

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

2.6.4 薬物動態試験の概要文

目 次

目 次	2
表 目 次	5
図 目 次	8
略号と用語の定義	11
1 まとめ	14
2 分析法	20
2.1 分析法	21
2.2 薬物動態評価に用いた分析法	21
2.2.1 siRNA及びその代謝物の定量法.....	21
2.2.2 DLin-MC3-DMA及びその代謝物の定量法	24
2.2.3 放射性標識体を用いた生物学的分析法	24
2.2.4 PEG ₂₀₀₀ -C-DMG及び代謝物の定量	25
2.3 総TTRの薬力学的測定.....	25
2.4 抗薬物抗体（ADA）分析法	25
2.5 その他の分析法	26
3 吸収	35
3.1 パチシラン-LNP投与後の薬物動態及びトキシコキネティクス.....	35
3.1.1 マウスにおける血漿中トキシコキネティクス	35
3.1.1.1 C57BL/6マウスを用いた6週間反復（q2w×4）静脈内投与用量設定毒性試験.....	36
3.1.2 Sprague-Dawleyラットにおける血漿中薬物動態及びトキシコキネティクス	38
3.1.2.1 ラットにおける静脈内投与試験	39
3.1.3 ウサギにおける血漿中トキシコキネティクス	46
3.1.3.1 ウサギを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験	47

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

3.1.4	カニクイザルにおける血漿中薬物動態及びトキシコキネティクス	49
3.1.4.1	カニクイザルを用いた単回投与試験	50
3.1.4.2	サルを用いた反復投与試験	54
4	分布	57
4.1	タンパク結合	58
4.2	生体内分布： <i>in vivo</i>	59
4.2.1	ラットにおける生体内分布	59
4.2.2	ラットを用いた生体内分布試験（定量的全身オートラジオグラフィー法）	62
4.2.3	ラットを用いた組織内分布試験（マイクロオートラジオグラフィー法）	67
4.2.4	サルにおける生体内分布	68
4.3	その他の分布試験	70
4.3.1	Sprague-Dawleyラットを用いた静脈内投与による受胎能並びに胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験	71
4.3.2	Sprague-Dawleyラットを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験	71
4.3.3	パチシラン-LNP（ALN-TTR02）及びAF-011-18534の乳汁中分泌：ラットを用いた静脈内投与による出生前及び出生後の発生に関する試験	74
4.3.4	ニュージーランドホワイトウサギを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験	75
5	代謝（動物種間の比較）	77
5.1	<i>In vitro</i> 代謝試験	78
5.1.1	ALN-18328（原薬）の肝サイトゾル中での代謝安定性.....	78
5.1.2	パチシラン-LNP中のALN-18328の血清及び肝サイトゾル中での代謝安定性	78
5.1.3	マウス、ラット、サル及びヒト血清並びに肝S9画分中でのALN-18328（原薬）の代謝安定性及び代謝プロファイリング	79
5.1.4	DLin-MC3-DMAの肝ミクロソーム及びS9画分中での代謝安定性	81
5.1.5	肝ミクロソーム及びS9画分中でのPEG ₂₀₀₀ -C-DMG代謝に関する動物種間比較（マウス、ラット、サル及びヒト）	81

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

5.1.6	ALN-18328 : ヒトSupersomeとのインキュベーションによるALN-18328代謝に関与するCYP分子種の特定	83
5.1.7	DLin-MC3-DMA : ヒトSupersomeとのインキュベーションによるDLin-MC3-DMA代謝に関与するCYP分子種の特定	83
5.1.8	PEG ₂₀₀₀ C-DMG : ヒトSupersomeとのインキュベーションによるPEG ₂₀₀₀ C-DMG代謝に関与するCYP分子種の特定	83
5.1.9	ALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG ₂₀₀₀ -C-DMGのシトクロムP450阻害試験	84
5.1.10	ALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG ₂₀₀₀ -C-DMGのシトクロムP450誘導試験	86
5.2	<i>Ex Vivo</i> 代謝試験.....	87
5.2.1	パチシラン-LNP処理サル由来肝ミクロソームを用いたシトクロムP450及びUGT酵素活性に対するパチシラン-LNPの影響.....	87
5.3	<i>In vivo</i> 代謝試験.....	88
5.3.1	ラットを用いた <i>In vivo</i> 代謝プロファイリング試験.....	88
5.3.2	ラット血漿、尿、胆汁、糞及び組織中の ¹⁴ C-DLin-MC3-DMA及び代謝物の同定、プロファイリング及び定量	89
5.3.3	サルに静脈内投与したときの ¹⁴ C-DLin-MC3-DMAの吸収、代謝、排泄及び血漿、尿、糞中代謝物	91
6	排泄	93
6.1	ラット	93
6.1.1	Sprague-Dawleyラットを用いた ¹⁴ C-DLin-MC3-DMAの静脈内投与マスバランス試験	93
6.2	サル	95
6.2.1	サルを用いた ¹⁴ C-DLin-MC3-DMA、ALN-18328及びPEG ₂₀₀₀ -C-DMGの単回静脈内投与マスバランス試験（尿及び糞）	95
7	薬物動態学的薬物相互作用	97
7.1	<i>In vitro</i> 薬物トランスポーター	97
8	その他の薬物動態試験	99
8.1	サルを用いた単回静脈内持続投与ブリッジング同等性試験	99
8.2	ラットにおける探索的2週毎7回13週間あるいは3週毎7回19週間皮下投与忍容性試験	100

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

8.3	薬物動態に対する免疫原性の影響に関する評価	101
8.4	サルを用いた各種工程バッチの10週間静脈内投与同等性試験	101
9	考察及び結論	109
10	参考文献	115

表 目 次

表 1 - パチシラン-LNPの開発中に使用した名称	14
表 2 - パチシラン-LNPを単回投与したときの各動物種におけるALN-18328のPKパラメータ	16
表 3 - パチシラン-LNPを単回投与したときの各動物種におけるDLin-MC3-DMAのPKパラメータ	16
表 4 - パチシラン-LNPを単回投与したときの各動物種におけるPEG ₂₀₀₀ -C-DMGのPKパラメータ	17
表 5 - 非臨床試験で使用したバリデートされた分析法の概要	28
表 6 - 実試料再分析 (ISR) の概要	33
表 7 - マウスを用いて実施したTK試験	35
表 8 - マウスにパチシラン-LNPを反復 (q2w×4) 静脈内ボラス投与したときの1日目及び43日目におけるALN-18328の血漿中TKパラメータ (雄性マウスの平均値)	36
表 9 - マウスにパチシラン-LNPを反復 (q2w×4) 静脈内ボラス投与したときの1日目及び43日目におけるDLin-MC3-DMAの血漿中TKパラメータ (雄性マウスの平均値)	37
表 10 - マウスにパチシラン-LNPを反復 (q2w×4) 静脈内ボラス投与したときの1日目及び43日目におけるPEG ₂₀₀₀ -C-DMGの血漿中TKパラメータ (雄性マウスの平均値)	38
表 11 - Sprague-Dawleyラットを用いて実施したPK及びTK試験	38
表 12 - Sprague-Dawleyラットにパチシラン-LNPを単回静脈内ボラス投与したときのALN-18328のPKパラメータ (平均値、雌雄統合)	40
表 13 - ラットにパチシラン-LNPを静脈内ボラス投与したときのDLin-MC3-DMAの血漿中PKパラメータ (平均値、雌雄統合)	42
表 14 - Sprague-Dawleyラットにパチシラン-LNPを単回静脈内ボラス投与したときのPEG ₂₀₀₀ -C-DMGの血漿中PKパラメータ (平均値)	43

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 15 - ラットにパチシラン-LNPを1時間静脈内持続投与したときのALN-18328のTK/パラメータ (平均値、雌雄統合)	44
表 16 - 雌雄のラットにパチシラン-LNPを1時間静脈内持続投与したときのDLin-MC3-DMAの TK/パラメータ (平均値、雌雄統合)	45
表 17 - ラットにパチシラン-LNPを1時間静脈内持続投与したときのPEG ₂₀₀₀ -C-DMGの TK/パラメータ (平均値、雌雄統合)	46
表 18 - ニュージーランドホワイトウサギを用いて実施したTK試験.....	47
表 19 - 妊娠7及び19日のウサギにパチシラン-LNPを静脈内持続投与したときの ALN-18328のTK/パラメータ (平均値)	48
表 20 - 妊娠7及び19日目の妊娠ウサギにパチシラン-LNPを静脈内持続投与したときの DLin-MC3-DMAの TK/パラメータ (平均値)	48
表 21 - 妊娠7及び19日のウサギにパチシラン-LNPを静脈内持続投与したときの PEG ₂₀₀₀ -C-DMGのTK/パラメータ (平均値)	49
表 22 - カニクイザルを用いて実施したPK及びTK試験.....	49
表 23 - サルにパチシラン-LNPを15分間又は1時間静脈内持続投与したときの ALN-18328の血漿中PK/パラメータ (平均値、雌雄統合)	52
表 24 - サルにパチシラン-LNPを15分間又は1時間静脈内持続投与したときのDLin-MC3-DMAの血漿中PK/パラメータ (平均値、雌雄統合)	53
表 25 - サルにパチシラン-LNPを1時間静脈内持続投与したときのPEG ₂₀₀₀ -C-DMGの血漿中PK/パラメータ (平均値、雌雄統合)	54
表 26 - サルにパチシラン-LNPを単回及び反復投与したときのALN-18328の TK/パラメータ (平均値、雌雄統合)	55
表 27 - サルにパチシラン-LNPを単回及び反復投与したときのDLin-MC3-DMAの TK/パラメータ (平均値、雌雄統合)	56
表 28 - サルにパチシラン-LNPを単回 (初回) 及び反復投与したときのPEG ₂₀₀₀ -C-DMGの TK/パラメータ (平均値、雌雄統合)	56
表 29 - パチシラン-LNPの血漿タンパク結合及び分布試験.....	57
表 30 - ラット血清アルブミン、ヒト血清アルブミン及びヒト α_1 -酸性糖タンパク質に対するパチシラン-LNPの結合率.....	59

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 31 - Sprague-Dawleyラットにパチシラン-LNPを単回静脈内ボラス投与したときのALN-18328の肝臓、脾臓及び血漿中PKパラメータ（平均値）	60
表 32 - Sprague-Dawleyラットにパチシラン-LNPを単回静脈内ボラス投与したときのDLin-MC3-DMAの肝臓及び脾臓中PKパラメータ	60
表 33 - Sprague-Dawleyラットに1.0 mg/kgのパチシラン-LNPを単回静脈内ボラス投与したときのPEG ₂₀₀₀ -C-DMGの肝臓及び脾臓中PKパラメータ（平均値）	61
表 34 - Sprague-Dawleyラットに1.0 mg/kgのパチシラン-LNPを単回静脈内ボラス投与したときのALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG ₂₀₀₀ -C-DMGの組織中分布（対投与量%平均値）	62
表 35 - 定量的全身オートラジオグラフィー法によるラット生体内分布試験の試験デザイン	63
表 36 - Sprague-Dawleyラットに ¹⁴ C-パチシラン-LNP（ ¹⁴ C-DLin-MC3-DMA）を静脈内投与したときの組織中放射能濃度	64
表 37 - Sprague Dawleyラットにおける脾臓、腎臓、肝臓、脳、副腎、心臓及び肺中放射能分布（対投与量%）	67
表 38 - サルにパチシラン-LNPを単回1時間静脈内持続投与したときのALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG ₂₀₀₀ -C-DMGの肝臓中PKパラメータ（平均値）	69
表 39 - サルに1.0 mg/kgのパチシラン-LNPを単回静脈内持続投与したときのALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG ₂₀₀₀ -C-DMGの組織中分布（対投与量%平均値）	70
表 40 - パチシラン-LNPを静脈内持続投与したときの妊娠19日におけるラット胎児中DLin-MC3-DMA濃度（平均値）	71
表 41 - ラットにAF-011-18534又はパチシラン-LNPを反復静脈内持続投与したときの妊娠20日の母体肝臓、胎盤及び胎児組織中のALN-18328及びALN-18534 siRNA濃度（平均値±SD）	72
表 42 - ラットに1.5 mg/kgのAF-011-18534（ラットサロゲート）又はパチシラン-LNPを反復静脈内持続投与したときの妊娠20日の母体肝臓、胎盤及び胎児組織中DLin-MC3-DMA濃度（平均値±SD）	73
表 43 - ラットにAF-011-18534又はパチシラン-LNPを反復静脈内持続投与したときの妊娠20日の母体肝臓、胎盤及び胎児組織中PEG ₂₀₀₀ -C-DMG濃度（平均値±SD）	74
表 44 - ニュージーランドホワイトウサギに対して妊娠7、13及び19日にパチシラン-LNPを静脈内持続投与したときの妊娠20日（剖検時）における胎盤及び胎児中ALN-18328濃度及び母体血漿中C _{max} に対する割合（平均値±SD）	75
表 45 - ニュージーランドホワイトウサギに妊娠7、13及び19日にパチシラン-LNPを静脈内持続投与したときの妊娠20日（剖検時）における胎盤及び胎児中DLin-MC3-DMA濃度及び母体血漿中C _{max} に対する割合（平均値±SD）	76

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 46 - ニュージーランドホワイトウサギに妊娠7、13及び19日にパチシラン-LNPを静脈内持続投与したときの妊娠20日（剖検時）における胎盤及び胎児中PEG ₂₀₀₀ -C-DMG濃度及び母体血漿中C _{max} に対する割合（平均値±SD）	76
表 47 - ALN-18328及びパチシラン-LNP成分の代謝試験	77
表 48 - <i>in vitro</i> におけるマウス、ラット、サル及びヒト血清中でのALN-18328の代謝安定性	79
表 49 - <i>in vitro</i> におけるマウス、ラット、サル及びヒト肝S9画分中でのALN-18328の代謝安定性.....	79
表 50 - パチシラン-LNPの排泄試験.....	93
表 51 - ラットにおける ¹⁴ C-DLin-MC3-DMAの排泄（平均値）	94
表 52 - サルにおける ¹⁴ C-パチシラン-LNPの排泄（平均値）	96
表 53 - 雄Sprague-Dawleyラットにパチシラン-LNPを皮下投与したときの85又は127日目におけるALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG ₂₀₀₀ -C-DMGの血漿中TKパラメータ（平均値）	100
表 54 - サルに異なる2工程バッチのパチシラン-LNPを3週間毎に1時間静脈内持続投与したときの1日目及び43日目におけるALN-18328のトキシコキネティクスパラメータ	104
表 55 - サルに異なる2工程バッチのALN-TTR02を3週間毎に1時間静脈内持続投与したときの1日目及び43日目におけるDLin-MC3-DMAのトキシコキネティクスパラメータ.....	106
表 56 - サルに異なる2工程バッチのパチシラン-LNPを3週間毎に1時間静脈内持続投与したときの1日目及び43日目におけるPEG ₂₀₀₀ -C-DMGのトキシコキネティクスパラメータ	108

目 次

図 1 - ラット放射性標識体試験で使用した ¹⁴ C-DLin-MC3-DMA.....	24
図 2 - ラットにパチシラン-LNPを静脈内ボラス投与したときの血漿中ALN-18328濃度－時間推移（平均値、雌雄統合） ^a	40
図 3 - ラットにパチシラン-LNPを静脈内ボラス投与したときの血漿中DLin-MC3-DMA濃度－時間推移（平均値、雌雄統合） ^a	41
図 4 - 雌雄ラットにパチシラン-LNPを静脈内ボラス投与したときの血漿中PEG ₂₀₀₀ -C-DMG濃度－時間推移.....	42

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

図 5 - ラットにパチシラン-LNPを1時間静脈内持続投与したときの1日目（左パネル）及び43日目（右パネル）の血漿中ALN-18328濃度－時間推移（平均値、雌雄統合） ^a	44
図 6 - ラットにパチシラン-LNPを1時間静脈内持続投与したときの1日目（左パネル）及び43日目（右パネル）の血漿中DLin-MC3-DMA濃度－時間推移（平均値、雌雄統合） ^a	45
図 7 - ラットにパチシラン-LNPを1時間静脈内持続投与したときの1日目（左パネル）及び43日目（右パネル）の血漿中PEG ₂₀₀₀ -C-DMG濃度－時間推移（平均値、雌雄統合） ^a	46
図 8 - サルにパチシラン-LNPを1時間静脈内持続投与したときの血漿中ALN-18328濃度－時間推移（平均値、雌雄統合） ^a	51
図 9 - サルにパチシラン-LNPを1時間静脈内持続投与したときの血漿中DLin-MC3-DMA濃度－時間推移（平均値、雌雄統合） ^a	52
図 10 - サルにパチシラン-LNPを1時間静脈内持続投与したときの血漿中PEG ₂₀₀₀ -C-DMG濃度－時間推移（平均値、雌雄統合） ^a	53
図 11 - サルにパチシラン-LNPを1時間静脈内持続投与したときの1日目（左パネル）及び43日目（右パネル）の血漿中ALN-18328濃度－時間推移（平均値、雌雄統合） ^a	55
図 12 - <i>in vitro</i> 血清及び肝S9画分中のALN-18328の推定代謝経路.....	80
図 13 - サル及びヒト肝ミクロソーム及び肝S9画分でのPEG ₂₀₀₀ -C-DMGの推定代謝経路.....	82
図 14 - 血漿、肝臓及び尿を介したALN-18328の推定代謝経路.....	89
図 15 - 雄Sprague-DawleyラットにおけるDLin-MC3-DMAの推定代謝経路.....	91
図 16 - サルにおけるDLin-MC3-DMAの推定代謝経路.....	92
図 17 - 非カニューレ処置ラット（上図）及びBDCラット（下図）に2.1 mg/kgの ¹⁴ C-DLin-MC3-DMAを含む ¹⁴ C-パチシラン LNPを静脈内投与したときの放射能の排泄推移.....	94
図 18 - 雄サルにパチシラン-LNPを単回60分間静脈内持続投与したときの ¹⁴ C-DLin-MC3-DMA由来放射能の尿、糞及びケージ洗浄液中の累積放射能排泄率を示した代表的プロファイル.....	96
図 19 - 雌サルにパチシラン-LNPを単回60分間静脈内持続投与したときの ¹⁴ C-DLin-MC3-DMA由来放射能の尿、糞及びケージ洗浄液中の累積放射能排泄率を示した代表的プロファイル.....	97
図 20 - カニクイザルにパチシラン-LNP（ 又はAlynlam製）を1 mg/kgの用量で1時間静脈内持続投与したときのALN-18328の血漿中濃度－時間推移（平均値） ^a	99
図 21 - 異なる2工程バッチのパチシラン-LNPを0.3 mg/kg及び2 mg/kg用量にて3週間毎に1時間静脈内持続投与したときの1日目及び43日目におけるサル雌雄の平均（±SD）ALN-18328血漿中濃度-時間プロファイル.....	103

