のほとんどが、代謝物である DMBA として回収された。ラット及びサルの血漿中の DMBA は、投与量の 3%未満であった。投与した DLin-MC3-DMA の 10%を超える DLin-MC3-DMA 代謝物は、循環血中には認められなかった。*In vitro* 試験では、CYP3A4 による DLin-MC3-DMA の代謝はわずかであり、酸化体のみが生成された。しかしながら、ラット及びサルの *in vivo* 試験においては、CYP によらない加水分解で DMBA の生成が認められた。¹⁴C-DLin-MC3-DMA を用いて製剤化したパチシラン-LNP の排泄プロファイルは、ラット及びサルで類似していた。放射能は主に尿中に回収され（ラットで約 49%、サルで約 50%）、一部は糞中に排泄された（ラットで約 24%、サルで約 10%）。尿及び糞中のいずれについても、放射能は主に DLin-MC3-DMA の代謝物である DMBA として検出された。非カニューレ処置ラットと胆管カニューレ処置（BDC）ラットにおいて、尿中排泄率（対投与量%）は非カニューレ処置ラットで約 33%であったのに対して、BDC ラットでは約 12%であり、尿中排泄に差が認められた。このことから、DLin-MC3-DMA 関連成分が胆汁中に排泄され、再吸収された後、腎排泄を受けることが示唆された。全体として、DLin-MC3-DMA の排泄は、CYP を介さないで DMBA に代謝された後、主に尿中に排泄されることが示された。PEG₂₀₀₀-C-DMG は、*in vitro* でのマウス、ラット、サル及びヒト由来の肝ミクロソーム及び S9 画分中で比較的安定であった。*In vitro* での代謝は極わずかであり、サル及びヒトで唯一の代謝経路として O-脱テトラデシル化が特定されたが、CYP を介したのではないと考えられた。*In vitro* 試験で、ヒトに特異的な代謝物は認められなかった。

PEG の代謝は分子量に依存し、PEG₂₀₀₀-C-DMG と同程度の分子量をもつ PEG はほとんど又は代謝されない(20)。ラット及びサルでは PEG₂₀₀₀-C-DMG は尿中に検出されず、サルでは PEG₂₀₀₀-C-DMG の約 44%が、投与後 168 時間までに糞中に排泄された。これらの代謝及び排泄の結果から、PEG₂₀₀₀-C-DMG は主に代謝されず、肝胆道系を介して未変化体として糞中に排泄されることが示唆された。

薬物間相互作用について、ALN-18328 は 1 つの例外を除いて、及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は、主要な CYP の基質、誘導剤並びに直接的又は時間依存的阻害剤ではなく、薬物動態学的薬物間相互作用を惹起する、又はその影響を受ける可能性は低いと考えられる。ALN-18328 は、CYP2B6 の直接

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

的阻害剤及び時間依存的阻害剤であったが、この濃度では臨床効果につながる可能性は低い。*In vitro* で、ALN-18328 濃度が臨床 C_{max} の約 17 倍高い場合 (7.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、及び臨床 C_{avgss} の約 340 倍高い場合 (0.355 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に、パチシラン-LNP は CYP2B6 も誘導した。DLin-MC3-DMA は、CYP3A4 によりわずかに代謝されたが、ラット及びサルの *in vivo* での DLin-MC3-DMA の主な代謝経路は、CYP を介さない加水分解によるものであった。DLin-MC3-DMA は、CYP の誘導又は直接的及び時間依存的な阻害作用を示さなかった。ALN-18328、DLin-MC3-DMA、PEG₂₀₀₀-C-DMG 及び DMBA は主要なトランスポーターの基質ではなかった。ALN-18328、PEG₂₀₀₀-C-DMG 及び DMBA は、0.3 mg/kg のパチシラン-LNP を投与したヒトで認められる血漿中 C_{max} (DMBA は尿中濃度) の 20 ~ 50 倍の濃度まで、これらのトランスポーターに対する阻害作用を示さなかった。DLin-MC3-DMA は、溶解度上限を最高濃度 (CYP 阻害試験では上記 C_{max} の 0.5 倍、トランスポーター試験では上記 C_{max} の 0.1 倍以下) で検討を行い、これらの濃度までは、これら主要なトランスポーターの基質及び、阻害剤にならないことが示された。

