

2.6.1 緒言
パチシランナトリウム

2.6.1 緒言

目 次

2.6.1 緒言	1
目 次	2
表 目 次	3
図 目 次	3
略号と用語の定義	4
1 はじめに	6
2 作用機序	8
3 パチシラン原薬	10
4 パチシラン製剤（パチシラン-LNP）	11
5 非臨床評価	15
6 参考文献一覧	19

表 目 次

表 1 - Patisiran-LNPの組成	11
------------------------------	----

図 目 次

図 1 - RNA干渉のメカニズムと治療概念.....	9
図 2 - ALN-18328の構造	10
図 3 - パチシラン添加剤の化学構造.....	13
図 4 - <i>In vivo</i> でのLNPIによるsiRNAの肝臓への送達	14

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、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、薬理学的に非活性な対照 (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 ALN-18328 を内包する (ALN-TTR02 と同様) 第一世代の SNALP 処方、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	第二世代 LNP である AF-011 で処方した RNAi 医薬品パチシラン製剤。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、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
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
EMA	欧州医薬品庁 (European Medicines Agency)
FDA	食品医薬品局 (Food and Drug Administration)
hATTR	遺伝性異型トランスサイレチン (Hereditary atypical transthyretin)
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)

2.6.1 緒言
パチシランナトリウム

略号、用語	定義
NOAEL	無毒性量 (No observed adverse effect level)
PBS	リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline)
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))
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)
RBP	レチノール結合タンパク (Retinol binding protein)
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)
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)
V _{ss}	分布容積 (Volume of distribution)

1 はじめに

パチシラン製剤 (ALN-TTR02 ; パチシラン-LNP) は RNA 干渉 (RNAi) を利用した治療薬であり、2 mg/mL のパチシラン原薬 (ALN-18328、トランスサイレチン [TTR] を標的とした siRNA) 及び脂質添加剤 ((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino) butanoate [DLin-MC3-DMA]、1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [DSPC]、コレステロール及び(R)-2,3-bis(tetradecyloxy)propyl 1-(methoxy poly(ethylene glycol)2000)propylcarbamate [PEG₂₀₀₀-C-DMG]) を含む脂質ナノ粒子 (LNP) として、等張リン酸緩衝化生理食塩水中に製剤化したものである。

ALN-18328 は、変異型及び野生型 TTR のメッセンジャーRNA (mRNA) の産生及び対応するタンパク質の発現を阻害するために RNAi の自然発生メカニズムを利用する、初の合成 siRNA である。パチシラン-LNP の治療仮説は、ALN-18328 を LNP で製剤化し、静脈内投与すると、ALN-18328 が肝細胞内へ送達され、肝細胞における TTR タンパク質産生が RNAi 媒介性に低下し、その結果循環血中の TTR タンパク質量が低下する、というものである。循環血中 TTR タンパク質量の減少により、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) の病態生理の基礎をなすアミロイド原線維の形成が妨げられることが期待される。すなわち、パチシラン製剤は、肝臓における野生型及び変異型の TTR の両方の発現を低下させ、それによって hATTR アミロイドーシス患者における TTR アミロイド形成及び沈着を減少させる。

プレアルブミンとしても知られる TTR は 127 個のアミノ酸からなるタンパク質であり、四量体を形成する。TTR は主に肝細胞で産生され (循環血中 TTR の 95% 超が肝由来)、脈絡叢及び網膜でも少量が産生される(1)。循環血中 TTR のおよそ半分は非結合型であり、残りは主にビタミン A の輸送を促進するレチノール結合タンパク質 (RBP) と複合体を形成する(2)。ヒトにおいて、血漿中結合形サイロキシンの大部分はサイログロブリンと複合体を形成しているが、TTR はサイロキシンのマイナーな担体でもある。

hATTR アミロイドーシスは、TTR 遺伝子の突然変異によって引き起こされる常染色体優性の全身性疾患である (これまでにヒト TTR で 120 を超えるアミロイド形成性変異が同定されている)(3)(4)(5)(6)。TTR 遺伝子の突然変異は、TTR 四量体タンパク質の不安定化により二量体及び個々の変異型・野生型単量体への解離を導き、その後ミスフォールドが生じる。これらのミスフォールドした TTR 単量体は、次いで循環血中で自己集合してオリゴマーを形成し、末梢神経系、心臓及び胃腸管を含む様々な組織の細胞外空間にアミロイド線維及びプラークを形成する(7)(8)。これらの沈着物は重度の障害の原因となり、胃腸吸収不良及び栄養失調による体重減少だけでなく、多発性神経障害及び心筋症に起因する生活の質の重大な低下を引き起こす(4)(9)(10)(11)。心不全または感染に起因する死亡を招き、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(12)。

2.6.1 緒言

パチシランナトリウム

これまで、hATTR アミロイドーシスは臨床症状によって 2 つの遺伝的症候群に分けられていた。すなわち多発性神経障害を伴う hATTR アミロイドーシス（古くから家族性アミロイドポリニューロパチー [FAP] として知られていた）及び心筋症を伴う hATTR アミロイドーシス（同様に家族性アミロイド性心筋症 [FAC] として知られていた）である。いずれも患者では変異型及び野生型両方のアミロイド沈着が特徴的にみられる(13)(14)。しかし、最近、hATTR アミロイドーシスを有する個々の患者は、多発性神経障害及び心筋症の両方の徴候及び症状を発現することが報告されている(12)。

パチシラン-LNP の予定適応症は、トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチーである。推奨される治療投薬レジメンは、通常、0.3 mg/kg、体重が 104kg 以上の患者には 31.2kg を 3 週毎に 1 回（q3w）点滴静注するというものである。

すべての非臨床試験について、特に断らない限り、用量は siRNA の濃度として記載する。

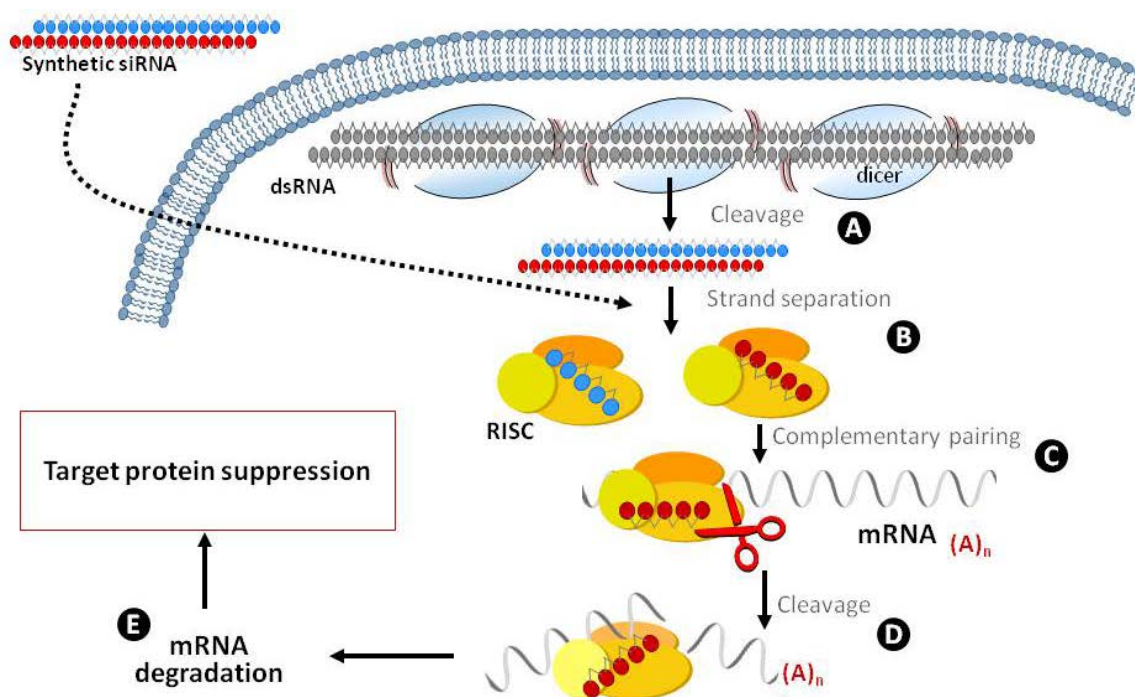
2 作用機序

RNA 干渉 (RNAi) は、二本鎖 (典型的には 21~23 塩基長) の低分子干渉 RNA (small interfering RNA ; siRNA) によりメッセンジャーRNA (mRNA) の配列特異的分解を誘導し、コードされるタンパク質の合成を減少させることができる天然の生物学的機構である(15)(16)。図 1 に示すように、細胞に導入された合成 siRNA は、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RNA Induced Silencing Complex ; RISC) と呼ばれる天然に存在する細胞質マルチサブユニットタンパク質複合体に組み込まれる。本来 RISC の RNA 成分は、通常、二本鎖 RNA からダイサー (Dicer) 酵素によって 21~23 塩基長に切り出された二本鎖 RNA に由来する。合成 siRNA (ALN-18328) を細胞に送達すると、ダイサー処理過程の下流から RNAi 機構が開始される。RISC への取り込み時に、合成 siRNA の二本の鎖が解離し、ガイド鎖 (すなわちアンチセンス鎖) が標的 mRNA の相補的配列に結合することが可能になる。センス鎖は、分離後に分解される。siRNA アンチセンス鎖内の「シード領域」 (第 2~9 位塩基) 及び「切断領域」 (第 10 位及び第 11 位塩基) の配列相補性が RNAi 媒介遺伝子サイレンシング (すなわち標的タンパク質減少) の主要な決定因子であることが証明されている。標的 mRNA は、siRNA のアンチセンス鎖と対合すると、RISC/siRNA 酵素複合体の中の Argonaute-2 エンドヌクレアーゼによって正確に切断され、それによって標的 mRNA がコードする標的タンパク質の合成が妨げられる。siRNA アンチセンス鎖は一度 RISC 中にロードされると複数の標的 mRNA を切断することができる(17)(18)。

2.6.1 緒言

パチシランナトリウム

図 1 - RNA 干渉のメカニズムと治療概念



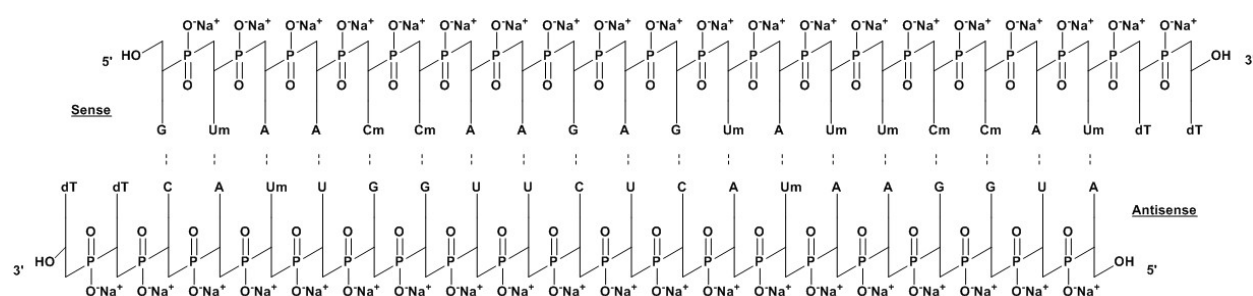
天然に存在するプロセスでは、細胞内二本鎖 RNA はダイサー複合体経路 (A) で処理され siRNA を生じ、その siRNA はマルチサブユニットタンパク質複合体である RISC 複合体を形成する (B)。siRNA 二本鎖は解離し、そのアンチセンス鎖は RISC に結合した状態で標的となる相補的 mRNA 配列を認識し (C)、RISC が標的 mRNA 配列を切断し (D)、その結果、標的タンパク質抑制 (E) が生じる。この RNAi 経路を応用する治療薬として、パチシラン製剤は、*TTR* mRNA に特異的な合成 siRNA を肝細胞の細胞質に送達する。いったん細胞質に入ると siRNA はダイサー複合体経路 (A) をバイパスし、ダイサー複合体経路の下流の RISC と相互作用 (B、C、D) して *TTR* mRNA の特異的分解 (E) を仲介し、産生及び分泌されるタンパク質の量を減少させる。

Bumcrot et al 2006 (16) の図を改編。

3 パチシラン原薬

ALN-18328 は、*TTR* mRNA の 3'非翻訳領域 (3'-UTR) における高度に保存された配列を標的とする合成 siRNA であり、従って、野生型及び全ての変異型 *TTR* の発現を同様に低下させる。化学的には、ALN-18328 は、両方の鎖の 3'末端に 2 塩基オーバーハングを有する合成二本鎖オリゴヌクレオチドである。図 2 に示すように、2 つの部分相補的な一本鎖、センス鎖 (A-32345) 及びアンチセンス鎖 (A-32346) のハイブリダイゼーションによって形成される。すべての 40 個のホスホジエステル基は、中性 pH でナトリウムを対イオンとして負に帯電している。

図 2 - ALN-18328 の構造



ALN-18328 の二本鎖の配列を示す。A、C、G、及び U は、アデノシン、グアノシン、シチジン及びウリジンリボヌクレオチド残基を表す。Cm 及び Um は、2'O-メチルシチジン及び 2'O-メチルウリジンヌクレオチド残基を表す。dT はチミジンデオキシリボヌクレオチド残基を表す。各鎖内で、連続するヌクレオチドの 3'及び 5'酸素はホスホジエステル結合によって連結される。センス鎖とアンチセンス鎖とのハイブリダイゼーションは、破線で示すように、19 個のヌクレオチド塩基対にわたる。40 個のホスホジエステル基全てが中性 pH で負に帯電している。

リボースの 2'位のメチル化 (2'OMe) は真核生物の RNA で自然に生じる修飾である。起こりうるオフターゲット作用を最小化するために、ALN-18328 の数箇所にヌクレオチドに対する 2'OMe 修飾を行った(19)。センス鎖の 5'末端からの 2 番目の位置の 2'OMe 修飾は、センス鎖により起こりうる siRNA オフターゲット作用を低減する上で重要である。また、2'OMe 修飾は真核細胞が自己及び非自己 RNA を区別するために獲得した戦略でもあり、これを模倣することで、生体の自然免疫系が二本鎖 RNA を認識することを阻止している(20)。

In silico 及び *in vitro* での非臨床試験により、ALN-18328 が *TTR* mRNA に対して高度に特異的であり、配列依存オフターゲット作用を有する可能性は低いことが示された。ALN-18328 は、ヒト及びサルの *TTR* に対して活性を有するが、マウス、ラット、又はウサギにおいて活性を示さない (2.6.2「薬理試験の概要文」参照)。

2.6.1 緒言

パチシランナトリウム

4 パチシラン製剤（パチシラン-LNP）

合成 siRNA が活性を示すには、標的とする組織の細胞内へ送達される必要がある。静脈内に投与された非製剤化合成 siRNA は、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼにより分解され、速やかに循環血中から消失し、*in vivo* で薬理的活性を示すことができない(21) (2.6.4「薬物動態試験の概要文」参照)。循環 TTR の 95% が肝細胞で産生されることから(22)、ALN-18328 を肝細胞の細胞質に送達し、肝臓に発現する遺伝子に対する TTR 特異的 RNAi 媒介サイレンシングを可能にするための脂質ナノ粒子 (LNP) 製剤が開発された。

パチシラン-LNP は、水性緩衝液中に ALN-18328 及び 4 種の脂質添加剤を含有する無菌製剤である (表 1)。4 種の脂質添加剤のうち DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は新規合成脂質であり、これまで医薬品に使用されていない成分である。コレステロールは真核生物の細胞膜に存在する天然脂質である。ホスファチジルコリンは動植物の細胞膜及びオルガネラ膜に広く存在する成分である。DSPC は合成ホスファチジルコリンであり、米国 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。

表 1 - Patisiran-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 
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG (R)-2,3-bis(tetradecyloxy)propyl 1-(methoxypoly(ethylene glycol)2000)propyl carbamate	1.6	8.0	Excipient 
DSPC 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	3.3	16.5	Excipient 

2.6.1 緒言

パチシランナトリウム

成分	1 mL あたり 含量 (mg/mL)	1 バイアル あたりの量 (mg)	機能
Cholesterol (5-Cholesten-3 β -ol; 3 β -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.

新規イオン性脂質 DLin-MC3-DMA は、[REDACTED]
[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] である。
DLin-MC3-DMA は [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED] アミノ脂質である。この特徴により、[REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] がある。ポリエチレングリコール脂質 (PEG₂₀₀₀-C-DMG) は、[REDACTED]
[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]。さらに、PEG₂₀₀₀-C-DMG は、[REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] (23)。コレステロール及び DSPC は [REDACTED]
[REDACTED]。物理化学的には、パチシラン LNP は平均粒子径 [REDACTED] nm の脂質ナノ粒子の均質な
乳白色の分散液である。

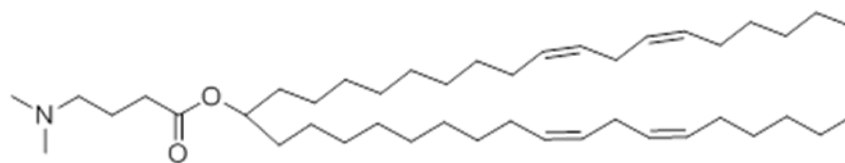
DLin-MC3-DMA、PEG₂₀₀₀-C-DMG、DSPC 及びコレステロールの化学構造を図 3 に示す。

2.6.1 緒言

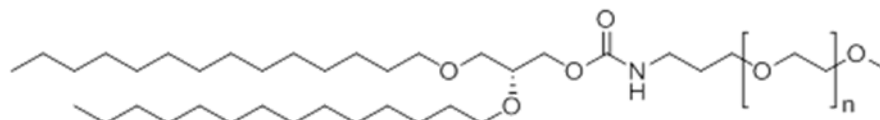
パチシランナトリウム

図 3 - パチシラン添加剤の化学構造

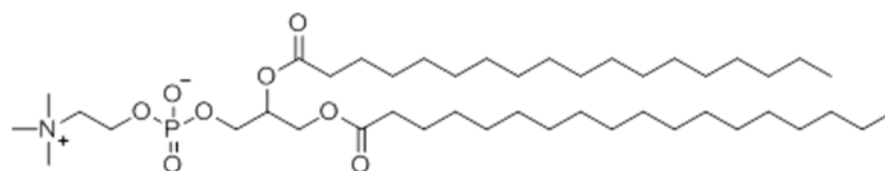
DLin-MC3-DMA



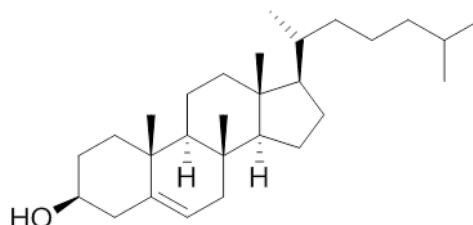
PEG₂₀₀₀-C-DMG



DSPC



コレステロール



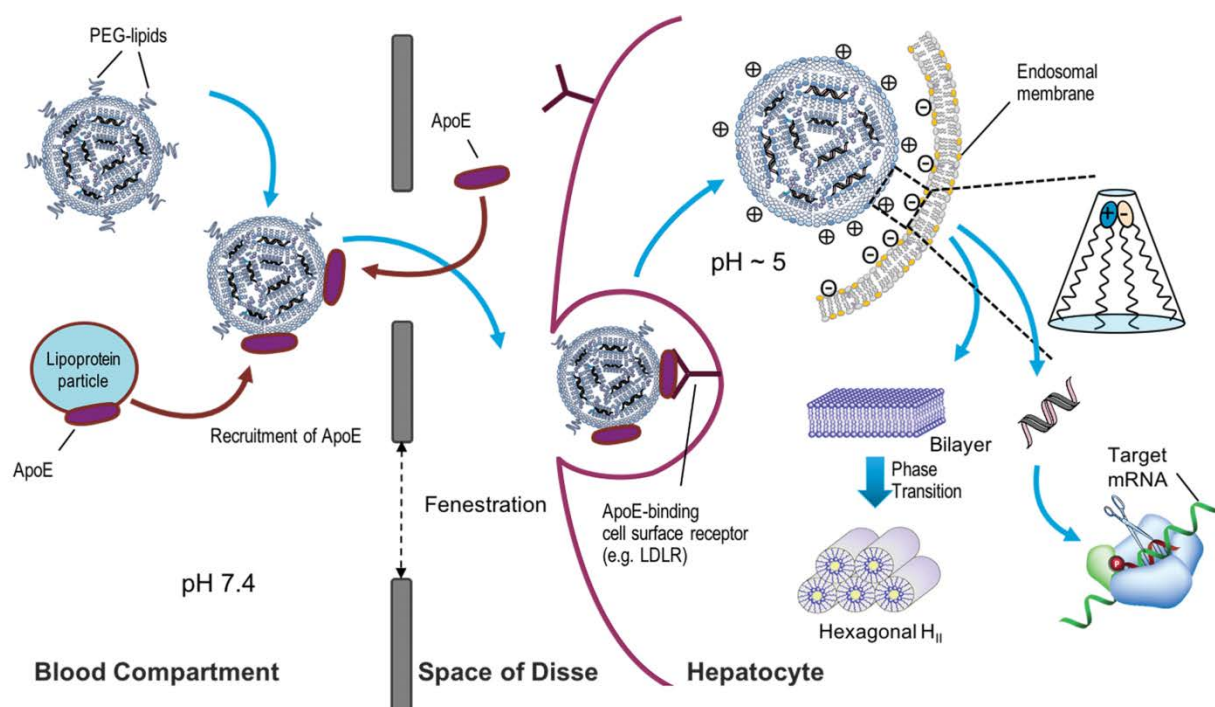
静脈内投与されたパチシラン-LNP は、血漿から有窓性内皮を有し大量の血液が灌流する肝臓内に急速に分布、蓄積する。LNP の肝細胞への取り込みと siRNA の細胞質への放出のメカニズムを図 4 に示す。静脈内投与後の肝臓への分布過程において、PEG₂₀₀₀-C-DMG 脂質の大部分は LNP から放出され、循環性リポタンパク質及び血球に移行する(23)。PEG コーティングが除去されると内因性アポリポタンパク質 E (ApoE) が LNP に結合する。そして肝細胞に発現する低比重リポタンパク質受容体 (LDLR) や他の ApoE 結合受容体といった ApoE 依存的機構を介して肝細胞へ取り込まれる(24)。特に、イオン化可能なカチオン性脂質を用いた LNP 製剤は、カイロミクロンと同様に内因性 ApoE を吸着し、ApoE 結合部位を持つ複数の受容体を介して肝細胞に取り込まれる(25)。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 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) (26)(27)。LNP 中の正に帯電した DLin-MC3-DMA

2.6.1 緒言

パチシランナトリウム

脂質は負に帯電したエンドソーム脂質と相互作用し、LNPの物理的崩壊、エンドソーム膜の不安定化、並びに細胞質への siRNA 放出が生じる(26)(27)(28)。細胞質内へ放出された ALN-18328 は RISC に結合し二本鎖が解かれ、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'UTR 領域の標的配列とアンチセンス鎖が特異的に結合する。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(17)(18)。

図 4 - *In vivo* での LNP による siRNA の肝臓への送達



イオン性 LNP の ApoE 媒介送達メカニズム：PEG コーティングが粒子表面から解離し、リポタンパク質粒子由来又は肝細胞から分泌された生体内 ApoE が LNP 表面に結合する。LNP は肝臓の有窓性内皮を通過して肝細胞上の LDLR 及び他の ApoE 受容体と結合する。LNP はエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれ、pH が低下するとイオン性脂質 DLin-MC3-DMA がエンドソーム膜と相互作用し、siRNA が細胞質に放出され RISC と結合する。

略号：ApoE=アポリポタンパク質 E、LDLR=LDL 受容体、mRNA=メッセンジャーRNA、PEG-lipids=PEG₂₀₀₀-C-DMG

パチシラン原薬とパチシラン製剤は、研究開発の過程を通していくつかの別称があり、その名称のリストは 2.6.2 薬理試験、2.6.4 薬物動態及び 2.6.6 毒性試験の概要文にそれぞれ記載する。

5 非臨床評価

非臨床薬理試験の *in silico* 及び *in vitro* 試験では、ALN-18328 の効力及び選択性を検討し、また野生型及び変異型ヒト TTR をサイレンシングする能力を評価した。ALN-18328 はマウス、ラット又はウサギに対して薬理学的活性がなく、カニクイザルに対しては活性を示すため、*in vivo* 薬理試験はカニクイザルを用いてパチシラン-LNP の薬理学的効果を評価した。さらにラット生殖発生毒性試験では、げっ歯類 TTR に特異的な siRNA (ALN-18534) をパチシラン-LNP と同じように製剤化し、パチシラン-LNP とともにオンターゲットの薬理作用により生じる可能性のある毒性を検討した。

ALN-18328 の非臨床薬理活性は、ALN-TTR01 と呼ばれる初期 LNP 製剤を使い、TTR アミロイドによる初期の病態を示すトランスジェニック (Tg) マウスモデルを用いて検証した。ALN-18328 により、Tg マウスにおける変異型ヒト TTR の発現量が低下し、複数の組織で TTR 沈着が減少することが示された。この結果は TTR レベルの低下がヒトの組織中アミロイド沈着を減少させるという治療仮説と一致していた。

カニクイザルにおいては、パチシランの反復静脈内投与により血清 TTR タンパク質の用量依存的な低下が認められた。サルでは複数の投与レジメンを評価した。パチシラン 0.5 mg/kg の q4w 投与と 0.3 mg/kg の q3w 投与で、最大の血清 TTR 濃度低下 (投与前値との比較で 95% 超の低下) が得られた (2.6.2, 2.2.4 項参照)。

サルの安全性薬理試験では、最高検討用量の 6 mg/kg まで心電図の質的異常や QTcF 補正值への影響は認められなかった。3 mg/kg ではパチシラン-LNP の投与に関連する呼吸器系 (血液ガス又は呼吸数) 並びに神経学的検査の変化もみられなかった。心拍数及び体温の上昇が 3 mg/kg 以上で認められた。

結果の詳細は 2.6.2 「薬理試験の概要文」 及び 2.6.3 「薬理試験概要表」 に示す。

ALN-18328 と新規脂質添加剤である DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG を含むパチシラン-LNP の薬物動態及びトキシコキネティクス評価は、マウス (6 ヶ月間 TgRasH2 マウスがん原性試験のサポート)、ラット、ウサギ (胎児発生毒性試験のサポート) 及びサルで実施した。様々なマトリックス中の検体を定量するために、再現性のある高感度かつ特異的な生物学的分析法を用いた。PEG₂₀₀₀-C-DMG に特異的な抗体を検出する分析法を用いて、ラット及びサル血清で抗薬物抗体 (ADA) を測定した。(2.6.4, 3 項「吸収」参照)

パチシラン-LNP を静脈内投与すると、いずれの動物種でも肝臓への組織分布によるものと考えられる ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の早い初期分布相がみられた。血漿中濃度がピーク時の 5% 未満まで低下したのは ALN-18328 が最も急速で (1~4 時間)、次に PEG₂₀₀₀-C-DMG (8~48

2.6.1 緒言 パチシランナトリウム

時間)、DLin-MC3-DMA (24~96 時間) の順であった。この初期分布相の後に消失相が認められた。パチシラン-LNP をマウス、ラット及びサルに単回投与した後の消失半減期は、ALN-18328 で 0.29~8.44 時間、PEG₂₀₀₀-C-DMG で 4.58~161 時間、DLin-MC3-DMA で 51~658 時間の範囲であった。ラット及びカニクイザルにおける ALN-18328 の分布容積 (V_{ss}) は小さく、一方 2 つの脂質の V_{ss} は中等度~大であったことから、これらの脂質成分はより広範に分布することが示唆された。PK/TK において最大血漿中濃度 (C_{max}) 及び AUC は概して用量比例的であり、性差は認められなかった。q3w による反復投与 (サルの試験で最大 14 回投与) では、測定した 3 つの成分すべてにおいて血漿中での蓄積性は認められなかった。

ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝を評価した *in vitro* 及び *in vivo* 試験では、マウス、ラット、サル及びヒトの間で代謝が類似していることが示され、これら 3 つの成分についてヒト特異的な代謝物は認められなかった。ALN-18328、DLin-MC3-DMA、及び PEG₂₀₀₀-C-DMG を用いた *in vitro* 試験では、これらの成分のいずれも主要な CYP 酵素を阻害又は誘導せず、一般的なトランスポーターの基質及び阻害剤にもならないことが示された。DLin-MC3-DMA は CYP3A4 を含む複数の CYP 分子種で代謝された。CYP3A4 による代謝は約 26% であった。しかし *in vivo* 試験 (ラット、サル) では CYP450 を介さない、4- (ジメチルアミノ) 酪酸を形成する加水分解が DLin-MC3-DMA の主要な代謝経路であることが示唆された。

¹⁴C-DLin-MC3-DMA を用いたパチシラン-LNP を使い、ラットの組織分布及びマスバランス試験を実施し、またサルでもマスバランス試験を行った。雄 Sprague Dawley ラットと Long Evans ラットを用いた組織分布試験では、¹⁴C で標識した DLin-MC3-DMA を用いたパチシラン-LNP の静脈内単回ボーラス投与を行った。投与 4 時間後、投与量の約 90% が肝臓に認められた。中枢神経系及び心臓組織ではごくわずかな量の放射能しか検出されず、パチシラン-LNP は筋肉組織へ移行しないこと、及び血液脳関門を通過しないことが示唆された。また、メラニン組織にも ¹⁴C-DLin-MC3-DMA に関連した放射能は見られなかった。これらの結果はパチシラン-LNP が ApoE を介して肝臓 (TTR の主要な産生部位であり TTR タンパク質の産生低下という薬理学的作用の場) へ取り込まれるという、期待される組織分布に一致するものであった。

ラット及びサルではともに、未変化体 ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の尿中排泄量はごくわずかであった。ALN-18328 と DLin-MC3-DMA の主要な消失経路は代謝であり、DLin-MC3-DMA については代謝後に腎排泄されと考えられた。PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝はごくわずかであり、未変化体が胆汁中に排泄されると示唆された。パチシラン-LNP (ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG) の PK 及び TK 成績の詳細は、2.6.4 「薬物動態試験の概要文」及び 2.6.5 「薬物動態試験概要表」に示す。

2.6.1 緒言

パチシランナトリウム

非臨床毒性試験（TKを含む）は主にラット及びカニクイザルを用い、パチシラン-LNPを静脈内投与して行った。ほとんどの試験では、臨床試験と同様にパチシラン-LNPを1時間かけて持続静注した。パチシラン-LNPはラットでは薬理活性がないが、薬理作用以外の影響を調べるため、ラットを用いた毒性試験が実施された。ラットはパチシランの毒性に関して最も感受性の高い種であると判定された。カニクイザルは、パチシランの薬理作用に起因する潜在的な毒性並びにLNP製剤に起因する潜在的な毒性の評価を行うため、毒性試験に用いた。さらに、ラット及びサルとの初期の毒性試験では、昆虫ルシフェラーゼを標的とする（すなわちヒト遺伝子を標的としない）siRNAをパチシラン-LNPと同じ脂質ナノ粒子化したAF-011-1955製剤を対照製剤として用い、siRNA成分とLNP製剤の毒性比較を行った。

ラットでは0.03から3 mg/kgの用量範囲で、4週間（q4w×2回）、6週間（q2w×4回）、並びに26週間（q2w×14回）投与の毒性試験を実施した。サルでは0.03から3 mg/kgの用量範囲で、6週間（q2w×4回）及び39週間（q3w×14回）投与の毒性試験を実施した。サルの試験ではTTR減少に関連する副次的薬理作用の評価項目（ビタミンA及びサイロキシン）も検討した。ラット及びサルとも、肝臓と脾臓が毒性の主要な標的臓器と考えられた。ADA産生のためにラットでは曝露量が変化するとみられ、ラットの長期毒性試験ではNOAELが4週間投与の試験よりも高くなったが、これはパチシラン-LNPの真のNOAELを示す値ではないと考えられる。ラット4週間投与とサル長期投与毒性試験のNOAELはそれぞれ0.1 mg/kg及び1 mg/kgであった。

パチシラン-LNP及び個々の新規脂質添加剤DLin-MC3-DMA及びPEG₂₀₀₀-C-DMGの遺伝毒性を、*in vitro* 遺伝毒性試験（細菌を用いた復帰突然変異試験及び染色体異常試験）で評価した。さらに、パチシラン-LNPについては*in vivo* ラット小核試験で評価した。遺伝毒性試験のデータから、パチシラン-LNP及び新規脂質のいずれも遺伝毒性を有しないことが示された。

TgRasH2マウスの26週間がん原性試験では、パチシラン-LNPの発がん作用は認められなかった。ラットにおける2年間のがん原性試験は実施されていないが、ラットに2年間の静脈内投与を行う技術的課題及びラット長期反復投与毒性試験で観察されたADA出現による薬物動態の変化に伴う曝露量の低下のために、実施可能ではないと判断した。米国FDAと欧州EMAはこの見解に同意した（2.6.6, 5項「がん原性試験」）。

パチシラン-LNPの生殖発生毒性は、ラットの受胎能、胚・胎児発生、及び出生前/出生後の各試験、並びにウサギの胚・胎児発生毒性試験といった一連の試験で評価した。ビタミンA欠乏は発生に影響を及ぼすが、TTRはRBPと結合してビタミンA運搬に関与するため、TTR低下により血漿中ビタミンA量が減少する可能性がある(29)。この薬理作用に関連した影響を調べるため、ラット生殖発生毒性試験では、パチシラン-LNPと同じLNPで製剤化したラットサロゲートsiRNA（すなわちラット *Ttr*

2.6.1 緒言 パチシランナトリウム

特異的 siRNA (ALN-18534) 投与群を加えた。LNP として製剤化されたパチシランは、母動物毒性を示さない用量において、生殖能に影響を及ぼさなかった。ラット及びウサギの胚・胎児試験において、ALN-18328 は胎児組織から検出されず、またラット出生前後試験において乳汁からも検出されなかった。

毒性試験成績の詳細は、2.6.6「毒性試験の概要文」及び 2.6.7「毒性試験概要表」に示す。

総合して、以上の非臨床試験成績は、トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチー患者の治療に通常、0.3 mg/kg、体重が 104kg 以上の患者には 31.2kg で 3 週間毎に 1 回、長期にわたって点滴静注するというパチシラン-LNP の臨床使用を支持するものである。

6 参考文献一覧

全ての文献の写しを[Module 4.3]に添付する。

1. Vieira, M. and M.J. Saraiva, Transthyretin: a multifaceted protein. *Biomol Concepts*, 2014. 5(1): p. 45-54.
2. Gillmore, J.D. and P.N. Hawkins, Drug Insight: emerging therapies for amyloidosis. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2006. 2(5): p. 263-70.
3. Connors, L.H., et al., Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003. *Amyloid*, 2003. 10(3): p. 160-84.
4. Connors, L.H., et al., A rare transthyretin mutation (Asp18Glu) associated with cardiomyopathy. *Amyloid*, 2004. 11(1): p. 61-6.
5. Garzuly, F., et al., Familial meningocerebrovascular amyloidosis, Hungarian type, with mutant transthyretin (TTR Asp18Gly). *Neurology*, 1996. 47(6): p. 1562-7.
6. Tsuchiya, A., et al., Marked regression of abdominal fat amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy during long-term follow-up after liver transplantation. *Liver Transpl*, 2008. 14(4): p. 563-70.
7. 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.
8. 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.
9. Benson, M.D. and J.C. Kincaid, The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy. *Muscle Nerve*, 2007. 36(4): p. 411-23.
10. Carvalho, A., A. Rocha, and L. Lobato, Liver transplantation in transthyretin amyloidosis: issues and challenges. *Liver Transpl*, 2015. 21(3): p. 282-92.
11. Soares, M.L., et al., Susceptibility and modifier genes in Portuguese transthyretin V30M amyloid polyneuropathy: complexity in a single-gene disease. *Hum Mol Genet*, 2005. 14(4): p. 543-53.
12. Swiecicki, P.L., et al., Hereditary ATTR amyloidosis: a single-institution experience with 266 patients. *Amyloid*, 2015. 22(2): p. 123-31.
13. Yazaki, M., et al., Cardiac amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy consists of abundant wild-type transthyretin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 274(3): p. 702-6.
14. Yazaki, M., et al., Progressive wild-type transthyretin deposition after liver transplantation preferentially occurs onto myocardium in FAP patients. *Am J Transplant*, 2007. 7(1): p. 235-42.
15. Meister, G. and T. Tuschl, Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 2004. 431(7006): p. 343-9.
16. Bumcrot, D., et al., RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol*, 2006. 2(12): p. 711-9.
17. 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.

2.6.1 緒言 パチシランナトリウム

18. Soutschek, J., et al., Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 2004. 432(7014): p. 173-8.
19. Jackson, A.L., et al., Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA*, 2006. 12(7): p. 1197-205.
20. Zust, R., et al., Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat Immunol*, 2011. 12(2): p. 137-43.
21. Layzer, J.M., et al., *In vivo* activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA*, 2004. 10(5): p. 766-71.
22. Stangou, A.J. and P.N. Hawkins, Liver transplantation in transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy. *Curr Opin Neurol*, 2004. 17(5): p. 615-20.
23. 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.
24. Akinc, A., et al., Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther*, 2010. 18(7): p. 1357-64.
25. Cullis, P.R. and M.J. Hope, Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Mol Ther*, 2017. 25(7): p. 1467-1475.
26. Semple, S.C., et al., Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*, 2010. 28(2): p. 172-6.
27. 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.
28. 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.
29. Clagett-Dame, M., E.M. McNeill, and P.D. Muley, Role of all-trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation. *J Neurobiol*, 2006. 66(7): p. 739-56.

2.6.2 薬理試験の概要文

目 次

2.6.2 薬理試験の概要文	1
目 次	2
表 目 次	3
図 目 次	4
略号と用語の定義	5
1 まとめ	8
2 効力を裏付ける試験	12
2.1 <i>In vitro</i> 薬理試験	13
2.1.1 ALN-18328の特定：ヒトTTRを標的とする強力かつ特異的なsiRNA	13
2.1.1.1 ALN-18328の選択	13
2.1.1.2 ALN-18328標的部位の多型解析	15
2.1.1.3 ALN-18328のオフターゲット活性の解析	16
2.1.2 ALN-18328は野生型及び変異型TTR対立遺伝子を同程度の効力で抑制する	21
2.1.3 ALN-18328のアンチセンス鎖(A-32346)末端欠失により生じる可能性のある代謝物の <i>in vitro</i> におけるTTR mRNA低下作用	23
2.2 <i>In vivo</i> 薬理試験	24
2.2.1 トランスジェニックマウスを用いた試験におけるRNAiを介したTTR減少によるTTR組織 沈着及び消退への影響	24
2.2.2 サルにSNALP-18324又はSNALP-18328 (ALN-TTR01) を単回投与したときの肝臓内TTR mRNA減少に基づく、開発候補としてのALN-18328の選択	28
2.2.3 サルにパチシラン-LNPを単回投与したときのTTRの減少	29
2.2.4 サルにパチシラン-LNPを反復投与したときの血清中TTRの減少	31
3 副次的薬理試験	37
3.1 <i>In vivo</i> 副次的薬理試験	37

2.6.2 薬理試験の概要文
パチシランナトリウム

3.1.1	サルにおける血清中TTR減少によるRBP濃度への影響	37
3.1.2	サルを用いた毒性試験における血清中TTR、ビタミンA及びサイロキシン濃度の減少	38
4	安全性薬理試験	42
4.1	<i>In vitro</i> 安全性薬理試験	42
4.2	<i>In vivo</i> 安全性薬理試験	43
4.2.1	サルを用いたパチシラン-LNP（ALN-TTR02）の点滴静注による安全性薬理試験（心血管系、呼吸系及び中枢神経系評価を含む）	43
5	薬力学的薬物相互作用試験	45
6	考察及び結論	45
7	図表	47
8	参考文献	48

表 目 次

表 1 - 薬理試験で用いられた各製剤の名称	9
表 2 - Hep3B細胞でのIC ₅₀ 解析を行った12種の二本鎖siRNAの <i>in vitro</i> 有効性データの要約	14
表 3 - ALN-18328アンチセンス鎖の潜在的オフターゲット候補遺伝子	15
表 4 - ALN-18328によりオフターゲット抑制を受ける可能性のある候補遺伝子	17
表 5 - アンチセンス鎖（A-32346）の末端欠失型siRNAの <i>in vitro</i> におけるTTR mRNA低下作用（BIO17012試験）	24
表 6 - hTTR V30M/Hsf-1 KOマウスにALN-TTR01を反復投与したときの肝臓内TTR mRNA及び血清中TTRタンパク質の減少	26
表 7 - 22ヵ月齢のhTTR V30M/Hsf-1 KOマウスにALN-TTR01を反復投与したときの末梢組織内TTR沈着の抑制	28
表 8 - パートI：用量がTTR減少に及ぼす影響－4週に1回（q4w）投与	31
表 9 - パートI及びパートII：異なる臨床用法用量がTTR減少に及ぼす影響を評価するためのパートI後の動物における用量又は投与レジメンの変更	32
表 10 - サルを用いた反復投与試験のパートIIIにおける血清中TTR減少率の最大値及び最小値のまとめ	35

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

表 11 - サル39週間 (q3w×14) 試験における血清中TTR、ビタミンA及びサイロキシンの 変化率 (ベ スラインとの比較) の平均値	41
---	----

図 目 次

図 1 - Hep3B肝細胞癌細胞を用いたALN-18328のオフターゲット解析	18
図 2 - デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを用いたALN-18328のオフターゲット解析	19
図 3 - ALN-18328を介した野生型及び病原性変異型TTR mRNAの減少 (BIO12014試験)	22
図 4 - <i>hTTR V30M/Hsf-1</i> KOマウスにALN-TTR01を反復投与したときの 肝臓内TTR mRNA及び血清中TTR タンパク質の減少	26
図 5 - 22ヵ月齢の <i>hTTR V30M/Hsf-1</i> KOマウスにALN-TTR01を反復投与したときの 末梢組織におけるTTR 沈着像	27
図 6 - 22ヵ月齢の <i>hTTR V30M/Hsf-1</i> KOマウスにALN-TTR01を反復投与したときの 末梢組織内TTR沈着 の抑制	27
図 7 - サルにSNALP-18324又はSNALP-18328 (ALN-TTR01) を単回投与したときの 肝臓内TTR mRNA 減少	29
図 8 - サルにパチシラン-LNPを単回投与したときの肝臓内TTR mRNAの減少	30
図 9 - サルにパチシラン-LNPを単回投与したときの血清中TTRタンパク質の減少	30
図 10 - サルにパチシラン-LNPを反復投与したときの血清中TTRタンパク質濃度の減少	33
図 11 : 雄サルにおけるパチシラン-LNPの異なる2バッチを反復投与した後の血清中TTR減少	36
図 12 : 雌サルにおけるパチシラン-LNPの異なる2バッチを反復投与した後の血清中TTR減少	36
図 13- サルにおけるRNAiを介した血清中TTR減少による血清中RBP濃度への影響	38
図 14- サルにおけるPBS、パチシラン-LNP又はAF-011-1955の初回及び最終投与後の 血清中TTR、ビ タミンA及びサイロキシンの減少率	39

略号と用語の定義

略号、用語	定義
ADAM	メタロプロテアーゼドメイン (Metallopeptidase domain)
ADAMTS6	ADAM メタロペプチダーゼ及びトロンボスポンジン 1 型モチーフ 6 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 6)
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、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	<i>TTR</i> mRNA を標的とする siRNA ALN-18328 を内包する (ALN-TTR02 と同様) 第一世代の SNALP 処方、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	第二世代 LNP である AF-011 で処方した RNAi 医薬品パチシラン製剤。2 mg/mL のパチシラン原薬 (<i>TTR</i> 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、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)
bDNA	分岐 DNA アッセイ (Branched DNA)
BPI	殺菌性透過性増強タンパク質 (Bactericidal permeability-increasing protein)
bpm	心拍数 (Beats per minute)
cDNA	相補的 DNA (Complimentary deoxyribonucleic acid)
CDS	コーディング DNA 配列 (Coding deoxyribonucleic acid sequence)
C _{max}	最高血中濃度 (Maximum (peak) concentration)
CYP	シトクロム P450 (Cytochrome P450)

2.6.2 薬理試験の概要文
パチシランナトリウム

略号、用語	定義
CYSLTR1	システイニルロイコトリエン受容体 1 (Cysteinyl leukotriene receptor 1)
DLin-MC3-DMA	(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino) butanoate
DNA	デオキシリボ核酸 (Deoxyribonucleic acid)
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
Dual-Luc	デュアルルシフェラーゼ (Dual-luciferase)
ECG	心電図 (Electrocardiography)
EDDM3B	精巣上体分泌タンパク質 E3β (Epididymal secretory protein E3-beta)
EDTA	エチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	酵素結合免疫吸着検査法 (Enzyme-linked immunosorbent assay)
EST	発現配列試験 (Expressed Sequence Test)
EMA	欧州医薬品庁 (European Medicines Agency)
FDA	食品医薬品局 (Food and Drug Administration)
GAPDH	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
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	遺伝性異形トランスサイレチン
hERG	ヒト <i>ether-à-go-go</i> 関連遺伝子 (human <i>ether-à-go-go</i> related gene)
HPLC	高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography)
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)
KO	ノックアウト (Knockout)
LDLR	低比重リポタンパク質受容体 (Low density lipoprotein receptor)
LINC00924	長鎖遺伝子間非翻訳 RNA 924 (Long intergenic non-protein coding RNA 924)
LNP	脂質ナノ粒子 (Lipid nanoparticle)
LOC105376100	Locus 105376100
MAP	平均動脈圧 (Mean arterial pressure)
mRNA	メッセンジャーRNA (Messenger RNA)
NA	該当せず (Not applicable)
NCBI	National Center for Biotechnology Information

2.6.2 薬理試験の概要文
パチシランナトリウム

略号、用語	定義
ND	測定せず (Not determined)
PBS	リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline)
PEAK1	仮足濃縮非定型キナーゼ 1 (Pseudopodium enriched atypical kinase 1)
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	(R)-2,3-bis(tetradecyloxy)propyl 1-(methoxy poly(ethylene glycol)2000)propyl carbamate
PHD	植物ホメオドメイン (Plant homeodomain)
PK	薬物動態 (Pharmacokinetic(s))
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)
qPCR	定量ポリメラーゼ連鎖反応 (Quantitative polymerase chain reaction)
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)
SD	標準偏差 (Standard deviation)
SEN5P	セントリン/SUMO 特異的プロテアーゼ (Sentrin/SUMO-specific protease)
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)
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
SUMO1	Small ubiquitin-like modifier 1
Tg	トランスジェニック (Transgenic)
TK	トキシコキネティクス (Toxicokinetic(s))
TTC39A	テトラトリコペプチド反復タンパク質 (Tetratricopeptide repeat protein 39A)
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
ZFP64	ジンクフィンガータンパク質 64 ホモログ (Zinc finger protein 64 homolog)

1 まとめ

パチシラン-LNP（別名：ALN-TTR02）は、2 mg/mL のパチシラン（ALN-18328）及び 4 種の脂質添加剤で構成されるリボ核酸干渉（RNAi）治療薬である。等張リン酸緩衝生理食塩液（PBS）中に、DLin-MC3-DMA ((6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-heptatriaconta-6, 9, 28, 31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino) butanoate)、DSPC (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)、コレステロール及びPEG₂₀₀₀-C-DMG ((R)-2,3-bis (tetradecyloxy) propyl 1-(methoxy poly(ethylene glycol)2000)propyl carbamate) が脂質ナノ粒子（LNP）として製剤化されている。ALN-18328 は、トランスサイレチン（TTR）メッセンジャーRNA（mRNA）を標的とする低分子干渉リボ核酸（siRNA）であり、遺伝性トランスサイレチン型アミロイドーシス患者〔遺伝性 ATTR（hATTR）〕において、肝臓での野生型及び変異型 TTR 発現のいずれをも減少させることにより、TTR アミロイド形成及び沈着を抑制するように設計されている。

TTR（プレアルブミンとも呼ばれる）は 127 個のアミノ酸からなるタンパク質であり、四量体を形成する。TTR は主に肝細胞で産生され（循環血中 TTR の 95% 超が肝臓由来）、またごくわずかであるが脈絡叢及び網膜でも産生される(1)(2)。循環血中の全 TTR のうち約半分が非結合形であり、残りは主にレチノール結合タンパク質（RBP）と複合体を形成し、ビタミン A の輸送を促進する(3)。ヒトにおいて、血漿中結合形サイロキシンの大部分はサイログロブリンと複合体を形成しているが、TTR はサイロキシンのマイナーな担体でもある(4)。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）は、TTR 遺伝子の変異により、最終的にタンパク質のアミロイド形成促進性変異が誘導されて引き起こされる常染色体優性全身疾患である（これまでにヒト TTR で 120 を超えるアミロイド形成性変異が特定されている）(5)(6)。TTR タンパク質の変異によって四量体が不安定化し、その結果 TTR タンパク質の二量体及び単量体への解離が促進される。単量体のミスフォールディングとこれに続く凝集によって、オリゴマー及びアミロイド繊維の組織沈着が引き起こされる(37)(38)(39)。一般的に、アミロイド沈着物には変異型及び野生型両方の TTR が含まれており、これらの沈着物が時間の経過とともに顕著な組織傷害を引き起こす(7)(8)(9)(10)。hATTR アミロイドーシスは重度の病的状態を伴い、神経、心臓及び消化管に病理性アミロイド沈着が認められる(11)。hATTR アミロイドーシスの臨床症状は変異によって異なり、しばしば 2 つの臨床症候群（多発性神経障害を伴う家族性アミロイドポリニューロパチー〔FAP〕と心筋症を伴う家族性アミロイド心筋症〔FAC〕）に分けられる。

ALN-18328 はヒト TTR 遺伝子の 3'非翻訳領域（3'-UTR）を標的とする。ALN-18328 の標的領域は、ヒトとカニクイザル（*Macaca fascicularis*、以下サルと記載する）の間に 100% 保存されているが、げっ歯類とは交差反応しないため、マウス、ラット及びウサギでは RNAi による内因性 TTR 遺伝子発現の減少がみられない。したがって、パチシラン-LNP の非臨床 *in vivo* 薬理評価は主にサルで行った。サルは siRNA に対して薬理学的反応を示し、非臨床薬物動態及び薬力学的評価によく使用される。このことから、これらの試験により、ヒトで予想される反応に似た反応が確認される可能性が最も高くなると考えられた。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

In vivo 活性の評価には、トランスジェニックマウスモデル (*hTTR V30M/Hsf-1* KO マウス) も使用した(12)。熱ショック因子 1 (*Hsf-1*) 欠損の遺伝的背景を有するマウスに、ヒトのアミロイド形成性変異体 *V30M TTR* をコードするトランスジーンを発現させると、*V30M hATTR* アミロイドーシス患者と類似したタンパク質凝集物の組織沈着を呈する。SNALP (stable nucleic acid lipid particle : 安定核酸脂質粒子) と呼ばれる第一世代 LNP で製剤化した ALN-18328 を含有する ALN-TTR01 (別名 : SNALP-18328、表 1 参照) をマウスに投与した。ALN-TTR01 の製剤化工程、組成及び生化学的特性はパチシラン-LNP と類似している(13)(14)。ALN-TTR01 は第 I 相臨床試験で薬理活性を示すことが確認されたが、パチシラン-LNP の方が約 10 倍強い効力を示すことが非臨床及び臨床試験で示されたため、その後の臨床開発を中止した(15)。しかし ALN-TTR01 は、パチシラン-LNP より効力が弱いものの肝臓内 TTR 発現をパチシラン-LNP 同様に特異的に低下させることから、申請資料にはこれらの裏付け試験を含めた。ALN-TTR01 の試験で使用した手法の詳細は引用元の報告書に記載している。

パチシラン-LNP は ALN-TTR02、LNP11-18328 又は AF-011-18328 と称されており、これらの名称は以下の薬理試験について記載されている引用元の報告書で使用されている。同様に、パチシランは ALN-18328 や AD-18328 と称されている。試験報告書で使用されているパチシラン、パチシラン-LNP 及び関連する製剤の名称や別名を表 1 に示す。

表 1 - 薬理試験で用いられた各製剤の名称

名称	説明	使用した目的及び試験	試験番号
パチシラン AD-18328 ALN-18328	サル及びヒトの <i>TTR</i> を標的とする siRNA で、パチシラン-LNP (ALN-TTR02) 及び以前の第一世代 LNP (ALN-TTR01) で使用。	非製剤化原薬 (<i>in vitro</i> 試験で使用)、第一世代 LNP (SNALP) 製剤 (製剤名 : ALN-TTR01) 又は第二世代 LNP (AF-011) 製剤 (製剤名 : ALN-TTR02 又はパチシラン-LNP) として評価した <i>TTR</i> 特異的 siRNA。	BIO09003 BIO09004 BIO09005 BIO09025 BIO12014 BIO17012 BIO18014
パチシラン-LNP ALN-TTR02 AF-011-18328 LNP11-18328	パチシラン (ALN-18328) の AF-011 LNP 製剤。	パチシラン (ALN-18328) の製剤名。大半の <i>in vivo</i> 薬理、薬物動態及び毒性試験で評価した。	BIO10026 BIO11002 BIO11003 20031783 TTR02-NCD10-011 TTR02-NCD10-003 TTR02-NCD12-001 TTR02-GLP17-007
AD-1661	マウス第 VII 因子 (FVII) 遺伝子発現を標的とする siRNA。	<i>In vitro</i> での siRNA による非特異的作用を示す陰性対照として使用したマウス FVII 特異的 siRNA。ヒト FVII 発現は変化させない。	BIO09025 BIO12014

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

名称	説明	使用した目的及び試験	試験番号
AF-011-1955 LNP11-1955	パチシラン-LNP と同じ LNP で製剤化した非哺乳類ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的とする siRNA。	パチシランによる <i>TTR</i> mRNA 低下とは無関係でパチシラン-LNP に使用されている LNP 製剤による影響を評価するために薬理及び毒性試験で使用した陰性対照 siRNA-LNP。	BIO10026 BIO11003 TTR02-NCD10-011 LD-NCD10-016
ALN-TTR01 SNALP-18328	パチシラン (ALN-18328) を含有する、効力の弱い第一世代 LNP (SNALP) 製剤。	<i>hTTR V30M/Hsf-1</i> KO マウス及びサルを用いた <i>in vivo</i> 薬理試験で評価した。これらの試験で得られた結果は、製剤にパチシラン (ALN-18328) が含まれているため重要である。	BIO10118 BIO16041
SNALP-1955	SNALP LNP で製剤化した非哺乳類ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的とする siRNA。	パチシランによる <i>TTR</i> mRNA 低下とは無関係で SNALP LNP 製剤による影響を評価するための ALN-TTR01 の陰性対照。	BIO10118 BIO09009
SNALP-18324	<i>TTR</i> を標的とする siRNA の AD-18324 を含有する、効力の弱い第一世代 LNP (SNALP) 製剤。	サルを用いた <i>in vivo</i> 薬理試験で評価した。これらの試験で得られた結果は、パチシラン (ALN-18328) と AD-18324 の差別化に役立つため重要である。	BIO09009

効力を裏付ける試験として、ALN-18328 の効力及び選択性を検討した *in vitro* 試験 (BIO09003 試験、BIO09004 試験、BIO09005 試験、BIO09025 試験、BIO12014 試験、BIO17012 試験及び BIO18014 試験)、ヒトトランスジェニックマウス ATTR アミロイドーシスモデルを用いた *in vivo* 試験 (BIO10118 試験) 並びにサルを用いてパチシラン-LNP の効力及び有効性を評価した *in vivo* 試験 (BIO09009 試験、BIO10026 試験、BIO11002 試験、BIO11003 試験及び 20031783 試験) を実施した。

In silico 試験と *in vitro* 試験を組み合わせることによって、ヒト及びサル *TTR* を標的とする強力かつ特異的な siRNA として ALN-18328 を選択した。*TTR* 遺伝子の 3'-UTR を標的とする ALN-18328 の選択は以下の基準を考慮して行った。