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

図 22 -異なる2工程バッチのパチシラン-LNPを0.3 mg/kg及び2 mg/kg用量にて3週間毎に1時間静脈内持
続投与したときの1日目及び43日目におけるサル雌雄の平均 (±SD) DLin-MC3-DMA血漿中濃度-
時間プロファイル 105

図 23 -サル雌雄に異なる2工程バッチのパチシラン-LNPを0.3 mg/kg及び2 mg/kg用量にて3週間毎に1時
間静脈内持続投与したときの1日目及び43日目における平均 (±SD) PEG₂₀₀₀-C-DMG血漿中濃度-
時間プロファイル 107

図 24- パチシラン-LNPの成分であるALN-18328の分布、代謝及び排泄 114

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

略号と用語の定義

用語	定義
AAG	ヒト α 1-酸性糖タンパク質 (Alpha1 acid glycoprotein)
AD-18354	げっ歯類サロゲート siRNA
ADA	抗薬物抗体 (Anti-drug antibody)
ADME	吸収、分布、代謝及び排泄 (Absorption, distribution, metabolism, and excretion)
ALN-18328	パチシラン-LNP 製剤中の <i>TTR</i> mRNA を標的とする siRNA 原薬 (siRNA drug substance in patisiran-LNP)
ALN-TTR02	2 mg/mL ALN 18328 及び LNP (AF-011) として処方化された脂質添加剤 DLin-MC3-DMA、DSPC、コレステロール及び PEG ₂₀₀₀ -C-DMG から構成され、等張リン酸緩衝生理食塩水を分散液とする RNAi 治療薬であるパチシラン製剤 [Patisiran drug product, an RNAi therapeutic comprised of 2 mg/mL patisiran drug substance (ALN 18328, an siRNA targeting <i>TTR</i> mRNA) and lipid excipients DLin-MC3-DMA, DSPC, cholesterol and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG formulated as lipid nanoparticles (LNPs, AF-011) in isotonic phosphate buffered saline.]
ApoE	アポリポタンパク質 E (Apolipoprotein E)
AUC	曲線下面積 (Area under the curve)
Bb	補体 B 因子の分解産物 (Split product of complement factor B)
BDC	胆管カニューレ処置 (bile duct cannulated)
BMV	分析法バリデーション (Bioanalytical Method Validation)
bDNA	分岐 DNA (Branched DNA)
¹⁴ C	原子量 14 の炭素同位体 (Carbon isotope with atomic weight of 14)
C3	補体第 3 成分 (Complement component 3)
C3a	補体第 3a 成分 (Complement component 3a)
CL	クリアランス (Clearance)
C _{max}	最高血漿中濃度 (Maximum plasma concentration)
CRP	C 反応性タンパク (C-reactive protein)
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
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay)
EMA	欧州医薬品庁 (European Medicines Agency)
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準 (Good Laboratory Practice)

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

用語	定義
hATTR	遺伝性異型トランスサイレチン (Hereditary Atypical Transthyretin)
HSA	ヒト血清アルブミン (Human serum albumin)
IC ₅₀	50%阻害濃度 (Concentration for 50% of maximal inhibition)
IFN- α	インターフェロン- α (Interferon- α)
IgM	免疫グロブリン M (Immunoglobulin M)
IgG	免疫グロブリン G (Immunoglobulin G)
IL-1RA	インターロイキン-1 受容体アンタゴニスト (Interleukin-1 receptor antagonist)
IL-6	インターロイキン-6 (Interleukin-6)
ISR	実試料再分析 (incurred sample reanalysis)
IV	静脈内 (Intravenous)
LC-MS	液体クロマトグラフィー/質量分析法 (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LLOQ	定量下限 (Lower level of quantification)
LNP	脂質ナノ粒子 (Lipid nanoparticle)
mRNA	メッセンジャーRNA (Messenger RNA)
Patisiran-LNP	パチシラン-LNP 製剤 (Patisiran drug product)
PBS	リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline)
PD	薬力学 (Pharmacodynamics)
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	(R)-2,3-bis(tetradecyloxy)propyl 1-(methoxy poly[ethylene glycol]2000)propylcarbamate
PK	薬物動態 (Pharmacokinetics)
qPCR	定量的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質 (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	リボ核酸干渉 (Ribonucleic acid interference)
RSA	ラット血清アルブミン (Rat serum albumin)
SD	標準偏差 (Standard deviation)
siRNA	低分子干渉リボ核酸 (Small interfering ribonucleic acid)
t _{1/2}	終末相消失半減期 (Terminal elimination half life)
T ₃	トリヨードサイロニン (tri-iodothyronine)
T ₄	サイロキシン (thyroxine)
TK	トキシコキネティクス (Toxicokinetic)

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

用語	定義
TTR	トランスサイレチン (Transthyretin)
V_{ss}	定常状態における分布容積 (Volume of distribution at steady state)

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

1 まとめ

脂質ナノ粒子 (LNP) として製造されたパチシラン-LNP は、トランスサイレチン (TTR) の mRNA を標的とする siRNA である ALN-18328 を有効成分 (原薬) とする RNA 干渉医薬品である。パチシラン-LNP は、等張リン酸緩衝生理食塩水を分散液として、ALN18328 を 2 mg/mL 及び脂質添加剤として (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-heptatriaconta-6, 9, 28, 31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino) butanoate (DLin-MC3-DMA) (13 mg/mL)、1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DSPC) (3.3 mg/mL)、コレステロール (6.2 mg/mL) 及び(R)-2,3-bis(tetradecyloxy)propyl 1-(methoxy poly[ethylene glycol]2000)propylcarbamate (PEG₂₀₀₀-C-DMG) (1.6 mg/mL) から構成される。本 Module では、非臨床試験用動物種にパチシラン-LNP を投与したときの薬物動態 (PK)、分布、代謝及び排泄を評価した。

パチシラン-LNP は、成人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) の治療を目的とした、0.3 mg/kg を 3 週に 1 回、長期投与する、静脈内投与製剤である。

プレアルブミンとしても知られる TTR は、127 個のアミノ酸から構成される四量体タンパク質であり、主に肝細胞により産生され (>95% の循環している TTR が肝臓に由来する)、ごく一部が脈絡叢及び網膜で産生される(1)。全 TTR の約半分が非結合型として循環しているが、それ以外の大部分は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(2)。ヒトでは、TTR はわずかではあるがサイロキシンの結合及び輸送にも関与する。なお、大部分の結合型サイロキシンはサイログロブリンと複合体を形成している(2)。

パチシラン-LNP 製剤の開発中にて、原薬及び製剤について様々な名称が用いられ、これらが試験報告書にも使用されている。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」では混乱を避けるため、ALN-TTR02 はパチシラン-LNP と記載した。また、開発中に使用したパチシラン原薬、LNP 製剤及び関連類似体の名称を表 1 に示した。

表 1 - パチシラン-LNP の開発中に使用した名称

名称	説明	使用試験
AD-18328 ALN-18328 パチシラン	サルとヒト TTR mRNA を標的とする siRNA (マウス、ラット、ウサギには薬理学的活性を示さない) であり、本 Module では ALN-18328 の名称を使用	単回投与毒性試験 1 試験及び in vitro 試験
パチシラン-LNP ALN-TTR02	ALN-18328 を封入した製剤 (パチシラン-LNP と ALN-TTR02 は同一の LNP) であり、本 Module ではパチシラン-LNP の名称を使用	大部分の薬物動態及び毒性試験
AD-18534 AF-011-18534	げっ歯類 TTR mRNA を標的とする siRNA である AD-18534 を封入した LNP 製剤 (パチシラン-LNP と同一の LNP)	げっ歯類毒性試験 (薬理学的活性を有する対照製剤であり、薬物動態又はトキシコキネティクスも評価)

Abbreviations: LNP=lipid nanoparticle; mRNA=messenger ribonucleic acid; siRNA=small interfering ribonucleic acid; TTR=transthyretin.

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

ALN-18328 はサル及びヒトで薬理学的活性を示したが、マウス、ラット及びウサギでは薬理学的活性を示さなかった。そのため、ラット TTR を標的とする siRNA をパチシラン-LNP と同じ製法で製剤化した AF-011-18534 (表 1) をマウス及びラットに投与し、薬理効果である TTR 低下による原薬の PK への影響を評価した。AF-011-18534 及びパチシラン-LNP を投与したいずれの試験においても、PK 挙動は類似していた。そのため、以降の試験ではパチシラン-LNP を用いた。AF-011-18534 の PK 又は TK の結果は各試験報告書 (Module 4) を参照とする。

薬物動態試験の評価には、パチシラン-LNP の毒性試験で使用した動物種及び系統を用いた。オリゴヌクレオチド製剤では一般的なように、一般毒性試験はサル及びげっ歯類を用いて実施し、トキシコキネティクス (TK) パラメータも評価した(3)。主要な毒性試験に用いられた動物種のパチシラン-LNP 投与後の PK を包括的に評価するため、ラット及びサルを用いて単回投与試験を実施した。本 Module では反復投与試験での代表的な TK と共に考察した。がん原性試験及び生殖発生毒性試験に使用した動物種であるマウス及びウサギについては、反復投与試験から得られた代表的 TK の結果のみを本 Module に記載した。全ての PK 及び TK 試験についての詳細は 2.6.5 「薬物動態試験概要表」を参照とする。

パチシラン-LNP の構成成分である ALN-18328 (RNAi 治療薬の有効成分であり原薬) 及び 2 種の新規脂質添加剤である DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG について、毒性評価 (2.6.6 「毒性試験の概要文」参照) 及び薬物動態特性を評価した。パチシラン-LNP に用いられているその他の添加剤であるコレステロール及び DSPC は、内因性物質であること、又は自然界に存在するホスファチジルコリンと非常に類似した構造を持つことから、パチシラン-LNP による毒性発現には寄与しないと考えられる。そのため、コレステロール及び DSPC の全身曝露量は評価しなかった。また、コレステロール及び DSPC は米国食品医薬品局 (FDA) による承認製剤の不活性成分として収載されており、安全性への懸念がないと考えられる (2.6.6, 9.1 項参照)。様々な動物種及び生体試料中の ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は、再現性のある高感度生物学的分析法である、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法、液体クロマトグラフィー/高分解能精密質量 (LC-MS/HRAM) 法及び Atto-Probe HPLC 法を用いて定量した (2.2 項)。ピボタルな反復投与毒性試験に用いた血漿試料の分析法については、フルバリデーションを実施した。非臨床薬物動態試験及び TK 評価を行った毒性試験で用いた用量は、遊離酸ではなく siRNA のナトリウム塩として換算した。これらの試験では、補正係数 0.94 を乗じることでそれぞれの遊離酸当量の用量に換算できる。

パチシラン-LNP を静脈内投与後、パチシラン-LNP は標的臓器である肝臓でエンドサイトーシスを介して取り込まれる(4)。サル及びラットを用いた *in vivo* 試験において、有効成分の siRNA である ALN-18328 は血漿中で非常に不安定であることが示された。そのため、血漿中 ALN-18328 濃度測定値は、LNP に封入されている siRNA 由来の濃度を示している。

結論として、マウス、ラット及びサルにパチシラン-LNP を単回投与したときの 3 種の成分 (ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG) の PK 又は TK には、動物種に関わらず、いずれの PK 及び TK においても性差は認められず、曝露量 (C_{max} 及び AUC) には用量比例性が認められ、類似した傾向が認められた。いずれの動物種においても、ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

濃度は、初回試料採取時点（投与後 0.083 時間又は投与直後）に最高値（ C_{max} ）に達し、その後、多相性の濃度推移を示して低下した。3 種すべての成分において、主に肝臓への分布によるものと考えられる早い初期分布相がみられた。消失半減期は、DLin-MC3-DMA で最も長く、次いで PEG₂₀₀₀-C-DMG で長かった。3 種すべての成分において、サルでの曝露量はマウス及びラットに比べ高値を示し、いずれの成分の半減期も長かった。ラット及びサル（主要な毒性試験用動物種）における、ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の代表的 PK パラメータを、それぞれ表 2、表 3 及び表 4 に示した。少数の試験にてマウス及びウサギにおける TK も評価したが、これらはがん原性試験及び胚・胎児試験にのみ使用されたため、以下の表に記載せず、3.1 項に記載した。

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」内では、AUC、 C_{max} 、 V_{ss} 及び CL などの PK パラメータは可能な限り 3 桁の有効数字を用いて表記した。そのため、これらの数値は、元の報告書に記載された数値と比べ、端数処理によりわずかに異なる可能性がある。

表 2 - パチシラン-LNP を単回投与したときの各動物種における ALN-18328 の PK パラメータ

Drug Administered / Analyte Measured		Patisiran-LNP / ALN-18328 (siRNA)				
Species	Study	Dose (siRNA) (mg/kg)	$t_{1/2\beta}$ (h)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	V_{ss} (mL/kg)	CL (mL/h/kg)
Rat	TTR02-NCD10-006	0.3	0.29*	3.71	27.5*	88.2*
Monkey	TTR02-NCD10-018	0.3	8.44	4.54	447	46.3

Abbreviations: AUC=area under the curve; CL=total body clearance; siRNA=small interfering ribonucleic acid; $t_{1/2\beta}$ =terminal elimination half-life; V_{ss} =volume of distribution at steady state.

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

* represents values from males only.

表 3 - パチシラン-LNP を単回投与したときの各動物種における DLin-MC3-DMA の PK パラメータ

Drug Administered / Analyte Measured		Patisiran-LNP / DLin-MC3-DMA (lipid)				
Species	Study	Dose ^a (lipid) (mg/kg)	$t_{1/2\beta}$ (h)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	V_{ss} (mL/kg)	CL (mL/h/kg)
Rat	TTR02-NCD10-006	1.9	192	69.0	4310	29.4
Monkey	TTR02-NCD10-018	1.9	610	684	1530	3.08

Abbreviations: AUC=area under the curve; CL=total body clearance; $t_{1/2\beta}$ =terminal elimination half-life; V_{ss} =volume of distribution at steady state.

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

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

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 4 - パチシラン-LNP を単回投与したときの各動物種における PEG₂₀₀₀-C-DMG の PK パラメータ

Drug Administered / Analyte Measured		Patisiran-LNP / PEG ₂₀₀₀ -C-DMG (lipid)				
Species	Study	Dose ^a (lipid) (mg/kg)	t _{1/2β} (h)	AUC (μg•h/mL)	V _{ss} (mL/kg)	CL (mL/h/kg)
Rat	TTR02-NCD10-006	0.76	21.3*	22.0	304*	36.5*
Monkey	TTR02-NCD10-018	0.76	161	222	134	3.48

Abbreviations: AUC=area under the curve; CL=total body clearance; t_{1/2β}=terminal elimination half-life; V_{ss}=volume of distribution at steady state.

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

*Represents values from females only.

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

マウス、ラット及びサルにパチシラン-LNP を反復投与したとき、ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は、いずれも血漿中への蓄積はみられず、PK において性差は認められず、曝露量は用量に比例して増加した。但し、ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験（2 週間 1 回、14 回投与）では、最終投与後（183 日目）の ALN-18328 及び 2 種の脂質の血漿中濃度は、初回投与後に比べて著しく低かった。この血漿中濃度の低下は、PEG₂₀₀₀-C-DMG に対する抗薬物抗体（ADA）の発現に起因すると考えられ、約半分のラットにて ADA が検出された。なお、マウス及びサルに反復投与したとき、曝露量に明らかな変化はみられず、また、サルでは ADA が検出された動物数は少なく、ADA による血漿中曝露量への影響は認められなかった。

パチシラン-LNP のラット血清アルブミン（RSA）、ヒト血清アルブミン（HSA）及びヒト α₁-酸性糖タンパク質（AAG）への結合率は、*in vitro* にてそれぞれ約 0.89%、0.46% 及び 2.07% と低かったことから、パチシラン-LNP の分布がタンパク結合の影響を受ける可能性は低いと考えられる。ヒト血漿中では、PEG₂₀₀₀-C-DMG 成分は脂質又はリポタンパク質と結合し、高いタンパク結合率を示した（タンパク結合率 97%）。*In vivo* での生体内分布試験は、ラットやサルを用いて実施した。胎盤、胎児及び母乳（ラットのみ）中濃度については、ラット及びウサギを用いて生殖発生毒性試験の一部として評価した。パチシラン-LNP を単回静脈内投与したとき、非標識 ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は、肝臓（ラット及びサル）及び脾臓（ラット）に高濃度に分布した。ラットでは、投与後 1~4 時間までに肝臓及び脾臓中の ALN-18328 濃度が最高値に達し、肝臓への ALN-18328 の分布率（対投与量%）は脾臓に比べて約 100 倍高かった。肝臓及び脾臓への最高分布率（対投与量%）はそれぞれ、ALN-18328 で 25.6% 及び 0.242 %、DLin-MC3-DMA で 77.7% 及び 0.98%、PEG₂₀₀₀-C-DMG で 48.9% 及び 0.82% であった。雄 Sprague-Dawley ラット及び雄 Long Evans ラットに ¹⁴C-DLin-MC3-DMA を用いて製剤化したパチシラン-LNP を単回静脈内投与した定量的全身オートラジオグラフィ（QWBA）試験では、0.25 時間から 1344 時間（56 日）まで放射能を測定した。その結果、リンパ節（276 μg/g 組織）、肝臓（69.5 μg/g 組織）、脾臓（12.0 μg/g 組織）及び副腎（12.3 μg/g 組織）に高い放射能が検出

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

された。結論として、肝臓の放射エネルギーが最も高く、投与後 4 時間で投与量の約 90% が検出された。また、中枢神経系及び心臓における放射エネルギーはごくわずかであったことから、パチシラン-LNP は筋肉に蓄積せず、脳組織にも移行しないことが示唆された。メラニンと結合した放射エネルギーは認められなかった。

妊娠ラット及びウサギでは、ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は胎児及び胎盤組織への分布はない、又は無視しうる程度であった。ラットに高用量 (1.5 mg/kg) のパチシラン-LNP を妊娠及び授乳期間を通して 6 日毎に 6 回投与したとき、乳汁中には ALN-18328 は検出されなかったが、低濃度の DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG が検出され、反復投与後 2 時間での DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の乳汁中濃度は、血漿中濃度のそれぞれ 8.3% 及び 6.6% であった。

マウス、ラット、サル及びヒトの血清、並びに肝細胞内画分を用いて、パチシラン-LNP 及びその構成成分である ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の *in vitro* での代謝安定性をそれぞれ評価した (試験一覧は表 47 を参照)。パチシラン-LNP はヒト以外の血清中ではやや不安定であったが (24 時間後の残存率 42~71%)、ヒト血清中では非常に安定であった (残存率 102%)。また、パチシラン-LNP は動物由来の肝サイトゾル中では比較的安定であり (6 時間後の残存率 77~88%)、ヒト肝サイトゾル中では、更に安定であった (残存率 100~102%)。LNP 封入型ではない ALN-18328 は、4 種いずれの動物種において、肝サイトゾル中では安定であるものの、血清中では速やかに代謝された。これらの試験では、センス鎖及びアンチセンス鎖の末端ヌクレオチド切断によって生成する代謝物が認められ、これは各動物種で普遍的に発現するエキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼによる可能性が考えられる(5)。DLin-MC3-DMA の代謝はいずれの動物種においても類似しており、代謝物として一酸化体又は二酸化体が認められた。PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝はごくわずかであり、サル及びヒトで唯一 *O*-脱テトラデシル化代謝が認められた。*In vitro* 試験では、いずれの 3 成分においても、ヒト特異的な代謝物は認められなかった。