5.3 毒性試験

サルに製剤化していない ALN-18328 を単回ボーラス投与したが、毒性は認められなかった。NOAEL は 100 mg/kg (検討した最高用量) であった。

個々の脂質添加物を用いて別途に動物毒性試験を行わなくても、パチシラン-LNP の脂質は毒性試験で適切に評価されている。39 週間 (q3w × 14) のサルの毒性試験におけるパチシラン-LNP の NOAEL (1 mg/kg/q3w) では、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿曝露マージンは、推奨ヒト用量での AUC のそれぞれ 3.4 倍及び 2.2 倍であった。DSPC 及びコレステロールは、現在承認されているいくつかの静脈内投与リポソーム薬剤の成分であり、パチシラン-LNP の投与 1 回あたりの投与量は、DSPC では他の DSPC 含有薬剤で送達される量よりも少なく、コレステロールでは他のコレステロール含有薬剤で送達される量の範囲の中央に位置していた。パチシラン-LNP の各投与量で送達される DSPC 及びコレステロールの量は、それぞれ循環内在性ホスファチジルコリン及びコレステロールの約 0.4% 及び 0.8% である (36)。新添加物 DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は、細菌を用いる復帰突然変異試験及び哺乳類細胞を用いる染色体異常試験において陰性であった。上述の全ての理由から、パチシラン-LNP の推奨ヒト用量 0.3 mg/kg/q3w におけるこれら脂質添加物投与には明らかな安全性の懸念はないと考えられた。

パチシラン-LNP の静脈内持続投与又はボーラス投与は、マウスの 10 mg/kg/q2w 及びサルの 39 週間投与の 3/2 mg/kg/q2w (1 匹) で瀕死及び死亡が認められたものの、非臨床動物種において概して忍容性が良好であった。マウスでは、死亡は重度の肝毒性 (壊死を含む) と関連していた。サルの死亡は、23 日目のパチシラン-LNP の 2 mg/kg の初回投与から約 18 時間後に認められた (すなわち全体として 2 回目の投与後)。投与直後に有害な臨床徴候は認められず、病理組織学的検査において死因は特定されなかった。投与と死亡が時間的に近接しているため、静脈内持続投与関連反応を死亡原因の可能性として排除することはできなかった。

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

パチシラン-LNP の毒性標的器官（肝臓、脾臓、リンパ節、骨髄及び副腎）は、他の LNP について報告されているように、パチシラン-LNP の有窓内皮を有する類洞組織への LNP の取り込みと一致している(37)。パチシラン-LNP の生体内分布は、網内系（RES）内の食作用によっても影響される(37)。毒性の他の標的には、精巣/精巣上体（ラットの試験の1匹のみに認められた）及び投与部位が含まれた。