1. ヒト肝細胞癌細胞株 G2 (HepG2) 及びヒト肝細胞癌細胞株 3B (Hep3B) 細胞において、ALN-18328 は *in vitro* で強力かつ用量依存的に *TTR* mRNA を減少させた。
2. 広範な NCBI dbSNP データベースの *in silico* 検索並びに様々な民族及び地域のヒト集団から得られた *TTR* サンプルの直接配列解析を行ったところ、ALN-18328 の標的部位内の配列は 100% 保存されていたことから、ALN-18328 はいずれの地理的及び民族的背景を有する患者においても *TTR* mRNA を阻害すると考えられる。
3. Alnylam 社の独自アルゴリズムにより測定すると、ALN-18328 は *TTR* に高度に特異的であり、これは公的に入手可能な siRNA 選択ツール (siDirect 2.0) を用いて更に裏付けられた。*In silico* バイオインフォマティクス解析で配列依存的オフターゲット作用を示す可能性が最も高いと予測された 10 種の候補に対する阻害作用と *TTR* 阻害作用を比較すると、50% 阻害濃度 (IC₅₀)

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

に 10,000 倍を超える差がみられた。■ 個のオフターゲット遺伝子候補に対する新たなリスクアセスメントから、組織発現の欠如、配列相同性、及び遺伝子 ■ 個の既知の機能に基づいて、ALN-18328 のオフターゲット活性に関連する安全性の懸念はないことが明らかにされた。

4. 病原性 *TTR* 変異はコーディング領域 (CDS) に変異箇所があるため、ALN-18328 を用いた 3'-UTR を標的とすることにより病原性 *TTR* 変異体が野生型 *TTR* と同程度の効力で確実に阻害されることが、デュアルルシフェラーゼ (Dual-Luc) レポーター系を用いた *in vitro* 試験において確認された。

ALN-18328 (ALN-TTR01 製剤) の *in vivo* 薬理評価は、最初、*hTTR V30M/Hsf-1* KO マウスモデル⁽¹²⁾ を用いて行った。これらのマウスは、変異型 *TTR* の沈着が構造的及び空間的に V30M 変異 ATTR の初期ステージと類似していることが示唆されており、治療仮説を評価するための非臨床サロゲートとして使用できると考えられる。ALN-TTR01 は 2 週間に 1 回の計 6 回、3 mg/kg の用量で尾静脈にボラス投与した (BIO10118 試験)。ALN-TTR01 を投与すると、RNAi による肝臓内 *TTR* mRNA 発現の低下及び血清中 *TTR* タンパク質の 85% 超の減少が引き起こされ、新たな *TTR* 組織沈着が予防された。更に、関連する末梢組織における既存の *TTR* 沈着が ALN-TTR01 投与によって消退したことから、パチシラン-LNP 開発の根拠となる治療仮説の強力な裏付けが得られた。

サルを用いてパチシラン-LNP の単回及び反復投与による *in vivo* 薬理試験を実施した。単回投与 (0.03、0.1 及び 0.3 mg/kg) により、肝臓内 *TTR* mRNA 及び血清中 *TTR* タンパク質のいずれも強力かつ用量依存的に減少し、ベースラインからの減少率は約 50~90% であった (BIO10026 試験、BIO11002 試験、BIO11003 試験)。反復投与試験 (用量: 0.15~0.5 mg/kg、投与頻度: 3 週間に 1 回 [q3w] 又は 4 週間に 1 回 [q4w]) では、血清中 *TTR* タンパク質が用量依存的に減少し、最大血清中 *TTR* 減少率は最大で 99% であった。評価した投与法のうち、平均血清中 *TTR* 濃度減少率が最も大きかったのは 0.3 mg/kg q3w 又は 0.5 mg/kg/q4w の投与であった (ベースラインと比較した平均減少率は約 91%) ■ 20031783 試験)。サルにおいて異なる 2 スケール (■ kg と ■ kg) で製造されたパチシラン-LNP を反復投与 (3 週間に 1 回×4) した後に、0.3 mg/kg と 2.0 mg/kg で同様の血清中 *TTR* タンパク質濃度の減少が認められた (*TTR02-GLP17-007* 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。サル薬理試験 (BIO16041 試験) において、ALN-18328 (ALN TTR01 製剤) 投与後の血清中 *TTR* 減少と RBP 減少の間に直接的相関が認められた。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 (点滴静注: 0、0.3、1 及び 3 mg/kg/q2w、*TTR02-NCD10-011* 試験) 及びサル 39 週間反復投与 (14 回投与) 毒性試験 (点滴静注: 0、0.3、1 及び 3/2 mg/kg/q3w、*TTR02 NCD12-001* 試験) において、ビタミン A 濃度をモニタリングしたところ、いずれの試験においても *TTR* 低下とビタミン A 低下の間に直接的関係が認められた。投与期間を通して血清中 *TTR* タンパク質濃度が大幅に低下し (ベースラインからの最大平均減少率は 98%)、循環血中ビタミン 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%) 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

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

の変化は認められなかった。眼科学的検査、眼の病理組織学的検査及び網膜電図の結果（サル 39 週間反復投与毒性試験で検討）はすべて正常範囲内であった。

ヒトにおいて、TTR はサイロキシンのマイナーな担体であり、サイロキシンの約 80% がサイロキシン結合グロブリン (TBG) に結合し、15% が TTR、5% がアルブミン及びリポタンパク質に結合する(4)。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が減少した（ベースラインからの最大平均減少率は 41%）。

テレメトリー装着サルを用いて医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用の安全性薬理試験を実施し、予定臨床投与経路によるパチシラン-LNP の心血管系及び呼吸系への影響の評価並びに神経学的評価を行った（TTR02-NCD10-003 試験）。6 mg/kg（検討した最高用量）以下の用量において、心電図（ECG）の質的異常又は QTc(F)算出値への影響は認められなかった。3 mg/kg 以上の用量において、軽度から顕著な心拍数増加及び体温上昇がみられ、投与 48 時間後までにベースライン値への完全な回復は認められなかった。そのほかに顕著な変化は認められなかった。心拍数増加及び体温上昇はいずれも 1 mg/kg 以下の用量では認められなかった。血液ガス、呼吸数及び神経学的検査において、3 mg/kg の用量でパチシラン-LNP に関連した変化は認められなかった。3 mg/kg の用量における ALN-18328 への曝露量は、AUC に基づくと、推奨ヒト用量（RHD）0.3 mg/kg q3w におけるヒト曝露量の 7.3 倍であった。

2 効力を裏付ける試験

本項に述べる非臨床薬効薬理試験は、多発性神経障害を伴う hATTR アミロイドーシスの治療薬としてのパチシラン-LNP（ALN-TTR02）の開発を支持するものである。In silico 及び in vitro 試験ではパチシラン（ALN-18328）の選択について述べる。ALN-18328 はパチシラン-LNP の有効成分の siRNA である。パチシラン-LNP は ALN-18328 及び 4 種の脂質添加剤で構成される（2.6.1「諸言」参照）。これらの試験において、ALN-18328 が野生型及び変異型 TTR 遺伝子発現を効果的に減少させる強力かつ特異的な siRNA であることが示されている。ALN-18328 はサル及びヒトで活性を示すが、げっ歯類では活性を示さない。TTR 型アミロイドーシスモデルである hTTR V30M/Hsf-1 KO トランスジェニックマウスを用いて治療仮説を評価した in vivo 試験では、ALN-18328 による RNAi 経路を介して変異型 TTR タンパク質が減少すると、既存の TTR 沈着が消退することが示された。サルを用いた in vivo 試験では、パチシラン-LNP が TTR 遺伝子発現を効果的に減少させることが示され、その後の臨床試験に用いる用量及びレジメンの設定にはこの試験結果を参考にした。異なる 2 つのプロセスバッチ（■ kg 又は ■ kg）のパチシラン-LNP を投与されたサルにおいて、薬力学的作用に差はなかった。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

2.1 *In vitro* 薬理試験

2.1.1 ALN-18328 の特定：ヒト *TTR* を標的とする強力かつ特異的な siRNA

2.1.1.1 ALN-18328 の選択

(CTD: 4.2.1.1-1, BIO09003, CTD: 4.2.1.1-13: BIO18014)

ヒト *TTR* を標的とする強力かつ特異的な siRNA を特定するため、*in silico* バイオインフォマティクス解析、*in vitro* 試験及び *in vivo* 試験を組み合わせる実施した。最初のバイオインフォマティクス解析として、ヒト *TTR* (アクセッション番号 NM_000371.2) を標的とする [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] それぞれについて、NCBI RefSeq ライブラリーに含まれるすべてのヒト既知転写産物 (known human transcripts) との FASTA ホモロジー比較を行った (FASTA 配列アラインメントツールセット、リリース 34(16); NCBI RefSeq ヒト転写産物データセット、2009 年 4 月 24 日に <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/> からダウンロード(17))。*TTR* との完全な相補性を有し、かつ目的以外の mRNA 標的を阻害する可能性が低いと考えられる ([REDACTED])

種々の siRNA 候補を特定した (BIO09003 試験)。これらの siRNA について最初のスクリーニングとして、HepG2 肝細胞に siRNA を一定濃度 10 nmol/L で一過性にトランスフェクトしたときの *TTR* mRNA 濃度低下作用を検討した。スクリーニングを行った 種々の siRNA のうち 種が *TTR* mRNA 相対的濃度を約 75%以上低下させた。これらの siRNA については更に、HepG2 細胞に一過性にトランスフェクトさせる siRNA の濃度を様々に振って効力を評価した。効力は、*TTR* mRNA 相対的発現量を 50%減少させる siRNA 濃度 (IC₅₀) と定義し、それぞれの siRNA について求めた。このうち 12 種の siRNA について Hep3B 細胞で効力を評価したところ、HepG2 細胞を用いた試験の結果が裏付けられた (表 2)。IC₅₀ 解析及び 10 nmol/L の siRNA (使用した siRNA の最高濃度) による *TTR* mRNA 濃度の最大低下作用を比較すると、絞られた 12 種の siRNA 候補のうち ALN-18328、AD-18324、AD-18258 及び AD-18339 が最も強力かつ有効な siRNA であった。更にこれら 4 種の siRNA は遺伝子の非翻訳領域 (UTR) を標的としており、アミロイド形成性の変異がコーディング DNA 配列 (CDS) 内に位置することを考慮すると、すべてのアミロイド形成性変異に対して活性を示すものと考えられた。しかし、 が標的とするヒト *TTR* 遺伝子配列は

非臨床動物モデルとして[redacted]を使用すること、[redacted]
[redacted]
[redacted]、これら2種の siRNA の *in vivo* 活性を更に評価した。SNALP と呼ばれる第一世代 LNP(13)で製剤化し、サルに単回投与したとき、ALN-18328の方がより効果的に *TTR* mRNA 発現を低下させた (BIO09009 試験 ; 2.2.2項参照)。以上より、更なる評価に使用する siRNA として ALN-18328 を選択した。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

表 2 - Hep3B 細胞での IC₅₀ 解析を行った 12 種の二本鎖 siRNA の *in vitro* 有効性データの要約

最も強力な TTR siRNA の標的部位の場所及び転写産物における位置									
	二本鎖 siRNA ID 番号 ^a	転写産物にお ける位置 NM_000371.2	標的部位 の場所	単回投与 (10 nmol/L) 対照に対する残存 率 (%) ^b		IC ₅₀ (nmol/L)			
						HepG2		Hep3B	
				qPCR	bdNA	qPCR	bdNA	qPCR	bdNA
1	AD-18258		5'-UTR	10.2	10.8	0.007	0.005	0.004	0.005
2	AD-18324		3'-UTR	2.5	12.2	0.002	0.006	0.005	0.014
3	ALN-18328		3'-UTR	4.5	12.3	0.003	0.004	0.006	0.006
4	AD-18339		3'-UTR	6.5	22.1	0.004	0.002	0.018	0.029
5	AD-18330		3'-UTR	11.8	22.2	0.0004	0.010	0.020	ND
6	AD-18274		CDS	9.0	26.7	0.009	0.176	0.036	0.012
7	AD-18332		3'-UTR	11.5	43.5	0.001	0.076	0.065	ND
8	AD-18333		3'-UTR	12.2	68.6	0.001	0.115	0.075	ND
9	AD-18342		3'-UTR	7.6	49.2	ND	0.016	0.076	ND
10	AD-18336		3'-UTR	6.4	37.0	0.001	0.112	0.081	ND
11	AD-18320		3'-UTR	22.9	86.9	ND	0.023	0.403	ND
12	AD-18334		3'-UTR	16.3	68.0	0.0004	0.181	1.071	ND

略語：CDS=コーディング DNA 配列；ND=測定せず；5'-UTR=5'側非翻訳領域；3'-UTR=3'側非翻訳領域

a 二本鎖 siRNA は Hep3B 細胞における IC₅₀ 値の順に並べた。

b 定量ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) 及び分岐 DNA (bDNA) アッセイで測定した mRNA 濃度

最初の *in silico* 及び *in vitro* での siRNA 選択の実施後、異なる siRNA デザインツールを用いて引き続き *in silico* 探索を実施した。Refseq TTR 配列 (NM_000371.3) は、配列特異的予測を用いる siDirect 2.0 (日本のオンライン版 siRNA デザインツール) (40) 経由で実行したほか、シード依存적オフターゲット相互作用の可能性を検討するため、シード領域を標的にする二本鎖融解温度 (T_m) の予測により実行した。ここではデフォルトの検索設定を使用した。その結果、siDirect 2.0 の力価及び特異性基準を満たす 21 の siRNA 候補デザインが得られた。[redacted] の領域に相当する siRNA デザインで、本薬のアンチセンス鎖中心ターゲット領域と同じ 19 塩基を含み、2 塩基のオーバーハングがあった。siDirect 2.0 で算出されたこの配列のシード-ターゲット二本鎖 T_m は 21.2 °C であり、シード依存적オフターゲット作用のほばないシード配列とシード依存적オフターゲット作用のあるものとを識別する基準の 21.5 °C よりも低い (siDirect 2.0 ヘルプ) (41, 42)。この siDirect 2.0 解析から、[redacted] オフターゲットの可能性のある転写産物が特定された (表 4) 。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

表 3 - ALN-18328 アンチセンス鎖の潜在的オフターゲット候補遺伝子

アクセッション番号	候補遺伝子	ミスマッチ位置 ^a
██████████	ADAMTS6	████
██████████████████	LINC00924; Non-coding gene	██████████
██████████	TTC39A; See below ^b	████
██████████	SENP5; Did not achieve IC ₅₀ ^c	██████
██████████	PEAK1	████
██████████	EDDM3B	████
██████████	ZFP64	████
██████████	LOC105376100	████
██████████	Not a gene at NCBI; likely genomics contamination	████
██████████	Gene withdrawn by NCBI staff	████
██████████	BPI	████

Abbreviations: ADAM=metallopeptidase domain; ADAMTS6=ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 6; BPI=bactericidal permeability-increasing protein; EDDM3B=epididymal secretory protein E3-beta; EST=Expressed Sequence Test; IC₅₀=concentration for 50% of maximal inhibition; LINC00924=long intergenic non-protein coding RNA 924; LOC105376100=locus 105376100; mRNA=messenger RNA; NCBI=National Center for Biotechnology Information; PEAK1=pseudopodium enriched atypical kinase 1; SENP5=Sentrin/SUMO-specific protease; siRNA=small interfering RNA; SUMO=small ubiquitin-like modifier; TTC39A=tetratricopeptide repeat protein 39A; ZFP64=zinc finger protein 64 homolog.

^a

^b AB007921 is an early EST in the TTC39A EST cluster, but the region of AB007921 where the siRNA aligns does not align with the TTC39A mRNA.

^c

siDirect 2.0 経由で実行した検索で、ALN-18328 がヒト TTR に対する適した siRNA であることも同定され、予定された TTR 標的配列に対する高い特異性を有すると予測された。なお、その他の遺伝子に対するオフターゲット活性はほとんどもしくは全くなかった（BIO18014 試験）。

2.1.1.2 ALN-18328 標的部位の多型解析

(CTD: 4.2.1.1-2, BIO09004)

RNAi の配列特異性を考慮すると、TTR を標的とする siRNA のアンチセンス鎖とその標的 mRNA 配列の間で 1 塩基のミスマッチがあると、活性が低下又は消失する可能性がある(18)。siRNA 標的部位で自然に発生する一塩基多型 (SNP) が活性に影響を及ぼす可能性があり、その影響は、特定の民族的／地理的背景を有する患者で SNP が多くみられる場合、深刻なものになると考えられる。パチシラン-LNP は広範な地理的及び民族的背景を有する hATTR 患者の治療を目的としていることから、この多型について 2 つの検討を行った (BIO09004 試験)。第 1 の検討として、NCBI dbSNP データベースの検索 ([dbSNP Build ID: 130] ; (19)) を実施し、ALN-18328 結合部位に起こる可能性のある SNP を特定した。██████████ (アクセッション番号 NM_000371.3) ██████████

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

。第2の検討として、様々な民族的背景を有する から得られたサンプルを用いて、完全な *TTR* 遺伝子配列を決定した。サンプルは独自のリポジトリ から入手したもので、。この解析で *TTR* 遺伝子のコーディング領域における SNP が 種類検出されたが、ALN-18328 の標的部位には多型がみられなかった。これら2つの検討を総合すると、ALN-18328 の標的部位内の配列は100%保存されていることが立証された。このような配列の保存に基づく、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る。これらの結果から、いずれの臨床試験に組み入れる患者についても ALN-18328 の標的部位の詳細な配列解析を行う必要はないと考えられた。

2.1.1.3 ALN-18328 のオフターゲット活性の解析

(CTD: 4.2.1.1-1, BIO09003、CTD: 4.2.1.1-13: BIO18014、CTD: 4.2.1.1-3, BIO09005、CTD: 4.2.1.1-4, BIO09025)

アンチセンス鎖のシード領域及び切断領域におけるミスマッチは、1塩基であっても siRNA 活性が消失する可能性がある(20)。この知見に基づき、*TTR* 遺伝子転写産物以外の mRNA が RNA 干渉により減少するものと定義される“配列依存オフターゲット活性”を防ぐために、ALN-18328 はヒトゲノムにおける他の全ての既知 (known) 又は予測 (predicted) 転写産物に2塩基以上のミスマッチを有するようにデザインされた (BIO09003 試験)。この設計上の特徴により ALN-18328 がオフターゲット活性を示す可能性は低減されているが、ALN-18328 を構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖と非常に類似した配列を有するヒト mRNA 転写産物があれば、意図しないオフターゲット活性を示す可能性が予想される。ALN-18328 のオフターゲット活性の有無を評価するため、別のパイオインフォマティクス解析を実施した (BIO09005 試験)。ALN-18328 を構成する塩基配列をクエリとして用い、NCBI RefSeq ライブラリーに含まれるすべてのヒト既知転写産物との FASTA ホモロジー比較を行った (FASTA 配列アラインメントツールセット、リリース 34 (16) ; NCBI RefSeq ヒト転写産物データセット、2009年4月24日に <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/> からダウンロード(17))。

、クエリには独自のスコアリングアルゴリズムを使用した ()。これらの因子の中には、相対的な。さらに、かどうかの予測、それぞれ

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

。治療用 siRNA 候補の選択において、全ての転写産物と比較した場合の選別（ ）を行った。

。上記の検索の結果、オフターゲット活性を示す可能性が高いヒト転写産物として 12 種が特定され、このうちセンス鎖によって想定外の mRNA 阻害が生じる可能性が予測されたものは 5 種（ ）、アンチセンス鎖は 7 種（ ）であった。ALN-18328 のセンス鎖は化学修飾（具体的には 2 位の 2'-O-メチルリボシル置換）がされているため、センス鎖がオフターゲット遺伝子抑制を引き起こす可能性は低い(21)。しかし、ALN-18328 のアンチセンス鎖とホモロジーを示す 7 種のヒト転写産物はオフターゲット遺伝子抑制を受ける可能性のある候補と考え、*in vitro* で更に評価した（表 4）。

表 4 - ALN-18328 によりオフターゲット抑制を受ける可能性のある候補遺伝子

アクセッション番号	候補遺伝子	ミスマッチ位置 ^a
NM_000371.2	TTR	NA
	ADAM メタロペプチダーゼ及びトロンボスポンジン 1 型モチーフ 6	
	システイニルロイコトリエン受容体 1	
	サイクリン J	
	SUMO1/セントリン特異的ペプチダーゼ 5	
	Piccolo（シナプス前細胞マトリックスタンパク質）	
	20 番染色体オープンリーディングフレーム 96	
	プロモドメイン PHD フィンガー転写因子（BPTF）、バリエント 2	

略語：NA=該当せず。

^a

ALN-18328 投与によるオフターゲット作用の有無を評価するため、実践的及び頑健なアプローチを採用することとし、*in vitro* 系で qPCR などの従来の方法を用いて標的候補の詳しい *in silico* 評価を行って mRNA 発現量を正確に評価した。具体的には、2 つのアッセイを実施した。第 1 のアッセイとして、Hep3B ヒト肝細胞癌細胞における ALN-18328 の内因性遺伝子発現抑制作用を評価した (BIO09025 試験)。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

オフターゲットの可能性があると特定された 7 種のヒト転写産物うち、1 種（システインロイコトリエン受容体 1：[REDACTED]）を除くすべての転写産物がヒト Hep3B 細胞において発現していた。TTR 転写産物（アクセッション番号 NM_000371.2）も Hep3B 細胞で内因性に発現がみられた。予想されたように、ALN-18328 をトランスフェクトすると TTR mRNA 発現が濃度依存的に減少し、IC₅₀は約 2 pmol/L であった。一方、ALN-18328 をトランスフェクトした Hep3B 細胞の 6 種のオフターゲット候補遺伝子については顕著な発現低下は認められなかった。唯一意義のあるレベルの抑制がみられた転写産物は [REDACTED]（IC₅₀：1.4 μmol/L）で、試験した最高濃度である 100 nmol/L の ALN-18328 により約 30%の低下が認められた。これを TTR の減少と比較すると、効力に 10,000 倍を超える差がみられた（図 1）。

図 1 - Hep3B 肝細胞癌細胞を用いた ALN-18328 のオフターゲット解析

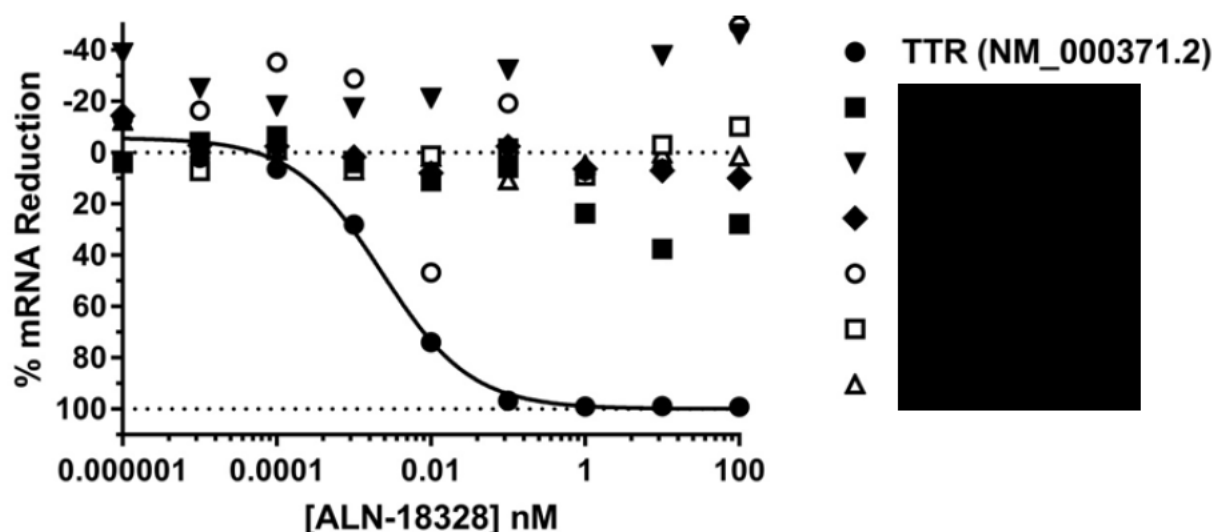


図 1：Hep3B 細胞での ALN-18328 によるオフターゲット mRNA 減少の評価。Hep3B 細胞に ALN-18328 をトランスフェクトした後、オフターゲット候補の各配列を qPCR で分析した。オフターゲット候補は凡例に示す NCBI Reference Sequence ID で示す。データはノンターゲットイング siRNA の AD-1955 と比較した mRNA 減少率で示す。TTR (NM_000371) 及び遺伝子 [REDACTED] の mRNA 減少データを 4 パラメータロジスティック非線形回帰に適合させたところ、IC₅₀値はそれぞれ 2 pmol/L 及び 1.4 μmol/L であった。評価したその他の遺伝子については mRNA 減少がみられなかったことから、データを適合させることができず、IC₅₀値が求められなかった。特記事項として、[REDACTED] の 0.01 nmol/L のデータポイントは異常値である可能性が高く、0.01 nmol/L を超えるいずれの濃度においても mRNA 減少率はごくわずかであった。

オフターゲット候補の転写産物 [REDACTED] は Hep3B 肝細胞癌細胞で発現がみられなかったため、Dual-Luc レポーター系を用いたアッセイを補完的に実施し、7 種の転写産物すべてを評価した (BIO09025 試験)。ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイは、感度が高く、ダイナミックレンジも広く、かつ内因性活性を持たないことから、遺伝子発現及びそれに関連する細胞事象を検討する製薬研究や生物医学研究に繁用されている (BIO18014 試験)。このアッセイには、ルシフェラーゼをコードする DNA プラスミドコンストラクトを使用し、コンストラクトに含まれるホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3'-UTR に TTR 又は各オフターゲット配列を遺伝的に付加した。これらのコンストラクトをトランスフェクトした COS-7 細胞に ALN-18328 を処理し、ルシフェラーゼ遺伝子発現を評価した。オフターゲット

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

ト候補の転写産物のいずれかが ALN-18328 の標的である場合には、その配列をルシフェラーゼ遺伝子 3'-UTR に付加することによって、ALN-18328 を処理したときにルシフェラーゼの発現が低下する。同様に、ルシフェラーゼの発現低下がみられない場合は、オフターゲット候補の転写産物は ALN-18328 の標的ではないことが示唆される。ALN-18328 は TTR を標的とするようにデザインされているため、TTR をルシフェラーゼ 3'-UTR に付加することによってルシフェラーゼの発現が低下すると予想されることから、これを陽性対照として使用した。

予想どおり、3'-UTR に TTR 遺伝子配列が付加されたルシフェラーゼコンストラクトをトランスフェクトした細胞に ALN-18328 を処理すると、ルシフェラーゼ遺伝子発現が強力かつ濃度依存的に低下した (IC₅₀: 約 3 fmol/L、図 2)。一方、ルシフェラーゼの 3'-UTR に 7 種のオフターゲット候補遺伝子配列を各々付加したルシフェラーゼコンストラクトをトランスフェクトした細胞に ALN-18328 を処理したときには、ルシフェラーゼ発現の低下はみられなかった。この結果は、評価した ALN-18328 のすべての濃度 (最高 2000 nmol/L) で認められた。Dual-Luc レポーターアッセイの結果は Hep3B 細胞を用いた評価結果と一致しており、バイオインフォマティクス解析の結果と合わせると、これらのデータから、ALN-18328 は TTR に高度に特異的であり、オフターゲット遺伝子抑制作用を引き起こす可能性は低いことが示唆された。