In vivo にてラットにパチシラン-LNP を投与したときの代謝物のプロファイルを検討した結果、ALN-18328 は血漿及び肝臓中では主に完全長センス鎖及びアンチセンス鎖として検出された。対照的に、尿中では完全長センス鎖及びアンチセンス鎖は検出されず、センス鎖由来の代謝物 c* 及び代謝物 d*、並びにアンチセンス鎖由来の代謝物 g* が検出された。¹⁴C-DLin-MC3-DMA 標識体を用いて製剤化したパチシラン-LNP をラット及びサルに投与したマスバランス試験では、一酸化、二酸化及び加水分解経路により生成する DLin-MC3-DMA の代謝物が認められた。胆汁 (ラットのみ)、糞 (ラット及びサル) 並びに尿 (ラット及びサル) 中では、主に代謝物である 4-ジメチル酪酸 (DMBA) が回収され、これが両動物種の尿及び糞中の主代謝物と特定された。血漿中では、ラット及びサルのいずれにおいても大部分は未変化体で検出され、血漿中から検出された総放射エネルギーの 10% 以上を占める DLin-MC3-DMA の代謝物は認められなかった。PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝物はラット尿中には検出されず、サルでは投与された PEG₂₀₀₀-C-DMG の約 44% が未変化体として糞中に排泄された。これらの結果より、PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝はごくわずかであることが示唆された。

結論として、¹⁴C-DLin-MC3-DMA を用いて製剤化したパチシラン-LNP を投与したときの排泄プロファイルは、ラットとサルの間で類似していた。ラット及びサルに投与した放射エネルギーは、主に尿中に (ラ

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

ットにて約 49%、サルにて約 50%)、一部は糞中に排泄された(ラットで約 24%、サルで約 10%)。尿及び糞中のいずれにおいても、回収された放射能は主に DLin-MC3-DMA の代謝物である DMBA であった。胆管カニューレ処置ラットと非処置ラットにおける尿中排泄を比較したとき、投与した放射能に対する尿中回収率は、胆管カニューレ非処置ラットにて約 33%であったのに対して、胆管カニューレ処置ラットでは約 12%であった。この結果より、¹⁴C-DLin-MC3-DMA 関連成分が胆汁中に排泄され、再吸収された後、腎排泄を受けることが示唆された。ラット及びサルのいずれについても、大部分の ALN-18328 の未変化体は尿又は糞中に排泄されなかった。PEG₂₀₀₀-C-DMG はラット及びサルの尿中には検出されなかった。PEG₂₀₀₀-C-DMG はサルでは主に胆汁より排泄され、投与量の約 44%が糞中へ排泄された。

ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG について、シトクロム P450 (CYP) 阻害、誘導及びトランスポーターを介した相互作用に関する *in vitro* 試験を実施した結果、いずれの成分においても薬物間相互作用の可能性は低いことが示唆された。ALN-18328 は、主要な CYP 分子種 (1A2、2C8、2C9、2C19、2D6 又は 3A4) に対して直接阻害作用も、時間依存的阻害作用も示さなかったが、CYP2B6 に対しては直接阻害作用と時間依存的阻害作用の双方を示した。但し阻害作用を示した濃度は、臨床的影響を及ぼす可能性はないと判断される濃度であった。DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG も、主要な CYP 分子種 (1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 又は 3A4) に対して直接阻害作用も、時間依存的阻害作用も示さなかった。ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は、CYP1A2、CYP2B6 又は CYP3A4 を誘導しなかったが、パチシラン-LNP は、臨床用量をヒトに投与したときに認められる最高血漿中濃度 (C_{max}) (7.15 µg/mL) の約 17 倍、及び定常状態時の平均血漿中濃度 ($C_{avg,ss}$) (0.355 µg/mL) の 340 倍の濃度で CYP2B6 に対して弱い誘導作用を示したが、臨床的影響の可能性は低いと判断された。ALN-18328 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は、主要な CYP 分子種 (1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 又は 3A4) に対して基質とならなかった。DLin-MC3-DMA では、CYP3A4 による軽微な代謝 (約 26%) が認められたが、ラット及びサルを用いた試験では、*in vivo* での主な代謝経路は CYP を介さない加水分解であった。DLin-MC3-DMA は溶解度の制限のため、臨床での C_{max} の約 0.5 倍である 30 µmol/L (19.3 µg/mL) を最高濃度として検討したとき、最高濃度まで CYP の阻害及び誘導を示さなかった。ALN-18328、DLin-MC3-DMA、PEG₂₀₀₀-C-DMG 及び DMBA は、主要なトランスポーター (OATP1B1、OATP1B3、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K) の基質とならなかった。また、これらのトランスポーターに対して、ALN-18328、PEG₂₀₀₀-C-DMG 及び DMBA は、臨床用量を投与したときヒトで認められた濃度 (ALN-18328 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の C_{max} : それぞれ約 7 µg/mL 及び約 5 µg/mL、DMBA の尿中濃度 : 約 7 µg/mL) の約 20~50 倍の濃度まで、阻害を示さなかった。DLin-MC3-DMA は溶解度の制限のため、臨床での血漿中 C_{max} の 0.1 倍以下である 3 µmol/L (1.9 µg/mL) を最高濃度として検討したとき、最高濃度までトランスポーターの阻害は認められなかった。

要約すると、*in vivo* 非臨床試験で用いた動物種及び *in vitro* 試験で検討したヒト並びに動物種を通じて、パチシラン-LNP 成分の分布、代謝及び排泄プロファイルに大きな種差は見られなかった。様々な動物種を用いた分布試験では、パチシラン-LNP を投与したとき大部分の ALN-18328 が肝臓に分布す

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

ることが示唆された。ALN-18328 及び DLin-MC3-DMA は主に代謝により消失すると考えられた。ラット及びサル血中の循環血中には、投与量の 10% 以上に相当する DLin-MC3-DMA の代謝物は検出されなかった。ALN-18328 はエキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼにより、フラグメントの短縮及び各ヌクレオチドへ代謝されると推測された (5)。ラット及びサル血漿中の ALN-18328 のフラグメントは、投与後 1 時間以内のみみられ、未変化体と比べて低い濃度でしか検出されなかった。PEG₂₀₀₀-C-DMG は、*in vitro* 試験よりほとんど代謝を受けないことが示唆され、サルでは、未変化体が胆汁排泄を介して糞中に排泄された。*In vitro* 試験では、いずれの 3 成分においてもヒト特異的な代謝物は認められなかった。

2 分析法

複数の生物学的分析法を用いて、PK、薬力学 (PD) 及び免疫原性 (抗薬物抗体 [ADA]) を評価した。その他の分析法は、探索的目的のために使用した。様々な生体試料中のパチシラン-LNP の 3 種類の成分 (siRNA である ALN-18328 並びに 2 種類の新規脂質である DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG) を定量するため、qualified method として確立した又はバリデートした生物学的分析法を用いた。また、これらの分析法は、げっ歯類に特異的なサロゲート siRNA である AD-18534 の血漿中濃度の測定にも使用した。GLP 試験用の血漿中分析法の開発及びバリデーション試験は、規制当局の分析法バリデーション (Bioanalytical Method Validation, BMV) ガイダンス文書、白書及び業界の慣例 (FDA 及び EMA) に従って実施した。ISR (incurred sample reanalysis ; 実試料再分析) は試料分析時に実施した。PD バイオマーカーの分析には、サル (及びヒト) 血清中総 TTR タンパク濃度を定量した。この定量のために、酵素結合免疫吸着測定 (ELISA) 法を、適宜規制 BMV ガイダンス文書に従いバリデートした。その他の動物種における血清中総 TTR 濃度は、qualified method として確立した ELISA キットを用いて測定した。

ADA 分析法は、規制ガイダンス文書、白書及び業界の慣例 (FDA 及び EMA) に従ってバリデートした。本 ADA 分析法は、新規成分である PEG₂₀₀₀-C-DMG に特異的な抗体を測定するように設定した。本分析法の試料分析には、カットポイント値に基づいて ADA 陽性のスクリーニング及び確認を行った後、ADA 抗体価を測定する、段階的アプローチを実施した。ラットを用いた GLP 非適用試験で使用した初期の ELISA 法は、カットポイントを用いず、投与前後で測定した吸光度 (OD) 比が 2 以上を示した場合、IgG 又は IgM に対する ADA 陽性と判定した。

探索的目的のためのその他の分析として、血漿補体 C3a 及び Bb フラグメントの分析には市販の ELISA キットを、血漿及び血清中サイトカインの分析には Luminex マルチプレックスプラットフォームを使用した。血清中トリヨードサイロニン (T3) 及びサイロキシシン (T4) 等の副次的バイオマーカーは RIA (ラジオイムノアッセイ) 法を用いて測定した。非臨床試験での血清中総ビタミン A/レチノール濃度は HPLC 法を用いて測定した。いずれの分析法でも許容基準を満たしており、各分析対象物質

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

に適した定量法であった。タンパク結合及び（ALN-18328 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の）推定代謝物測定には、探索的分析法を開発し使用した。

2.1 分析法

非臨床薬物動態試験及び TK 評価を行った毒性試験に用いた用量は、遊離酸ではなく、siRNA のナトリウム塩として換算した ALN-18328 濃度に基づいて設定した。これらの用量は、補正係数 0.94 を乗じることでそれぞれの遊離酸当量の用量に換算できる。投与液は、実濃度（分析証明書の記載値）又は名目濃度（2 mg/mL）に基づいて試験実施施設にて調製した。TK 評価を実施した主要な毒性試験での用量については、ナトリウム塩当量及び遊離酸当量を記載した（2.6.6, 表 2 参照）。

2.2 薬物動態評価に用いた分析法

PK パラメータ評価のため、血漿、尿、組織及びその他の試料中の siRNA である ALN-18328（又は AD-18534）、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の定量法について、以下に簡単に記載する。なお、バリデートした種々の分析法における、定量範囲、定量下限（LLOQ）、真度及び精度、及び判定基準を表 5 に要約した。非臨床薬物動態試験に用いたラット、ウサギ及びサル血漿中の ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG に関して ISR を実施した。規制当局の要件に基づき、対象となる試験の分析済み試料を再分析した。分析判定基準は、再分析したすべてのサンプルのうち、67% 以上の試料において元の測定値との乖離度が 20% 以内であることとした。ISR の結果は表 6 に示すようにすべて基準を満たした。ISR の結果は分析試験法報告書に記載し、表 5 に示した試験法の妥当性を裏付けた。ISR の結果により、バリデートした分析法の分析再現性は許容範囲内であることが示された。

2.2.1 siRNA 及びその代謝物の定量法

(CTD: 4.2.2.1-1, TSLS10-135、CTD: 4.2.2.1-2, TSLS10-136、CTD: 4.2.2.1-3, TSLS13-131、
CTD: 4.2.2.1-4, TSLS15-065、CTD: 4.2.2.1-5, TSLS15-159)

パチシラン-LNP の開発中にて、目的に合わせて様々な分析法を用いて異なる生体試料中の ALN-18328 濃度を測定した。これらの分析法には利点と欠点があった。そのため、以下に記載したようにパチシラン-LNP の開発過程の進展に応じて新規測定法を開発した。

使用した分析法は、結合を利用した分析法分析法及び結合を伴わないクロマトグラフィー法の 2 種に大別される。結合に基づく分析法として、ハイブリダイゼーション ELISA（S1 ヌクレアーゼ保護分析）法、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応定量（RT-qPCR）法、Atto 又はペプチド核酸（PNA）プローブ蛍光 HPLC 法（二本鎖 siRNA 薬物の相補的標的アンチセンス鎖にプローブ又はプライマーが結合することに基づく）が用いられた。結合を伴わないクロマトグラフィー法として、液体クロマトグラフィー/紫外可視分光検出（HPLC-UV）法、LC-MS/MS 法及び LC/MS-HRAM 法が用いられた。

siRNA（パチシラン-LNP 中の ALN-18328 又は AF-011-18534 中の AD-18534）は、バリデートした又は qualified method として確立した Atto プローブ蛍光 HPLC 法、LC-MS/MS 法及び LC/MS-HRAM 法を用

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

いて定量した。バリデーション試験では、真度及び精度（分析単位内及び分析単位間）、選択性、標準物質及び内部標準物質の回収率（質量分析法のみ）、定量範囲及び感度（LLOQ）、キャリアオーバー、再測定時の再現性、希釈直線性、及び安定性（凍結融解、ベンチトップ、長期、標準原液及び処理試料中）を評価した。

PNA プローブ蛍光 HPLC 法、ハイブリダイゼーション ELISA 法及び RT-qPCR 法は、その他の探索的
目的のため開発した。各 siRNA 分析法を以下に記載した。

探索的分析法（バリデートされていない分析法）

HPLC-UV 法

核酸を HPLC により分離し紫外可視分光検出器で直接検出した。本分析法は限られた試験にのみ使用した。

ハイブリダイゼーション ELISA 法

本ハイブリダイゼーション ELISA 法は、固定化した相補的蛍光プローブと siRNA の標的アンチセンス鎖との結合を利用した分析法であり、S1 ヌクレアーゼの分解を受けない二本鎖として存在する標的
分析対象物を測定した。本分析法は初期段階の試験にて使用した。

RT-qPCR 法

本 RT-qPCR 法はステムループプライマーを結合させ、PCR 法により標的アンチセンス鎖を増幅させる方法である。本分析法は完全長標的オリゴヌクレオチド及び一部の代謝物を検出し、一般的にクロマトグラフィー法より感度が高く、ハイスループットである。本分析法は限られた試験にのみ使用した。

PNA プローブ蛍光 HPLC 法

本 PNA プローブ法は、蛍光プローブハイブリダイゼーションと HPLC による標的二本鎖（アンチセンス鎖：PNA プローブ）の分離を組み合わせた分析法であり、一般的に結合を伴わないクロマトグラフィー法より感度が高い。本分析法を用いて完全長及び一部の代謝物を含む二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖を測定した。リン酸化及び非リン酸化アンチセンス鎖を区別することが可能であった。

In vitro 代謝安定性及び代謝プロファイリングに用いた分析法：

C57BL/6 マウス、Sprague-Dawley ラット、サル及びヒト由来のプールした血清及び肝 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝安定性試験では、定性的 LC/MS-HRAM 法を使用した。ALN-18328（遊離 siRNA 二本鎖）を血清又は肝 S9 画分とともにインキュベートし、様々な時点にてサンプリングし、抽出後、完全長アンチセンス鎖及びセンス鎖を分析した。*In vitro* 代謝プロファイル（Met ID）の評価のため、安定性試

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

験で得られた試料中のアンチセンス鎖及びセンス鎖由来の代謝物を分析した。ALN-18328 の両鎖由来の完全長オリゴヌクレオチド及び代謝物は、デコンボリューションソフトウェアを用いて同定した。

In vivo 代謝プロファイリングに用いた分析法

ラット血漿、尿、及び肝臓中での *in vivo* 代謝プロファイリングは、*in vitro* の評価に用いたものと同様の定性的 LC/MS-HRAM 法を用いて評価した。ラットにパチシラン-LNP を投与後の様々な時点での血漿、尿及び肝臓試料を分析し、ALN-18328 の完全長アンチセンス鎖及びセンス鎖あるいは潜在的な代謝物を同定した。

肝 *TTR* mRNA の定量 (分岐 DNA) :

初期段階の試験において、薬力学的 (PD) 作用である肝臓中の *TTR* mRNA の減少は、探索的分析法を用いて評価した。肝臓中の mRNA は、*TTR* 及び *GAPDH* にそれぞれ特異的なプローブを用いた分岐 DNA 分析法 (QuantiGene Reagent System, Panomics, Fremont, CA) を用いて定量した。凍結肝臓組織を粉碎及び溶解し、得られた肝溶解液中の *GAPDH* の mRNA 発現量に対する相対的な *TTR* mRNA 発現量を測定した。QuantiGene アッセイ (Genospectra) を用い、製造業者の使用手順書に従って組織溶解液中の mRNA (各 3 例) を測定した。各試料中の *TTR* mRNA 発現量の平均値は *GAPDH* の mRNA 発現量の平均値で補正した。さらに、得られた *TTR*/*GAPDH* 比の群平均値は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 投与群の平均値で補正し、相対的 *TTR* mRNA の発現量を算出した。

バリデートした分析法 (表 5) :

Atto プローブ蛍光 HPLC 法

本 Atto プローブ蛍光 HPLC 法は、蛍光プローブハイブリダイゼーションと HPLC による標的二本鎖 (アンチセンス鎖 : Atto プローブ) の分離を組み合わせた分析法であり、一般的に結合を伴わないクロマトグラフィー法より感度が高い測定法である。本分析法を用いて、完全長及び一部の代謝物を含む二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖を測定した。

本分析法は、蛍光プローブを利用することで感度を向上させた。プローブは完全長アンチセンス鎖及び代謝物のいずれにも結合するが、HPLC により完全長アンチセンスと代謝物を分離することが可能であった。

LC-MS/MS 法

LC-MS/MS 法を用いて、親イオンに対する娘イオンの質量/電荷比 (m/z) より、特定のイオン遷移を分析した。本測定法は、ALN-18328 及び AD-18534 のアンチセンス鎖及びセンス鎖の両方を同時に検出することが可能であった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

LC/MS-HRAM 法

LC/MS-HRAM 法を用いて、完全なアンチセンス鎖及びセンス鎖の質量/電荷比 (m/z) をそれぞれ検出し、アンチセンス鎖及びセンス鎖の両方を同時に分析することが可能であった。本分析法は特異的であり、完全長アンチセンスと代謝物を区別することが可能であった。

2.2.2 DLin-MC3-DMA 及びその代謝物の定量法

(CTD: 4.2.2.1-6, TSLS13-132、CTD: 4.2.2.1-7, TSLS10-039、CTD: 4.2.2.1-8, TSLS15-067、
CTD: 4.2.2.1-9, TSLS10-040、CTD: 4.2.2.1-10, TSLS11-042)

種々の生体試料中のDLin-MC3-DMA及びその尿中代謝物であるDMBA[4-(dimethylamino) butyric acid]は、qualified methodとして確立した又はバリデートしたLC-MS/MS法を用いて定量した。本分析法では、タンパク除去後の試料を用いてMS/MS遷移を分析した。バリデーション試験では、真度及び精度(分析単位内及び分析単位間)、選択性、標準物質及び内標準物質の回収率、定量範囲及び定量下限(LLOQ)、キャリアオーバー、再測定時の再現性、希釈直線性及び安定性(凍結融解、ベンチトップ、長期、標準原液及び処理試料中)を評価し、バリデートした。