肝臓はパチシラン-LNP の取り込み及び蓄積の主要部位である。非臨床動物種の全てにおいて肝毒性が NOAEL を決定した。肝臓における単細胞壊死がマウス、ラット及びサルで観察され、1つ又は複数の肝酵素（例えば ALT、AST、ALP、GGT、LDH）及び総ビリルビン（TBIL）の増加を伴った場合に有害であると考えられた。マウス及びラットでは、頻度は低い、凝固又は肝細胞壊死を特徴とし、肝酵素及び TBIL のより大きな増加を伴う重篤な肝臓の変化が観察された。非臨床動物種にまたがって頻繁に認められた他のパチシラン-LNP 関連肝臓所見は、肝細胞空胞化であった。サルでは空胞に脂質が含まれていることが判明した。混合細胞炎症/浸潤及び単核細胞浸潤は、マウス、ラット及びサルの肝臓においても一般的に観察され、血液学（例えば、総白血球数及び白血球分画）、凝固（フィブリノゲン）及び血清化学（アルブミン及びグロブリン）の炎症性変化をしばしば伴っていた。これらの炎症性変化はラットで最も強く認められた。類洞組織球増加及び反応性類洞壁細胞（Kupffer 細胞を含む）もまた、マウス、ラット及びサルの肝臓におけるパチシラン-LNP 関連の共通所見であり、これらの細胞におけるパチシラン-LNP 又は薬剤成分の細胞内濃度と関連している可能性がある。これらの所見は部分的又は完全に可逆的であった。10 mg/kg/q2w での死亡及び肝毒性に基づいて、マウスの最大耐量（MTD）は 6 mg/kg/q2w であり、ラット及びサルの NOAEL は 0.1 mg/kg/q4w 及び 1 mg/kg/q3w であった。ラットの NOAEL は、4 週間（q4w×2）の試験の結果に基づいている。ラットの 26 週間（q2w×14）試験での NOAEL は 0.3 mg/kg/q2w（検討した最高用量）であったが、試験の終わりに ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG への曝露が変化しており（恐らく ADA に起因する）、そのことにより毒性が認められなかった可能性が高い。プラセボ対照第3相試験を含むパチシラン-LNP 臨床プログラムで肝臓の安全性が包括的にモニターされたが、有害事象及び検査データの分析に基づき、肝臓の安全性の懸念は確認されなかった（2.7.4「臨床的安全性」参照）。

ラットの体内分布試験から、脾臓及びリンパ節がパチシラン-LNP の取り込みの重要な器官であることが明らかになった。げっ歯類では、脾臓の白脾髄と辺縁部が影響を受けていた。マウス及びラットにおいて、リンパ球枯渇/萎縮/壊死が、ラットの組織球増加とともに観察された。これらの所見は、循環リンパ球の減少又は免疫毒性の他の徴候を伴っていなかった。パチシラン-LNP 投与後のラット及びマウスの脾臓では、炎症による二次的な変化と考えられる髄外造血の増加が時折、観察された。サルにおいて、パチシラン-LNP 投与後に赤脾髄の低細胞性が観察された。げっ歯類及びサルの脾臓の変化は全て可逆的であった。ラットでは、6 週間（q2w×4）の毒性試験でリンパ節におけるパチシラン-LNP 関連の可逆的なリンパ球及び間質細胞の過形成、組織球増加並びに炎症が認められたが、その後の試験では認められなかった。マウス又はサルにリンパ節の所見は認められなかった。

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

マウス、ラット及びサルでは、炎症による二次的な変化と考えられる可逆的な骨髄変化が観察された（すなわち、骨髄性細胞の増加、造血細胞の増加、骨髄細胞対赤血球の比率の増加）。パチシラン-LNPによる骨髄への直接的な作用は認められなかった。

副腎もラットのパチシラン-LNPの生体内分布の部位であることが明らかとなった。6週間（q2w×4）の毒性試験では副腎の所見がラット及びサルで観察されたが、その後の試験では観察されなかった。ラットでは、投与期の終わりに皮質肥大が観察されたが、60日間の回復期間の終わりには、わずかな変性/壊死が観察された。6週間（q2w×4）のサル試験では、副腎における皮質空胞の可逆的減少が観察された。これらの変化は全て重症度が低く、短期間のラット及びサルの試験でのみ認められた。

マウス（雌雄）、ラット（雌）、又は若年成熟及び成熟サル（両性）の生殖系にパチシラン-LNP関連の所見は認められなかった。ラットの6週間（q2w×4）試験で、投与及び60日回復期間終了時に有害な精巣/精巣上体の毒性（精細管の著しい片側性又は両側性の変性/萎縮及び顕著な精子減少/無精子症）が観察された。これらの所見は、ラットのその後の4週間（q4w×2）及び26週間（q2w×14）の毒性試験では認められず、ラット雄受胎能試験での受胎能、交配、精子パラメータ、発生又はサル毒性試験での雄の生殖能評価に影響は認められなかった。これらの理由から、精巣及び精巣上体は毒性学的懸念のある標的器官ではないと考えられた。