図 2-デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた ALN-18328 のオフターゲット解析

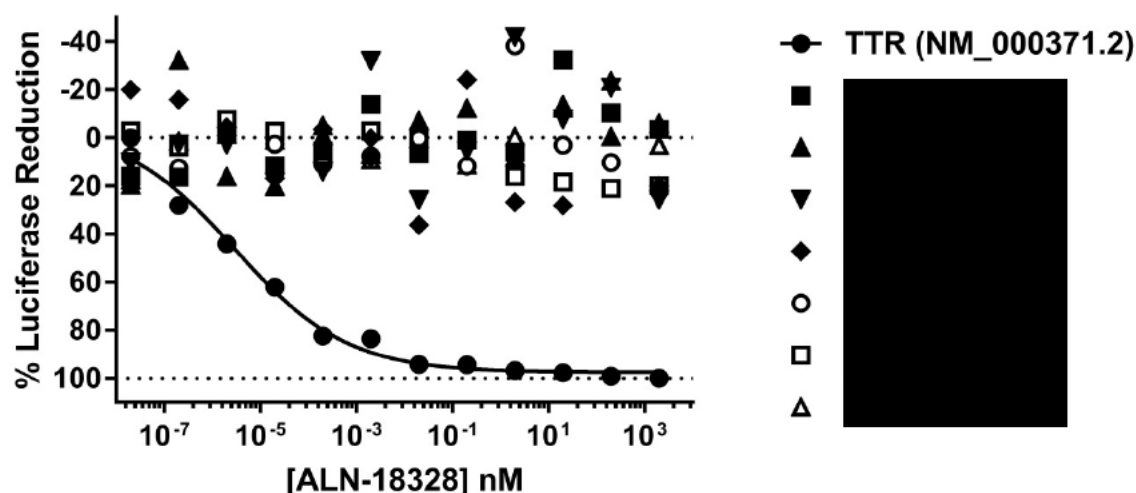


図 2: Dual-Luc レポーターアッセイを用いた ALN-18328 によるオフターゲット候補 mRNA 減少の評価。ALN-18328 をトランスフェクトした後、オフターゲット候補の各配列を Dual-Luc レポーターアッセイで評価した。オフターゲットは凡例に示す NCBI Reference Sequence ID で識別する。Dual-Luc アッセイのデータは、TTR 又はオフターゲット候補の転写産物のいずれも標的とし、陰性対照 siRNA の AD-1661 と比較したルシフェラーゼ減少率で示す。データは 4 パラメータロジスティック非線形回帰に適合させた。TTR 減少に関する IC₅₀ 値は約 3 fmol/L であったが、評価したその他の遺伝子についてはルシフェラーゼの減少がみられなかったことから、データを適合させることができず、IC₅₀ 値が求められなかった。データの正規化方法は BIO09025 試験報告書に記載されている。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

更に、その後の siDirect 2.0 を用いた *in silico* 検索で、ALN-18328 に対して複数の塩基のミスマッチを有すると推定されるオフターゲット転写産物を特定した。オフターゲットの可能性があるととして特定された転写産物うち、2 種類 (ADAMTS6、SENP5) を除くすべての転写産物で、少なくとも [REDACTED] [REDACTED] においてミスマッチが認められた。SENP5 については、肝臓、副腎、脾臓及びリンパ節で発現しているものの、その量は低いと考えられる (TPM<20)。一方で、肝臓での TTR 発現の TPM 中央値は 2726 であった。また、本薬と SENP5 転写産物のアライメントでは [REDACTED] 1 つのミスマッチがあった。BIO0925 試験 (CTD 4.2.1.1-4 参照) に記載したとおり、Hep3b 細胞を用いた試験において、SENP5 に対する本薬の IC₅₀ は決定できず、検討した最高濃度の本薬で SENP5 mRNA 濃度は AD-1995 陰性対照と比べて 10% 弱の減少であった。以上のデータを合わせると、本薬と SENP5 ターゲット配列の間のミスマッチの数 [REDACTED] 1 つ) 及びパチシラン-LNP の取り込み標的組織での SENP5 の発現量は低いことから、0.3 mg/kg のパチシラン-LNP を投与したとき、オフターゲット作用による SENP5 mRNA の減少があったとしてもそれによる安全性の懸念はないと考えられる。パチシラン-LNP 取り込みが既知の組織中で siDirect 2.0 を用いてオフターゲットの可能性があるととして特定された転写産物うち、ADAMTS6、CYSLTR1 及び PEAK1 については、以下のような理由で安全性への懸念があることから更に検討を行った：1) Hep3B 細胞において発現がみられなかった (CYSLTR1)、2) qPCR アッセイで Hep3B 細胞において遺伝子発現の減少が見られた (ADAMTS6)、又は 3) siDirect 2.0 検索で特定されたが、*in vitro* 評価が行われていない (PEAK1)。新たなリスクアセスメントでは、組織発現の欠如、配列相同性、及び遺伝子 [REDACTED] 1 個の既知の機能に基づいて、ALN-18328 のオフターゲット活性に関連する安全性の懸念はないことが明らかにされた (BIO18014 試験)。すなわち、オフターゲットの候補転写産物「ADAMTS6」、「CYSLTR1」及び「PEAK1」のそれぞれに関する安全性評価を実施しており、その詳細については BIO18014 試験 (CTD 4.2.1.1-13) の報告書 3 項を参照のこと。

上記以外でオフターゲットの可能性があるととして特定された転写産物に関しては、ミスマッチの程度、本薬のシード領域内に対するミスマッチの位置並びに遺伝子が発現する組織を踏まえて、これらの遺伝子それぞれの発現が減少することに起因するオフターゲット作用の可能性は非常に低く、安全性の懸念がないと判断した。その根拠を以下に示す。

- BX098209 (LINC00924) と本薬のアライメントでは [REDACTED] 1 つのミスマッチがあり、よって発現が影響を受ける可能性は低い。
- 本薬と AB007921 (TTC39A) のアライメントではシード領域内に [REDACTED] 1 つのマッチがあるものの、本薬自体と TTC39A のアライメントはなく、よって TTC39A の減少を介したオフターゲット作用の可能性はない。
- XM_370878 (PEAK1) と本薬のアライメントでは、シード領域内のミスマッチ 1 つを含む [REDACTED] 1 つのミスマッチがあり、肝臓での発現は非常に低い (TPM<2.0)。脾臓での発現は GTEx データベースの TPM が 46.3 であるが、ミスマッチの数及び位置から意味のある減少がみられる可能性は低い。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

- EDDM3B は肝臓、副腎、脾臓及びリンパ節で発現していないため、これらの組織で本薬による有害作用が生じる可能性は低い。
- ZFP64 はシード領域内に 1 つのミスマッチがあり、肝臓、副腎及び脾臓での発現が非常に低く (TPM<4)、リンパ節での発現はこれよりやや高い程度である (TPM=7.7)。ミスマッチの数及び位置から、この 4 種の組織で ZFP64 に意味のある減少がみられる可能性は低い。
- siDirect 2.0 で特定された LOC105376100 配列は、タンパク質をコードしない遺伝子で、GTEx (遺伝子型-組織発現) やその他の一般的な組織発現レベルの指標には含まれない。ミスマッチの数及び位置並びに LOC105376100 が意義のある生物活性を示す可能性は低いことから、本薬による発現減少が起きたとしても生物学的な影響はないと考えられる。
- CR603237 に対応する既知遺伝子はなく、ゲノムの汚染に起因する誤った EST であると考えられる。
- AB007879 配列は GenBank から削除されており、本物の遺伝子ではないと考えられる。
- BPI と本薬のアライメントではシード領域内に 1 つのミスマッチがあり、肝臓、副腎、脾臓及びリンパ節での発現は非常に低い (TPM<2)。よって、発現の減少があったとしてもその生理学的な影響は非常に低い。さらに、siRNA のシードと相補的な配列をもつ遺伝子の一部が抑制されるシード依存的オフターゲット作用の可能性について、siDirect 2.0 により検討した。siDirect 2.0 で算出された本薬配列のシード-ターゲット二本鎖 Tm は 21.2 °C であり、シード依存的オフターゲット作用のほばないシード配列とシード依存的オフターゲット作用のあるものとを識別する基準の 21.5 °C よりも低いことから、本薬のシード依存的オフターゲット作用の懸念は低いと考えられた (siDirect 2.0 ヘルプ) (41, 42)。

以上、ALN-18328 は強力かつ高度に特異的であることが示され、Alnylam 社の独自アルゴリズム及び公的に入手し得た siRNA 選択ツール (siDirect 2.0) により、TTR 遺伝子の不変領域を標的とすると考えられた。この結果及び ALN-18328 が臨床試験において ALN-TTR01 (SNALP-18328) 製剤の一部として評価されることを考慮し、本 siRNA をパチシラン-LNP の成分のリード候補として選択した。

2.1.2 ALN-18328 は野生型及び変異型 TTR 対立遺伝子を同程度の効力で抑制する

(CTD: 4.2.1.1-1, BIO09003、CTD: 4.2.1.1-4, BIO09025、CTD: 4.2.1.1-5, BIO12014)

TTR のアミロイド形成性変異は TTR コーディング領域内の特定の位置における SNP によって生じ、現在 120 種ものアミロイド形成性変異が特定されている。TTR 遺伝子にアミロイド形成性変異が生じると、TTR タンパク質の四量体型が不安定化して二量体及び単量体に解離し、最終的にミスフォールディングして様々な組織にオリゴマー及びアミロイド線維が沈着する(7)。一般的に、アミロイド沈着物には変異型及び野生型両方の TTR に加え、血清アミロイド P タンパク質 (SAP) やグリコサミノグリカンといった成分が含まれており(7)(8)(9)(10)、これらが時間の経過とともに顕著な組織傷害を引き起こす(22)。また、肝移植を受けた hATTR アミロイドーシス患者では、移植肝由来野生型 TTR の持続的な沈着により、移植後に疾患の進行がみられることが多い(22)(23)(24)。したがって、hATTR アミロ

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

イドーシスの病態生理に基づくと、ALN-18328 が有益な臨床効果を発揮するには、野生型及び変異型両方の TTR レベルを減少させることが必要である。前述のように、ALN-18328 は TTR 遺伝子の 3'-UTR を標的とするため (BIO09003 試験)、野生型及び変異型 TTR 遺伝子発現を同程度の効力で減少させると考えられる。この予想を検証するため、上記 BIO09025 試験のアッセイに類似した Dual-Luc レポーターアッセイを用いて ALN-18328 を評価した (BIO12014 試験)。この特殊な実験では、完全長の野生型又は変異型 TTR の相補的デオキシリボ核酸 (cDNA) 配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3'末端に遺伝子工学的に付加することによって、このハイブリッド遺伝子コンストラクトの mRNA 転写産物が ALN-18328 投与に感受性を示すようにした。陰性対照には TTR を挿入していない Dual-Luc コンストラクト (空ベクター) を用いた。

図3に示されるように、Dual-Luc レポーターアッセイを用いた *in vitro* 解析において、ALN-18328 をトランスフェクトすると野生型 TTR 及び高頻度に見られる 5 種の変異型 TTR (Val30Met、Thr60Ala、Ser77Tyr、Ser77Phe、Val122Ile) の発現が減少し、その効力は同程度であった (IC₅₀: それぞれ 36、28、23、30、16 及び 33 pmol/L)。TTR 遺伝子を挿入していない Dual-Luc ベクター (空ベクター) を用いた対照実験では ALN-18328 による減少が起こらなかったことから、この作用は挿入された TTR 遺伝子を介したものであることが確認された。これらのデータを総合すると、ALN-18328 は野生型及び病理性変異型 TTR に対して同程度の効力を示すことが確認された。

図3 - ALN-18328 を介した野生型及び病理性変異型 TTR mRNA の減少 (BIO12014 試験)

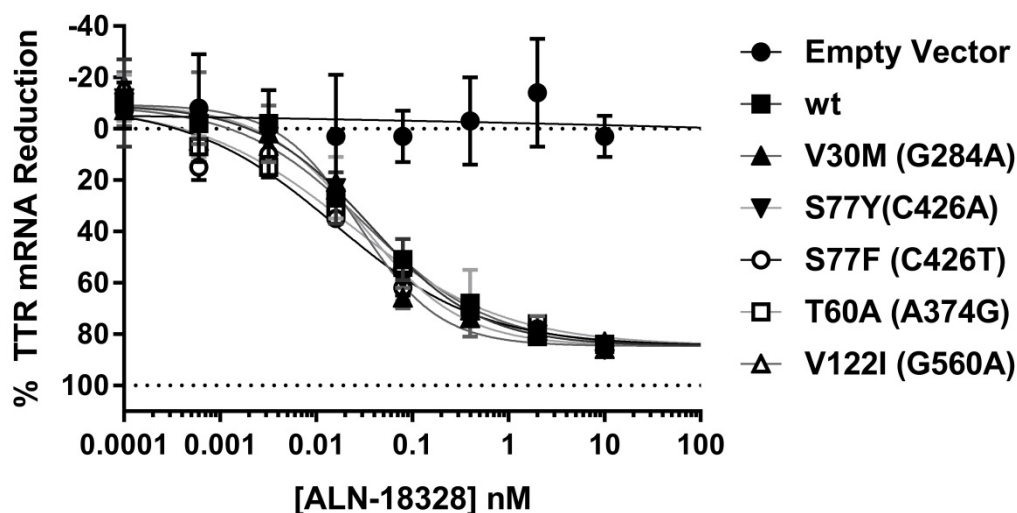


図3: デュアルルシフェラーゼ (Dual-Luc) レポーターアッセイを用いた野生型 (野生型) 及び変異型 TTR 遺伝子抑制の *in vitro* 解析。アミロイド形成性変異型 TTR については、凡例の括弧内にそれぞれ該当する核酸塩基の変化を記載する。空ベクターは TTR を挿入していない Dual-Luc コンストラクトを表し、陰性対照として使用する。データは、TTR を標的とし、陰性対照 siRNA の AD-1661 と比較した TTR mRNA 減少率で示す。データは 4 パラメータロジスティック非線形回帰に適合させた。エラーバーは平均値 (n=2) の標準誤差を示す。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

2.1.3 ALN-18328 のアンチセンス鎖 (A-32346) 末端欠失により生じる可能性のある代謝物の *in vitro* における *TTR* mRNA 低下作用

(CTD: 4.2.2.4-18, TTR02-DSM17-002, CTD: 4.2.1.1-6, BIO17012)

マウス、ラット、サル及びヒトの血清及び肝臓画分を用いて、*in vitro*における ALN-18328 の代謝安定性及びプロファイリング試験を実施したところ、これらの実験を通じて、エキソヌクレアーゼによる切断でセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方が分解され、類似した代謝物が生成することが示された(2.6.4, 5.1 項参照)。このことから、ALN-18328 を投与した場合には、細胞内エキソヌクレアーゼへの曝露によって ALN-18328 の一部が分解されるため、薬力学的活性が低下する可能性がある(25)。ラット肝臓を用いた *in vivo* 代謝プロファイリングでいずれの ALN-18328 代謝物も少量であることが示されたが(TTR02-DSM17-002 試験)、末端が欠失して生じる可能性がある一連の siRNA を合成し、それらの *TTR* 遺伝子抑制作用を Hep3B 細胞で評価した。評価した二本鎖 siRNA は、ALN-18328 のアンチセンス鎖 A-32346 と比較して、その [REDACTED] のいずれかが欠失したものである(表 5)。活性を有するのはアンチセンス鎖であるため、センス鎖 A-32345 の組成は変化させず、すべての二本鎖 siRNA は ALN-18328 と同じセンス鎖と各短縮型アンチセンス鎖とのアニーリングにより作製した。各々の二本鎖 siRNA を 0.1 及び 10 nmol/L の濃度で Hep3B 細胞にトランスフェクトし、その 24 時間後に qPCR により *TTR* mRNA を測定した。

ALN-18328 と比較して、[REDACTED] 欠失アンチセンス鎖を有する二本鎖 siRNA は、強い活性を維持できていなかった。Hep3B 細胞での正常型 ALN-18328 の *in vitro* IC₅₀ 値よりも約 30 倍高い 0.1 nmol/L において、1 塩基の欠失でも ALN-18328 と比較して活性の顕著な低下がみられた (*TTR* mRNA 低下率は ALN-18328 の 99% に対して 72%)。[REDACTED] すると活性が更に低下し (*TTR* mRNA 低下率は 19% のみ)、[REDACTED] の欠失ではほぼ不活性化し、*TTR* を標的としていない対照 siRNA と大差なくなった。なおこの試験で評価した [REDACTED] 欠失 siRNA は、いずれも 10 nmol/L siRNA 濃度で評価したとき明らかな活性を保持していたことに留意すべきである。しかしこのときの siRNA 濃度は、正常型 siRNA である ALN-18328 の IC₅₀ 濃度よりも 3000 倍以上高く、生理的濃度を超えるものであり、薬理学的用量で得ることは不可能と考えられる。したがって、0.1 nmol/L の siRNA 濃度も超生理的濃度と考えられるものの、この濃度の方が末端塩基欠失の影響を評価するのにより適切な濃度と考えられた。

■欠失とは対照的に、アンチセンス鎖の ■欠失ではより良好な活性維持が認められた。0.1 nmol/L では、 ■
■の欠失は活性に影響を与えなかった。更に、 ■
■でも、TTR mRNA 低下率は ALN-18328 と同程度であったことから、これらの塩基は活性に必須ではないことが示唆された ■ は、ALN-18328 と比較して活性の低下が認められ、TTR mRNA 低下率はそれぞれ約63%及び62%であった。
■の2種類の欠失体の間での違いは、アンチセンス鎖の ■ に siRNA 活性の主要な決定部位の1つであるシード領域(■)が含まれていることに起因する可能性が高い。したがって、■が欠失すると、siRNA のシード領域及び切断認識領域の両方がずれるため、siRNA が

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

根本的に変化する(26)。一方、[REDACTED]の欠失の場合には、単に siRNA の長さが短縮するだけであり、シー
ード領域及び切断認識領域はいずれも変化しない。[REDACTED]欠失による活性低下は、siRNA/RNA 誘導サ
イレンシング複合体 (RISC) 相互作用の最適性が低下したことに起因すると考えられる(26)。この結
果から、*in vivo* において [REDACTED]欠失体は活性を保持していると考えられ、存在する限り、薬理作用の
発現に寄与する可能性がある。

表 5 - アンチセンス鎖 (A-32346) の末端欠失型 siRNA の *in vitro* における TTR mRNA 低下作用
(BIO17012 試験)

二本鎖 siRNA ID ^{ab}	欠失	アンチセンス配列 (5' → 3')	TTR mRNA 低下率 (%) ^c	SD
パチシラン原薬 ALN-18328	完全長	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	98.9	0.3
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]		[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]		[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]		[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]		[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]		[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]		[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]		[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]		[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

略語：SD=標準偏差

a 末端欠失型アンチセンス鎖は ALN-18328 のアンチセンス鎖 A-32346 を元にデザインした。

b 二本鎖 siRNA はいずれも同じ正常型センス鎖 A-32345 (GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT) とアニーリングした。

c siRNA 濃度 0.1 nmol/L での TTR mRNA 低下率。

2.2 *In vivo* 薬理試験

2.2.1 トランスジェニックマウスを用いた試験における RNAi を介した TTR 減少による TTR 組 織沈着及び消退への影響

(CTD: 4.2.1.1-7, BIO10118)

ヒトで血清中 TTR が減少することによってタンパク質の組織沈着が抑制され、臨床ベネフィットが
得られるという治療仮説を検討するため、マウス hATTR アミロイドーシスモデルを用いて RNAi を介
した TTR 減少の影響を評価した(12)。hTTR V30M/Hsf-1 KO マウスはヒト V30M TTR を発現しており、
この V30M TTR とは、ポリニューロパチーを伴う hATTR アミロイドーシスにおけるニューロパチー
症状に関連する病原性 TTR 変異体のうち最も頻度の高い変異体である。さらに、タンパク質の適切な

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

構造獲得に関与する様々なシャペロンの発現を制御する転写因子である Hsf-1 の欠損により、病原性変異の影響が悪化し、最終的には TTR が凝集して病理学的にヒトと同様の組織（胃、十二指腸、結腸、坐骨神経及び後根神経節）に沈着する。*hTTR V30M/Hsf-1* KO マウスは、ポリニューロパチーを伴う hATTR アミロイドーシスの神経学的合併症及びその他の進行した症状を呈さないが、病態メカニズム上重要な段階である TTR タンパク質のミスフォールディング、凝集及び組織特異的沈着を模倣していると考えられる。RNAi を用いたアプローチの目的は、TTR タンパク質発現を抑制することによってこれらの病態メカニズム上の重要な段階を抑制することであるため、*hTTR V30M/Hsf-1* KO マウスモデルは組織沈着に対する作用を評価するのによく適している。初回投与の時点で約 22 ヶ月齢（顕著かつ組織特異的な TTR 沈着が一様に認められる月齢）のマウスを用いて試験を実施した。なおこの試験は、パチシラン-LNP と同じ siRNA の ALN-18328 を含有するが効力が弱い LNP 製剤である ALN-TTR01 (SNALP-18328) ((15); 表 1 参照) を用いて実施した。ALN-TTR01 の製剤化工程及び粒子構造はパチシラン-LNP と同様である(13)(14)。ALN-TTR01 は、パチシラン-LNP よりも効力が弱いものの同様の薬理作用を示し、ALN-18328 の肝臓への送達並びにその後の RNAi による肝臓内 TTR mRNA 及びタンパク質発現抑制を誘導する。これらの試験で評価した治療仮説は ALN-18328 のものと同一であることから、これらの試験とその結果は重要であると考え、本資料に含めた。また、陰性対照として SNALP-1955 と呼ばれる LNP 製剤を使用した (表 1 参照)。SNALP-1955 は、ALN-18328 の代わりに昆虫（ホタル）ルシフェラーゼを標的とする siRNA (AD-1955) を含有しているため、肝臓に送達されても RNAi による遺伝子発現抑制を誘導しないという点を除き、ALN-TTR01 と同じである。

22 ヶ月齢の *hTTR V30M/Hsf-1* KO マウスに 3 mg/kg の ALN-TTR01 (n=9) 又は 3 mg/kg の SNALP-1955 (n=6) のいずれかを Day 0、14、28、42、56 及び 70 に尾静脈内ボラス投与した（2 週間に 1 回、計 6 回投与；BIO10118 試験）。肝臓内 TTR mRNA（分岐 DNA [bDNA] アッセイ）、血清中 TTR タンパク質（酵素結合免疫吸着測定法 [ELISA]）、並びに既知の TTR 沈着部位である末梢組織（胃、十二指腸、結腸、坐骨神経及び後根神経節）での TTR 沈着（免疫組織化学 [IHC] 染色）を 6 回目投与の 1 週間後である Day 77 に評価した。

SNALP-1955 投与群と比較して、ALN-TTR01 投与により肝臓内 TTR mRNA 及び血清中 TTR タンパク質が 85%超低下した (図 4)。胃、十二指腸、結腸、坐骨神経及び後根神経節において、IHC 像で TTR 陽性染色が大幅に減少し (図 5)、TTR 組織沈着が 95%超減少した (図 6)。更に、IHC 像から、ALN-TTR01 投与後に残存した TTR 組織沈着はごくわずかであることも明らかになった (図 5)。広範な TTR 組織沈着を呈する 22 ヶ月齢の *hTTR V30M/Hsf-1* KO マウスを用いて試験を開始したことを考慮すると、これらのデータから、RNAi を介した肝臓内 TTR 発現の阻害により、新たな TTR 組織沈着が予防されるだけでなく、関連する細胞のクリアランス及び修復経路によって既存の TTR 組織沈着が軽減する可能性が得られることが示唆される。本試験で検討した末梢組織は、ポリニューロパチーを伴う hATTR アミロイドーシス患者における既知の病原性 TTR 沈着部位であることから、本試験により、ポリニューロパチーを伴う hATTR アミロイドーシス患者に対する治療的アプローチとしての RNAi を介した肝臓内 TTR 発現の抑制に関する概念実証 (proof-of-concept) が得られた(27)。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

図 4 - *hTTR V30M/Hsf-1* KO マウスに ALN-TTR01 を反復投与したときの
肝臓内 *TTR* mRNA 及び血清中 *TTR* タンパク質の減少

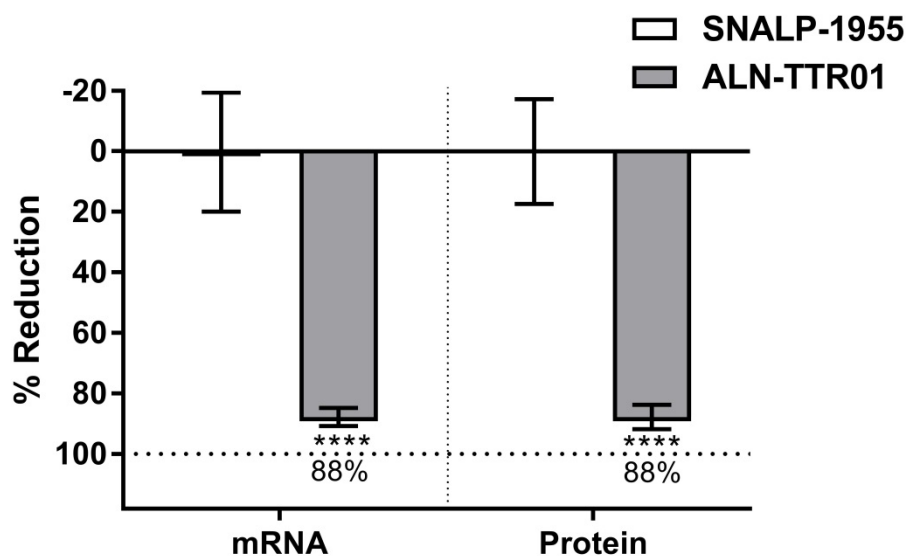


図 4 : 22 ヲ月齡の *hTTR V30M/Hsf-1* KO マウスに ALN-TTR01 又は SNALP-1955 を投与したときの肝臓内 *TTR* mRNA 及び血清中 *TTR* タンパク質量の変化。データは減少率 (SNALP-1955 投与対照との比較) の群平均で示す。エラーバーは平均値の標準偏差を表す。mRNA は bDNA アッセイで測定し、*TTR* タンパク質は ELISA で測定した。データは二元配置分散分析 (ANOVA) 及び Tukey の多重比較検定で解析した (**** $p < 0.0001$)。

表 6 - *hTTR V30M/Hsf-1* KO マウスに ALN-TTR01 を反復投与したときの
肝臓内 *TTR* mRNA 及び血清中 *TTR* タンパク質の減少

% TTR Reduction				
	SNALP-1955		ALN-TTR01	
	Average	SD	Average	SD
mRNA	0.20	44.06	87.67	9.03
Protein	2.0E-05	38.69	87.71	11.96

Abbreviations: HSF-1=heat shock factor 1; *hTTR*=human transthyretin; KO=knockout; mRNA=messenger ribonucleic acid; SD=standard deviation; SNALP=stable nucleic acid lipid particle used in ALN-TTR01; *TTR*=transthyretin; V30M=valine to methionine mutation at position 30 in human transthyretin gene.