また、探索的目的のために類似のLC-MS/MS法も用いられた。

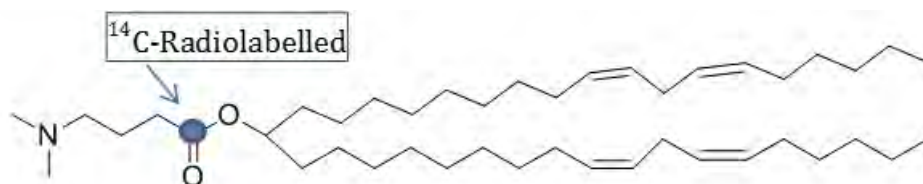
尿中代謝物であるDMBAは、qualified methodとして確立したLC-MS/MS法を用いて定量した。

2.2.3 放射性標識体を用いた生物学的分析法

ラット:

DLin-MC3-DMAを標識化(図1)した¹⁴C-パチシラン-LNPを投与し、生体試料中の放射能は、そのままの試料、あるいは、燃焼又は抽出処理後の試料を用い、液体シンチレーションカウンター(LSC)にて測定した。ラット組織中の放射能濃度は定量的オートラジオグラフィー(QWBA)法により測定した。¹⁴C-DLin-MC3-DMAの代謝プロファイリングは、クロマトグラフィー分離後、放射能を測定し、さらにLC-MS/MS法を用いて分析した。

図1 - ラット放射性標識体試験で使用した¹⁴C-DLin-MC3-DMA



サル:

¹⁴C-DLin-MC3-DMA(図1)を用いて標識したパチシラン-LNPを投与し、血漿、尿、糞及び組織中の放射能は、そのままの試料、あるいは、燃焼又は抽出処理後の試料を用い、LSCにより測定した。

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

異なるマトリックス中の ALN-18328、PEG₂₀₀₀-C-DMG および DLin-MC3-DMA の濃度は、LC/MS/MS 法で測定した。尿中 DMBA も LC/MS/MS 法で定量した。

2.2.4 PEG₂₀₀₀-C-DMG 及び代謝物の定量

(CTD: 4.2.2.1-11: TSLS13-130、CTD: 4.2.2.1-12: TSLS10-047、CTD: 4.2.2.1-13: TSLS15-253、
CTD: 4.2.2.1-14: TSLS15-068、CTD: 4.2.2.1-15, TSLS10-048)

様々な生体試料中の PEG₂₀₀₀-C-DMG の定量には、バリデートした又は qualified method として確立した LC-MS/MS 法を用いた。本分析法では、タンパク質の沈殿抽出後 MS/MS 遷移を分析した。バリデーション試験では、真度及び精度（分析単位内及び分析単位間）、選択性、標準物質及び内部標準物質（質量分析法のみ）の回収率、定量範囲及び感度（LLOQ）、キャリアオーバー、再測定時の再現性、希釈直線性、及び安定性（凍結融解、ベンチトップ、長期、標準原液及び処理試料）を評価し、バリデートした。

探索的目的のため類似の LC-MS/MS 法も使用した。PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝物の定量のためにも LC-MS/MS 法を開発した。

2.3 総 TTR の薬学的測定

(CTD: 4.2.2.1-16, ■■■ 302834)

血清中総 TTR タンパク質濃度は ELISA 法を用いて定量した。抗ヒト TTR ポリクローナル抗体を捕捉及び検出抗体として使用した。本分析法は、サル（及びヒト）試料分析のために ELISA 法を開発しバリデートした。

総 TTR ELISA 法のバリデーション試験では、特異性/選択性、真度及び精度（分析単位内及び分析単位間）、感度、定量範囲、希釈直線性（平行性）、及び試料の安定性（凍結融解、ベンチトップ、短期及び長期）を評価し、バリデートした。

探索的目的のためのマウス及びラット試料中の TTR の分析には、市販の ELISA キットを用いた。

2.4 抗薬物抗体（ADA）分析法

(CTD: 4.2.2.1-17, ■■■ 281821、CTD: 4.2.2.1-18, ■■■ 281818)

パチシラン-LNP は、パチシラン原薬 (ALN-18328)、PEG₂₀₀₀-C-DMG (PEG)、DLin-MC3-DMA (MC3)、中性脂質成分 DSPC 及びコレステロールを含む複合脂質ナノ粒子である。一般に PEG 含有バイオ製剤の投与、及び食品添加物や化粧品を通じて PEG の曝露を受けた人に、PEG が抗体産生を誘発することが知られている(6)。パチシラン-LNP のパーティクル表面にある PEG₂₀₀₀-C-DMG の免疫原性を評価するため、PEG₂₀₀₀-C-DMG に特異的な抗薬物抗体 (ADA) 分析法を開発した。この ADA 産生を評価するため、PEG₂₀₀₀-C-DMG に対する IgM と IgG 抗体の両方を測定した。陽性対照の ADA は、PEG₂₀₀₀-C-DMG (PEG) 及びパチシラン-LNP のいずれによっても競合的に阻害されたことから、本分析法が ADA 検出に適した方法であることを示した。

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

ラット及びサル血清中の免疫原性評価のために、血清中 ADA (IgM と IgG アイソタイプの両方) 分析用に開発した ELISA 法をバリデートし、PEG₂₀₀₀-C-DMG に特異的な ADA を分析するために用いた。本分析法では、PEG₂₀₀₀-C-DMG をプレートに固相化し、捕捉された ADA を種特異的な抗 IgG/IgM 抗体を用いて検出した。

ラット及びサル試料中の ADA 分析に用いた ELISA 法は、バリデーション試験レポートに記載した通り、開発当時の規制ガイダンス文書、白書及び業界の慣例 (FDA 及び EMA) に従ってバリデートした。最新の分析法のバリデーションについての要件を示すガイダンス及び参考文献を添付する(7,8)。バリデーション試験では、カットポイント (補正係数及びプレート特異的なカットポイント) 及び確認用カットポイント阻害率%を決定した。分析精度 (日内および日間差) 及び感度は、ADA 陽性対照を用いて評価した。分析特異性/選択性、drug tolerance limit (ADA 検出の妨害が認められない最大薬物濃度)、希釈直線性 (プロゾーン現象) 及び安定性も評価し、バリデートした。本分析法は、スクリーニング試験、確認試験、抗体価測定からなる段階的アプローチに従った試料分析のためのバリデーション基準を満たした。

初期段階のラットを用いた試験に使用した探索的 ELISA 法では、投与後と投与前の OD 比が 2 以上を示した場合、IgG 又は IgM に対して ADA 陽性とした。探索的 ELISA 法では上記と同様の基準を用いた。

2.5 その他の分析法

(CTD: 4.2.2.1-19, ■■■ 30257、CTD: 4.2.2.1-20, ■■■ 27873、CTD: 4.2.2.1-21, ■■■ 27556、
CTD: 4.2.2.1-22, ■■■ 27813、CTD: 4.2.2.1-23, ■■■ 30250、CTD: 4.2.2.1-24, ■■■ 30271、
CTD: 4.2.2.1-25, ■■■ 27812、CTD: 4.2.2.1-26, ■■■ 30196)

ビタミン A、T3 及び T4 を測定するため、qualified method として確立した又はバリデートしたバイオマーカー分析法を用いた。ビタミン A (総血清レチノール) は、タンパク質を沈殿させ、抽出した後、HPLC により分離及び検出した。T3 及び T4 はそれぞれ、市販試薬を用いる特異的な RIA 法により測定した。

サル及びヒト試料中の補体 C3a 及び Bb フラグメントの測定のため、市販キットを用いた ELISA 法をバリデートした。本試験では、選択性、希釈直線性及び平行性、真度及び精度、及び試料安定性についてバリデートした。

サル血漿及び血清中の様々なサイトカイン分析のために、Luminex マルチプレックス法を開発し、バリデートした。各分析対象物に用いられた分析法は表 5 に記載した。Luminex 法は、サル血清中の IL-1RA の分析のためにも開発した。これらの分析法は、選択性、希釈直線性、平行性、真度及び精度、及び試料安定性についてバリデートした。

サル血清中の IFN- α 又は C 反応性タンパク質 (CRP) 分析のため、それぞれ ELISA 法を開発し、バリデートした。これらの分析法は、両分析対象物間の交差反応性、選択性、特異性、希釈直線性及び平行性、真度及び精度、及び試料安定性についてバリデートした。

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

In vitro タンパク結合試験のため、高速タンパク質液体クロマトグラフィー (FPLC) による分離後、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による定量法を開発し、生理学的濃度又は最高可溶濃度(生理学的濃度の約25倍のヒトAAG)でのラット血清アルブミン(RSA)、ヒト血清アルブミン (HSA) 及びヒト α 1 酸性糖タンパク質 (AAG) へのパチシラン-LNP の結合量を測定した。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 5 - 非臨床試験で使用したバリデートされた分析法の概要

Validation Study Number	Species	Biological Matrix (Anticoagulant)	Quantification Range	LLOQ	Inter-assay Accuracy (%Diff)	Inter-assay Precision (%CV)	Studies in Which Method was Used
Method: LC-MS/MS for ALN-18328							
TSL10-135	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	25.0 to 5000 ng/mL	25.0 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-NCD10-005 TTR02-NCD10-006 TTR02-NCD11-002 TTR02-NCD12-003 TTR02-NCD13-003 TTR02-GLP15-031 TTR02-GLP15-035 TTR02-GLP16-003
TSL10-136	Monkey	Plasma (K ₂ EDTA)	25.0 to 5000 ng/mL	25.0 ng/mL	≤20% (≤25% for the LLOQ)	≤20% (≤25% for the LLOQ)	TTR02-NCD10-003 TTR02-NCD10-011 TTR02-NCD10-018 TTR02-NCD12-001 TTR02-NCD13-001 TTR02-DSM16-013 TTR02-GLP17-007
Method: LC-MS-HRAM for ALN-18328							
TSL13-131	Mouse	Plasma (K ₂ EDTA)	25.0 to 1000 ng/mL	25.0 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-GLP15-024
TSL15-065	Rabbit	Plasma (K ₂ EDTA)	20.0 to 20,000 ng/mL	20.0 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-GLP15-034
Method: LC-MS/MS for AD-18534							
TSL15-159	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	40.0 to 4000 ng/mL	40.0 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-GLP15-031 TTR02-GLP15-035 TTR02-GLP16-003

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

Validation Study Number	Species	Biological Matrix (Anticoagulant)	Quantification Range	LLOQ	Inter-assay Accuracy (%Diff)	Inter-assay Precision (%CV)	Studies in Which Method was Used
Method: LC-MS/MS for DLin-MC3-DMA							
TSLS13-132	Mouse	Plasma (K ₂ EDTA)	0.100 to 100 ng/mL	0.100 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-GLP15-024
TSLS10-039	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	0.100 to 100 ng/mL	0.100 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-NCD10-005 TTR02-NCD10-006 TTR02-NCD12-003 TTR02-NCD13-003 TTR02-GLP15-031 TTR02-GLP15-035 TTR02-GLP16-003
TSLS15-067	Rabbit	Plasma (K ₂ EDTA)	0.100 to 100 ng/mL	0.100 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-GLP15-034
TSLS10-040	Monkey	Plasma (K ₂ EDTA)	0.100 to 100 ng/mL	0.100 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-NCD10-003 TTR02-NCD10-011 TTR02-NCD10-018 TTR02-NCD12-001 TTR02-DSM16-013 TTR02-GLP17-007
TSLS11-042	Monkey	Plasma (K ₂ EDTA)	50.0 to 50,000 ng/mL	50.0 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-NCD12-001 TTR02-GLP17-007
Method: LC-MS/MS for PEG ₂₀₀₀ -C-DMG							
TSLS13-130	Mouse	Plasma (K ₂ EDTA)	10.0 to 10,000 ng/mL	10.0 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-GLP15-024

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

Validation Study Number	Species	Biological Matrix (Anticoagulant)	Quantification Range	LLOQ	Inter-assay Accuracy (%Diff)	Inter-assay Precision (%CV)	Studies in Which Method was Used
TSLS10-047	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	5.00 to 5000 ng/mL	5.00 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-NCD10-005 TTR02-NCD10-006 TTR02-NCD12-003 TTR02-NCD13-003 TTR02-GLP15-031 TTR02-GLP15-035 TTR02-GLP16-003
TSLS15-253	Rat	Milk (N/A)	10.0 to 10,000 ng/mL	10.0 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-GLP16-003
TSLS15-068	Rabbit	Plasma (K ₂ EDTA)	10.0 to 10,000 ng/mL	10.0 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-GLP15-034
TSLS10-048	Monkey	Plasma (K ₂ EDTA)	5.00 to 5000 ng/mL	5.00 ng/mL	≤15% (≤20% for the LLOQ)	≤15% (≤20% for the LLOQ)	TTR02-NCD10-003 TTR02-NCD10-011 TTR02-NCD10-018 TTR02-NCD12-001 TTR02-DSM16-013 TTR02-GLP17-007
Method: ELISA for TTR Pharmacodynamic Effect							
302834	Monkey	Serum (N/A)	1.19 to 38.00 ng/mL	1.19 ng/mL	≤ 20%	≤ 20%	TTR02-NCD13-001 TTR02-NCD10-011 TTR02-NCD12-001 TTR02-NCD10-018

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

Validation Study Number	Species	Biological Matrix (Anticoagulant)	Quantification Range	LLOQ	Inter-assay Accuracy (%Diff)	Inter-assay Precision (%CV)	Studies in Which Method was Used
281821	Rat	Serum (N/A)	Method: ELISA for Anti-PEG IgG/IgM (ADA) CF = 0.138 CCP = 53.7% signal inhibition (A450 nm)	N/A	≤25%	≤25%	TTR02-NCD12-003
281818	Monkey	Serum (N/A)	CF = 0.177 CCP = 45.2% signal inhibition (A450 nm)	N/A	≤25%	≤25%	TTR02-NCD12-001 TTR02-NCD13-001
30257	Monkey	Plasma (K ₂ or K ₃ EDTA)	Method: ELISA for Complement C3a 32.06 to 2052 pg/mL	32.06 pg/mL	≤25% (≤30% for the LLOQ and ULOQ)	≤25% (≤30% for the LLOQ and ULOQ)	TTR02-NCD13-001 TTR02-NCD10-011 TTR02-NCD12-001
27873	Monkey	Plasma (EDTA)	Method: ELISA for Complement Bb Fragment 50.03 to 745.00 ng/mL	50.03 ng/mL	≤20% (≤25% for the LLOQ and ULOQ)	≤20% (≤25% for the LLOQ and ULOQ)	TTR-NCD09-004 TTR02-NCD13-001 TTR02-NCD10-011
27556, 27813	Monkey	Serum (N/A)	Method: Multiplex Luminex for Cytokines (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, GM-CSF, IFN-γ) Specific for each cytokine	Specific for each cytokine	≤25% (≤30% for the LLOQ)	≤25% (≤30% for the LLOQ)	TTR-NCD09-004 TTR02-NCD10-011 TTR02-NCD12-001
30250	Monkey	Plasma (K ₂ or K ₃ EDTA)	Method: Multiplex Luminex for Cytokines (IL-1β, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-12/23, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, TNF-α) Specific for each cytokine	Specific for each cytokine	≤25% (≤30% for the LLOQ and ULOQ)	≤25% (≤30% for the LLOQ and ULOQ)	TTR02-NCD13-001

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

Validation Study Number	Species	Biological Matrix (Anticoagulant)	Quantification Range	LLOQ	Inter-assay Accuracy (%Diff)	Inter-assay Precision (%CV)	Studies in Which Method was Used
■ 30271	Monkey	Serum (N/A)	Method: Luminex for Cytokine IL-1RA 439.06 to 28100.00 pg/mL	439.06 pg/mL	≤25% (≤30% for the LLOQ and ULOQ)	≤25% (≤30% for the LLOQ and ULOQ)	TTR02-NCD10-011 TTR02-NCD12-001
■ 27812	Monkey	Serum (N/A)	Method: ELISA for Cytokine IFN-α 12.50 to 800.00 pg/mL	12.50 pg/mL	≤25% (≤30% for the LLOQ and ULOQ)	≤25% (≤30% for the LLOQ and ULOQ)	TTR-NCD09-004 TTR02-NCD10-011 TTR02-NCD12-001
■ 30196	Monkey	Serum (N/A)	Method: ELISA for C-reactive Protein (CRP) 2.34 to 200.00 ng/mL	2.34 ng/mL	≤25%	≤25%	TTR02-NCD10-011

Abbreviations: CCP=confirmatory cut-point; CF=cut-point factor; CV=coefficient of variance; EDTA=ethylenediaminetetraacetic acid; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; LC-HRAM=liquid chromatography high-resolution accurate mass spectrometry; LC-MS/MS=liquid chromatography tandem mass spectrometry; LLOQ=lower limit of quantification.

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 6 - 実試料再分析 (ISR) の概要

Validation Report Number	Method	Species/ Matrix	Analyte	Bioanalytical Study Number	Study Number	Samples Passed/ Samples Tested	Passing Rate (%)	Criteria
TSL13-131	LC-MS-HRAM	Mouse plasma	ALN-18328	TSL16-078	TTR02-GLP15-024 (████ 5001193)	Not completed	NA	NA
TSL13-132	LC-MS/MS	Mouse plasma	DLin-MC3-DMA	TSL16-078	TTR02-GLP15-024 (████ 5001193)	Not completed	NA	NA
TSL13-130	LC-MS/MS	Mouse plasma	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	TSL16-078	TTR02-GLP15-024 (████ 5001193)	Not completed	NA	NA
TSL10-135	LC-MS/MS	Rat plasma	ALN-18328	TSL10-042	TTR02-NCD10-005 (████ 503491)	46/49	93.9	67% within ±20%
TSL10-135	LC-MS/MS	Rat plasma	ALN-18328	TSL12-112	TTR02-NCD12-003 (████ 504264)	Not completed	NA	NA
TSL10-039	LC-MS/MS	Rat plasma	DLin-MC3-DMA	TSL10-042	TTR02-NCD10-005 (████ 503491)	34/42	81.0	67% within ±20%
TSL10-039	LC-MS/MS	Rat plasma	DLin-MC3-DMA	TSL12-112	TTR02-NCD12-003 (████ 504264)	27/31	87.1	67% within ±20%
TSL10-047	LC-MS/MS	Rat plasma	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	TSL10-042	TTR02-NCD10-005 (████ 503491)	21/21	100	67% within ±20%
TSL10-047	LC-MS/MS	Rat plasma	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	TSL12-112	TTR02-NCD12-003 (████ 504264)	24/24	100	67% within ±20%
TSL15-065	LC-MS-HRAM	Rabbit plasma	ALN-18328	TSL16-010	TTR02-GLP15-034 (████ 20050745)	18/20	90.0	67% within ±20%
TSL15-067	LC-MS/MS	Rabbit plasma	DLin-MC3-DMA	TSL16-010	TTR02-GLP15-034 (████ 20050745)	23/23	100	67% within ±20%
TSL15-068	LC-MS/MS	Rabbit plasma	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	TSL16-010	TTR02-GLP15-034 (████ 20050745)	25/25	100	67% within ±20%

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

Validation Report Number	Method	Species/ Matrix	Analyte	Bioanalytical Study Number	Study Number	Samples Passed/ Samples Tested	Passing Rate (%)	Criteria
TSL10-136	LC-MS/MS	Monkey plasma	ALN-18328	TSL10-051	TTR02-NCD10-011 (████ 504210)	61/65	93.8	67% within ±20%
TSL10-136	LC-MS/MS	Monkey plasma	ALN-18328	TSL13-069	TTR02-NCD13-001 (████ 5000132)	21/25	84.0	67% within ±20%
TSL10-040	LC-MS/MS	Monkey plasma	DLin-MC3-DMA	TSL10-051	TTR02-NCD10-011 (████ 504210)	44/59	74.6	67% within ±20%
TSL11-042	LC-MS/MS	Monkey plasma	DLin-MC3-DMA	TSL12-073	TTR02-NCD12-001 (████ 504265)	52/70	74.3	67% within ±20%
TSL10-048	LC-MS/MS	Monkey plasma	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	TSL10-051	TTR02-NCD10-011 (████ 504210)	41/47	87.2	67% within ±20%

Abbreviations: █████ LC-MS-HRAM=liquid chromatography/mass spectrometry – high-resolution accurate mass; LC-MS/MS=liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA=not applicable. Not completed, ISR was not done due to insufficient qualified samples.