マウス、ラット及びサルにおいて、静脈内投与/持続投与部位での可逆性のパチシラン-LNP関連血管/血管周囲炎症が観察された。最も重篤な所見は、6週間（q2w×4）及び26週間（q2w×14）の試験において、下大静脈の長期留置カテーテルを介して持続投与が行われたラットに認められた。尾側静脈から静脈内ボラス投与したマウス、尾側静脈から静脈内持続投与したラット（4週間；q4w×2試験）、又は一時経皮カテーテルから末梢静脈（伏在又は上腕）に持続投与したサルにおいて認められた変化は、より軽度なものであった。これらの変化は、炎症性の血液学（総白血球数及白血球分画の増加）、凝固（フィブリノゲン増加）及び血清化学（アルブミン及びアルブミン/グロブリン比の減少並びにグロブリンの増加）の変化をしばしば伴っていた。持続投与部位の所見は、39週間（q3w×14）のサルの試験では認められなかった。

パチシランに遺伝毒性は認められなかった。パチシラン-LNPは、細菌を用いた復帰突然変異試験及びヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験において陰性であった。30 mg/kg（MTD）以下の用量のパチシラン-LNPは、CD-1マウスの骨髄において小核形成を誘導しなかった。

パチシラン-LNPにがん原性は認められなかった。TgRasH2マウスにおける26週間のがん原性試験では、6 mg/kg（試験された最高用量）以下において、パチシラン-LNP関連の腫瘍性変化又は血液学的悪性腫瘍は認められなかった。

親動物に毒性を生じさせないパチシラン-LNP用量では、雌雄共に生殖又は発生毒性の懸念は認められなかった。これらの試験におけるNOAELでの安全域は、動物に投与されたパチシラン-LNPに内包されるsiRNA投与量のヒト当量に基づいて以下に示す。更に、げっ歯類において薬理的に活性なサロゲート（AF-011-18534）の投与後に循環TTR、ビタミンA及びサイロキシンが減少したが、生殖あるいは発生への影響は生じなかった。妊娠ラット又はウサギへのパチシラン-LNP

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

投与後、胎児への ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG 曝露はほとんど又は全く認められなかった。雄ラットでは、受胎能及び初期発生毒性の NOAEL は 0.3 mg/kg/q2w (試験した最高用量) であった。このヒト等価用量 (HED) は、RHD の 0.2 倍である。雌ラットでは、1.5 mg/kg で軽微な母動物毒性が認められた。母動物毒性の NOAEL は 0.5 mg/kg で、受胎能及び胚・胎児毒性の NOAEL は 1.5 mg/kg であった (試験した最高用量 : HED は RHD の 2.4 倍)。胚・胎児用量設定試験における妊娠ウサギに対するパチシラン-LNP の 1 及び 2 mg/kg (HED は RHD の 3.2 倍超) 投与により、母動物毒性並びに自然流産、早期胚吸収及び着床後死亡の増加、同腹児数、胚・胎児生存率及び胎児体重の減少が認められたが、これら用量での母動物毒性による二次的なものであると考えられた。その後実施したウサギの胚・胎児試験では、パチシラン-LNP の母動物の NOAEL は 0.3 mg/kg と考えられ、発生に対する NOAEL は 0.6 mg/kg と判断された (試験された最高用量 ; HED は RHD の 1.9 倍)。ラットの出生前/出生後試験では、母動物毒性及び生殖に関する NOAEL は検討した最高用量 (1.5 mg/kg ; RHD の 2.4 倍) であった。F₁ 児における生存率及び発育の NOAEL は 1.5 mg/kg (RHD の 2.4 倍) であった。授乳 12 日の投与後 2 時間の乳汁中に ALN-18328 又は ALN-18534 は検出されなかった。1.5 mg/kg のパチシラン-LNP 投与後のこの時点での乳汁中の DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の濃度は、それぞれの母体血漿中濃度の 4.7% 以下及び 6.6% 以下であった。1.5 mg/kg のげっ歯類特異的サロゲート AF-011-18534 は、意図された TTR 標的をほぼ完全に阻害したが、ラットの胚・胎児及び出生前/出生後毒性試験において生殖及び発生毒性を示さなかったことに留意すべきである。