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

図 5 - 22 ヲ月齡の *hTTR V30M/Hsf-1* KO マウスに ALN-TTR01 を反復投与したときの
末梢組織における TTR 沈着像

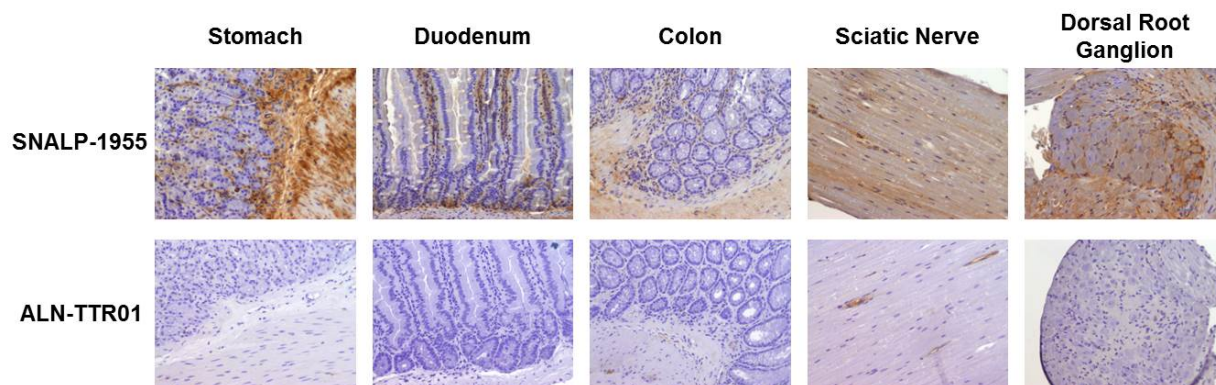


図 5 : 22 ヲ月齡の *hTTR V30M/Hsf-1* KO マウスに ALN-TTR01 又は SNALP-1955 を反復投与したときの代表的 IHC 像。TTR 陽性沈着は抗 TTR 抗体を用いて検出しており、IHC 像で褐色の染色領域として認められる。

図 6 - 22 ヲ月齡の *hTTR V30M/Hsf-1* KO マウスに ALN-TTR01 を反復投与したときの
末梢組織内 TTR 沈着の抑制

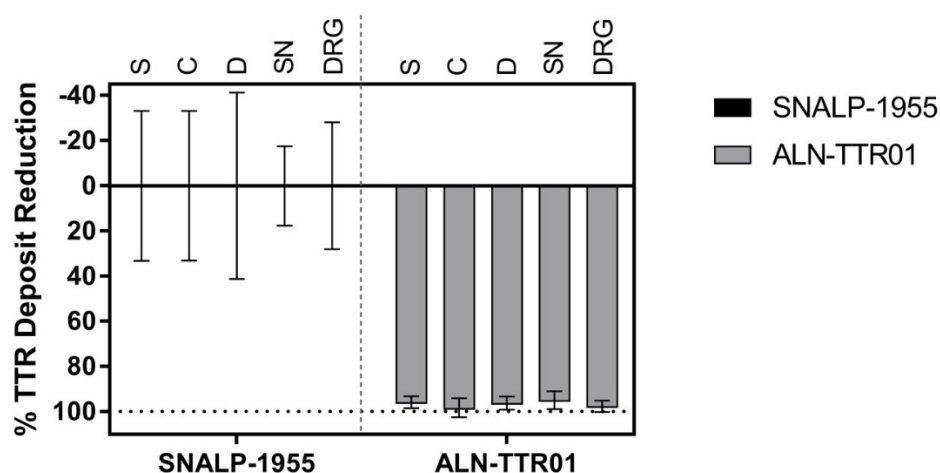


図 6 : 22 ヲ月齡の *V30M/Hsf-1* KO マウスに SNALP-1955 又は ALN-TTR01 を反復投与したときの TTR 組織沈着の定量。データは、TTR で陽性染色された表示面積を SNALP-1955 投与群と比較したときの減少率の平均値で示す。エラーバーは群平均の標準偏差を表す。S=胃、D=十二指腸、C=結腸、SN=坐骨神経、DRG=後根神経節。二元配置 ANOVA 及び Sidak の多重比較検定による SNALP-1955 との比較により薬効を評価した (いずれの投与群においても $p < 0.0001$)。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

表 7-22 カ月齢の hTTR V30M/Hsf-1 KO マウスに ALN-TTR01 を反復投与したときの
末梢組織内 TTR 沈着の抑制

% TTR Deposit Reduction				
	SNALP-1955		ALN-TTR01	
	Average	SD	Average	SD
Stomach	3E-06	33.16	95.78	2.64
Duodenum	-6E-16	33.13	98.30	4.20
Colon	4.5E-06	41.28	96.12	2.91
Sciatic Nerve	1.5E-05	17.54	94.88	3.90
Dorsal Root Ganglion	1E-05	28.09	97.56	2.53

Abbreviations: HSF-1=heat shock factor 1; hTTR=human transthyretin; KO=knockout; SD=standard deviation; SNALP=stable nucleic acid lipid particle used in ALN-TTR01; TTR=transthyretin; V30M=valine to methionine mutation at position 30 in human transthyretin gene.

2.2.2 サルに SNALP-18324 又は SNALP-18328 (ALN-TTR01) を単回投与したときの肝臓内 TTR mRNA 減少に基づく、開発候補としての ALN-18328 の選択

(CTD: 4.2.1.1-8, BIO09009)

ALN-TTR01 の開発においてリード siRNA を選択するための検討の一部として、ヒト及びサルで共通して高度に保存されている 3'UTR 領域を標的とする 2 種の強力な siRNA (AD-18324 及び ALN-18328) が特定された (2.1.1.1項)。これらの siRNA のうち 1 種をその後の開発のために最終的に選択する目的で、AD-18324 及び ALN-18328 を SNALP と呼ばれる LNP で製剤化して検討を行った。得られた LNP 製剤 (それぞれ SNALP-18324 及び SNALP-18328 [ALN-TTR01]) をサルに単回静脈内 (IV) 投与し、*in vivo* での TTR mRNA 減少作用を評価した (BIO09009 試験)。雄サル (1 群 3 匹) に SNALP-18324 (0.3、1 又は 3 mg/kg)、SNALP-18328 (0.3、1 又は 3 mg/kg) 又は陰性対照製剤 SNALP-1955 (3 mg/kg) を 15 分間の点滴静注で投与した。投与 48 時間後に動物を剖検して肝臓検体を採取し、bDNA 法を用いて TTR mRNA 濃度を測定した。SNALP-1955 投与群と比較して、SNALP-18324 及び SNALP-18328 (ALN-TTR01) の投与により、肝臓内 TTR mRNA の用量依存的な減少が認められた (図 7)。SNALP-18324 と SNALP-18328 (ALN-TTR01) の間で有効性にある程度の差が認められ、この差は統計学的有意ではなかったものの、SNALP-18328 は本試験で検討したすべての用量で一貫して TTR mRNA をより大きく減少させた。このことから、更なる開発に用いる siRNA として ALN-18328 を選択した。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

図 7 - サルに SNALP-18324 又は SNALP-18328 (ALN-TTR01) を単回投与したときの
肝臓内 *TTR* mRNA 減少

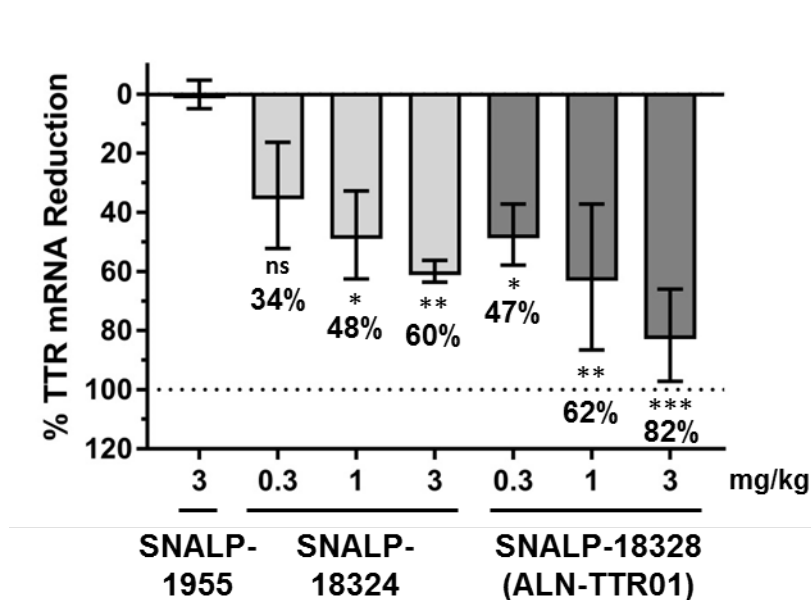


図 7 : SNALP-18324 又は SNALP-18328 (ALN-TTR01) を単回投与したときの肝臓内 *TTR* mRNA 発現の低下。各群の動物 (1 群 3 匹) に SNALP-18324 (0.3、1 又は 3 mg/kg) SNALP-18328 (0.3、1 又は 3 mg/kg) 又は SNALP-1955 (3 mg/kg、陰性対照) を 15 分間の点滴静注で静脈内投与した。投与 48 時間後に動物を剖検し、mRNA 解析のために肝臓検体を採取した。各個体について、肝臓溶解物中の *TTR* 及び *GAPDH* (*Gapdh*) の mRNA レベルを bDNA アッセイで測定し、*TTR/Gapdh* mRNA レベル比を算出した。SNALP-1955 投与群で平均 *TTR/Gapdh* 比を算出し、各個体についてそれぞれの *TTR/Gapdh* 比を SNALP-1955 群平均で正規化し、相対的 *TTR* mRNA 濃度を算出した。各投与群で群平均を算出し、SNALP-1955 投与群と比較した *TTR* mRNA 減少率を算出した。エラーバーは標準偏差を表す。データは一元配置 ANOVA 及び Tukey の事後検定を用いて解析し、SNALP-1955 投与群との統計比較を行った (ns=有意差なし、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$)。

2.2.3 サルにパチシラン-LNP を単回投与したときの *TTR* の減少

(CTD: 4.2.1.1-9, BIO10026、CTD: 4.2.1.1-10, BIO11002、CTD: 4.2.1.1-11, BIO11003)

パチシラン-LNP を単回投与したときの *in vivo* 有効性を評価するため、雄サル (1 群 3 匹) にパチシラン-LNP を 0.03、0.1 及び 0.3 mg/kg の用量で 15 分間の点滴静注により投与した。パチシラン-LNP と同じ LNP の製剤であり、非哺乳類ルシフェラーゼ遺伝子を標的とする siRNA を含有する AF-011-1955 (表 1 参照) を 0.3 mg/kg の用量で投与し、陰性対照とした。投与 48 時間後に、肝臓生検を採取し、bDNA 法を用いて *TTR* mRNA 濃度を測定した。図 8 に示すように、肝臓内 *TTR* mRNA 濃度の用量依存的な低下が認められ、最大で 0.3 mg/kg において 94% 減少し、最低用量の 0.03 mg/kg でほぼ 50% の発現抑制が認められた。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

図 8 - サルにパチシラン-LNP を単回投与したときの肝臓内 *TTR* mRNA の減少

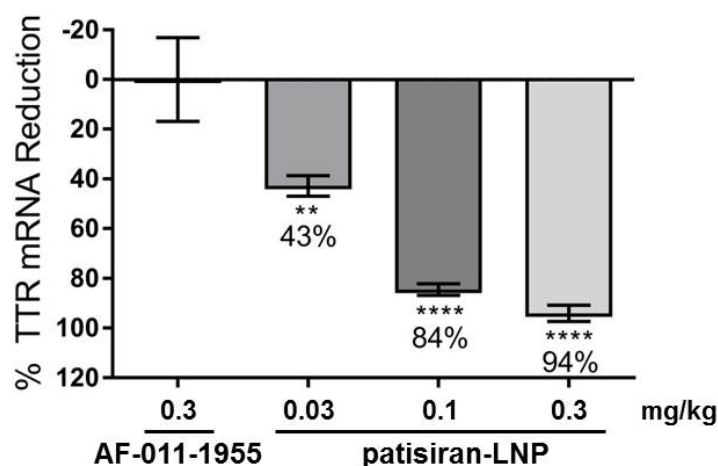


図 8: パチシラン-LNP の単回投与 48 時間後における肝臓内 *TTR* mRNA 発現の減少。各個体について、肝臓内 *TTR* mRNA レベルを測定し、肝臓内 *Gapdh* mRNA で正規化した。群平均を算出し、AF-011-1955 対照群で正規化したものを *TTR* mRNA 減少率としてプロットした。各パチシラン-LNP 投与群について、AF-011-1955 対照群と比較した減少率の群平均を示す。エラーバーは標準偏差を表す。一元配置 ANOVA 及び Tukey の事後検定で解析した (** $p<0.01$ 、**** $p<0.0001$)。

肝臓内 mRNA に加えて、血清中 *TTR* タンパク質濃度を投与前 (Day-1) 並びに投与 1、2、4、7、14、21 及び 28 日後に測定した。図 9 に示すように、パチシラン-LNP の投与により血清中 *TTR* タンパク質濃度が用量依存的に減少した。*TTR* タンパク質濃度が最も減少したのは投与 7 から 14 日後の間であり、その後徐々にベースラインに向けて回復した。mRNA 量と一致して、最高用量の 0.3 mg/kg でみられた *TTR* タンパク質最大減少率は約 90% であり、最低用量の 0.03 mg/kg では約 50% の減少が認められた。投与 28 日後における回復の程度は用量依存的であったことから、高用量では血清中 *TTR* 減少レベルがより大きく、また *TTR* 減少がより持続することが示唆された。

図 9 - サルにパチシラン-LNP を単回投与したときの血清中 *TTR* タンパク質の減少

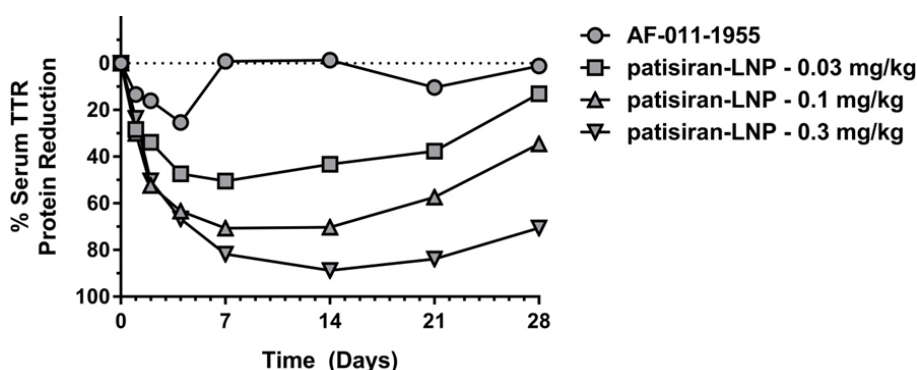


図 9: パチシラン-LNP を単回投与したときの血清中 *TTR* タンパク質の減少。各群について、それぞれの時点で各個体から採取した血清検体をプールして *TTR* タンパク質レベルを ELISA で測定し、投与前 (Day-1) の血清中 *TTR* タンパク質レベルで正規化したものを血清中 *TTR* タンパク質減少率としてプロットした。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

製剤開発過程の一部として更にサルを用いた 2 試験を実施し、パチシラン-LNP の単回投与を他の探索的 ALN-18328 LNP 製剤の比較標準として評価した (BIO11002 試験、BIO11003 試験)。これらの試験から得られた薬力学的データは、上記のデータ (BIO10026 試験) と類似しており、これらを総合すると、パチシラン-LNP の単回投与によって *TTR* mRNA 及び血清中 *TTR* タンパク質が強力に再現性よく減少することが立証された。更に、これらのデータから、サルを用いた反復投与試験 (2.2.4 項) 及びヒト初回投与試験である単回投与臨床試験 (2.5 「臨床に関する概括評価」 参照) で評価した用量の妥当性が示された。

2.2.4 サルにパチシラン-LNP を反復投与したときの血清中 *TTR* の減少

(CTD: 4.2.1.1-12, ■■■ 20031783, CTD: 4.2.3.2-7, TTR02-GLP17-007)

パチシラン-LNP を反復投与したときの *in vivo* 有効性を評価し、臨床試験で使用する投与スケジュールを検討するため、サルにパチシラン-LNP を 24 週間にわたって反復投与した (■■■ 20031783 試験)。上記の単回投与試験とは異なり、パチシラン-LNP は、臨床試験における注入速度と合わせるため、60 分間の点滴静注により投与した。この試験のパート I では、計 5 群 (各群に雌雄 2 匹ずつ) にパチシラン-LNP を 3 回ずつ投与した (表 8)。

表 8 - パート I: 用量が *TTR* 減少に及ぼす影響 - 4 週に 1 回 (q4w) 投与

パート I						
群番号	雄	雌	投与間隔 (週)	投与日	投与回数	用量
1	2	2	4	1, 29, 57	3	0.15 mg/kg
2	2	2	4	1, 29, 57	3	0.2 mg/kg
3	2	2	4	1, 29, 57	3	0.25 mg/kg
4	2	2	4	1, 29, 57	3	0.3 mg/kg
5	2	2	4	1, 29, 57	3	0.3 mg/kg

Abbreviations: q4w=once every 4 weeks.

パート I では、4 週に 1 回投与で各用量の効果を評価した。第 1、2 及び 3 群にはそれぞれ 0.15、0.2 及び 0.25mg/kg の用量で投与し、第 4 及び 5 群にはいずれも 0.3mg/kg の用量で投与した。用量及び投与頻度は、サルを用いた単回投与薬理試験、ラット及びサルを用いた毒性試験並びに健康被験者を対象とした用量漸増単回投与第 I 相試験の結果に基づいて設定した。

サルでの約 9 週間の投与期間 (3 回投与) 後に実施した中間データ解析を踏まえ、臨床的に安全かつ最大の血清中 *TTR* 減少が達成できる用量を検討した。その結果、12 週目に投与群の一部を下記に示す用法用量に変更を加え、パート II とした。

パート II において、第 1 群及び第 4 群では、パート I で当初計画したとおりの用量及び投与方法を継続した。第 2 群は用量を 0.2 mg/kg から 0.5 mg/kg に変更した。第 3 群及び第 5 群は投与頻度を 4 週に 1 回から 3 週に 1 回 (q3w) へと変更した。以上、第 2 群、第 3 群及び第 5 群では 12 週目 (85 日目に 4 回目の投与) から用法用量を変更したことを踏まえ、本試験に関する改訂後は表 9 に示すとおりパー

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

パート I とパート II に分けて表示する。パート I は投与前から 12 週目までの期間、パート II は 12 週目から 24 週目までの期間に対応する。その後、36 週目まで 12 週間の回復期間を設けた（表 9 には記載していない）。

表 9 - パート I 及びパート II : 異なる臨床用法用量が TTR 減少に及ぼす影響を評価するためのパート I 後の動物における用量又は投与レジメンの変更

パート I、II 共通			パート I (Weeks 1-12)			パート II (Weeks 12-24)		
群	雄	雌	投与間隔 (週)	投与量	投与日	投与間隔 (週)	投与量	投与日
1	2	2	4	0.15 mg/kg	1, 29, 57	パート I と 同じ	パート I と 同じ	85, 113, 141, 169
2	2	2	4	0.2 mg/kg	1, 29, 57	パート I と 同じ	0.5 mg/kg	85, 113, 141, 169
3	2	2	4	0.25 mg/kg	1, 29, 57	3	パート I と 同じ	85, 106, 127, 148, 169
4	2	2	4	0.3 mg/kg	1, 29, 57	パート I と 同じ	パート I と 同じ	85, 113, 141, 169
5	2	2	4	0.3 mg/kg	1, 29, 57	3	パート I と 同じ	85, 106, 127, 148, 169

血清中 TTR タンパク質分析用検体採取スケジュール

- 第 1、2 及び 4 群 : Day -9, -6, -3, 2, 3, 5, 8, 11, 15, 19, 24, 28, 31, 36, 41, 46, 51, 56, 59, 64, 69, 74, 79, 84, 87, 92, 97, 102, 107, 112, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 143, 148, 153, 158, 163, 168, 171, 176, 181, 186, 191, 196, 204, 211, 218, 225, 232, 239, 246, 253
- 第 3 及び 5 群 : Day -9, -6, -3, 2, 3, 5, 8, 11, 15, 19, 24, 28, 31, 36, 41, 46, 51, 56, 59, 64, 69, 74, 79, 84, 87, 92, 97, 102, 105, 108, 113, 118, 123, 126, 129, 134, 139, 144, 147, 150, 155, 160, 165, 168, 171, 176, 181, 186, 191, 196, 204, 211, 218, 225, 232, 239, 246, 253

パチシラン-LNP の反復投与により、血清中 TTR 濃度が用量依存性に減少したことが、本試験のパート I の結果で示された。本試験で検討した用量範囲内では、投与後約 10～14 日で血清中 TTR 濃度の減少が最大となった。反復投与では TTR 減少の程度が大きくなりこの効果は投与回数が増えるにつれ減弱して最終的には 24 週間の投与期間内に見かけ上定常状態に達した。検討したいずれの用法・用量群でも、RNAi による血清中 TTR の減少は完全に可逆的で、最終投与から 8 週間以内にベースライン値までほぼ完全に回復した。

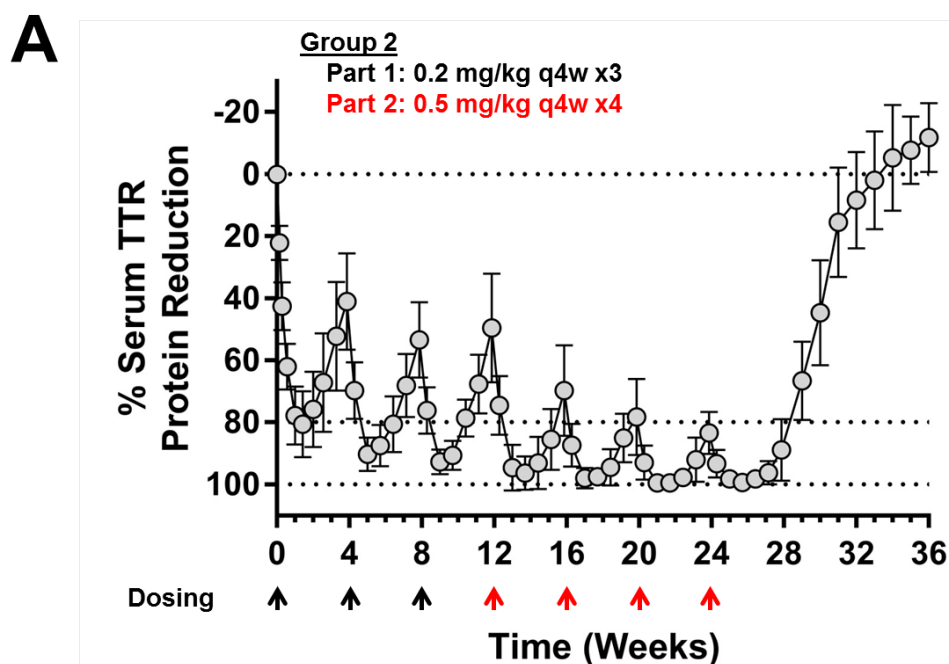
本試験のパート I で検討した最大用量の 0.3 mg/kg でパチシラン-LNP を 4 週に 1 回投与したとき、次の投与までの期間中の血清中 TTR タンパク質減少率は最大が 95%、最小が 70%であった（第 4 群）。約 9 週間の投与期間後、総血清中 TTR の減少をさらに大きくする最良の方法を検討するために用法用量に変更を加えた。これにより、上記の表 6 に記載したとおり、パート II では用量の影響（第 2 群）及び投与頻度の影響（第 3 群及び第 5 群）を検討した。これらの群での新たな用法用量は、パート I で認められた有意な TTR 減少が得られる可能性に基づき、同時に 2.6.6 項「毒性試験の概要文」に記載した非臨床毒性試験での用量制限を超えないように設定した。第 4 群の用法用量は変更せず、異な

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

る用法用量を評価する基準とした。第4群との比較において投与頻度は4週に1回のまま用量を0.5 mg/kgに増量することにより（第2群）、全体的な血清中 TTR 減少が大きくなった。この増量によって、最大血清中 TTR 減少率が高くなり（約 99%）、次回投与時までの間でのベースライン値までの回復の程度も小さくなった（約 80%）（図 10A、表 10）。同様に、用量は 0.3 mg/kg を維持したまま投与頻度を高めて3週に1回投与した場合も（第5群）、全体的な血清中 TTR 減少が大きくなった（図 10B、表 10）。しかし、より頻回な投与による最大血清中 TTR 減少率に対する効果（約 97%）はさほど大きくなかったが、3週間に1回投与したときの次回投与時点までの間の血清中 TTR 減少率は 85%に維持されており、本投与頻度では4週間に1回投与と比較してベースライン値までのより低い回復度が認められたことより、3週間に1回投与の主な利点は回復期に認められた。

第3群の用量は第5群より低かったことより、第3群で認められた全体的な TTR 減少は第5群よりも小さかったが、両群とも同様の薬力学的傾向を示した。定性的に、0.3 mg/kg を3週に1回投与（第5群）と 0.5 mg/kg を4週に1回投与（第2群）とは血清中 TTR 濃度を減少させる作用に関して同等であり、血清中 TTR 減少率の最大は 95%を上回り、最小でも 80%以上であった（図 10C、表 10）。

図 10 - サルにパチシラン-LNP を反復投与したときの血清中 TTR タンパク質濃度の減少



2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

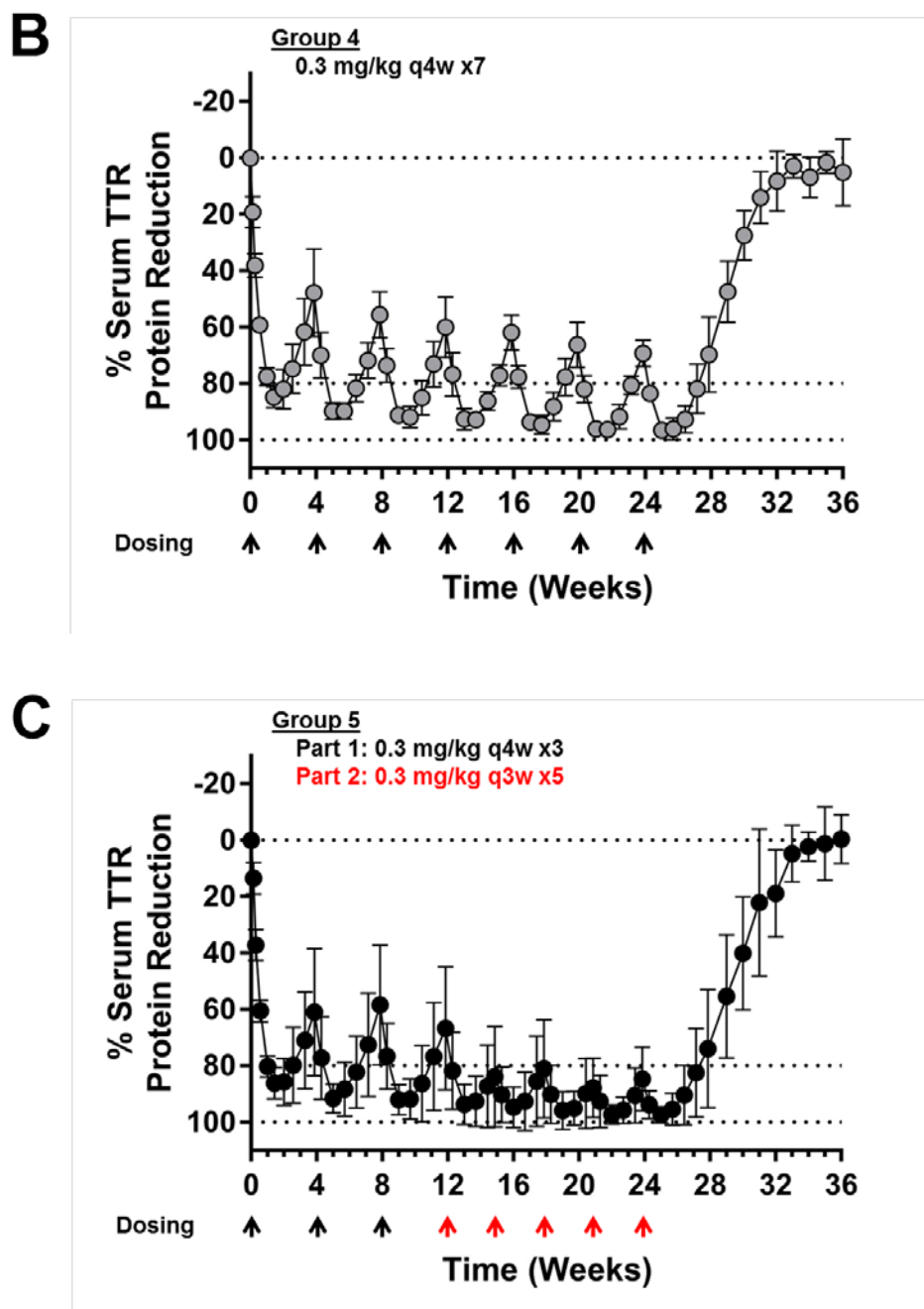


図 10 : パチシラン-LNP を反復投与したときの血清中 TTR タンパク質の減少。カニクイザルにパチシラン-LNP を、表 9 に記載の投与スケジュールに従って、点滴静注により反復投与した。様々な時点で血清検体を採取し、TTR タンパク質濃度を ELISA で測定した。データは、「% Serum TTR Protein Reduction」（血清中 TTR タンパク質減少率%）として各時点における血清中 TTR 減少率の群平均で示しており、個別データをベースラインの血清中 TTR タンパク質濃度で正規化して算出した。エラーバーは平均値の標準偏差を表す。第 2、4 及び 5 群のデータは用量及び投与頻度の設定に最も関連することから、データの比較には A) 第 2 群、B) 第 4 群及び C) 第 5 群を選んで示し、第 1 及び 3 群は可読性向上のために省略した。完全なデータセットは 20031783 試験報告書に記載されている。黒矢印はパチシラン-LNP 投与時点を示す。赤色矢印は Week 12 からのパート II における変更後の投与を示す (第 2 及び 5 群)。第 2 群の投与法 : 0.2 mg/kg q4w×3、その後 0.5 mg/kg q4w×4。第 4 群の投与法 : 0.3 mg/kg q4w×7。第 5 群の投与法 : 0.3 mg/kg q4w×3、その後 0.3 mg/kg q3w×5。血清中 TTR タンパク質減少率 0、80%及び 100%の位置を破線で示す。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