3 吸収

パチシラン-LNP の投与経路は静脈内投与であるため、吸収相は存在しない。

本項では、パチシラン-LNP を構成する siRNA (ALN-18328) 及び新規脂質 (DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG) の PK 及び TK パラメータについて要約する。非臨床試験で使用した動物種に静脈内投与 (ボーラス又は持続投与) したときの PK 及び TK パラメータを推定した。ラット及びサルでは PK 及び TK パラメータの両方を算出したのに対して、マウス及びウサギでは TK パラメータのみを算出した。これらの試験について動物種ごとに以下で要約する。

PK 及び TK パラメータは、適格性が確認された薬物動態解析ソフトウェアである WinNonlin (Pharsight Corp., Mountain View, CA) を用いて推定した。パラメータの推定にはノンコンパートメント法を使用した。本項では、C_{max}、t_{max}、AUC、t_{1/2}、CL 及び V_{ss} などのパラメータ推定値を記載し、適宜他のパラメータも記載した。また、記述統計量も適宜算出した。

3.1 パチシラン-LNP 投与後の薬物動態及びトキシコキネティクス

マウスにパチシラン-LNP を静脈内ボーラス投与、及びマウス、ラット、ウサギ、サルに静脈内持続投与した後、siRNA (ALN-18328)、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG をそれぞれ測定し、各成分の PK 及び TK プロファイルを評価した。各動物種における詳細な結果を個々の試験別に以下に示す。

3.1.1 マウスにおける血漿中トキシコキネティクス

マウスを用いた用量設定試験 (2 試験) 及び TgRasH2 マウスを用いた 26 週間がん原性試験にて、パチシラン-LNP を構成する siRNA (ALN-18328) 及び新規脂質 (DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG) の血漿中 TK パラメータを推定した。これらの実施した試験の一覧を表 7 に示した。

本項では、マウスにおけるパチシラン-LNP 成分の代表的な PK 挙動として、TTR02-NCD14-003 の TK の結果のみを記載した。その他の 2 試験における TK の結果は 2.6.6 「毒性試験の概要文」に要約した。

表 7 - マウスを用いて実施した TK 試験

Study # (Tabular Summary)	Purpose (Dose Regimen)	Species	Administration	Dose Levels (mg/kg) Tested
TTR02-NCD14-003 (表 2.6.5.4.A)	TK from non-GLP DRF study (q2w x4)	Mouse (C57BL/6)	Patisiran-LNP IV bolus	0.3, 1, 3 and 10 mg/kg
			AF-011-18534 IV bolus	1 mg/kg
TTR02-NCD14-004 (表 2.6.5.4.B)	TK from non-GLP DRF study (q2w x5)	Mouse (wt and TgRasH2 hemizygous)	Patisiran-LNP IV bolus	1, 3, and 6 mg/kg
			AF-011-18534 IV bolus	3 mg/kg

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

Study # (Tabular Summary)	Purpose (Dose Regimen)	Species	Administration	Dose Levels (mg/kg) Tested
TTR02-GLP15-024 (表 2.6.5.4.C)	TK from definitive TgRasH2 carcinogenicity study (q2w x14)	Mouse (TgRasH2 hemizygous mouse)	Patisiran-LNP IV bolus	0.5, 2, and 6 mg/kg

Abbreviations: DRF=dose range-finding; GLP=Good Laboratory Practice; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; q2w=once every two weeks; TK=toxicokinetic(s).

3.1.1.1 C57BL/6 マウスを用いた 6 週間反復 (q2w×4) 静脈内投与用量設定毒性試験

(CTD: 4.2.3.4.2-1, TTR02-NCD14-003)

本試験では、後に実施したマウスを用いた用量設定試験及びピボタルながん原性試験の用量を設定するために、マウスにパチシラン-LNP を投与したときの毒性作用及び TK を評価した。C57/BL6 マウスにパチシラン-LNP を 0.3、1、3 及び 10 mg/kg の用量で 2 週毎に 4 回 (q2w×4) 反復静脈内ボラス投与した。また、パチシラン-LNP はげっ歯類では薬理学的活性を示さないため、マウス/ラットで薬理学的活性を示すサロゲート製剤である AF-011-18534 (1 mg/kg) を 1 群のマウスに q2w×4 投与した。なお AF-011-18534 はげっ歯類に特異的な siRNA である ALN-18534 を ALN-18328 の代わりに含有する以外はパチシラン-LNP と同じ処方調製した。AF-011-18534 と ALN-18328 の TK パラメータは類似していた。

ALN-18328 :

C57BL/6 系マウスにパチシラン-LNP を反復 (q2w×4) 静脈内ボラス投与したときの ALN-18328 の血漿中 TK パラメータ推定値を以下の表 8 に示した。

表 8 - マウスにパチシラン-LNP を反復 (q2w×4) 静脈内ボラス投与したときの 1 日目及び 43 日目における ALN-18328 の血漿中 TK パラメータ (雄性マウスの平均値)

Dose (mg/kg)	0.3		1.0		3.0		10.0	
	Day 1	Day 43	Day 1	Day 43	Day 1	Day 43	Day 1	Day 43
C _{max} (µg/mL)	2.34	0.323	9.90	10.1	18.1	3.05	215	244
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	1.07	0.319	5.58	4.67	8.67	7.21	172	129

Abbreviations: AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve calculated from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) concentration; LNP=lipid nanoparticle; q2w=once every two weeks; TK=toxicokinetic(s).

用量 0.3、1、3 又は 10 mg/kg を反復 (q2w×4) 静脈内ボラス投与したとき、初回投与後 (1 日目) 又は反復投与後 (43 日目) の血漿中 ALN-18328 濃度は投与後 0.083 時間に最高値を示し、投与後 2 時間までに 5% 未満まで速やかに低下した後、多相性の濃度推移を示して緩徐に低下した。ALN-18328 の血漿中曝露量 (AUC_{0-t}) は、検討した用量範囲では用量比以上又は用量に比例して増加し、1 日目で 1.07~172 µg•h/mL、43 日目で 0.319~129 µg•h/mL であった。結論として、43 日目の ALN-18328 の血漿

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

中曝露量は、1日目と比較して同程度あるいは減少傾向にあり、反復投与による ALN-18328 の蓄積は認められなかった。

DLin-MC3-DMA :

用量 0.3、1、3 又は 10 mg/kg をマウスに反復 (q2w×4) 静脈内ボラス投与したとき、初回投与後 (1日目) 又は反復投与後 (43日目) の血漿中 DLin-MC3-DMA 濃度は投与後 0.083 時間に最高値を示した後、多相性の濃度推移を示して低下した ($t_{1/2\beta}$: 51~142 時間) (表 9)。全用量群を通して、1日目及び 43日目の血漿中 DLin-MC3-DMA 濃度は、43日目のトラフ濃度を含めて、投与後 336 時間 (最終血漿試料採取時点) まで定量可能であった。用量 0.3、1、3 又は 10 mg/kg のパチシラン-LNP を反復 (q2w×4) 静脈内投与したときの DLin-MC3-DMA の血漿中曝露量は、1日目及び 43日目のいずれについても、用量にほぼ比例して増加した。また、反復投与後の血漿中曝露量は初回投与後と同程度であった。以上より、反復投与による DLin-MC3-DMA の蓄積は認められなかった。

表 9 - マウスにパチシラン-LNP を反復 (q2w×4) 静脈内ボラス投与したときの 1日目及び 43日目における DLin-MC3-DMA の血漿中 TK パラメータ (雄性マウスの平均値)

Dose (mg/kg)	0.3		1.0		3.0		10.0	
	Day 1	Day 43	Day 1	Day 43	Day 1	Day 43	Day 1	Day 43
C_{max} (µg/mL)	16.3	7.15	25.5	22.6	299	23.3	2010	1410
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	41.9	59.9	108	184	428	339	2690	2080

Abbreviations: AUC_{0-t} =area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} =maximum (peak) concentration; LNP=lipid nanoparticle; q2w=once every two weeks; TK=toxicokinetics(s).

PEG₂₀₀₀-C-DMG :

用量 0.3、1、3 又は 10 mg/kg のパチシラン-LNP をマウスに反復 (q2w×4) 静脈内投与したとき、初回投与後 (1日目) 又は反復投与後 (43日目) の血漿中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は投与後 0.083~0.5 時間に最高値を示した後、多相性の濃度推移を示して低下した。全用量群を通して、1日目及び 43日目の血漿中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は投与後 24 時間まで定量可能であった (表 10)。PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中曝露量は、1日目及び 43日目のいずれについても検討した用量範囲で用量にほぼ比例して増加し、反復投与後の血漿中曝露量は初回投与後と同程度であったことから反復投与による PEG₂₀₀₀-C-DMG の蓄積は認められなかった。半減期は概して約 5 時間であり、最高用量 (10 mg/kg) では約 8 時間であった。1日目及び 43日目の全身クリアランス及び分布容積はすべての用量群で小さかった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 10 - マウスにパチシラン-LNP を反復 (q2w×4) 静脈内ボラス投与したときの 1 日目及び 43 日目における PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中 TK パラメータ (雄性マウスの平均値)

Dose (mg/kg)	0.3		1.0		3.0		10.0	
	Day 1	Day 43	Day 1	Day 43	Day 1	Day 43	Day 1	Day 43
C _{max} (µg/mL)	2.31	3.23	6.94	4.95	29.5	15.5	112	126
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	5.05	8.56	18.6	23.1	84.3	56.6	338	228

Abbreviations: AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) concentration; TK=toxicokinetic(s).

3.1.2 Sprague-Dawley ラットにおける血漿中薬物動態及びトキシコキネティクス

パチシラン-LNP を構成する siRNA (ALN-18328) 及び新規脂質 (DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG) の Sprague-Dawley ラットにおける血漿中 PK 及び TK パラメータを推定した。これらの実施した PK 及び TK 試験の一覧を表 11 に示す。TTR02-NCD10-006 試験の PK の結果及びラットにおけるパチシラン-LNP 反復投与後の代表的な PK として TTR02-NCD10-005 試験の TK の結果を以下に要約した。その他の試験における TK の結果は、4.3 項及び 8 項に要約した。すべての TK の結果は 2.6.5 「薬物動態試験概要表」及び 2.6.6 「毒性試験の概要文」を参照とする。

表 11 - Sprague-Dawley ラットを用いて実施した PK 及び TK 試験

Study # Section (Tabular Format)	Purpose	Administration	Dose Levels (mg/kg) Tested
TTR02-NCD14-001 8.2 項 (表 2.6.5.4.G)	Non-GLP repeat-dose subcutaneous TK (q2w x7 or q3w x7)	Patisiran-LNP SC injection	0.3, 1, and 10 mg/kg
TTR02-NCD10-006 4.2.1 項 (表 2.6.5.3.B)	Non-GLP single dose PK	Patisiran-LNP IV bolus	0.03, 0.3, and 1.0 mg/kg
TTR02-NCD10-005 3.1.2 項 (表 2.6.5.4.D)	TK from GLP repeat-dose 4-dose toxicity study. (q2w x4)	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion	0.15, 0.8, 1.8, and 3.0
TTR02-NCD11-002 (表 2.6.5.4.E)	TK from GLP 2-dose toxicity study (q4w x2)	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion	0.1, 0.3, and 1.0
TTR02-NCD12-003 (表 2.6.5.4.F)	TK from GLP 26-week toxicity study	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion	0.03, 0.1, and 0.3

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

Study # Section (Tabular Format)	Purpose	Administration	Dose Levels (mg/kg) Tested
TTR02-GLP15-035 (表 2.6.5.7.A)	TK from a GLP reproductive toxicity study in male rats	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion	0.03, 0.1, and 0.3
		AF-011-18534 1-hour IV infusion	0.1
TTR02-NCD13-003 4.3.1項 (表 2.6.5.7.B)	TK from GLP dose range-finding reproductive toxicity study	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion	0.03, 0.1, 0.3, and 1.0
		AF-011-18534 (rat-specific siRNA in AF-011 formulation) 1-hour IV infusion	0.3 and 1.0
TTR02-DSM15-015 4.3.2項 (表 2.6.5.7.C)	TK from non-GLP DRF embryo-fetal study	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion	1.5
		AF-011-18534 1-hour IV infusion	0.15, 0.5, and 1.5
TTR02-GLP15-031 (表 2.6.5.7.D)	TK from GLP embryo-fetal study	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion	0.15, 0.5, and 1.5
		AF-011-18534 1-hour IV infusion	1.5
TTR02-GLP16-003 4.3.3項 (表 2.6.5.7.E)	TK from GLP peri- and postnatal study	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion	0.15, 0.5 and 1.5
		AF-011-18534 1-hour IV infusion	1.5

Abbreviations: GLP=Good Laboratory Practice; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; NA=not applicable; PK=pharmacokinetic(s); q2w=once every two weeks; q3w=once every three weeks; q4w=once every four weeks; TK=toxicokinetic(s).

3.1.2.1 ラットにおける静脈内投与試験

3.1.2.1.1 Sprague-Dawley ラットを用いた単回静脈内投与薬物動態試験

(CTD: 4.2.2.3-2, TTR02-NCD10-006)

本試験では、ラットにパチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与したときの PK を評価するため、Sprague-Dawley ラット（1 群当たり雌雄各 20 例）にパチシラン-LNP を 0.03、0.3 及び 1 mg/kg の用量で投与した。さらに、血漿中に遊離した siRNA 濃度を評価するため、雌雄各 8 例のラットに用量 1 mg/kg のパチシラン-LNP を投与した。血液試料（1 時点当たり雌雄各 2 例）は、投与後 0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24、48、96、168、240、336、504、672 及び 1440 時間に採取した。

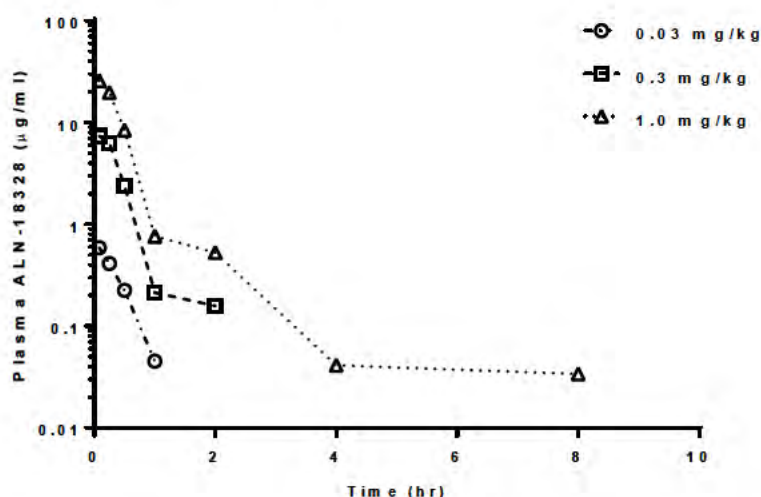
Sprague-Dawley ラットに用量 0.03～1 mg/kg のパチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与したときの siRNA である ALN-18328 の血漿中 ALN-18328 濃度-時間推移を評価し、血漿中 PK パラメータを推定した。

ALN-18328 :

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

血漿中 ALN-18328 濃度は初回試料採取時点に最高値を示した後、多相性（三相性）の濃度推移を示して低下した（図2）。

図2- ラットにパチシラン-LNP を静脈内ボラス投与したときの血漿中 ALN-18328 濃度-時間推移（平均値、雌雄統合）^a



^a 性差は認められなかったため、雌雄を統合した平均値を示す。なお、試験報告書では雌雄別で平均値を示す。

PK データについて、明らかな性差が認められなかったため、雌雄を統合した結果を表 12 に示した。ALN-18328 の血漿中曝露量 (C_{max} 及び AUC) は用量にほぼ比例して増加した。ALN-18328 のクリアランスは約 72~99 mL/hr/kg であり、定常状態における分布容積 (V_{ss}) は約 28~36 mL/kg であった。ALN-18328 の見かけの終末相消失半減期は約 0.3~0.44 時間と短かった。一部の動物については、消失相における定量下限以上の濃度が得られた時点数が十分でなかったため、 $t_{1/2\beta}$ を算出できなかった。

表 12 - Sprague-Dawley ラットにパチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与したときの ALN-18328 の PK パラメータ（平均値、雌雄統合）

Dose (mg/kg)	0.03	0.3	1.0
C_{max} (µg/mL)	0.591	7.40	25.9
$t_{1/2\beta}$ (h)	0.25	0.29*	0.44*
AUC _{0-t} (µg·h/mL)	0.253	3.71	13.2
CL (mL/hr/kg)	99.0	88.2*	72.3*
V_{ss} (mL/kg)	36.3	27.5*	31.2*

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

* represents values from one sex only (0.3 mg/kg males only; 1 mg/kg females only); $t_{1/2}$ values not reported for animals where elimination phase could not be fully captured.