ALN-18328 を末梢血単核細胞にトランスフェクトした場合、免疫刺激 (サイトカイン放出) は *in vitro* で観察されなかった。7.5 及び 15 mg/kg のパチシラン-LNP の CD-1 マウスへの単回静脈内投与は対照と比較し、投与後 24 時間にわたって IL-6、IP-10、KC 及び MCP の一過性の上昇をもたらした。サルにおいて、パチシラン-LNP 投与の 3 時間後に IL-1RA 及び IL-6 の用量依存的増加が観察されたが (最初のサンプリング時点)、一過性のものであった。サルにおいてパチシラン-LNP の全ての用量群で一過性 (24 時間以内) の補体活性化 (Bb 及び/又は C3a) が観察されたが、有害な臨床症状は伴っていなかった。AF-011-1955 投与後に同様のサイトカイン及び補体の変化が観察され、この作用は LNP に起因する可能性があり、それに内包されている特異的 siRNA に起因しない可能性が示唆された。パチシラン-LNP のサルへの長期投与により B 因子、総 C3 及び CH₅₀ 活性が影響を受けなかったことは、パチシラン-LNP 投与後の補体の一過的活性化が最終的な補体枯渇を引き起こさないことを示している。サルのパチシラン-LNP による感作の証拠は認められなかった。

GLP 毒性試験で使用されたパチシラン-LNP 中に存在する不純物又は公表された情報に基づき、不純物の安全性確認を行った。不純物の適切な管理が実証されているか、又はそれぞれの合成工程内の管理において、最終的なパチシラン-LNP におけるそれらの存在の可能性が非常に低いことが示されていることから、ALN-18328 又は DLin-MC3-DMA 中の遺伝毒性不純物に関する毒性学的懸念はないと考えられた。コレステロールは複数の公定書 (米国、欧州及び日本) に記載されている添加物であり、承認された医薬品に使用されているため、不純物 (潜在的な遺伝毒性不

2.4 非臨床試験の概括評価 パチシランナトリウム

純物を含む) は評価しなかった。DSPC は、 からの情報によると毒性又は遺伝毒性を有する不純物は含まれていないと考えられた。

サルを用いた単回投与及び反復投与の同等性/同質性試験において、 、 、又は kg スケールバッチで製造されたパチシラン-LNP を投与後に、安全性/毒性に差のないことが示された。

5.4 安全域

毒性試験において、わずかな例外を除き、NOAELにおけるALN-18328のAUCに基づく血漿曝露マージンは、RHDにおけるものに比べて1倍未満であった。パチシラン-LNPに対する感受性の種差(すなわち、NOAELとRHDとの間の小さなマージン)及び消失半減期(ヒトよりも動物においてより短い)が、非臨床動物種においてALN-18328に対する低い血漿曝露マージンをもたらす主要な要因である(2.6.6, 9.2項「パチシラン-LNPの一般毒性」参照)。