以上、パチシラン-LNP の反復投与では血清中 TTR タンパク質が用量依存性に減少した。検討した用法用量のうち、パチシラン-LNP 0.5 mg/kg を 4 週に 1 回投与及び 0.3 mg/kg を 3 週に 1 回投与で、血清中 TTR 濃度の平均減少率が最も高かった。この 2 種類の異なる用法用量では同等の TTR 減少が達成されたが、0.3 mg/kg を 3 週に 1 回投与の方が経時的な総投与量は少ない（表 10）。サルを用いた長期毒性試験（2.6.6, 3.2 項参照）並びに第 I 相試験及び第 II 相試験で得られたパチシラン-LNP の臨床薬力学及び安全性プロファイル（2.5 項を参照）を合わせて、これらの非臨床データは、第 III 相臨床試験で 0.3 mg/kg を 3 週に 1 回の用法用量を設定することの妥当性を裏付けている。

表 10 - サルを用いた反復投与試験のパート II における血清中 TTR 減少率の最大値及び最小値のまとめ

	第 2 群 0.5 mg/kg q4w	第 4 群 0.3 mg/kg q4w	第 5 群 0.3 mg/kg q3w
最大 TTR 減少率 (%) ^a	99	95	97
最小 TTR 減少率 (%) ^a	80	70	85
1 年間（52 週間）の投与回数	13	13	17.3
52 週間での累積投与量 (mg/kg)	6.5	3.9	5.2

a サル反復投与試験のパート II で測定された減少率に基づく。

反復投与（3 週間に 1 回×4）毒性試験（TTR02-GLP17-007 試験）で、0.3 mg/kg 又は 2.0 mg/kg を投与したサルにおいて、異なる 2 つのプロセスバッチ（■ kg と ■ kg）で製造されたパチシラン-LNP の薬力学的作用を評価した。雄において、■ kg 又は ■ kg スケールのパチシラン-LNP 投与後に、0.3 mg/kg と 2.0 mg/kg で同様の血清中 TTR タンパクの平均減少率が認められた（図 11 参照）。雌において、同様の血清中 TTR タンパク質濃度の平均減少率が、製造スケールを問わず、2.0 mg/kg で認められた（図 12 参照）。血清中 TTR タンパク質濃度の平均減少率は 0.3 mg/kg（■ kg スケールバッチ）で、0.3 mg/kg（■ kg スケールバッチ）と比較して低く、これは主に雌 1 頭によるものであった。この動物では、血清中 TTR タンパク質濃度が、ベースラインから Day 64 までに 15.7% から 47.2% しか減少しなかった。本研究の詳細な記述及び要約した表については、2.6.6, 8.12 項に記載しているほか、2.6.7, 17.C 項でも参照可能となっている。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

図 11：雄サルにおけるパチシラン-LNP の異なる 2 バッチを反復投与した後の血清中 TTR 減少

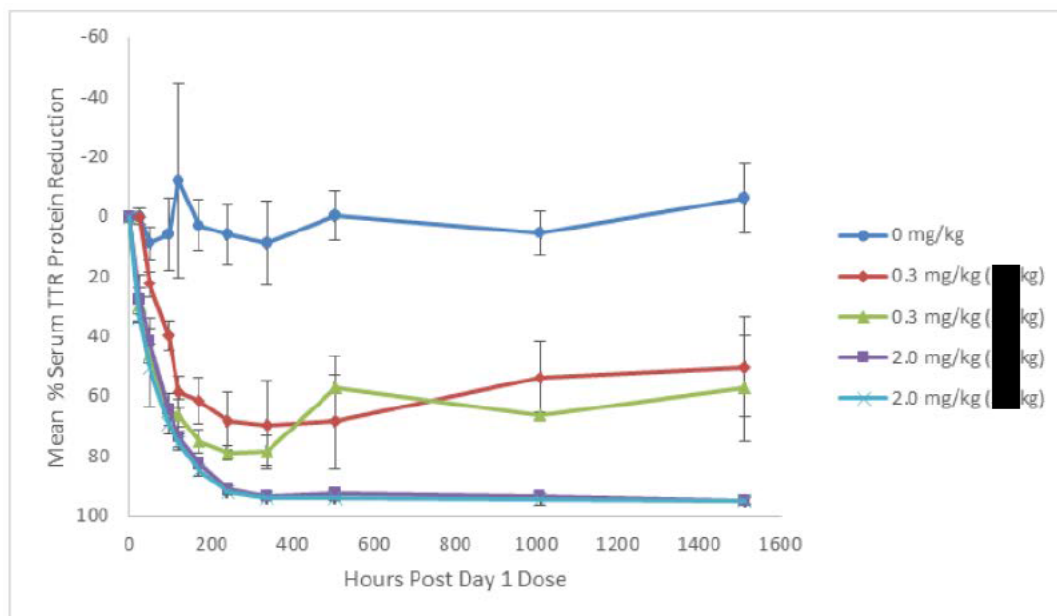


図 11：略語：LNP=脂質ナノ粒子、TTR=トランスサイレチン。1群あたり 4頭の雄サルにおいて、血清中 TTR タンパク質濃度の測定を、投与前、Day 1 静注終了後の 24、48、96、120、168、240、及び 336 時間時点、Day 22 (504 h)、Day 43 (1,008 h)、及び Day 64 (1,512 h) の投与前に行った。データは、ベースラインからの平均変化率±1 標準偏差を示す。

図 12：雌サルにおけるパチシラン-LNP の異なる 2 バッチを反復投与した後の血清中 TTR 減少

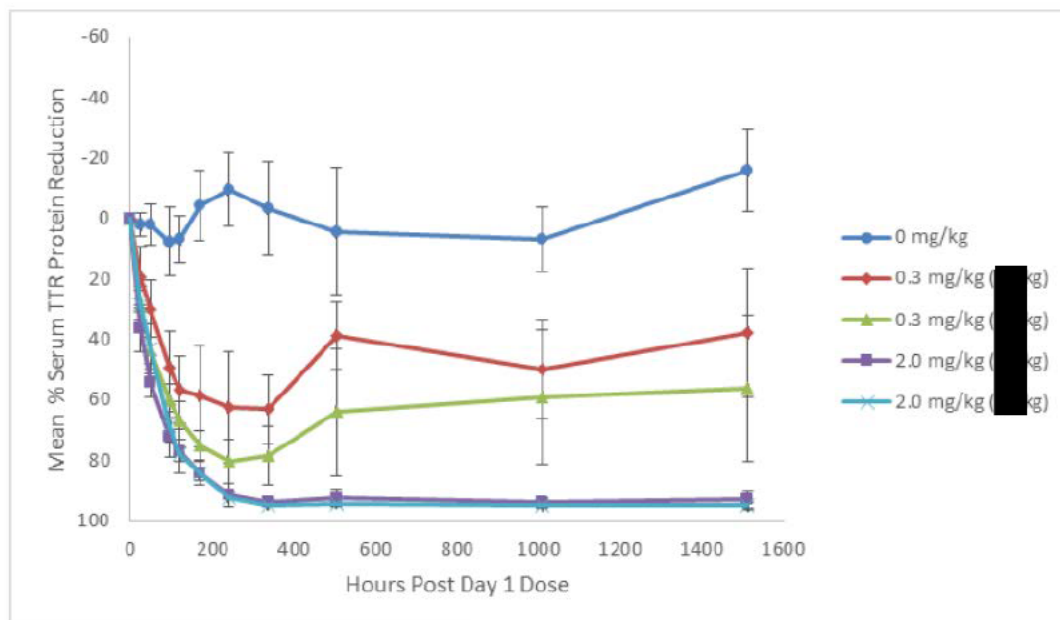


図 12：略語：LNP=脂質ナノ粒子、TTR=トランスサイレチン。1群あたり 4頭の雌サルにおいて、血清中 TTR タンパク質濃度の測定を、投与前、Day 1 静注終了後の 24、48、96、120、168、240、及び 336 時間時点、Day 22 (504 h)、Day 43 (1,008 h)、及び Day 64 (1,512 h) の投与前に行った。データは、ベースラインからの平均変化率±1 標準偏差を示す。

3 副次的薬理試験

TTRは生理作用として循環血中でレチノール（ビタミンA）の輸送に関与している。循環血中レチノールは21 kDaのRBPに結合し、さらにRBPが循環血中で55 kDaのTTRと1:1のタンパク質-タンパク質複合体を形成することで腎臓でのろ過を受けずに血中に維持される(28)。したがって、パチシラン-LNPによるTTRの減少に伴い、副次的薬理作用として循環血中RBP及びビタミンAが減少する可能性が考えられる。また、TTRはげっ歯類でサイロキシンの主要な血漿中担体であり、ヒトではサイロキシンのマイナーな血漿中担体である(4)。

TTR減少による血清中RBP濃度への影響をALN-TTR01のサル単回投与薬理試験（BIO16041試験）で評価した。その後パチシラン-LNPを用いて実施したサル反復投与毒性試験（TTR02-NCD10-011試験、TTR02-NCD12-001試験）において、TTR、血清中ビタミンA及びサイロキシン濃度を測定した。

3.1 *In vivo* 副次的薬理試験

3.1.1 サルにおける血清中TTR減少によるRBP濃度への影響

(CTD: 4.2.1.2-1, BIO16041)

血清中RBP輸送におけるTTRの役割(3)(29)(30)に基づき、血清中TTR減少による血清中RBP濃度への影響を評価するため、PBS又はALN-TTR01のいずれかを単回投与したサルから血清検体を採取し、血清中RBP濃度を測定した。サルにPBS投与又は3 mg/kg ALN-TTR01の15分間点滴静注による投与のいずれかを行った（1群雌雄各1匹；BIO16041試験）。血清中TTR濃度をELISAで測定し、血清中TTR濃度データを基に、Day 7におけるPBS投与群及び3 mg/kg ALN-TTR01投与群の検体について、更にRBP濃度をELISAで測定した。TTR及びRBPの絶対濃度を投与前値で正規化し、減少率を算出した。図に示すように、ALN-TTR01を3 mg/kgの用量で単回投与したとき、血清中TTRが約50～60%減少した。これらの同じ個体でRBPも同程度減少したことから、予想された通りTTR減少によりRBPが減少し、その減少の程度は2種のタンパク質間で相関していることが立証され、この結果はヒトでみられた結果(15)と一致していた。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

図 13- サルにおける RNAi を介した血清中 TTR 減少による血清中 RBP 濃度への影響

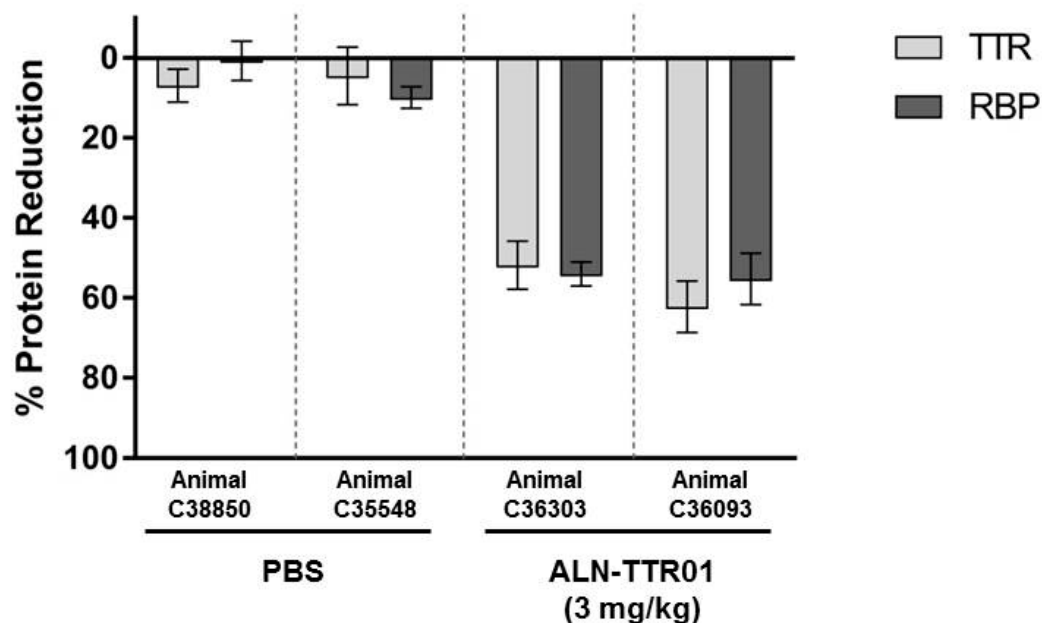


図 13 : RNAi を介した血清中 TTR 減少による循環血中 RBP 濃度への影響。TTR 及び RBP の両方について、Day 7 の濃度をそれぞれの投与前値で正規化し、タンパク質減少率としてプロットした。値は 3 回反復測定 of 平均値を表す。エラーバーは平均値の標準偏差を表す。データは二元配置 ANOVA 及び Tukey の多重比較検定で解析した。各々の検体で RBP 減少率と TTR 減少率の間に統計学的な差はみられなかった。雄：個体番号 C38850 及び C36303。雌：個体番号 C35548 及び C36093。

3.1.2 サルを用いた毒性試験における血清中 TTR、ビタミン A 及びサイロキシン濃度の減少

(CTD: 4.2.3.2-5, TTR02-NCD10-011、CTD: 4.2.3.2-6, TTR02-NCD12-001)

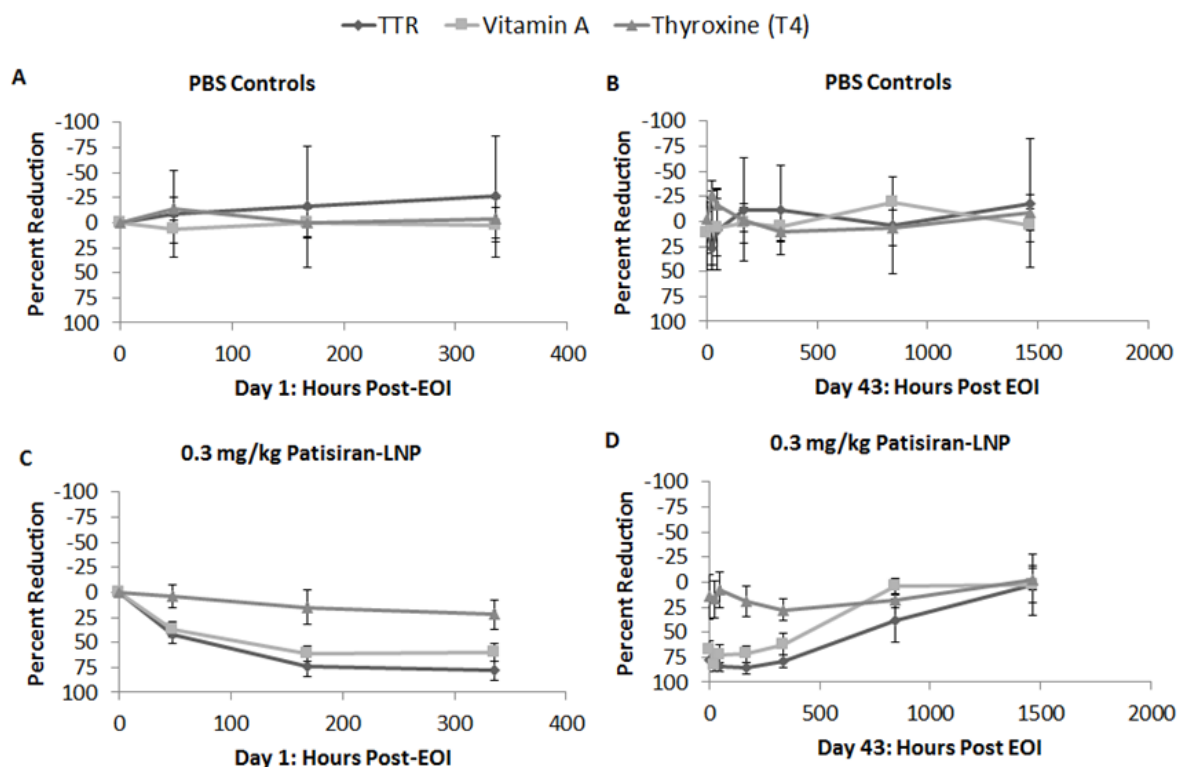
サルを用いた最初の毒性試験である、6 週間反復投与 (q2w×4) 毒性試験及び 60 日間回復性試験 (TTR02-NCD10-011 試験 ; 2.6.6, 3.2.1 項参照) において、パチシラン-LNP 投与後の薬理作用を介した血清中 TTR、ビタミン A 及びサイロキシン濃度の経時変化を評価した。投与期間終了時及び回復期間終了時に TTR mRNA 濃度測定用の肝臓検体も採取した。サル (1 群雌雄各 6 匹) にパチシラン-LNP (0 [PBS]、0.3、1 又は 3 mg/kg q2w) 又は陰性対照 AF-011-1955 (3 mg/kg q2w ; パチシラン-LNP と同じ LNP の製剤であり、昆虫ルシフェラーゼを標的とする siRNA を含有する) を 1 時間の点滴静注で 4 回投与した。Day 45 (最終投与の約 48 時間後) に全群で、Day 104 (投与 1464 時間 [61 日] 後) に対照群及びパチシラン-LNP 投与群で肝臓内 TTR mRNA 濃度を測定した。肝臓内 TTR mRNA 濃度は、非 GLP 下の bDNA アッセイ法で測定した。Day 1 の初回投与後 (投与 336 時間 [14 日] 後まで) 及び Day 43 の最終投与後 (投与 1464 時間 [61 日] 後まで) に、血清中 TTR、ビタミン A 及びサイロキシン濃度を測定した。血清中 TTR 濃度は、GLP 下で ELISA 法により測定した。血清中ビタミン A 濃度は、非 GLP 下で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法により測定した。サイロキシン濃度は、GLP 下で定量的ラジオイムノアッセイ法により測定した。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

Day 45 に、パチシラン-LNP の 0.3、1 及び 3 mg/kg 群の肝臓内 *TTR* mRNA 濃度が対照群と比較してそれぞれ 92、97 及び 99%減少した。Day 104 には部分的な回復が認められたが、0.3、1 及び 3 mg/kg 群における肝臓内 *TTR* mRNA 濃度は依然として対照群よりもそれぞれ 20、25 及び 62%低かった。Day 1 及び Day 43 の両方でパチシラン-LNP の 0.3、1 及び 3 mg/kg 群の雌雄において、循環血中 *TTR*（ベースラインからの最大平均減少率は 96%）、ビタミン A（ベースラインからの最大平均減少率は 90%）及びサイロキシン（ベースラインからの最大平均減少率は 35%）の用量依存的な減少も認められた。Day 43 の投与前は、それ以前にパチシラン-LNP を 3 回投与していたことから、血清中 *TTR*、ビタミン A 及びサイロキシン濃度が試験前値のベースラインと比較すると既に低かったが、図 14 に示すように、60 日間の回復期間の間に完全又は部分的に回復した。AF-011-1955 の 3 mg/kg 群でも Day 45 に肝臓内 *TTR* mRNA の非特異的減少（対照と比較して 49%減少）がみられ、それに伴ってビタミン A も減少したが、*TTR* は炎症急性期に減少するタンパク質であることから(31)、ここで認められた *TTR* の減少は、この投与群でみられた炎症や毒性による二次的なものであった可能性がある。AF-011-1955 投与群では回復性の評価を行わなかった。

ビタミン A 及びサイロキシンの減少による毒性変化は認められず、眼科学的検査並びに眼及び甲状腺の病理組織学的検査において異常な所見はなかった。本試験における無毒性量は 1 mg/kg q2w であった。本試験の詳細な概要文及び概要表はそれぞれ 2.6.6、3.2.4 項及び表 2.6.7.7.D に示す。

図 14- サルにおける PBS、パチシラン-LNP 又は AF-011-1955 の初回及び最終投与後の
血清中 *TTR*、ビタミン A 及びサイロキシンの減少率



2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

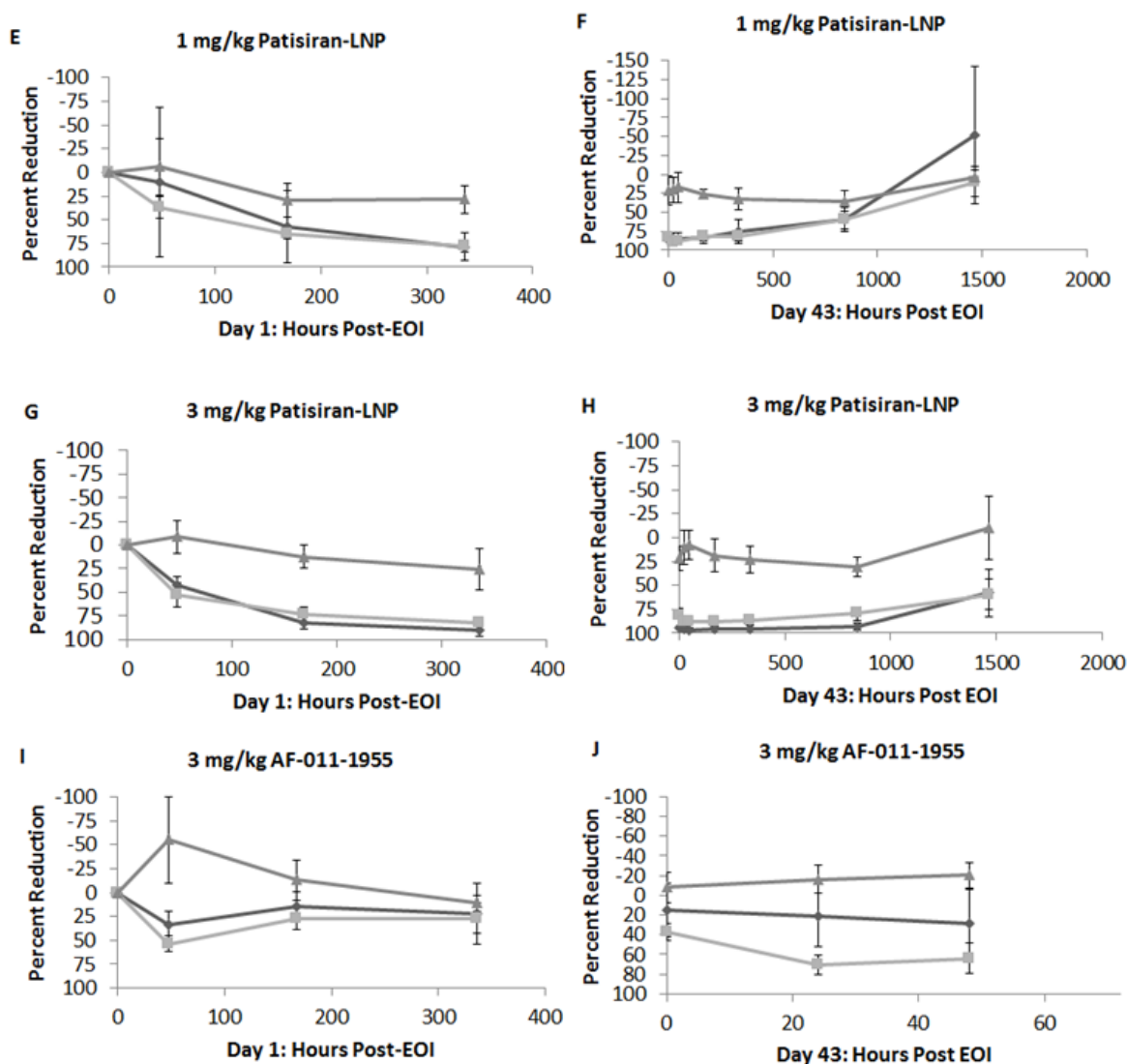


図 14：雌雄サル（雌雄合算）に PBS（図 A 及び B）パチシラン-LNP（図 C～H）又は AF-011-1955（図 I 及び J）を点滴静注で投与したときの初回投与（Day 1）又は最終投与（Day 43）後の血清中 TTR、ビタミン A 及びサイロキシン濃度の試験前値のベースラインと比較した平均（± SD）減少率 [Day 1 の PBS 及びパチシラン-LNP は 1 群各 12 匹、AF-011-1955 は 1 群各 6 匹、Day 43 の PBS 及びパチシラン-LNP は投与 48 時間後まで 1 群各 12 匹、投与 1464 時間（60 日）後まで 1 群各 6 匹、AF-011-1955 は投与 48 時間後まで 1 群各 6 匹。AF-011-1955 投与群には回復性試験動物を含めなかった]。負の値は、血清中 TTR、ビタミン A 又はサイロキシンの試験前のベースラインと比較した増加を示す。0 時間は Day 1 の初回投与前又は Day 43 の最終投与前の値を表す。

サルを用いた第 2 の毒性試験では、サルにパチシラン-LNP を 0、0.3、1.0 又は 3.0/2.0 mg/kg q3w の用量で 1 時間の点滴静注により 39 週間にわたって計 14 回投与した（TTR02-NCD12-001 試験）。血清中 TTR、ビタミン A 及びサイロキシン濃度を定期的に測定した（試験前、Day 1、22、127 及び 274 の投与前、並びに Day 277 及び 365 の剖検前）。血清中 TTR 濃度は、GLP 下で ELISA 法にて測定した。血

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

清中ビタミン A 濃度は、非 GLP 下で HPLC 法にて測定した。サイロキシン濃度は、GLP 下で定量的ラジオイムノアッセイ法にて測定した。

パチシラン-LNP の 0.3、1.0 及び 3.0/2.0 mg/kg 群では、投与期間終了時 (Day 274、14 回目の投与) に血清中 TTR の著しい減少が認められ (ベースラインからの最大平均減少率は 98%)、3 ヶ月の回復期間後 (Day 365) にベースラインまで戻った。これらの TTR の減少に伴って、血清中ビタミン A (ベースラインからの最大平均減少率は 81%) 及びサイロキシン (ベースラインからの最大平均減少率は 41%) が減少し、回復期間終了時までに対照群のレベルかそれ以上、あるいはビタミン A の場合投与群のベースライン濃度かそれ以上まで戻った (表 11)。ビタミン A 及びサイロキシンの減少に関連する毒性変化は認められず、眼科学的検査、網膜電図検査並びに眼及び甲状腺の病理組織学的検査において異常な所見はなかった。本試験における無毒性量は 1 mg/kg q3w であった。本試験の詳細な概要文及び概要表をそれぞれ 2.6.6、3.2.2 項及び表 2.6.7.7.F に示す。

表 11 - サル 39 週間 (q3w×14) 試験における血清中 TTR、ビタミン A 及びサイロキシンの変化率 (ベースラインとの比較) の平均値

用量 (mg/kg q3w)	ベースライン 濃度	Day 22	Day 127	Day 274	Day 277	Day 365 (回復期間終了時)
TTR (µg/mL)						
0	319.05 (75.29)	-8.0 (15.1)	-10.2 (14.7)	-5.8 (14.2)	-5.1 (18.5)	-20.9 (16.6)
0.3	319.02 (94.26)	-68.1 (23.8)	-78.0 (13.8)	-80.9 (16.8)	-89.1 (11.4)	-22.2 (10.7)
1.0	338.57 (59.65)	-93.3 (1.6)	-95.9 (1.2)	-96.0 (1.4)	-98.0 (0.4)	-15.6 (13.6)
3.0/2.0	291.03 (55.80)	-96.5 (0.8)	-97.4 (0.8)	-97.5 (0.6)	-98.1 (0.3)	-28.4 (17.6)
ビタミン A (ng/mL)						
0	340.1 (62.4)	-6.7 (20.6)	-1.3 (19.3)	+7.6 (25.2)	+16.5 (38.6)	+216.3 (40.3)
0.3	307.9 (77.6)	-60.9 (13.2)	-57.4 (12.6)	-57.6 (11.8)	-64.1 (10.8)	+250.0 (65.1)
1.0	334.9 (60.9)	-79.9 (4.3)	-72.5 (11.8)	-72.7 (6.8)	-75.2 (6.0)	+196.8 (70.8)
3.0/2.0	331.3 (104.1)	-81.2 (5.1)	-76.5 (7.5)	-71.9 (12.4)	-69.5 (14.0)	+198.3 (84.8)
サイロキシン (µg/dL)						
0	5.15 (0.97)	-9.2 (9.8)	-9.5 (14.7)	-3.5 (18.5)	-0.4 (14.3)	-4.9 (8.1)
0.3	4.61 (1.11)	-10.7 (29.7)	-29.0 (13.0)	-19.9 (22.2)	-24.0 (16.5)	-6.8 (12.2)
1.0	4.78 (1.08)	-26.9 (13.7)	-22.7 (16.2)	-31.2 (22.1)	-22.8 (31.4)	+0.0 (17.6)
3.0/2.0	5.57 (2.00)	-38.2 (9.2)	-30.4 (29.7)	-40.8 (15.3)	-37.0 (25.1)	-12.5 (17.8)