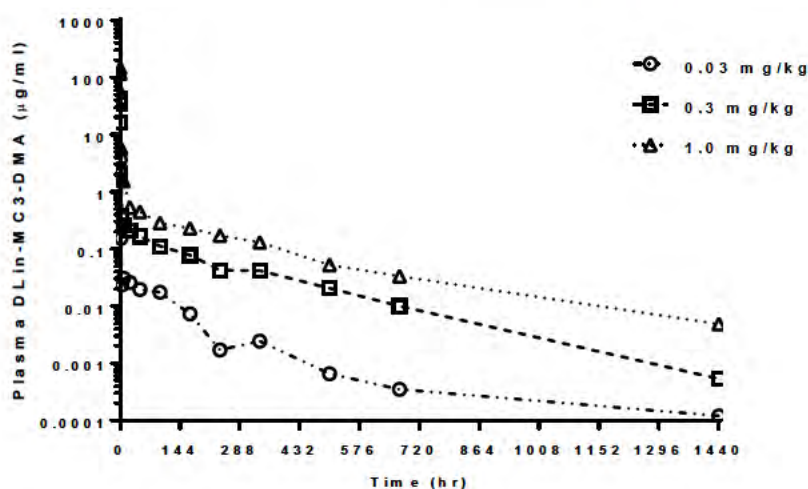
2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

更に、LNP より遊離した siRNA 濃度を測定するため、LNP 構造を破壊せずに遊離型 siRNA のみが透過する Amicon Ultra-4 フィルター（分子量カットオフ 100,000 Da）に血漿試料を供し、200 g で 60 分間遠心分離した。得られた濾液中の ALN-18328 濃度を LC-MS/MS 法（表 5、TSL10-135 試験）を用いて測定した。投与後 24 時間における血漿中の LNP 封入型に対する遊離型の比率から、ALN-18328 は全身循環血中では LNP に封入されたまま安定性を保っていることを確認した。遊離型 ALN-18328 は 1.0 mg/kg 静脈内ボラス投与後の初回試料採取時点にてのみ検出され、LNP 封入型に対する遊離型の比率は約 0.8~1.5%であったことから、全身循環血中の siRNA の 98.5%以上は LNP 封入型として存在することが示唆された。

DLin-MC3-DMA :

ラットにパチシラン-LNP を静脈内ボラス投与したとき、DLin-MC3-DMA は二相性の血漿中濃度—時間推移を示した（図 3）。

図 3- ラットにパチシラン-LNP を静脈内ボラス投与したときの血漿中 DLin-MC3-DMA 濃度—時間推移(平均値、雌雄統合) ^a



^a 性差は認められなかったため、雌雄を統合した平均値を示す。なお、試験報告書では雌雄別で平均値を示す。

パチシラン-LNP を 0.03~1 mg/kg の用量で単回静脈内ボラス投与したときの DLin-MC3-DMA の PK パラメータ推定値を表 13 に示す。血漿中曝露量 (C_{max} 及び AUC) は用量にほぼ比例して増加した。DLin-MC3-DMA の終末相半減期は約 130~267 時間であった。DLin-MC3-DMA の PK パラメータ推定値に明らかな性差は認められなかった。全身クリアランス (約 30 mL/h/kg) は小さく、分布容積 (約 3~5 L/kg) が大きかったことから、DLin-MC3-DMA が全身循環から広範囲に分布することが示された。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 13- ラットにパチシラン-LNP を静脈内ボラス投与したときの DLin-MC3-DMA の血漿中 PK パラメータ
(平均値、雌雄統合)

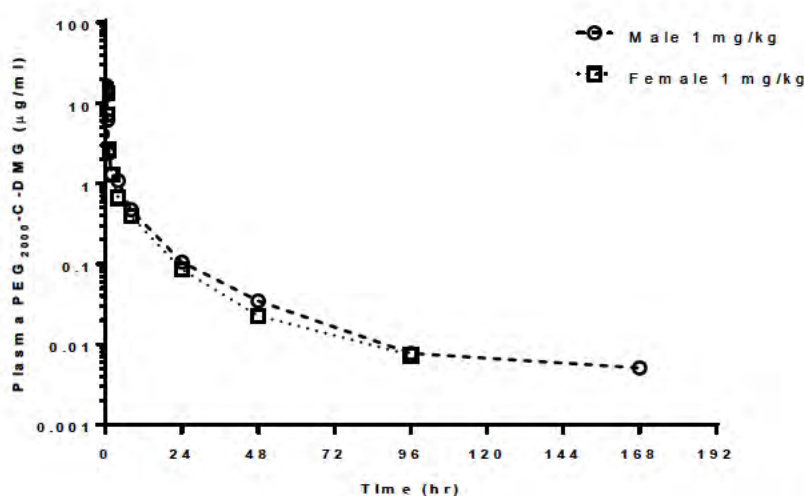
Dose (mg/kg)	0.03	0.3	1.0
C_{max} (µg/mL)	3.63	42.0	146
$t_{1/2\beta}$ (h)	130	192	267
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	6.10	69.0	223
CL (mL/hr/kg)	32.6	29.4	30.1
V_{ss} (mL/kg)	3080	4310	4880

Abbreviations: AUC_{0-t} =area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; CL=total body clearance; C_{max} =maximum (peak) concentration; $t_{1/2\beta}$ =elimination half-life; V_{ss} =volume of distribution at steady state.

PEG₂₀₀₀-C-DMG :

ラットにパチシラン-LNP を静脈内ボラス投与したとき、PEG₂₀₀₀-C-DMG は多相性の血漿中濃度-時間推移を示した (図 4)。

図 4- 雌雄ラットにパチシラン-LNP を静脈内ボラス投与したときの血漿中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度-時間推移



C_{max} 及び AUC は雌雄のラットにて同程度であったことから、曝露量に性差がないことが示された。消失相における定量可能な血漿中濃度データが不足していたため、雄では一部の PK パラメータを推定できなかった (表 14)。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 14 - Sprague-Dawley ラットにパチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与したときの
PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中 PK パラメータ (平均値)

Dose (mg/kg)	1.0 ^a	
	Sex	Female
	Male	Female
$t_{1/2\beta}$ (h)	NR	21.3
t_{max} (h)	0.083	0.083
C_{max} (µg/mL)	16.5	15.1
AUC_{0-t} (µg•h/mL)	23.5	20.6
CL (mL/hr/kg)	NR	36.5
V_{ss} (mL/kg)	NR	304

Abbreviations: AUC_{0-t} =area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; CL=total plasma clearance; C_{max} =maximum (peak) concentration; $t_{1/2\beta}$ =terminal elimination half-life; t_{max} =time to reach maximum (peak) plasma concentration following drug administration; V_{ss} =volume of distribution at steady state.

a There was nothing observed at doses ≤ 1.0 mg/kg; therefore, data are only presented for the 1.0 mg/kg dose group.

3.1.2.1.2 Sprague-Dawley ラットを用いた 6 週間反復 (q2w × 4) 静脈内投与毒性試験
(CTD: 4.2.3.2-1, TTR02-NCD10-005)

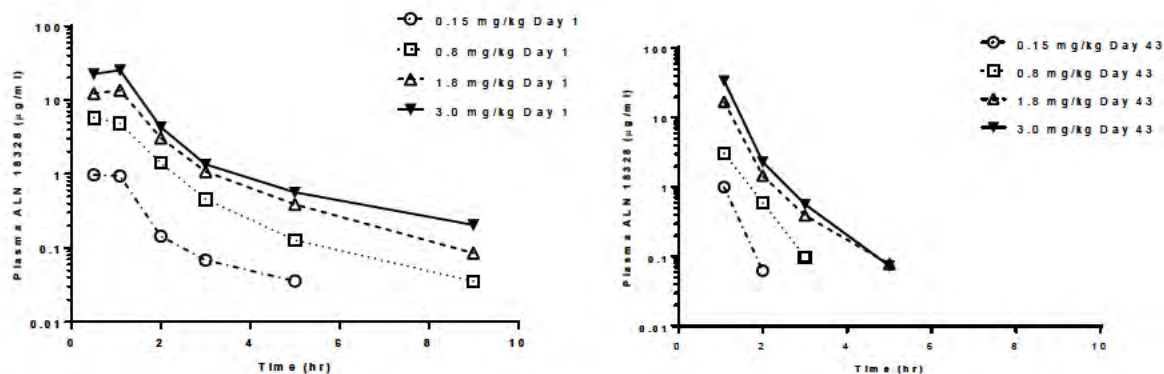
本 GLP 適用試験では、雌雄の Sprague-Dawley ラットにパチシラン-LNP を 0 (PBS) 、0.15、0.8、1.8 又は 3.0 mg/kg の用量で 2 週毎 (1 日目、15 日目、29 日目及び 43 日目) に 1 時間静脈内持続投与 (12 mL/kg/hr) した。TK 評価用ラットは、PBS 投与群 (1 群当たり雌雄各 2 例) 及びパチシラン-LNP 投与群 (1 群当たり雌雄各 14 例) に割り付けた。血液試料は初回投与後 (投与終了後 336 時間まで) 及び 43 日目の最終投与後 (投与終了後 1464 時間まで) に採取した。

ALN-18328:

1 日目及び 43 日目の血漿中 ALN-18328 濃度 (雌雄統合) は、1 時間の持続投与終了時に最高値を示した後、二相性の濃度推移を示して低下した (図 5) 。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

図5- ラットにパチシラン-LNP を1時間静脈内持続投与したときの1日目（左パネル）及び43日目（右パネル）の血漿中 ALN-18328 濃度—時間推移（平均値、雌雄統合）^a



^a 性差は認められなかったため、雌雄を統合した1日目及び43日目の平均値を示す。なお、試験報告書では雌雄別で平均値を示す。

パチシラン-LNP の用量増加に伴って ALN-18328 の曝露量は増加したが、蓄積は認められなかった。また、TKパラメータに性差は認められなかった。0.8 mg/kg 投与群を除いて、1日目と43日目で C_{max} 及び AUC は類似していたものの、43日目における定量下限以上の濃度が得られた最終時点 (t_{last}) 及び半減期は1日目と比較して短い傾向がみられた。TKパラメータを表15に示した。

表15- ラットにパチシラン-LNP を1時間静脈内持続投与したときのALN-18328のTKパラメータ（平均値、雌雄統合）

Time Point	Day 1				Day 43				
	Dose (mg/kg)	0.15	0.8	1.8	3	0.15	0.8	1.8	3
C_{max} (µg/mL)		1.04	6.68	13.6	25.4	1.00	3.08	17.0	34.1
AUC_{0-t} (µg•h/mL)		1.51	9.24	22.8	39.5	1.22*	3.61	18.8	37.1

Abbreviations: AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} =maximum (peak) concentration.

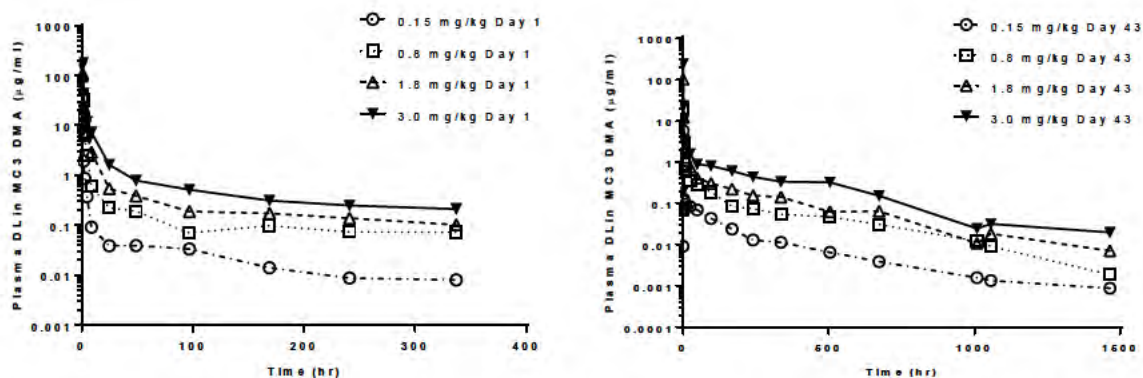
AUC_{0-t} is up to 337 hr post-start of infusion on Day 1 and 1465 hr post-start of infusion on Day 43; *Values for females only, AUC not calculable in males due to insufficient time points with measurable plasma concentrations.

DLin-MC3-DMA :

DLin-MC3-DMA の曝露量はパチシラン-LNP の用量に比例して増加し、性差は認められなかった。すべての用量 (0.15、0.8、1.8 及び 3.0 mg/kg) において、DLin-MC3-DMA の C_{max} 及び AUC_{0-337} (雌雄統合) が1日目と43日目で類似していたことから、2週毎の反復投与では血漿中に蓄積しないことが示された (図6、表16)。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

図 6- ラットにパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したときの 1 日目 (左パネル) 及び 43 日目 (右パネル) の血漿中 DLin-MC3-DMA 濃度-時間推移 (平均値、雌雄統合) ^a



^a 性差は認められなかったため、雌雄を統合した 1 日目及び 43 日目の平均値を示す。なお、試験報告書では雌雄別で平均値を示す。

表 16 - 雌雄のラットにパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したときの DLin-MC3-DMA の TK パラメータ (平均値、雌雄統合)

Time Point	Day 1				Day 43			
	Dose (mg/kg)	0.15	0.8	1.8	3	0.15	0.8	1.8
C_{max} (µg/mL)	7.48	43.7	107	176	5.83	19.7	102	239
AUC_{0-337h} (µg·h/mL)	19.9	112	295	544	17.5	74.9	223	528
$AUC_{0-1465h}$ (µg·h/mL)	-	-	-	-	21.3	100	269	660

Abbreviations: AUC_{0-337h} =area under the concentration-time curve time zero to 337 hours; $AUC_{0-1465h}$ =area under the concentration-time curve from time zero to 1464 hours; C_{max} =maximum (peak) concentration.

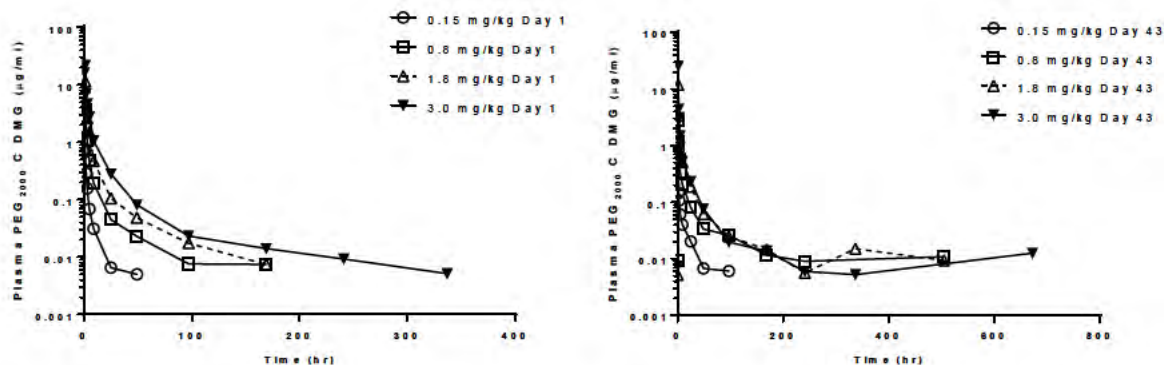
AUC_{0-} is up to 337 hr post-start of infusion on Day 1 and 1465 hr post-start of infusion on Day 43

PEG₂₀₀₀-C-DMG :

反復投与後の血漿中 PEG₂₀₀₀-C-DMG の TK パラメータ (雌雄統合) は初回投与後と類似し、パチシラン-LNP の反復投与による PEG₂₀₀₀-C-DMG の蓄積は認められなかった (図 7)。

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

図7- ラットにパチシラン-LNP を1時間静脈内持続投与したときの1日目（左パネル）及び43日目（右パネル）の血漿中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度-時間推移（平均値、雌雄統合）^a



^a 性差は認められなかったため、雌雄を統合した1日目及び43日目の平均値を示す。なお、試験報告書では雌雄別で平均値を示す。

1日目及び43日目の C_{max} 及び AUC_{0-t} は用量にほぼ比例して増加した。PEG₂₀₀₀-C-DMG の PK に明らかな性差は認められなかった（表17）。

表17- ラットにパチシラン-LNP を1時間静脈内持続投与したときの PEG₂₀₀₀-C-DMG の TKパラメータ（平均値、雌雄統合）

Dose (mg/kg)	Day 1				Day 43			
	0.15	0.8	1.8	3	0.15	0.8	1.8	3
C_{max} (µg/mL)	0.815	4.74	11.6	21.9	0.836	2.84	11.9	25.5
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	2.10	13.8	35.3	69.9	2.35	14.7	35.5	55.9

Abbreviations: AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} =maximum (peak) concentration.

3.1.3 ウサギにおける血漿中トキシコキネティクス

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（TTR02-DSM15-034試験；表2.6.5.7.G参照）の一部として、パチシラン-LNP投与後の血漿中 TK 及び組織内濃度を評価した。本試験で得られた血漿中 TK の結果をウサギにおけるパチシラン-LNP 反復投与後の代表的な TK とみなし、以下に要約した。また組織内濃度の結果は4.3.4項に要約した。その他、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験（TTR02-DSM15-012試験；表2.6.5.7.F参照）において血漿中 TK 及び組織内濃度を評価した。実施した TK に関する試験の一覧を表18に示した。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 18 - ニュージーランドホワイトウサギを用いて実施した TK 試験

Study # Section (Tabular Format)	Purpose	Administration	Dose Levels (mg/kg) Tested
TTR02-DSM15-012 4.3.4項 (表 2.6.5.7.F)	TK from non-GLP DRF embryo-fetal study	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion AF-011-18534 1-hour IV infusion	0.3, 1, and 2 mg/kg 0.3, 1, and 3 mg/kg
TTR02-GLP15-034 3.1.3.1項 (表 2.6.5.7.G)	TK from GLP embryo-fetal study	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion	0.1, 0.3, and 0.6 mg/kg

Abbreviations: DRF=dose range-finding; GLP=Good Laboratory Practice; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; TK=toxicokinetic(s).