ラットは、パチシラン-LNP毒性に対してより感受性の高い種であり、生物学及び先天性免疫の違いに基づき、サルよりも炎症惹起作用に対して影響を受けやすいと考えられた(37)(38)。薬理学的に不活性なsiRNAを内包するLNP製剤では、その毒性は主にLNPに起因し、そのイオン化可能な陽イオン性脂質成分、DLin-MC3-DMAに起因する可能性が高い。このため、DLin-MC3-DMAに基づく血漿曝露マージンは、ALN-18328に基づくものよりもヒトの安全性を判定するのに適していると思われる。マウスがん原性試験の最高用量(6 mg/kg/q2w)、26週間のラット毒性試験のNOAEL(0.3 mg/kg/q2w)、39週間のサル毒性試験のNOAEL(1 mg/kg/q3w)でのDLin-MC3-DMA曝露マージンは、AUCに基づいてRHDのそれぞれ0.82倍、0.07倍及び3.36倍であった(2.6.6, 9.2項「パチシラン-LNPの一般毒性」参照)。

動物の投与量はsiRNAの投与量に基づいており、LNPに起因する安全性を理解するのに適していることから、HEDに基づく安全域も計算した。ラットの4週間及び26週間の毒性試験及びラットの雄受胎能試験では、NOAELは0.1~0.3 mg/kgの範囲であり、HEDに基づく安全域はRHDの0.2倍以下であった。対照的に、他の39週間のサルの試験におけるNOAEL(1 mg/kg/q3w)並びにラット及びウサギの生殖及び発生毒性試験におけるNOAEL(それぞれ1.5 mg/kg、0.6 mg/kg)では、HEDに基づく安全域は全てRHDの1.1~2.4倍の範囲であった(2.6.6, 9.2項「パチシラン-LNPの一般毒性」参照)。

5.5 結論

パチシラン-LNPは、ICHガイドライン及び規制当局からの助言に従った広範な非臨床開発プログラムにより、薬理学的、薬物動態学的及び毒性学的な特性が明らかになった。全体の開発計画はパチシラン-LNPの作用機序及び対象患者集団を考慮したものであり、妥当かつ適切である。

これらの非臨床試験成績は、0.3 mg/kg/q3wの静脈内投与による投薬レジメンでヒトにおけるパチシラン-LNPの安全性を確立した臨床試験の実施を裏付け、成人hATTRアミロイドーシスの治療のためのパチシラン-LNPの承認申請を支持するものである。

6 参考文献

全ての文献の写しを[Module 4.3]に添付する。

1. Reixach, N., et al., *Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2817-22.
2. Hou, X., M.I. Aguilar, and D.H. Small, *Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration*. FEBS J, 2007. **274**(7): p. 1637-50.
3. Coelho, T., et al., *Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis*. N Engl J Med, 2013. **369**(9): p. 819-29.
4. Butler, J.S., et al., *Preclinical evaluation of RNAi as a treatment for transthyretin-mediated amyloidosis*. Amyloid, 2016. **23**(2): p. 109-18.
5. Mui, B.L., et al., *Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles*. Mol Ther Nucleic Acids, 2013. **2**: p. e139.
6. Akinc, A., et al., *Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms*. Mol Ther, 2010. **18**(7): p. 1357-64.
7. Cullis, P.R. and M.J. Hope, *Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies*. Mol Ther, 2017. **25**(7): p. 1467-1475.
8. Semple, S.C., et al., *Rational design of cationic lipids for siRNA delivery*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(2): p. 172-6.
9. Jayaraman, M., et al., *Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo*. Angew Chem Int Ed Engl, 2012. **51**(34): p. 8529-33.
10. Hafez, I.M., N. Maurer, and P.R. Cullis, *On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids*. Gene Ther, 2001. **8**(15): p. 1188-96.
11. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 188-200.
12. Soutschek, J., et al., *Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 173-8.
13. Garay, R.P., et al., *Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents*. Expert Opin Drug Deliv, 2012. **9**(11): p. 1319-23.