略語：q3w=3 週間に 1 回、SD=標準偏差、TTR=トランスサイレチン。

雌雄合算データを示す (Day 274 まで 1 群 12 匹、Day 277 は 1 群 6 匹、Day 365 は 1 群 5 又は 6 匹)。

カッコ内は標準偏差。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

要約すると、TTR の生理的役割から予想されたように、サルにパチシラン-LNP を投与したとき、血清中 TTR の減少に伴って、RBP、ビタミン A 及びサイロキシンが減少した。サルにおいて、これらの所見に伴う毒性変化は認められなかった。

4 安全性薬理試験

パチシラン-LNP の安全性薬理プログラムとして、テレメトリー装着サルを用いた GLP 適用の単回投与安全性薬理試験において、医薬品規制調和国際会議 (ICH) S7A に規定されているコアバッテリー (心血管系、中枢神経系及び呼吸系) の評価を行った (TTR02-NCD10-003 試験)。ALN 18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG について、トキシコキネティクス (TK) パラメータを測定した。心血管系、呼吸系及び中枢神経系はサルにおける本薬の毒性標的器官ではないことが示された。

4.1 *In vitro* 安全性薬理試験

(CTD: 4.2.1.3-1, LD-NCD10-016, CTD: 4.2.2.5-1, ■■■-319-1103)

高分子量の薬物 (生物学的製剤及びオリゴヌクレオチド) は、hERG チャンネルの内孔に入らないことから、ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子 (hERG) アッセイは不要と考えられる(32)(33)。パチシラン-LNP 粒子は、最小径が 60 nm と十分に大きいため、生物学的製剤と同様に、急速活性型遅延整流心筋カリウム電流 (IKr) チャンネル孔に達しないことから、IKr チャンネルの薬物結合部位と相互作用する可能性はない。

パチシラン-LNP の siRNA 成分である ALN-18328 (14 kDa) 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG (2.5 kDa) もそれぞれ十分に大きいため、IKr 又は他のイオンチャンネルと相互作用しないと考えられる。LNP の別の脂質成分 DLin-MC3-DMA の分子量は小さいが (642 Da)、雄 Sprague Dawley ラット及び Long Evans ラットに放射性標識 DLin-MC3-DMA を含有するパチシラン-LNP を投与した定量的全身オートラジオグラフィ試験の結果において、心臓に分布したのは投与量の 0.24%未満であったことに基づくと (■■■ 319-1103 試験; 2.6.4, 5.2.3 項参照)、ヒトの心臓組織における DLin-MC3-DMA の曝露量はわずかであると考えられる。

上記から、ALN-18328 及びパチシラン-LNP の hERG アッセイは必要ないと考える。

なお、AF-011-1955 製剤を用いた非 GLP 適用試験を実施し (LD-NCD10-016 試験)、LNP の hERG チャンネルへの影響の有無を評価するにあたって試験中に生じる可能性のある LNP と hERG アッセイ緩衝液の適合性 (沈殿、凝集) といった問題点に関して、実施可能性を検討した。アッセイ緩衝液に AF-011-1955 を添加すると、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た。この実験において、AF-011-1955 は 150、750 又は 1500 µg/mL (siRNA 濃度に基づく) の *in vitro* 濃度において、ヒト胎児腎臓 (HEK293) 細胞の hERG チャンネル電流の障害は認められなかった (障害率は ≤1.1%)。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

要約すると、心臓において、パチシラン-LNP（又はその成分）と hERG 又はその他のイオンチャネルの間で相互作用は生じないと考えられる。このことは、非臨床試験において心臓の電気生理学的変化が認められなかったことと一致している。

4.2 *In vivo* 安全性薬理試験

4.2.1 サルを用いたパチシラン-LNP（ALN-TTR02）の点滴静注による安全性薬理試験（心血管系、呼吸系及び中枢神経系評価を含む）

(CTD: 4.2.1.3-2, TTR02-NCD10-003)

雄サルを用いたパチシラン-LNP の心血管系、呼吸系及び中枢神経系評価を含む GLP 適用安全性薬理試験を実施した（TTR02-NCD10-003 試験）。試験は2つのパートに分け、計 15 匹のサルを使用した。第 I 部では主に心血管系評価項目に 12 匹のサルを供し、第 II 部では呼吸系及び中枢神経系評価項目に 3 匹のサルを使用した。

第 I 部：Day 1 において、埋込型テレメトリー装着サル 12 匹に媒体対照（PBS）を 1 時間の点滴静注（20 mL/kg/h）により投与した。Day 7 に、これらのサルを 4 群（1 群雄 3 匹）に割り付け、パチシラン-LNP を 0.1、1、3 又は 6 mg/kg の用量で 1 時間の点滴静注（20 mL/kg/h）により投与した。第 I 部では、心血管系データ（ECG 波形、平均動脈圧 [MAP] 及び心拍数）を注入開始 60 分前から注入開始 48 時間後まで定期的に採取した。テレメトリーによる体温（中枢神経系パラメータ）データも採取した。パチシラン-LNP のデータと、対応する時間の媒体対照のデータを個体別又は群別に比較した。

第 II 部：第 II 部の Day 1 に、無処置の雄サル 3 匹にパチシラン-LNP を 3 mg/kg の用量で 1 時間の点滴静注（20 mL/kg/h）により投与した。第 I 部において、パチシラン-LNP の 6 mg/kg 群では全例で心拍数増加及び体温上昇が認められたが、3 mg/kg 群ではこれらのパラメータの増加がみられたのが 1 例のみであったことから、第 II 部では 3 mg/kg の用量を設定した。第 II 部では、呼吸系（呼吸数及び血液ガス）並びに中枢及び末梢神経系（獣医師による行動、運動機能、脳神経及び自己受容を評価する神経学的検査）への影響を評価した。呼吸数及び血液ガスの評価は、投与前並びに注入開始の約 75 分後、5 時間後及び 25 時間後に実施した。神経学的検査は、試験開始前及び注入終了約 1 時間後から 24 時間後の間に実施した。第 II 部において、TK 評価用の血液検体を様々な時点で採取した（Day 1：投与前、30 分間注入時、並びに注入開始 75、90、120、135、150、180、300、540 及び 1500 分後）。血漿中 ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度をバリデーション済みの LC/MS/MS 法で測定した。

サルに 0.1 又は 1 mg/kg の用量で投与したとき、評価したいずれのパラメータにおいてもパチシラン-LNPに関連した変化は認められなかった。

パチシラン-LNP の 3 mg/kg 群において、6 匹中 2 匹（第 I 部及び第 II 部の各 1 匹）で摂餌量減少が 1 回発現し、これらの動物のうち 1 匹では活動性低下及び円背位も投与約 24 時間後に 1 回認められた。これらの所見は、この動物で同じ期間にみられた体温上昇及び心拍数増加（それぞれ最大で 3°C 上昇及び 120 bpm 増加）と関連していた。6 mg/kg では、摂餌量減少が 3 匹中 1 匹（第 I 相のみ）で、平均体温上昇（1~2°C）及び平均心拍数増加（10~80 bpm）が 3 匹全例で認められた。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

パチシラン-LNP の 3 mg/kg 以上の群では、用量依存性的かつ軽度から顕著な心拍数増加及び体温上昇が認められた。3 mg/kg 投与後に心拍数及び体温の即時的変化は認められず、両パラメータとも消灯期間の早期に予想される低下が認められたが、3 mg/kg 群の 3 匹中 1 匹（動物番号 3102）では、対応する対照値と比較して、体温及び心拍数が顕著に高いままであった（体温：投与の約 42 時間後において約 1~3℃、心拍数：投与の約 47 時間後において約 30~120 bpm）。動物番号 3102 も Day 7 のベースライン値と比較して心拍数が増加し、体温が上昇したが、これらの変化の大きさは Day 1 の PBS 対照値との差より小さかった。6 mg/kg 群では、軽度から中等度の平均体温上昇（主に 2 匹〔動物番号 4001 及び 4002〕によるもの、約 1~2℃）及び心拍数増加（約 10~80 bpm）が注入開始の約 4 時間後からみられ、いずれも約 39 時間にわたり、対応する対照値と比較して高いままであった。一方、これらの動物における心拍数は、各個体の Day 7 のベースライン値と同程度のままであった。6 mg/kg の用量でのパチシラン-LNP 投与後の各個体の体温をそれぞれの Day 7 のベースラインと比較したとき、それぞれの Day 1 の PBS 対照値と比較したときよりも上昇幅が小さかった。Day 7 において、動物番号 4002 の体温が消灯期間の早期に予想された低下を示さず、投与の約 4 時間後から 28 時間後までベースラインより高いままであった。3 mg/kg 以上の用量でみられた心拍数増加及び体温上昇は、その大きさ及び持続性を考慮すると、有害な変化と考えられた。

ECG の質的異常は、6 mg/kg 以下の用量で認められなかった。ECG 間隔（QT 及び RR 間隔）測定値及び QTc(F)補正值への影響は、1 mg/kg 以下の用量で認められなかった。3 mg/kg 群の 1 匹で認められた心拍数増加（RR 間隔短縮）及び 6 mg/kg 群における平均心拍数の増加（RR 間隔短縮）は被験物質に関連したものと考えられた。パチシラン-LNP の投与に起因すると考えられるその他の異常な ECG 所見は認められなかった。

パチシラン-LNP に関連した MAP への影響は最大 6 mg/kg まで認められず、心拍数及び体温への影響は 1 mg/kg 以下の用量では認められなかった。

パチシラン-LNP に関連した神経学的検査パラメータ及び呼吸系（呼吸数、酸素分圧及び二酸化炭素分圧、血液 pH、並びにヘモグロビンの酸素飽和度を含む）への影響は 3 mg/kg の用量（検討した唯一の用量）で認められなかった。

第 II 部においてパチシラン-LNP を 3 mg/kg の用量で静注により投与したときの ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の平均最大血漿中濃度（C_{max}）値はそれぞれ 49.90、421 及び 60.75 µg/mL であった。平均 AUC₀₋₄ 値はそれぞれ 422.5、2713.3 及び 506.2 µg•h/mL であった。3 mg/kg の用量における ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の曝露量は、それぞれ RHD での AUC に基づくヒト曝露量の 7.3、3.4 及び 2.8 倍であった。

結論として、検討した最高用量である 6 mg/kg までの用量において、ECG の質的異常及び QTc(F)補正值への影響は認められなかった。パチシラン-LNP に関連した呼吸系パラメータ（血液ガスや呼吸数など）及び神経学的検査パラメータへの影響は 3 mg/kg で認められなかった。3 mg/kg 以上の用量で心血管系パラメータ（心拍数など）の増加及び体温上昇が認められ、ベースライン値への完全な回復は認められなかった。1 mg/kg 以下の用量では、心拍数及び体温への影響は認められなかった。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

サルを用いた 6 週間反復投与 (q2w×4) 毒性試験及び 39 週間 (q3w×14) 反復投与毒性試験では、ECG パラメータを測定しなかったが、これらの試験で評価した最高用量 (それぞれ 3 mg/kg/q2w 及び 3.0/2.0 mg/kg/q3w) まで、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への影響は認められなかった。

5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用を評価する試験は実施していない。

TTR 産生に影響を及ぼすその他の TTR 降下薬又はその他の薬剤の併用投与があるとは考えにくいことから、ヒトでパチシラン-LNP による薬力学的薬物相互作用が生じる可能性は極めて低いと考えられる。

6 考察及び結論

hATTR アミロイドーシスは、TTR 遺伝子の変異によって引き起こされる常染色体優性の全身性、消耗性かつ致死性の疾患である。現在、多様な民族的及び地理的背景において、120 を超えるアミロイド形成性 TTR 遺伝子変異が特定されている。臨床症状は変異の種類並びに民族的及び地理的背景によって異なるものの、hATTR アミロイドーシスに共通する特徴として、TTR タンパク質のミスフォールディングにより、最終的に様々な組織で野生型及び変異型 TTR の両方を含むアミロイド線維の形成及び沈着が起こる。ヒトにおける本疾患の臨床症状は、変異の種類並びにアミロイド線維沈着の程度及び部位 (神経、心臓、消化管) によって異なる。したがって、治療薬の開発を成功させるためには、TTR アミロイド形成及び沈着を軽減することが不可欠である。

パチシラン-LNP は、肝臓における野生型及び変異型両方の TTR の発現を特異的に阻害するようにデザインされている。治療仮説では、RNAi を介して肝臓内 TTR 遺伝子発現を抑制すると、TTR タンパク質の正常フォールド形及びアミロイド線維形成の基質となるミスフォールド形の両方を含む総量が減少することによって、組織内アミロイド量が減少するため、臨床所見が改善すると予想している。パチシラン-LNP による RNAi を介した肝臓内 TTR の減少のメカニズムの詳細は 2.6.1 「緒言」に記載する。非臨床薬理試験において、パチシラン-LNP は、肝臓での野生型及び変異型 TTR の発現を特異的及び強力に抑制し、様々な変異並びに民族的及び地理的背景を有する hATTR アミロイドーシス患者においても同様の作用を示すことが予想され、RNAi を介した肝臓内 TTR 発現の抑制が TTR 組織沈着を予防することが示された。これらのデータと、健康被験者及び hATTR アミロイドーシス患者を対象とした早期臨床試験の結果 (15) ; 2.5 「臨床に関する概括評価」 参照) とを総合すると、ポリニューロパチーを伴う hATTR アミロイドーシスの治療薬としてパチシラン-LNP を開発することが支持される。

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

Alnylam 社の独自アルゴリズム及びそれに続いて公的に入手した siRNA 選択ツール (siDirect 2.0) を用いた両方のバイオインフォマティクス試験及び *in vitro* 試験から、野生型及び変異型 TTR に対する ALN-18328 の効力及び特異性が確認された。更に、ALN-18328 はオフターゲット作用を示す可能性が最も高いと考えられるヒト転写産物に対して活性を示さなかった。これらの試験では、様々な民族及び地域の集団から得られた ALN-18328 標的部位内の配列が 100%保存されていることも確認され、パチシラン-LNP は様々な民族的及び地理的背景を有する hATTR アミロイドーシス患者において TTR 発現を同程度に抑制することが示唆された。

ALN-18328 はヒト及びサルで薬理活性を示すが、げっ歯類では示さないことから、薬理評価はヒトトランスジェニックマウス ATTR アミロイドーシスモデル及びサルを用いて実施した。アミロイド沈着のみられる老齢 *hTTR V30M/Hsf-1* KO マウスの hATTR アミロイドーシスモデルを用いた反復投与薬理試験において、RNAi を介した肝臓内 TTR 発現の減少により、既存の TTR 沈着が消退した。また、このことは、細胞固有のクリアランス及び修復経路により既存の TTR 沈着が除去されることで、TTR 凝集を許容可能なレベルまで抑制することが可能であることを示唆する過去の文献(34)(35)(36)と一致している。全体として、この結果から、パチシラン-LNP の治療仮説の妥当性が裏付けられ、hATTR アミロイドーシス患者においてパチシラン-LNP が新たな TTR アミロイド沈着を予防し、既存の沈着を消退させる可能性があることが示唆された。

サルを用いたパチシラン-LNP の単回投与薬理試験において、肝臓内 TTR mRNA 及び血清中 TTR タンパク質が強く減少し、投与 7 日後から 14 日後の間に減少が最大となり、その後投与終了の約 21～28 日後にベースラインに戻った。サルを用いた反復投与薬理試験では、ベースライン値と比較した最大血清中 TTR 減少率が 95%を超え、最小血清中 TTR 減少率が 80%を超えた（すなわち、投与間隔内で TTR が減少率 80%を超えたまま維持された）。更に、これらの試験において、サルを用いた非臨床毒性試験で決定されたパチシラン-LNP の安全な投与法に合致する至適投与スケジュール (0.3 mg/kg q3w) が特定された。同様の血清中 TTR タンパク質濃度の減少は、パチシラン-LNP の異なる 2 つのプロセスバッチ (■ kg と ■ kg) をサルに投与した 0.3 mg/kg 及び 2.0 mg/kg 反復投与 (3 週間に 1 回×4) 毒性試験で認められた (2.6.6, 8.12 項参照)。

サルにおいて、パチシラン-LNP 投与後に血清中 TTR 濃度の著しい減少 (ベースラインからの最大平均減少率は 98%) が認められた。サルにおける TTR の役割はビタミン A を輸送する RBP の主要な担体であり、サイロキシンのマイナーな担体であることから、サルの試験でパチシランを介した TTR の減少に伴って、予想された通り RBP、ビタミン A 及びサイロキシンの減少が認められた (ALN-TTR01 試験; ベースラインからの最大平均減少率はそれぞれ 60%、90%、41%)。なお、このようにビタミン A 及びサイロキシンが持続的に減少しても、サルを用いたパチシラン-LNP の毒性試験で眼及び甲状腺への有害な影響は認められなかった (2.6.6, 3.2 項参照)。

パチシラン-LNP は粒子サイズが大きく (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

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

DLin-MC3-DMA (642 Da) へ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が低いと予想される。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まで投与したとき、3 mg/kg以上の用量において、持続的な心拍数増加及び体温上昇が認められたが、QTc延長並びにECGにおけるその他の量的(心拍数による補正時)及び質的異常は認められなかった。1.0 mg/kg以下の用量において、心血管系パラメータ及び体温への影響は認められず、3 mg/kgの用量において、呼吸系パラメータ及び神経学的検査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の曝露量は、それぞれRHDでのAUCに基づくヒト曝露量の7.3、3.4及び2.8倍であった。

結論として、パチシラン-LNPは肝臓内 TTR 産生に対する強力かつ特異的な阻害剤である。トランスジェニックマウスモデル(疾患早期ステージのモデル)において、ALN-18328を介した変異型 TTR の減少に伴い、一部の組織でTTR沈着が抑制された。サルのデータから、至適な投与スケジュール(q3w)及び用量(0.3 mg/kg)により、循環血中 TTR 濃度が減少率 80%を超えて低く維持されることが確認された。予想されるパチシラン-LNPの副次的薬理作用(RBP、ビタミンA及びサイロキシンの減少)がサルで認められたが、ビタミンA及びサイロキシンの持続的な減少による眼及び甲状腺への有害な影響は認められなかった。パチシラン-LNP又はその成分が心臓イオンチャネルに有害な影響を及ぼす可能性は低い。6 mg/kgまでの用量において、パチシラン-LNPによるQTc及び心拍数で補正したその他の定量的ECG間隔への影響並びにECGの質的变化は認められなかったが、3 mg/kg以上の用量で心拍数の増加が認められた。3 mg/kgの用量において、パチシラン-LNPの呼吸数及び神経学的検査への影響は認められなかった。テレメトリー装着サルを用いた試験では、3 mg/kg以上の用量で体温の上昇が認められたが、サルを用いた反復投与毒性試験では認められなかった。サルを用いた反復投与毒性試験において、中枢神経系及び呼吸系に関連した一般状態の変化は認められなかった。

以上より、ポリニューロパチーを伴うhATTRアミロイドーシスの治療薬としてパチシラン-LNPを開発するための治療仮説が薬理データから裏付けられ、この臨床適応症に対する至適な用量及び投与スケジュールが妥当であることが非臨床データから裏付けられた。

7 図表

図表はいずれも本文中に示した。

8 参考文献

全ての文献の写しを[Module 4.3]に添付する。

1. Stangou AJ, Hawkins PN. Liver transplantation in transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy. *Curr Opin Neurol*. 2004;17(5):615-20.
2. Holmgren G, Steen L, Ekstedt J, Groth CG, Ericzon BG, Eriksson S, et al. Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clin Genet*. 1991;40(3):242-6.
3. Kanai M, Raz A, Goodman DS. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest*. 1968;47(9):2025-44.
4. Choksi NY, Jahnke GD, St Hilaire C, Shelby M. Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2003;68(6):479-91.
5. Connors LH, Lim A, Prokhaeva T, Roskens VA, Costello CE. Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003. *Amyloid*. 2003;10(3):160-84.
6. Sekijima Y, Yoshida K, Tokuda T, Ikeda S. Familial Transthyretin Amyloidosis. *GeneReviews*. 1993.
7. Reixach N, Deechongkit S, Jiang X, Kelly JW, Buxbaum JN. 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):2817-22.
8. Yazaki M, Tokuda T, Nakamura A, Higashikata T, Koyama J, Higuchi K, et al. Cardiac amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy consists of abundant wild-type transthyretin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;274(3):702-6.
9. Liepnieks JJ, Benson MD. Progression of cardiac amyloid deposition in hereditary transthyretin amyloidosis patients after liver transplantation. *Amyloid*. 2007;14(4):277-82.
10. Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Kametani F, Sekijima Y, Ikeda S. Wild-type transthyretin significantly contributes to the formation of amyloid fibrils in familial amyloid polyneuropathy patients with amyloidogenic transthyretin Val30Met. *Hum Pathol*. 2011;42(2):236-43.
11. Sekijima Y. Transthyretin (ATTR) amyloidosis: clinical spectrum, molecular pathogenesis and disease-modifying treatments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86(9):1036-43.
12. Santos SD, Fernandes R, Saraiva MJ. The heat shock response modulates transthyretin deposition in the peripheral and autonomic nervous systems. *Neurobiol Aging*. 2010;31(2):280-9.
13. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*. 2006;441(7089):111-4.
14. Semple SC, Akinc A, Chen J, Sandhu AP, Mui BL, Cho CK, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*. 2010;28(2):172-6.

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

15. Coelho T, Adams D, Silva A, Lozeron P, Hawkins PN, Mant T, et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*. 2013;369(9):819-29.
16. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(8):2444-8.
17. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufo S, Haddad D, McVeigh R, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D733-45.
18. Du Q, Thonberg H, Wang J, Wahlestedt C, Liang Z. A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(5):1671-7.
19. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(1):308-11.
20. Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, et al. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA*. 2006;12(7):1179-87.
21. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, et al. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA*. 2006;12(7):1197-205.
22. Okamoto S, Wixner J, Obayashi K, Ando Y, Ericzon BG, Friman S, et al. Liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: impact on Swedish patients' survival. *Liver Transpl*. 2009;15(10):1229-35.
23. Obayashi K, Ueda M, Oshima T, Kawahara S, Misumi Y, Yamashita T, et al. Pathological changes long after liver transplantation in a familial amyloidotic polyneuropathy patient. *BMJ Case Rep*. 2012;2012
24. Ikeda S, Tojo K, Suzuki-Tsuchiya A, Akamatu T, Hashimoto T, Higuchi K. Significant deposition of wild type transthyretin-derived amyloid in the gastrointestinal tract of aged individuals. *Amyloid*;2009;16(3):174-7.
25. Bartlett DW, Davis ME. Effect of siRNA nuclease stability on the in vitro and in vivo kinetics of siRNA-mediated gene silencing. *Biotechnol Bioeng*. 2007;97(4):909-21.
26. Wee LM, Flores-Jasso CF, Salomon WE, Zamore PD. Argonaute divides its RNA guide into domains with distinct functions and RNA-binding properties. *Cell*. 2012;151(5):1055-67.
27. Butler JS, Chan A, Costelha S, Fishman S, Willoughby JL, Borland TD, et al. Preclinical evaluation of RNAi as a treatment for transthyretin-mediated amyloidosis. *Amyloid*. 2016;23(2):109-18.
28. van Bennekum AM, Wei S, Gamble MV, Vogel S, Piantadosi R, Gottesman M, et al. Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice. *J Biol Chem*. 2001;276(2):1107-13.
29. Goodman DS. Plasma retinol-binding protein. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;348:378-90.
30. Waits RP, Yamada T, Uemichi T, Benson MD. Low plasma concentrations of retinol-binding protein in individuals with mutations affecting position 84 of the transthyretin molecule. *Clin Chem*. 1995;41(9):1288-91.
31. Raynes JG. The acute phase response. *Biochem Soc Trans*. 1994;22(1):69-74.

2.6.2 薬理試験の概要文 パチシランナトリウム

32. Vargas HM, Bass AS, Breidenbach A, Feldman HS, Gintant GA, Harmer AR, et al. Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2008;58(2):72-6.
33. Berman CL, Cannon K, Cui Y, Kornbrust DJ, Lagrutta A, Sun SZ, et al. Recommendations for safety pharmacology evaluations of oligonucleotide-based therapeutics. *Nucleic Acid Ther*. 2014;24(4):291-301.
34. Misumi Y, Ando Y, Goncalves NP, Saraiva MJ. Fibroblasts endocytose and degrade transthyretin aggregates in transthyretin-related amyloidosis. *Lab Invest*. 2013;93(8):911-20.
35. Magalhaes J, Saraiva MJ. The heat shock response in FAP: the role of the extracellular chaperone clusterin. *Amyloid*. 2012;19 Suppl 1:3-4.
36. Almeida MR, Saraiva MJ. Clearance of extracellular misfolded proteins in systemic amyloidosis: experience with transthyretin. *FEBS Lett*. 2012;586(18):2891-6.
37. Joao Saraiva, M., et al., Familial amyloidotic polyneuropathy: protein aggregation in the peripheral nervous system. *J Mol Neurosci*, 2004. 23(1-2): p. 35-40.
38. Coelho, T., et al., Tafamidis for transthyretin familial amyloid polyneuropathy: a randomized, controlled trial. *Neurology*, 2012. 79(8): p. 785-92.
39. Ando Y, Coelho T, Berk J, Waddington Cruz M, Erizon B, Ikeda S, et al. Guideline of transthyretinrelated hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet J of Rare Dis*. 2013;8(31).
40. siDirect. siDirect version 2.0. Dec 3, 2009; Available from: <http://sidirect2.mai.jp/>.
41. Naito, Y. and K. Ui-Tei, Designing functional siRNA with reduced off-target effects. *Methods Mol. Biol*, 2013. 942: p. 57-68.
42. Naito, Y., Yoshimura, J., et al., siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics*. 2009. 10: 392

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

2.6.3 薬理試験概要表

目 次

2.6.3 薬理試験概要表	1
目 次	2
表 目 次	3
略号と用語の定義	6
1 薬理試験一覧表	8
2 効力を裏付ける試験	13
3 副次的薬理試験	20
4 安全性薬理試験	22
5 薬力学的薬物相互作用試験	25

表 目 次

SUMMARY OF FORMULATION NAMES USED IN PHARMACOLOGY STUDIES	4
表2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program.....	8
表2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics	13
表2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics	20
表2.6.3.4.1 - Safety pharmacology : in vitro	22
表2.6.3.4.2 - Safety pharmacology : in vivo	23

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

SUMMARY OF FORMULATION NAMES USED IN PHARMACOLOGY STUDIES

Name(s)	Description	Purpose and Studies Employed	Studies
Patisiran AD-18328 ALN-18328	siRNA targeting monkey and human TTR used in both patisiran-LNP (ALN-TTR02) and a previous first generation LNP formulation termed ALN-TTR01.	TTR-specific siRNA that was evaluated unformulated in in vitro studies and formulated in either first generation LNP called SNALP (formulation referred to as ALN-TTR01) or in second generation LNP called AF-011 (formulation referred to as ALN-TTR02 or patisiran-LNP).	BIO09003 BIO09004 BIO09005 BIO09025 BIO12014 BIO17012 BIO18014
Patisiran-LNP ALN-TTR02 AF-011-18328 LNP11-18328	Patisiran (ALN-18328) formulated in AF-011 LNP formulation.	Nomenclature for patisiran (ALN-18328) formulated drug product; evaluated in majority of in vivo pharmacology, pharmacokinetic, and toxicology studies.	BIO10026 BIO11002 BIO11003 ■ 20031783 TTR02-NCD10-011 TTR02-NCD10-003 TTR02-NCD12-001 TTR02-GLP17-007
AD-1661	siRNA targeting mouse Factor VII (FVII) gene expression.	siRNA specific for mouse FVII used as a negative control for nonspecific siRNA-mediated effects in vitro; does not modulate human FVII expression.	BIO09025 BIO12014
AF-011-1955 LNP11-1955	siRNA targeting the nonmammalian firefly luciferase gene formulated in the same LNP as patisiran-LNP.	Negative control siRNA-LNP used in pharmacology and toxicology studies to evaluate the effects of the LNP formulation used in patisiran-LNP independent of patisiran-mediated reduction of TTR mRNA.	BIO10026 BIO11003 TTR02-NCD10-011 LD-NCD10-016

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

Name(s)	Description	Purpose and Studies Employed	Studies
ALN-TTR01 SNALP-18328	First generation, less potent LNP formulation (SNALP) comprising the patisiran (ALN-18328).	Evaluated in in vivo pharmacology studies in the hTTR V30M/HSF-1 KO mouse and monkey. The results from these studies are relevant because they contain patisiran (ALN-18328).	BIO10118 BIO16041
SNALP-1955	siRNA targeting nonmammalian firefly luciferase gene formulated with SNALP LNP.	Negative control for ALN-TTR01 to evaluate the effects of the SNALP LNP formulation independent of patisiran-mediated reduction of TTR mRNA.	BIO10118 BIO09009
SNALP-18324	First generation, less potent LNP formulation (SNALP) comprising the TTR targeting siRNA AD-18324.	Evaluated in in vivo pharmacology studies in monkey. The results from these studies are relevant because they helped differentiate patisiran (ALN-18328) and AD-18324.	BIO09009

Abbreviations: hTTR=human transthyretin; KO=knockout; LNP=lipid nanoparticle; mRNA=messenger ribonucleic acid; siRNA=small interfering ribonucleic acid; SNALP=stable nucleic acid lipid particle; TTR=transthyretin.