3.1.3.1 ウサギを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験

(CTD: 4.2.3.5.2-2, TTR02-GLP15-034)

ウサギを用いた GLP 適用の胚・胎児発生に関する試験 (TTR02-GLP15-034 試験) の一部として、妊娠ウサギ (1 群当たり TK 評価用 3 例) に妊娠 7、13 及び 19 日に用量 0.1、0.3 又は 0.6 mg/kg のパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したときの ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中 TK を評価した。溶媒対照群には、週 1 回、妊娠 7、13 及び 19 日に生理食塩水を 1 時間静脈内持続投与した。妊娠 7 及び 19 日の投与後 0、0.083、1、2、8 及び 24 時間に血液試料を採取した。

ALN-18328 :

妊娠 7 及び 19 日の全用量群での妊娠ウサギにおける ALN-18328 の TK パラメータを表 19 に示した。妊娠ウサギにパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したとき、検討した用量範囲では ALN-18328 は類似した時間-濃度推移を示し、 t_{max} は妊娠 7 及び 19 日いずれにおいても、最初の試料採取時点である投与終了後 (0.083 時間) に認められた。用量 0.1、0.3 又は 0.6 mg/kg のパチシラン-LNP を投与したときの ALN-18328 の曝露量は、0.1~0.3 mg/kg では用量比を上回る増加を示し、0.3~0.6 mg/kg では用量にほぼ比例して増加した。パチシラン-LNP の週 1 回反復投与による ALN-18328 の蓄積は認められなかった。0.3 mg/kg 投与群の全身クリアランス及び分布容積は、妊娠 7 日と 19 日で同程度であったが、0.6 mg/kg 投与群では妊娠 19 日の方が高値を示した。消失半減期は約 9 時間であったが、0.6 mg/kg 投与群では、妊娠 19 日では延長が認められ (約 36 時間)、これに対応して分布容積は大きかった。妊娠 19 日の C_{max} 、クリアランス及び分布容積の変化は、妊娠に伴う変化 (血漿及び体液容量の増加) と一致していた。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 19 -妊娠 7 及び 19 日のウサギにパチシラン-LNP を静脈内持続投与したときの
ALN-18328 の TK パラメータ (平均値)

Dose (mg/kg)	GD 7			GD 19		
	0.1	0.3	0.6	0.1	0.3	0.6
C _{max} (µg/mL)	0.641	3.12	8.23	0.339	1.61	3.60
AUC _{last} (µg•h/mL) ^a	0.776	10.1	24.1	ND	3.76	10.0

Abbreviations: AUC_{last}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable time point; C_{max}=maximum (peak) concentration; GD=presumed day of gestation.

a Time from start of infusion was used to calculate the parameter.

DLin-MC3-DMA :

妊娠ウサギにパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したとき、検討した用量範囲では DLin-MC3-DMA は類似した時間 - 濃度推移を示し、t_{max} は妊娠 7 及び 19 日いずれにおいても投与終了後 0.083 時間に認められた。妊娠 7 及び 19 日目の妊娠ウサギにおける DLin-MC3-DMA の曝露量 (C_{max} 及び AUC_{last}) は、0.1~0.3 mg/kg では用量比を上回る増加を示し、0.3~0.6 mg/kg では用量にほぼ比例して増加した。全体的に妊娠 19 日目での C_{max} 及び AUC_{last} は妊娠 7 日目と比較して小さかった。これは妊娠中の血漿及び体液容量の増加による全身クリアランス及び分布容積の増加に起因すると考えられ、実際に妊娠ウサギにおける全身クリアランス及び分布容積は、妊娠 7 日目 (それぞれ、16.7~30.2 mL/hr/kg 及び 133~292 mL/kg) に比べて妊娠 19 日目 (それぞれ、67.7~107 mL/hr/kg 及び 464~1020 mL/kg) の方が約 3 倍大きかった (表 20)。

表 20 -妊娠 7 及び 19 日目の妊娠ウサギにパチシラン-LNP を静脈内持続投与したときの
DLin-MC3-DMA の TK パラメータ (平均値)

Dose (mg/kg) ^a	GD 7			GD 19		
	0.1	0.3	0.6	0.1	0.3	0.6
C _{max} (µg/mL)	3.62	19.7	46.8	1.41	11.7	19.9
AUC _{last} (µg•h/mL) ^b	19.7	94.1	228	6.51	29.9	57.0

Abbreviations: AUC_{last}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable time point; C_{max}=maximum (peak) concentration; GD=presumed day of gestation; TK=toxicokinetic(s).

a siRNA doses of 0.1, 0.3 and 0.6 mg/kg correspond to DLin-MC3-DMA doses of 0.65, 1.94 and 3.89 mg/kg, respectively, which were used to calculate the TK parameters for DLin-MC3-DMA, and corresponded to PEG₂₀₀₀-C-DMG doses of 0.08, 0.23 and 0.46 mg/kg, respectively, which were used to calculate the TK parameters for PEG₂₀₀₀-C-DMG.

b Time from start of infusion was used to calculate the parameter.

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

PEG₂₀₀₀-C-DMG :

妊娠ウサギにパチシラン-LNP を 0.1、0.3 又は 0.6 mg/kg の用量で 1 時間静脈内持続投与したとき、妊娠 7 及び 19 日目における PEG₂₀₀₀-C-DMG の曝露量 (C_{max} 及び AUC_{last}) は、用量に比例して増加した (表 21)。妊娠 7 及び 19 日目の妊娠ウサギにおける PEG₂₀₀₀-C-DMG の消失半減期 (5.0~6.5 時間) は、用量群間で一貫した値を示した。妊娠 19 日の妊娠ウサギにおける曝露量は妊娠 7 日に比べて低値を示し、全身クリアランス及び分布容積は、妊娠 7 日 (それぞれ、8~10 mL/hr/kg 及び 49~64 mL/kg) に比べて妊娠 19 日 (それぞれ、21~30 mL/hr/kg 及び 98~209 mL/kg) の方が 2~3 倍大きかった。これらの PK パラメータの変化は、妊娠に伴う血漿及び体液容量の変化と一致するものであった (2.6.6, 6.2.2 項参照)。

表 21 - 妊娠 7 及び 19 日のウサギにパチシラン-LNP を静脈内持続投与したときの
PEG₂₀₀₀-C-DMG の TK パラメータ (平均値)

Dose (mg/kg) ^a	GD 7			GD 19		
	0.1	0.3	0.6	0.1	0.3	0.6
C _{max} (µg/mL)	1.10	3.46	8.20	0.486	2.45	3.64
AUC _{last} (µg·h/mL) ^b	7.88	23.6	52.5	2.58	10.9	18.9

Abbreviations: AUC_{last}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable time point; C_{max}=maximum (peak) concentration; GD=presumed day of gestation; LNP=lipid nanoparticle; TK=toxicokinetic(s).

a Patisiran-LNP doses of 0.1, 0.3 and 0.6 mg/kg correspond to PEG₂₀₀₀-C-DMG doses of 0.08, 0.23 and 0.46 mg/kg, respectively, which were used to calculate the TK parameters for PEG₂₀₀₀-C-DMG.

b Time from start of infusion was used to calculate the parameter.

3.1.4 カニクイザルにおける血漿中薬物動態及びトキシコキネティクス

パチシラン-LNP を構成する siRNA (ALN-18328) 及び新規脂質 (DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG) のサルにおける血漿中 PK 及び TK パラメータを推定した。これらの PK 及び TK 試験の一覧を表 22 に示す。サルにおける ALN-18328 及びパチシラン-LNP 成分の代表的な PK として、TTR-NCD09-004 試験及び TTR02-NCD10-018 試験の PK の結果と TTR02-NCD10-011 試験の TK の結果を以下に要約した。すべての試験の PK 及び TK 結果の要約については、2.6.5 「薬物動態試験概要表」及び 2.6.6 「毒性試験の概要文」を参照とする。

表 22 - カニクイザルを用いて実施した PK 及び TK 試験

Study # (Tabular Format)	Purpose	Administration	Dose Levels (mg/kg) Tested
Single Dose Studies			
TTR-NCD09-004 (表 2.6.5.3.A)	TK from single dose GLP siRNA toxicity study	ALN-18328 IV bolus (single dose)	10, 30, and 100 mg/kg
TTR02-NCD10-018 (表 2.6.5.3.C)	Non-GLP single dose PK & PD study	Patisiran-LNP 15-min (0.3 mg/kg) and 1-hour IV infusions	0.3 (15 min) 0.03, 0.3, and 1.0 mg/kg

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

Study # (Tabular Format)	Purpose	Administration	Dose Levels (mg/kg) Tested
TTR02-NCD10-003 (表 2.6.5.3.D)	TK from GLP safety pharmacology study	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion	3.0 mg/kg
Multiple Dose Studies			
TTR02-NCD10-011 (表 2.6.5.4.H)	TK from GLP 4-dose toxicity study	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion	0.3, 1.0, and 3.0 mg/kg
TTR02-NCD12-001 (表 2.6.5.4.I)	TK from GLP 39-week toxicity study	Patisiran-LNP 1-hour IV infusion	0.3, 1.0, and 3.0/2.0 ^a mg/kg

Abbreviations: GLP=Good Laboratory Practice; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; TK=toxicokinetics.

^a Dose was reduced from 3.0 to 2.0 mg/kg following the first dose.

3.1.4.1 カニクイザルを用いた単回投与試験

3.1.4.1.1 サルを用いた ALN-18328 の単回静脈内投与毒性試験

(CTD: 4.2.3.1-1, TTR-NCD09-004)

注射用生理食塩水を溶媒として ALN-18328 のみ (LNP 製剤化されていない siRNA) を 0 (6 例)、10 (3 例)、30 (3 例) 及び 100 mg/kg (5 例) の用量で単回静脈内投与したときの潜在的毒性及び TK プロファイルを評価した。いずれの用量群についても投与後 0.25~6 時間の血漿試料中の ALN-18328 濃度は定量できなかった。血漿試料のイオン交換クロマトグラフィー分析にて ALN-18328 の代謝による断片と考えられる複数のピークが認められたことから、血漿中でおそらくエキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼによって ALN-18328 は速やかに代謝されることが示唆された(5)。この ALN-18328 の速やかな代謝は、サル血清を用いた *in vitro* 安定性試験によって裏付けられた：ALN-18328 をサル血清とともに 30 分間インキュベートしたときの残存率は 46%であった (表 48)。これらの結果は、非製剤化 siRNA を全身性に投与したときに速やかに消失することを示した文献報告と一致する(9)。

3.1.4.1.2 サルを用いた単回静脈内投与 PK/PD 試験

(CTD: 4.2.2.3-4, TTR02-NCD10-018)

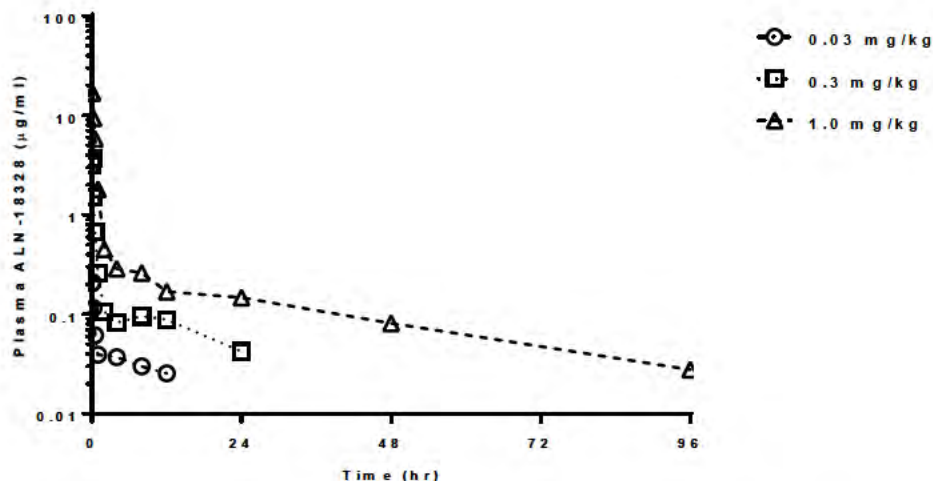
カニクイザル (1 群当たり雌雄各 4 例) にパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与 (0.03、0.3 及び 1 mg/kg) 又は 15 分間静脈内持続投与 (0.3 mg/kg) により単回投与したときの ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-DMG の PK を評価した。ALN-18328 の薬力学的作用の評価については、2.6.2 「薬理試験の概要文」に示した。

ALN-18328 :

パチシラン-LNP を名目用量 0.03、0.3 及び 1 mg/kg (1 群当たり雌雄各 4 例) で 1 時間静脈内持続投与又は 0.3 mg/kg で 15 分間静脈内持続投与したとき、パチシラン-LNP (ALN-18328 として測定) は速やかに分布し、血漿中 ALN-18328 濃度は初回試料採取時点に最高値を示した後、多相性の濃度推移を示して低下した (図 8)。

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

図 8 - サルにパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したときの血漿中 ALN-18328 濃度—
時間推移 (平均値、雌雄統合)^a



^a 性差は認められなかったため、雌雄を統合した平均値を示す。なお、試験報告書では雌雄別で平均値を示す。

ALN-18328 の曝露量 (C_{max} 及び AUC_{0-last}) は、パチシラン-LNP の用量増加に概ね比例して増加した (表 23)。いずれの PK パラメータ推定値にも明らかな性差は認められなかった。サルに 1 時間静脈内持続投与したときの ALN-18328 のクリアランスは、検討した用量範囲では小さく (約 43~148 mL/hr/kg)、 V_{ss} 値は 306~447 mL/kg であった。サルにおける見かけの $t_{1/2\beta}$ は約 7.4~16.2 時間であった。 $t_{1/2\beta}$ が変動した原因は、消失相における定量下限以上の濃度が得られた時点数が十分でなかったためと考えられた。

パチシラン-LNP を 0.3 mg/kg の用量で 15 分間静脈内持続投与したときの血漿中 ALN-18328 濃度は、1 時間静脈内持続投与に比べて速やかに最高値に達した。また、ALN-18328 のクリアランスはやや高値を示し、その結果として血漿中曝露量はわずかに小さかった。

血中遊離型 siRNA 濃度を測定するため、LNP 構造を破壊せずに遊離型 siRNA のみが透過する Amicon Ultra-4 フィルター (分子量カットオフ 100,000 Da) に血漿試料を供し、200 g で 60 分間遠心分離した。得られた濾液中の ALN-18328 濃度を LC-MS/MS 法 (TSLS10-136 試験、表 5) を用いて測定した。投与後 96 時間での血漿中での LNP 封入型に対する遊離型の比率から、ALN-18328 は全身循環血中では LNP に封入されたまま安定性を保っていることが確認された。遊離型 ALN-18328 は 1.0 mg/kg 静脈内ボラス投与後の初回試料採取時点にてのみ検出され、LNP 封入型に対する遊離型の比率は約 2.17~6.07% であった。このことから、全身循環血中の siRNA の大部分は LNP 封入型として存在することが示唆され、これはラットと同様の結果 (3.1.2.1.1 項) であった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 23 - サルにパチシラン-LNP を 15 分間又は 1 時間静脈内持続投与したときの
ALN-18328 の血漿中 PK パラメータ (平均値、雌雄統合)

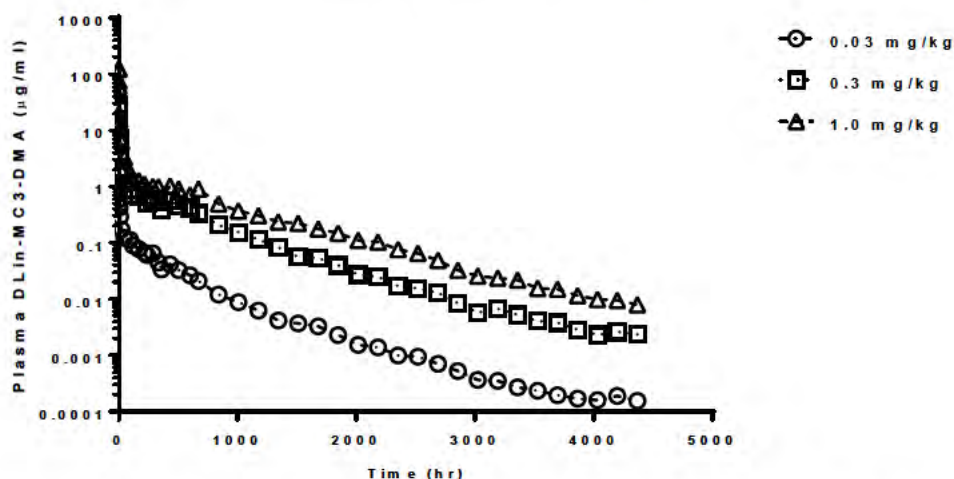
Dose (mg/kg)	0.03 (1 h infusion)	0.3 (1 h infusion)	1 (1 h infusion)	0.3 (15 min infusion)
C _{max} (µg/mL)	0.231	3.71	17.3	3.91
t _{1/2β} (h)	7.35	8.44	16.2	2.91
AUC _{0-t} (µg·h/mL)	0.314	4.54	24.4	2.70
CL (mL/h/kg)	148	46.3	42.9	139
V _{ss} (mL/kg)	353	447	306	260

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

DLin-MC3-DMA :

サルにパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したとき、血漿中 DLin-MC3-DMA 濃度は初回試料採取時点にて最高値を示した後、多相性の濃度推移を示して低下した (図 9)。

図 9 - サルにパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したときの血漿中 DLin-MC3-DMA 濃度—
時間推移 (平均値、雌雄統合) ^a



^a 性差は認められなかったため、雌雄を統合した 1 日目及び 43 日目の平均値を示す。なお、試験報告書では雌雄別で平均値を示す。

パチシラン-LNP を 15 分間又は 1 時間静脈内持続投与したとき、DLin-MC3-DMA の血漿中 PK は類似していた (表 24)。動物数が少なく、個体間変動がみられるものの、曝露量 (C_{max}及び AUC) は概ね用量に比例して増加した。DLin-MC3-DMA のクリアランスは小さく (3.08~4.16 mL/hr/kg)、V_{ss} が 1384~2141 mL/kg であったことから、DLin-MC3-DMA は全身に広く分布することが示唆された。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

DLin-MC3-DMA の見かけの終末相消失半減期は約 19.5~27.4 日であった。サルにパチシラン-LNP を 15 分間又は 1 時間静脈内持続投与したときの PK パラメータに明らかな性差は認められなかった。

表 24 - サルにパチシラン-LNP を 15 分間又は 1 時間静脈内持続投与したときの DLin-MC3-DMA の血漿中 PK パラメータ (平均値、雌雄統合)

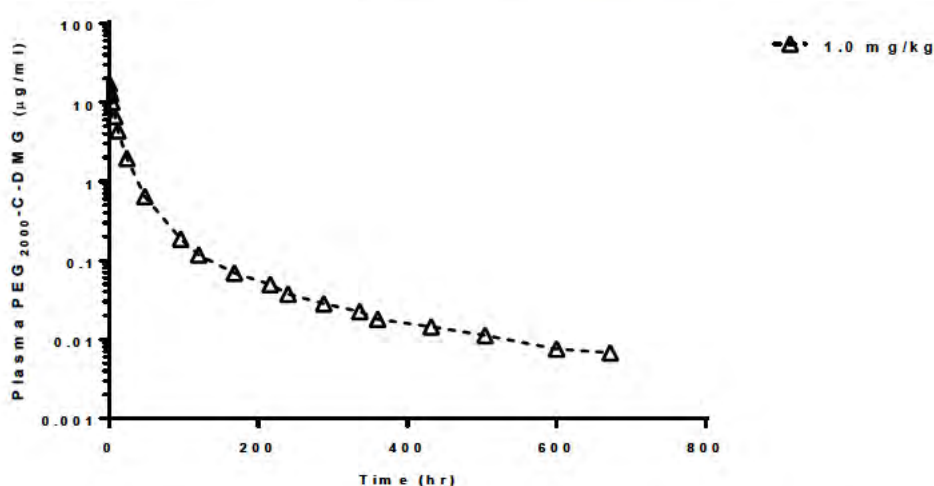
Dose (mg/kg)	0.03 (1 h infusion)	0.3 (1 h infusion)	1 (1 h infusion)	0.3 (15 min infusion)
C _{max} (µg/mL)	1.92	29.4	129	26.9
t _{1/2β} (h)	468	610	658	576
AUC _{0-t} (µg·h/mL)	56.8	684	1700	646
CL (mL/h/kg)	3.62	3.08	4.16	3.19
V _{ss} (mL/kg)	1380	1530	2140	1820

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

PEG₂₀₀₀-C-DMG :

PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度測定には、高用量群 (1 mg/kg) の試料のみを用い、いずれの動物でも投与後 504 時間まで測定可能であった。サルにパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したときの血漿中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は初回試料採取時点に最高値を示した後、二相性の濃度推移を示して低下した (図 10)。

図 10 - サルにパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したときの血漿中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度-時間推移 (平均値、雌雄統合) ^a



^a 性差は認められなかったため、雌雄を統合した平均値を示す。なお、試験報告書では雌雄別で平均値を示す。

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

雌雄のサルにパチシラン-LNP を静脈内投与したときの血漿中 TK パラメータ（試料容量が原因で名目用量 1 mg/kg のみ評価）を表 25 に要約した。なお、PEG₂₀₀₀-C-DMG のいずれの PK パラメータについても、明らかな性差は認められなかった。

表 25 - サルにパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したときの PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中 PK パラメータ
(平均値、雌雄統合)

Dose (mg/kg)	1
C _{max} (µg/mL)	17.5
t _{max} (h)	1.03
t _{1/2β} (h)	161
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	222
CL (mL/hr/kg)	3.48
V _{ss} (mL/kg)	134

Abbreviations: AUC_{0-t}= area under the concentration-time curve calculated from time zero to the last measurable concentration; CL=total body clearance; C_{max}=maximum (peak) concentration; t_{1/2β}=elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; V_{ss}=volume of distribution at steady state.