2.4 非臨床試験の概括評価
パチシランナトリウム

14. Jacobs, F., E. Wisse, and B. De Geest, *The role of liver sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer*. Am J Pathol, 2010. **176**(1): p. 14-21.
15. Tanuma, Y., M. Ohata, and T. Ito, *Electron microscopic studies on the sinusoidal cells in the monkey liver*. Arch Histol Jpn, 1983. **46**(3): p. 401-26.
16. Sambrook J, F.F.E., and Maniatis T, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
17. Santos, S.D., R. Fernandes, and M.J. Saraiva, *The heat shock response modulates transthyretin deposition in the peripheral and autonomic nervous systems*. Neurobiol Aging, 2010. **31**(2): p. 280-9.
18. Choksi, N.Y., et al., *Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health*. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2003. **68**(6): p. 479-91.
19. Yang, W., *Nucleases: diversity of structure, function and mechanism*. Q Rev Biophys, 2011. **44**(1): p. 1-93.
20. Webster, R., et al., *PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(1): p. 9-16.
21. Fahmi, O.A., et al., *Evaluation of CYP2B6 Induction and Prediction of Clinical Drug-Drug Interactions: Considerations from the IQ Consortium Induction Working Group-An Industry Perspective*. Drug Metab Dispos, 2016. **44**(10): p. 1720-30.
22. Nambiar, P.R., S.E. Turnquist, and D. Morton, *Spontaneous tumor incidence in rasH2 mice: review of internal data and published literature*. Toxicol Pathol, 2012. **40**(4): p. 614-23.
23. Paranjpe, M.G., et al., *Historical control data of spontaneous tumors in transgenic CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic (Tg.rasH2) mice*. Int J Toxicol, 2013. **32**(1): p. 48-57.
24. Dannenberg, H., [*N-hydrox-succinimide, a non carcinogenic N-hydroxy compound*]. Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol, 1971. **76**(3): p. 216-8.
25. Turecek, P.L., et al., *PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs*. J Pharm Sci, 2016. **105**(2): p. 460-475.
26. Swiecicki, P.L., et al., *Hereditary ATTR amyloidosis: a single-institution experience with 266 patients*. Amyloid, 2015. **22**(2): p. 123-31.
27. Plante-Bordeneuve, V. and G. Said, *Familial amyloid polyneuropathy*. Lancet Neurol, 2011. **10**(12): p. 1086-97.
28. Okamoto, S., et al., *Liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: impact on Swedish patients' survival*. Liver Transpl, 2009. **15**(10): p. 1229-35.
29. *Vyndaqel (tafamidis meglumine), EMA Summary of Product Characteristics*. 2016.

2.4 非臨床試験の概括評価
パチシランナトリウム

30. Barroso, F.A., et al., *Long-term safety and efficacy of tafamidis for the treatment of hereditary transthyretin amyloid polyneuropathy: results up to 6 years*. *Amyloid*, 2017. **24**(3): p. 194-204.
31. Stangou, A.J. and P.N. Hawkins, *Liver transplantation in transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy*. *Curr Opin Neurol*, 2004. **17**(5): p. 615-20.
32. Carvalho, A., A. Rocha, and L. Lobato, *Liver transplantation in transthyretin amyloidosis: issues and challenges*. *Liver Transpl*, 2015. **21**(3): p. 282-92.
33. Ericzon, B.G., et al., *Liver Transplantation for Hereditary Transthyretin Amyloidosis: After 20 Years Still the Best Therapeutic Alternative?* *Transplantation*, 2015. **99**(9): p. 1847-54.
34. van Bennekum, A.M., et al., *Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(2): p. 1107-13.
35. Janssen, S.T. and O.E. Janssen, *Directional thyroid hormone distribution via the blood stream to target sites*. *Mol Cell Endocrinol*, 2017.
36. Trabado, S., et al., *The human plasma-metabolome: Reference values in 800 French healthy volunteers; impact of cholesterol, gender and age*. *PLoS One*, 2017. **12**(3): p. e0173615.
37. Barros, S.A. and J.A. Gollob, *Safety profile of RNAi nanomedicines*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012. **64**(15): p. 1730-7.
38. Vaure, C. and Y. Liu, *A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 316.