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

略号と用語の定義

略号、用語	定義
Admin.	Administration
Conc.	Concentration
CNS	Central nervous system
COS-7	Cell line derived from kidney tissue of an African green monkey
ECG	Electrocardiogram
F	Female
GLP	Good Laboratory Practice
Hep3B	Human hepatoma derived cell line Hep3B
HepG2	Human hepatoma derived cell line HepG2
HEK	Human embryonic kidney cells
hERG	Human ether-à-go-go-related gene
HSF-1	Heat shock factor 1
hTTR	Human transthyretin
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
IHC	Immunohistochemistry
IKr	Rapidly activating, delayed rectifier cardiac potassium current
IV	Intravenous
KO	Knockout
LNP	Lipid nanoparticle
M	Male
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NA	Not applicable
No.	Number
PBS	Phosphate buffered saline
q3w	Once every 3 weeks
q4w	Once every 4 weeks
QT	Interval from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave on an electrocardiogram
QTcF	Fridericia's Correction Formula, which takes into account the physiologic shortening of the QT

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

略号、用語	定義
	interval which occurs as the heart rate increases
RBP	Retinol binding protein
RR	Interval between 2 consecutive R waves used to measure heart rate
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SNALP	Stabile nucleic acid lipid particle
Temp	Temperature
TTR	Transthyretin

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program

Overview			Test Article: Patisiran-LNP ^{a, b}	
Study Description	Test System	Method of Admin.	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics				
In Vitro / In Silico				
Identification of ALN-18328, a potent and specific siRNA targeting human transthyretin	HepG2, Hep3B cell lines	in vitro	Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	BIO09003
To identify polymorphism variations in human transthyretin (TTR) in the region surrounding the siRNA targeting site of ALN-18328	NA (in silico)	in silico	Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	BIO09004
Identification of human mRNA transcripts containing sequences most closely related to the sense and antisense strands comprising ALN-18328 (Bioinformatics; potential off targets)	NA (in silico)	in silico	Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	BIO09005
In vitro investigation of the in silico predicted off-target transcripts for the antisense strand of ALN-18328 (reduction of TTR in vitro)	COS-7, Hep3B cell lines	in vitro	Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	BIO09025
Analysis of wild-type (wt) and mutant TTR allele reduction by ALN-18328	COS-7 cell line	in vitro	Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	BIO12014
Evaluation of the impact of progressive [REDACTED] exonuclease mediated degradation on ALN-18328 activity (antisense strand)	Hep3B cell line	in vitro	Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	BIO17012

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - overview - study program (continued)

Overview			Test Article: Patisiran-LNP ^{a, b}	
Study Description	Test System	Method of Admin.	Testing Facility	Study Number
Patisiran-LNP (ALN-TTR02): siRNA selection and off-target activity assessment	NA (in silico)	in silico	Alnylam, Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	BIO18014
In Vivo				
Evaluation of the regression of TTR deposition in peripheral tissues of human hTTR V30M/HSF-1 KO (Null) transgenic mice following treatment with ALN-TTR01	hTTR V30M/HSF-1 KO transgenic mouse, 22 months old	IV bolus, dosing every 2 weeks for a total of 6 doses	██████████ Portugal	BIO10118
Investigation of the pharmacodynamics of ALN-18328 and AD-18324 formulated in a lipid nanoparticle (LNP) formulation called SNALP	Cynomolgus Monkey	15 min IV infusion Single dose	██████████ USA	BIO09009
Investigation of the pharmacodynamics of patisiran-LNP and AF-023-18328 in the cynomolgus monkey	Cynomolgus Monkey	15 min IV infusion Single dose	██████████ USA	BIO10026
Evaluation of the pharmacological activity (reduction of serum TTR levels) of three novel LNP formulations with TTR-specific siRNA, ALN-18328 (LNP09-18328, patisiran-LNP or LNP13-18328) in the cynomolgus monkey	Cynomolgus Monkey	15 min IV infusion Single dose	██████████ USA	BIO11002
Evaluation of the pharmacological activity (reduction of serum TTR levels) of two novel LNP formulations with ALN-18328 (patisiran-LNP or LNP12-18328) in the cynomolgus monkey	Cynomolgus Monkey	15 min IV infusion Single dose	██████████ USA	BIO11003

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - overview - study program (continued)

Overview			Test Article: Patisiran-LNP ^{a, b}	
Study Description	Test System	Method of Admin.	Testing Facility	Study Number
Determination of the pharmacodynamic activity of patisiran-LNP when administered by monthly or every 3 week IV infusions to cynomolgus monkeys for a total of 7 or 8 doses followed by a 12-week dose-free period	Cynomolgus Monkey	60 min IV infusion Part I: dosing every 4 weeks for a total of 4 doses Part II: dosing every 3 weeks for a total of 8 doses or dosing every 4 weeks for a total of 7 doses followed by an 8 week recovery period	██████████ USA	██████████ 20031783
Comparison of the toxicity, toxicokinetics and pharmacodynamics of patisiran-LNP manufactured by different batch processes in monkeys (please see 2.6.7 Toxicology Tabulated Summary, Section 17.C for tabular results)	Cynomolgus Monkey	60 min IV infusion dosing every 3 weeks for a total of 4 doses	██████████ Canada	TTR02-GLP17-007

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - overview - study program (continued)

Overview			Test Article: Patisiran-LNP ^{a, b}	
Study Description	Test System	Method of Admin.	Testing Facility	Study Number
Secondary Pharmacodynamics				
In Vivo				
Evaluation of the effect of a single IV infusion of ALN-TTR01 on serum TTR RBP levels in cynomolgus monkeys	Cynomolgus Monkey	15 min IV infusion Single dose	██████████ USA	BIO16041
Evaluation of patisiran-LNP-mediated effects on TTR, vitamin A, and thyroxine in a multiple-dose study in the cynomolgus monkey (please see 2.6.7 Toxicology Tabulated Summary, Section 7.E for tabular results)	Cynomolgus Monkey	60 min IV infusion dosing every 2 weeks for a total of 4 doses followed by a 60 day recovery period	██████████ Canada	TTR02-NCD10-011 (██████████ 504210)
Evaluation of patisiran-LNP-mediated effects on TTR, vitamin A, and thyroxine in a 39-week study in the cynomolgus monkey (please see 2.6.7 Toxicology Tabulated Summary, Section 7.F for tabular results)	Cynomolgus Monkey	60 min IV infusion dosing every 3 weeks for a total of 14 doses followed by a 3 month recovery period	██████████ Canada	TTR02-NCD12-001 (██████████ 504265)
Safety Pharmacology				
In Vitro				
Investigation of the in vitro effects (concentration-response relationship) of AF-011-1955 on the hERG (human ether-à-go-go-related gene) potassium channel current (a surrogate for IKr, the rapidly activating, delayed rectifier cardiac potassium current)	Mammalian cells (HEK 293 cells) expressing hERG potassium channel	in vitro	██████████ USA	LD-NCD10-016 (100707.BMR)
In Vivo				
Identification of potential effects of patisiran-LNP on the cardiovascular, respiratory, and central nervous systems and characterization of systemic exposure at the maximum tolerable dose in cynomolgus monkeys	Cynomolgus Monkey	60 min IV infusion Single dose	██████████	TTR02-NCD10-003 (██████████ 2002866)

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - overview - study program (continued)

Overview			Test Article: Patisiran-LNP ^{a, b}	
Study Description	Test System	Method of Admin.	Testing Facility	Study Number
Pharmacodynamic Drug Interactions				
No studies conducted.				

Abbreviations: COS-7=cell line derived from kidney tissue of an African green monkey; HEK=human embryonic kidney cells; Hep3B=human hepatoma derived cell line Hep3B; HepG2=human hepatoma derived cell line HepG2; hERG=human ether-à-go-go-related gene; HSF-1= heat shock factor 1; hTTR=human transthyretin; IKr=rapidly activating, delayed rectifier cardiac potassium current; IV=intravenous, KO=knockout; LNP=lipid nanoparticle; mRNA=messenger ribonucleic acid; NA=not applicable; RBP=retinol binding protein; siRNA=small interfering ribonucleic acid; SNALP=stable nucleic acid lipid particle; TTR=transthyretin; wt=wild type.

- ^a Please note that the in vitro tests were done with siRNA ALN-18328 (drug substance; also termed patisiran and AD-18328); the in vivo studies were done with patisiran-LNP or ALN-TTR01 and these are noted in the Table, as appropriate; both formulations contain the same siRNA ALN-18328.
- ^b Patisiran-LNP was previously called ALN-TTR02, LNP11-18328, or AF-011-18328 in pharmacology studies; these names can be found in the original source reports documenting the studies described below. For the sake of clarity, ALN-TTR02, LNP11-18328, and AF-011-18328 will be referred to as patisiran-LNP (which is considered patisiran drug product) throughout Module 2.6.3. Other formulations of ALN-18328 siRNA other than patisiran-LNP were also evaluated in these studies and are indicated in tables below. Section 2.6.2, Table 1 describes the use of alternative nomenclature for patisiran, patisiran-LNP, and analogs.

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

2 効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics

Overview					Test Article: Patisiran-LNP ^a	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. and Lot Numbers	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Primary Pharmacodynamics - In Vitro / In Silico						
Selection of ALN-18328	HepG2 cell line Hep3B cell line	in vitro	<u>HepG2</u> a) single concentration = 10 nM b) select analysis, range = 10 fM to 10 nM <u>Hep3B</u> range = 10 fM to 10 nM	NA	■ siRNAs were screened for their ability to silence TTR mRNA when transiently transfected in HepG2 and Hep3B liver cell lines at a fixed siRNA concentration of 10 nM. A subset of ■ siRNAs showing >75% reduction of relative TTR mRNA concentrations was further analyzed by transient transfection into HepG2 at a range of siRNA concentrations to evaluate siRNA potency. Of these, a subset of 12 siRNAs were evaluated for potency in Hep3B cell line to confirm the findings observed in HepG2 cell line. ALN-18328 exhibited dose-dependent reduction of TTR mRNA (IC ₅₀ ~ 3 pM).	BIO09003
Analysis of polymorphism variations in region surrounding ALN-18328 target site	NA	in silico	NA	NA	Diverse ethnic and geographical populations demonstrated 100% sequence conservation within the ALN-18328 target site	BIO09004
Selection of TTR-specific siRNAs and ALN-18328 (bioinformatics)	NA	in silico	NA	NA	TTR-specific siRNAs were identified following bioinformatic rules to select an siRNA with minimum off-target potential.	BIO09005

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics (continued)

Overview					Test Article: Patisiran-LNP ^a	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. and Lot Numbers	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Off-target analysis of ALN-18328 (in vitro)	Hep3B cell line COS-7 cell line	in vitro	<u>Hep3B (endogenous)</u> range = 1 x 10 ⁻⁶ nM to 100 nM <u>COS-7 (Dual-Luc assay)</u> range = 2 x 10 ⁻⁸ nM to 2 x 10 ³ nM	NA	Hep3B: There is a >10,000-fold difference in potency between the “on-target” reduction of TTR by ALN-18328 (IC ₅₀ ~ 2.4 pM) and the “off-target” reduction of any of the most closely related off-target transcripts ([REDACTED] in the target region of the siRNA of unknown physiological consequence). COS-7: Treatment with ALN-18328 resulted in robust, concentration dependent reduction in luciferase gene expression in cells transfected with the luciferase construct containing the TTR gene sequence in the 3'UTR (IC ₅₀ of 3 fM). ALN-18328 is highly specific for TTR and is highly unlikely to result in off-target gene reduction activity.	BIO09025
Activity of ALN-18328 against mutant TTR alleles (in vitro)	COS-7 cell line	in vitro	range = 10 nM to 100 fM	NA	ALN-18328 shows similar potency (range of 41-74 pM) against wt and pathogenic TTR mutant variants and that the TTR reduction effect is specific to the TTR gene.	BIO12014
Evaluation of the impact of progressive [REDACTED] exonuclease mediated degradation on ALN-18328 activity (antisense strand)	Hep3B cell lines	in vitro	0.1 nM and 10 nM	NA	At 0.1 nM, which is 30X higher than the in vitro IC ₅₀ value in Hep3B cells for ALN-18328: ALN-18328 (intact): 98.9% TTR reduction [REDACTED]	BIO17012

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics (continued)

Overview					Test Article: Patisiran-LNP ^a	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. and Lot Numbers	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Patisiran-LNP (ALN-TTR02): siRNA selection and off-target activity assessment	NA	in silico	NA	NA	Alnylam's proprietary algorithm and a publicly available siRNA selection tool (siDirect 2.0) both identified ALN-18328 as a suitable, highly specific siRNA against human TTR. The combination of in silico work using Alnylam's algorithm, and in vitro analyses, including a qPCR-based assay in Hep3B cells and the dual luciferase reporter assay adequately identified and assessed the potential off-targets of ALN-18328. No safety concerns associated with off-target activity of ALN-18328 against ADAMTS6, CYSLTR1, or PEAK1 based on lack of tissue expression and sequence homology, and the known functions of these genes.	BIO18014
Primary Pharmacodynamics- In Vivo						
Evaluation of the regression of TTR deposition in peripheral tissues of human hTTR V30M/HSF-1 KO (Null) transgenic mice following treatment with ALN-TTR01	hTTR V30M /HSF-1 KO transgenic mouse, 22 months old	IV bolus, dosing every 2 weeks for a total of 6 doses	<u>SNALP-1955</u> Lot No. [REDACTED] 3 mg/kg <u>ALN-TTR01</u> Lot No. [REDACTED] 3 mg/kg	N=6 (controls) N=9 (ALN- TTR01 treated) (M and F)	In comparison to SNALP-1955 treated animals, ALN-TTR01 administration resulted in >85% reduction of hepatic TTR mRNA and serum TTR protein and was associated with >95% reduction in TTR tissue deposition in stomach, duodenum, colon, sciatic nerve, and dorsal root ganglia (as measured by IHC staining intensity using imaging software).	BIO10118

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics (continued)

Overview					Test Article: Patisiran-LNP ^a	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. and Lot Numbers	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Investigation of the pharmacodynamics of ALN-18328 and AD-18324 formulated in SNALP LNP formulation	Cynomolgus Monkey	15 min IV infusion Single dose	SNALP-1955 Lot No. [REDACTED] 3 mg/kg SNALP-18324 Lot No. [REDACTED] 0.3, 1, or 3 mg/kg SNALP-18328 (ALN-TTR01) Lot No. [REDACTED] 0.3, 1, or 3 mg/kg	3M/ group	When formulated in SNALP, ALN-18328 more effectively reduced TTR mRNA expression compared to AD-18324 and was selected for further pharmacodynamic investigation.	BIO09009
Reduction of serum TTR protein following single dose administration of patisiran-LNP in the cynomolgus monkey	Cynomolgus Monkey	15 min IV infusion Single dose	AF-011-1955 Lot No. [REDACTED] 0.3 mg/kg patisiran-LNP Lot No. [REDACTED] 0.03, 0.1, or 0.3 mg/kg	3M/ group	At 48 hours postinfusion, a dose dependent reduction of liver TTR mRNA concentrations was observed with patisiran-LNP, with a maximum decrease of 94% at 0.3 mg/kg. Patisiran-LNP exhibited robust and durable dose-dependent reduction of serum TTR protein (90% max reduction of serum TTR at 0.3 mg/kg). Maximal TTR protein reduction occurred between Days 7 and 14 postdose. The extent of recovery on Day 28 was dose-dependent.	BIO10026 ^b
Reduction of serum TTR protein following single dose administration of patisiran-LNP in the cynomolgus monkey	Cynomolgus Monkey	15 min IV infusion Single dose	PBS 0 mg/kg Patisiran-LNP Lot No. [REDACTED] 0.03, 0.1, or 0.3 mg/kg	3M/ group	Patisiran-LNP exhibited robust and durable dose-dependent reduction of serum TTR protein (90% max reduction of serum TTR at 0.3 mg/kg).	BIO11002 ^c

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics (continued)

Overview					Test Article: Patisiran-LNP ^a	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. and Lot Numbers	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Reduction of serum TTR protein following single dose administration of patisiran-LNP in the cynomolgus monkey	Cynomolgus Monkey	15 min IV infusion Single dose	<u>PBS</u> 0 mg/kg <u>LNP-011-1955</u> Lot No. [REDACTED] 0.3 mg/kg <u>patisiran-LNP</u> Lot No. [REDACTED] 0.03, 0.1, or 0.3 mg/kg	3M/ group	Patisiran-LNP exhibited robust and durable dose-dependent reduction of serum TTR protein (91% max reduction of serum TTR at 0.3 mg/kg).	BIO11003 ^d

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics (continued)

Overview					Test Article: Patisiran-LNP ^a	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. and Lot Numbers	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Reduction of serum TTR protein following repeat administration of patisiran-LNP in the cynomolgus monkey	Cynomolgus Monkey	60 min IV infusion	patisiran-LNP Lot No. [REDACTED] <u>Part 1 (Day 1)</u> 0.15, 0.2, 0.25, or 0.3 mg/kg q4w for 3 doses <u>Part 2 (Day 85), Groups 1, 2, and 4</u> 0.15, 0.3, or 0.5 mg/kg q4w for 4 doses (7 doses in total including Part 1) <u>Part 2 (Day 85) Groups 3 and 5</u> 0.25 and 0.3 mg/kg q3w for 5 doses (8 doses in total including Part 1)	2/sex/ group	Patisiran-LNP exhibited robust and durable dose-dependent reduction of serum TTR protein at 10-14 days postdose. Maximum TTR reduction modestly but significantly increased following repeat dosing, with consistent, >80% reduction observed at 0.3 mg/kg patisiran-LNP q3w and 0.5 mg/kg patisiran-LNP q4w. In conjunction with toxicity data, 0.3 mg/kg q3w was chosen as the clinical dose and regimen.	[REDACTED] 20031783

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics (continued)

Overview					Test Article: Patisiran-LNP ^a	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. and Lot Numbers	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Comparison of the toxicity, toxicokinetics, and pharmacodynamics of patisiran-LNP manufactured by different batch processes in monkeys	Cynomolgus Monkey	60 min IV infusion	0, 0.3 and 2.0 mg/kg q3w for 4 doses Lot No. [REDACTED] Lot No. [REDACTED]	4/sex/ group	No differences between batches in pharmacodynamics. Mean reductions in serum TTR protein of up to 80.4 and 95.1% from baseline were observed at 0.3 and 2.0 mg/kg, respectively.	TTR02- GLP17-007

Abbreviations: COS-7=cell line derived from kidney tissue of an African green monkey; Hep3B=human hepatoma derived cell line Hep3B; HepG2=human hepatoma derived cell line HepG2; HSF=heat shock factor 1; IHC=immunohistochemistry; hTTR=human transthyretin; IC₅₀=half maximal inhibitory concentration; IV=intravenous; KO=knockout; LNP=lipid nanoparticle; mRNA=messenger ribonucleic acid; NA= not applicable; PBS=phosphate buffered saline; q3w=once every three weeks; q4w=once every four weeks; siRNA=small interfering ribonucleic acid; SNALP=stable nucleic acid lipid particle; TTR=transthyretin; 3'UTR=3' untranslated region; V30M=valine to methionine change at amino acid position 30.

^a Please note that the *in vitro* tests were done with siRNA ALN-18328 (drug substance; also termed Patisiran and AD-18328); the *in vivo* studies were done with patisiran-LNP (previously described as ALN-TTR02, LNP11-18328, or AF-011-18328) or ALN-TTR01, and these are noted in the Table, as appropriate, both formulations contain the same siRNA ALN-18328.

^b An experimental LNP formulation called AF-023 was also evaluated in the study described in BIO10026

^c Two experimental LNP formulations called LNP09 and LNP13 were also evaluated in the study described in BIO11002

^d An experimental LNP formulation called LNP12 was also evaluated in the study described in BIO11003

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

3 副次的薬理試験

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics

Overview					Test Article: ALN-18328, ALN-TTR01, Patisiran-LNP	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. / Dose (mg/kg) and Lot Numbers	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Secondary Pharmacodynamics - In Vitro						
No studies conducted.						
Secondary Pharmacodynamics- In Vivo						
Evaluation of the effect a single IV infusion of ALN-TTR01 on serum TTR and RBP levels in cynomolgus monkeys	Cynomolgus Monkey	15 min IV infusion Single dose	<u>PBS</u> 0 mg/kg <u>ALN-TTR01</u> Lot No. [REDACTED] 3 mg/kg	1/sex/ group	Single dose administration of ALN-TTR01 at 3 mg/kg resulted in approximately 50-60% reduction in both serum TTR and RBP on Day 7 after dosing. TTR reduction results in RBP reduction and the extent of reduction between the 2 proteins is correlated.	BIO16041
Evaluation of patisiran-LNP-mediated effects on TTR, vitamin A, and thyroxine in a multiple-dose study in the cynomolgus monkey	Cynomolgus Monkey	60 min IV infusion Dosing every 2 weeks for a total of 4 doses followed by a 60-day recovery period	<u>PBS</u> 0 mg/kg <u>AF-011-1955</u> Lot No. [REDACTED] 3 mg/kg <u>patisiran-LNP</u> Lot No. [REDACTED] 0.3, 1.0, or 3.0 mg/kg	6/sex/ group	Reductions in circulating TTR, vitamin A, and thyroxine were observed in males and females at 0.3, 1, and 3 mg/kg patisiran-LNP on Day 1 (after the 1 st dose) and on Day 43 (after the 4 th dose). Prior to the Day 43 dose, serum TTR, vitamin A, and thyroxine concentrations were already reduced relative to the prestudy baseline due to the previous patisiran-LNP doses. Reductions in serum TTR, vitamin A, and thyroxine concentrations were fully or partially reversed at the end of the 60 day recovery period. (please see 2.6.7 Toxicology Tabulated Summary, Section 7.E for full study tabular results)	TTR02-NCD10-011

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics (continued)

Overview					Test Article: ALN-18328, ALN-TTR01, Patisiran-LNP	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Conc. / Dose (mg/kg) and Lot Numbers	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Evaluation of patisiran-LNP-mediated effects on TTR, vitamin A, and thyroxine in a 39-week study in the cynomolgus monkey	Cynomolgus Monkey	60 min IV infusion Dosing every 3 weeks for a total of 14 doses followed by a 3-month recovery period	0.9% NaCl 0 mg/kg <u>patisiran-LNP</u> Lot No. [REDACTED] 0.3, 1, or 3 mg/kg* *Day 1; 2 mg/kg all other Study Days	6/sex/ group	Mean maximum reductions in serum TTR (98% from baseline) (sexes combined) were observed at the end of the dosing phase (Day 274) and values returned to baseline after a 3-month recovery period (Day 365). Mean maximum reductions in serum vitamin A (81% from baseline) and thyroxine (41% from baseline) (sexes combined) were also observed; these changes returned to baseline values during the recovery period. (please see 2.6.7 Toxicology Tabulated Summary, Section 7.F for full study tabular results)	TTR02-NCD12-001

Abbreviations: IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; PBS=phosphate buffered saline; RBP=retinol binding protein; TTR=transthyretin.

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

4 安全性薬理試験

表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology : in vitro

Overview					Test Article: AF-011-1955		
Safety Pharmacology-In Vitro							
Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Concentration (µg/mL) and Lot Numbers	No. Cells per Conc.	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular	Mammalian cells (HEK 293) expressing hERG potassium channel	In vitro	Assay buffer (control): 0 µg/mL AF-011-1955: 0, 150, 750, and 1500 µg/mL Cisapride (positive control): 90 nM <u>Lot:</u> AF-011-1955:	3 cells/ concentration	AF-011-1955 did not inhibit hERG current up to the highest concentration of 1500 µg/mL. In contrast, the positive control cisapride inhibited the hERG current by 92%.	No	LD-NCD10-016

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.3.4.2 - Safety pharmacology : in vivo

Overview				Test Article: Patisiran-LNP			
Safety Pharmacology-In Vivo							
Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses ^a (mg/kg)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings ^b	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular, Respiratory, and Central Nervous System	Cynomolgus Monkey	60 min IV infusion Single dose	Phase I: PBS (control:) 0 mg/kg patisiran-LNP: 0.1, 1, 3, 6 mg/kg Phase II: patisiran-LNP: 3 mg/kg <u>Lot:</u> patisiran-LNP: [REDACTED]	Phase I: 12 males All animals received vehicle on Day 1; assigned to 4 groups of 3 males per group for Day 7 patisiran-LNP dosing Phase II: 3 males	Phase I (cardiovascular effects): 0 mg/kg: no noteworthy findings. 1 mg/kg: no noteworthy findings. 3 mg/kg: (1/3 animals) ↓food consumption, ↓activity, hunched appearance ↑body temp, ↑heart rate (with corresponding decreases in RR and QT interval durations). 6 mg/kg: (1/3 animals) ↓food consumption; ↑ mean body temp, ↑ mean heart rate (with corresponding decreases in RR, QT, and QTc interval durations). No qualitative ECG abnormalities, no direct effects (i.e. those unrelated to the increased heart rate) on derived QTc(F) values, and no effects on mean arterial pressure Phase II (CNS and respiratory effects): 3 mg/kg: (1/3) ↓food consumption. No CNS or respiratory findings, including partial pressures of oxygen and carbon dioxide, blood pH, or saturation of hemoglobin with oxygen. Toxicokinetics: were also conducted ^c	Yes ^d	TTR02-NCD10-003

2.6.3 薬理試験概要表 パチシランナトリウム

表 2.6.3.4.2 - Safety pharmacology : in vivo (continued)

Abbreviations: CNS=central nervous system; ECG=electrocardiogram; GLP=Good Laboratory Practice; HEK=human embryonic kidney; hERG= Human ether-à-go-go-related gene; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; PBS=phosphate buffered saline; QT= interval from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave on an electrocardiogram; QTc(F)=Fridericia's Correction Formula, which takes into account the physiologic shortening of the QT interval which occurs as the heart rate increases; RR=interval between 2 consecutive R waves used to measure heart rate.

- a Single dose, 1 hour infusion on day 1 [control dose (Phase I) and 3.0 mg/kg (Phase II)], and day 7 [0.1, 1.0, 3.0, and 6.0 mg/kg (Phase I)].
- b Number of animals with finding per number evaluated is shown. At ≤ 6.0 mg/kg there were no ECG abnormalities, no direct effects on the derived QTc(F) values, and no effects on mean arterial pressure. At ≤ 3.0 mg/kg (the highest dose tested in Phase II), there were no effects on neurological parameters. At ≤ 1.0 mg/kg there were no patisiran-LNP-related effects on clinical observations, food consumption, or body temperature.
- c Following a 1-hour IV infusion of patisiran-LNP at 3.0 mg/kg to cynomolgus monkeys, plasma levels of ALN-18328, Dlin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG declined after peaking at 1.25 hours. ALN-18328, Dlin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG mean C_{max} values were 49.9, 421, and 60.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Mean AUC_{0-t} values were 423, 2710, and 506 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, respectively for ALN-18328, Dlin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG.
- d Toxicokinetic analysis was not GLP-compliant but adhered to accepted scientific practices.

2.6.3 薬理試験概要表
パチシランナトリウム

5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験なし