3.1.4.2 サルを用いた反復投与試験

3.1.4.2.1 サルを用いた 6 週間反復 (q2w×4) 静脈内持続投与毒性試験

(CTD: 4.2.3.2-5, TTR02-NCD10-011)

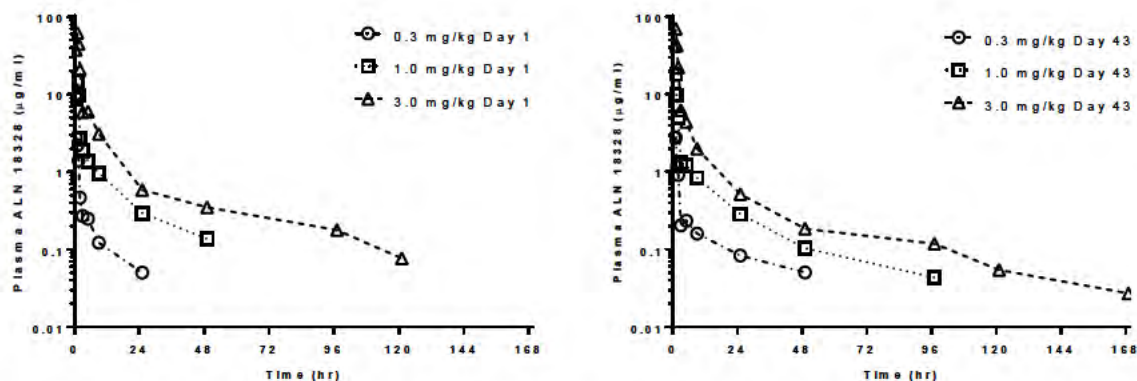
GLP 適用 TTR02-NCD10-011 試験では、雌雄のサル（投与開始時点で 3~4 歳）にパチシラン-LNP (ALN-TTR02) を 0 (PBS)、0.3、1 又は 3 mg/kg の用量で 1、15、29 及び 43 日目 (q2w×4) に 1 時間静脈内持続投与 (20 mL/kg/hr) した (TK 評価用雌雄各 2 例)。

ALN-18328 :

反復静脈内持続投与後 (1、15、29 及び 43 日目) の ALN-18328 の TK プロファイルは、1 日目と類似しており、パチシラン-LNP の反復投与による ALN-18328 の明らかな蓄積は認められなかった。パチシラン-LNP を単回 (初回) 又は反復 1 時間静脈内持続投与したとき、血漿中 ALN-18328 濃度は初回試料採取時点に最高値を示した後、多相性の濃度推移を示して低下した。0.3 mg/kg 投与群の雄及び雌サルの代表的 PK プロファイルを図 11 に示した。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

図 11- サルにパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したときの 1 日目（左パネル）及び 43 日目（右パネル）の血漿中 ALN-18328 濃度－時間推移（平均値、雌雄統合）^a



^a 性差は認められなかったため、雌雄を統合した平均値を示す。なお、試験報告書では雌雄別で平均値を示す。

パチシラン-LNP の用量増加に伴い ALN-18328 の曝露量 (C_{max} 及び AUC_{0-t}) は概ね用量に比例して増加した。1 日目と 43 日目の曝露量が類似していたことから、反復投与による蓄積性は認められず(表 26)、また、曝露量に性差は認められなかった。

表 26 - サルにパチシラン-LNP を単回及び反復投与したときの ALN-18328 の TK パラメータ（平均値、雌雄統合）

Dose (mg/kg)	Day 1 ^a			Day 43 ^a		
	0.3	1	3	0.3	1	3
C_{max} (µg/mL)	2.94	14.7	62.2	3.31	18.4	70.2
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	6.37	38.7	167	8.12	45.0	156

Abbreviations: AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve calculated from time zero to the last measurable concentration; C_{max} =maximum (peak) concentration.

^a N=2 sex/dose

DLin-MC3-DMA :

パチシラン-LNP を単回（初回）又は反復投与したときの血漿中 DLin-MC3-DMA の C_{max} は類似していたものの、反復投与後の AUC_{0-t} はやや高値を示し、わずかに DLin-MC3-DMA の蓄積が示唆された(表 27)。これはパチシラン-LNP の反復投与後の DLin-MC3-DMA の半減期が延長した結果と矛盾しなかった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 27 - サルにパチシラン-LNP を単回及び反復投与したときの DLin-MC3-DMA の
TKパラメータ（平均値、雌雄統合）

Dose (mg/kg)	Day 1 ^a			Day 43 ^a		
	0.3	1	3	0.3	1	3
C _{max} (µg/mL)	26.5	120	534	24.5	132	379
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	348	998	4060	785	2420	6230
AUC _{0-337h} (µg•h/mL)	-	-	-	402	1170	3880

Abbreviations: AUC_{0-337h}=area under the plasma concentration-time curve from time zero to 337h;

AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve calculated from time zero to the last measurable concentration;

C_{max}=maximum (peak) concentration

AUC_{0-t} is up to 337 hr post-start of infusion on Day 1 and 1465 hr post-start of infusion on Day 43.

^a N=2 sex/dose

PEG₂₀₀₀-C-DMG :

反復投与 (q2w×4) 後の PEG₂₀₀₀-C-DMG の TK プロファイルは単回 (初回) 投与後と類似しており、明らかな性差も認められなかった。サルにパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与したときの血漿中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は、初回試料採取時点に最高値を示した後、二相性の濃度推移を示して低下した。

PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中曝露量 (C_{max} 及び AUC) はほぼ用量に比例して増加した。初回投与後及び最終投与後の PEG₂₀₀₀-C-DMG の曝露量は同程度であったことから、明らかな蓄積はなく、性差も認められなかった (表 28)。

表 28 - サルにパチシラン-LNP を単回 (初回) 及び反復投与したときの PEG₂₀₀₀-C-DMG の
TKパラメータ（平均値、雌雄統合）

Dose (mg/kg)	Day 1			Day 43		
	0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	3.0
C _{max} (µg/mL)	4.04	16.6	54.6	4.26	16.5	56.7
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	67.5	238	789	67.5	286	697

Abbreviations: AUC_{0-t}= area under the concentration-time curve calculated from time zero to the last measurable concentration;

C_{max}=maximum (peak) concentration.

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

4 分布

パチシラン-LNP の血漿タンパク結合及び分布を評価するために実施した試験の一覧を表 29 に示した。

表 29 - パチシラン-LNP の血漿タンパク結合及び分布試験

Study #	Purpose of Study	Species	Analyte Evaluated	GLP Status
		Protein Binding		
BA11010	Non-GLP in vitro protein binding study	Sprague Dawley rat albumin, human albumin, and human α 1-acid glycoprotein	Patisiran-LNP	Non-GLP
		Distribution Studies		
TTR02-NCD10-006	Distribution of patisiran-LNP in male and female Sprague Dawley rats after a single IV bolus administration (rat PK study)	Sprague Dawley rat	ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Non-GLP
■ 319-1103	Mass balance and tissue distribution by QWBA	Sprague Dawley and Long-Evans rat	¹⁴ C-ALN-TTR02 (patisiran-LNP labeled on the DLin-MC3-DMA lipid portion)	GLP
■ 319 D-1202	Tissue distribution by microautoradiography	Sprague Dawley rat	¹⁴ C-ALN-TTR02 (patisiran-LNP labeled on the DLin-MC3-DMA lipid portion)	Non-GLP
TTR02-NCD10-018	Distribution of patisiran-LNP in the monkey after a single IV bolus administration (monkey PK study)	Cynomolgus monkey	ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Non-GLP
TTR02-NCD13-003	Embryo-fetal transfer	Sprague Dawley rat	ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Non-GLP
TTR02-DSM15-015	Maternal liver, placental, and fetal transfer	Sprague Dawley rat	ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Non-GLP

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

Study #	Purpose of Study	Species	Analyte Evaluated	GLP Status
TTR02-DSM15-012	Placental and fetal transfer	New Zealand white rabbits	ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Non-GLP
TTR02-GLP16-003	Lacteal secretion analysis	Sprague Dawley rat	ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	GLP

Abbreviations: GLP=Good Laboratory Practice; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; PK=pharmacokinetic(s); QWBA=quantitative whole-body autoradiography.

4.1 タンパク結合

(CTD: 4.2.2.3-1, BA11010、CTD: 4.2.2.3-5, TTR02-DSM18-024 (319N-1815))

パチシラン-LNPの血漿タンパク結合率の測定には、その分子量及び物理化学的特性から透析法又は限外ろ過法などの従来の方法は使用できない。そのため、FPLCによる分離後、SDS-PAGEを利用した定量法を開発し、薬物と結合する血清タンパク質として広く認識されているラット血清アルブミン(RSA)、ヒト血清アルブミン(HSA)及びヒト α_1 -酸性糖タンパク質(AAG)へのパチシラン-LNPの結合量を測定した(7)(10)(11)。生理学的濃度又は最大溶解濃度(生理学的濃度の約25倍のヒトAAG濃度)におけるこれらの血清タンパク質に対するパチシラン-LNP(1.05 mg/mL ALN-18328)の結合率は低く、それぞれ、約0.89%、0.46%及び2.07%であった(表30)。

PEG₂₀₀₀-C-DMGの血漿タンパク結合を5~20 μ mol濃度で、下記の4種類の測定法・測定機器を用いて評価した:迅速平衡透析ユニット(RED;8 kDa分子量カットオフメンブレン)、Harvard Multi-Equilibrium DIALYZER™デバイス(10 kDa分子量カットオフメンブレン)、Centrifree®限外ろ過デバイス(30 kDa分子量カットオフメンブレン)及び、超遠心分離器(319N-1815試験;表2.6.5.6.B参照)を用いて評価した。RED、Harvard Multi-Equilibrium DIALYZER™デバイス及びCentrifree®限外ろ過デバイスを用いてタンパク結合試験を行った結果、緩衝液又は透析液中に検出可能な量(LLOQ=90 nM)のPEG₂₀₀₀-C-DMGは認められなかった。このことから、PEG₂₀₀₀-C-DMGは透析膜又はメンブレンフィルターを通過しないことが示唆された。二次的な分子間相互作用がPEG₂₀₀₀-C-DMGの膜透過性に影響を与えた結果、これらの従来の方法でPEG₂₀₀₀-C-DMGの血漿タンパクに結合を測定することが難しくなったと考えられる。したがって、血漿タンパク結合率の別の測定法として、超遠心分離法を選択した。PEG₂₀₀₀-C-DMGは、ヒト血漿及びヒト血漿上清中の双方で、37°Cで安定であり、18時間培養後の残存率は約100%であった。ヒト血漿上清中のPEG₂₀₀₀-C-DMGが超遠心分離管と非特異的に結合するエビデンスは認められず、回収率は98%を超えた。PEG₂₀₀₀-C-DMGは、脂質又はリポタンパク質と結合し、ヒト血漿中でタンパク結合率は高いことが示された。5及び20 μ mol濃度双方での非結合率は約3%(血漿タンパク結合率97%)であった。血漿タンパク結合は、検討した濃度範囲で、濃度に依存しないことが示された。陽性対照(ワルファリン)のタンパク結合データは、超遠心分離法を用いた既存の背景データと一致した(非結合率2%未満)。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 30 - ラット血清アルブミン、ヒト血清アルブミン及びヒト α_1 -酸性糖タンパク質に対するパチシラン-LNP
の結合率

Protein	Protein Concentration (mg/mL)	Protein Bound to Patisiran-LNP (%)
RSA	32	0.89
HSA	50	0.46
AAG	25	2.07

Abbreviations: AAG= α_1 -acid glycoprotein; HSA=human serum albumin; RSA=rat serum albumin.

4.2 生体内分布 : *in vivo*

4.2.1 ラットにおける生体内分布

(CTD: 4.2.2.3-2, TTR02-NCD10-006)

雌雄の Sprague-Dawley ラットを用いた PK 試験の一部として、用量 0.03、0.3 及び 1 mg/kg (1 群当たり雌雄各 20 例) のパチシラン-LNP (非標識) を単回静脈内ボラス投与したときの ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の肝臓及び脾臓への分布を評価した (PK については 3.1.2.1.1 項参照)。組織試料は投与後 1、4、24、96、168、240、336、504、672 及び 1440 時間に採取した。

結論として、ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の肝臓及び脾臓中 PK に明らかな性差は認められなかった。そのため可能な限り雌雄のデータの平均値を記載した。

ALN-18328 の血漿及び組織中 PK :

ALN-18328 の最高血漿中濃度は、0.03、0.3 及び 1 mg/kg 投与群でそれぞれ、0.59、7.4 及び 26 μ g/mL であった。肝臓及び脾臓中 ALN-18328 濃度は概して初回試料採取時点である投与後 1 時間に最高値を示し、それぞれ投与後 48 及び 336 時間には定量下限未満となった。1 mg/kg 投与群の最高組織中濃度は、脾臓に比べて肝臓で 5 倍高かった一方、消失半減期は、肝臓に比べて脾臓では長く (約 24 倍)、AUC_{0-t} は脾臓に比べて肝臓にて 2 倍高値を示した (表 31)。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 31 - Sprague-Dawley ラットにパチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与したときの ALN-18328 の肝臓、脾臓及び血漿中 PK パラメータ (平均値)

Tissue	Dose (mg/kg)	t _{max} (h)	C _{max} (µg/g)	AUC _{0-t} (µg·h/g)	t _{1/2} (h) ^a
Liver	0.03	NE	NE	NE	NE
	0.3	1.00	1.53	5.72	NE
	1.0	1.00	5.48	30.3	5.27
Spleen	0.03	4.00	0.180	0.468	NE
	0.3	1.00	0.795	10.8	84.7
	1.0	1.00	1.01	14.8	128
Plasma	0.03	0.083	0.591	0.253	0.250
	0.3	0.083	7.40	3.71	0.290
	1.0	0.083	25.9	13.2	0.440

Abbreviations: AUC_{0-t}= area under the concentration-time curve calculated from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) concentration; NE=not estimable; t_{1/2}=elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration.

a Data represents Female only; Male NE.

DLin-MC3-DMA の組織中 PK :

組織中 DLin-MC3-DMA 濃度は、肝臓では投与後 4 又は 24 時間後 (測定した 2 時点)、脾臓では投与後 1~168 時間後に最高値を示した (表 32)。

表 32 - Sprague-Dawley ラットにパチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与したときの DLin-MC3-DMA の肝臓及び脾臓中 PK パラメータ

Tissue	Dose (mg/kg)	t _{max} (h)	C _{max} (µg/g)	AUC _{0-t} (µg·h/g)	t _{1/2} (h)
Liver	0.03	14.0	3.18	699	263
	0.3	24.0	33.7	9720	233
	1.0	4.00	129	36700	339
Spleen	0.03	4.00	1.90	419	525
	0.3	84.5	8.77	3840	474
	1.0	24.0	22.4	12100	479
Plasma	0.03	0.083	3.63	6.10	130
	0.3	0.083	42.0	69.0	192
	1.0	0.083	146	223	267

Abbreviations: AUC_{0-t}= area under the concentration-time curve calculated from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) concentration; t_{1/2}=elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration.

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

DLin-MC3-DMAの最高血漿中濃度は、0.03、0.3及び1 mg/kg投与群でそれぞれ、3.63、42.0及び146 µg/mLであった。肝臓及び脾臓中のDLin-MC3-DMAは最終試料採取時点である投与後60日目まで検出された。検討した用量範囲（0.03、0.3及び1 mg/kg）では、血漿中C_{max}及びAUC_{0-t}は概して用量にほぼ比例して増加した。DLin-MC3-DMAは、脾臓に比べて肝臓へ約2~3倍分布した。また、DLin-MC3-DMAは、脾臓（t_{1/2}=19.8~21.9日）に比べて、肝臓中（t_{1/2}=9.7~14.1日）にてより速やかに消失した。

PEG₂₀₀₀-C-DMGの組織中PK：

パチシラン-LNPを1.0 mg/kg投与したときのPEG₂₀₀₀-C-DMGの肝臓及び脾臓への分布を評価した。PEG₂₀₀₀-C-DMGの組織内濃度は、肝臓で投与後1時間、脾臓で投与後24時間に最高値に達した。1 mg/kg投与群でのPEG₂₀₀₀-C-DMGの最高血漿中濃度は15.8 µg/mLであった。PEG₂₀₀₀-C-DMGは肝臓中で少なくとも168時間、脾臓中で少なくとも336時間まで残存していた。PEG₂₀₀₀-C-DMGの消失相半減期は、脾臓に比べて肝臓で約2倍長かった。PEG₂₀₀₀-C-DMGの組織中最高濃度は、肝臓に比べ脾臓中で4倍高かったものの、肝臓中及び脾臓中AUC_{0-t}は同程度であった（表33）。

表33 - Sprague-Dawleyラットに1.0 mg/kgのパチシラン-LNPを単回静脈内ボラス投与したときのPEG₂₀₀₀-C-DMGの肝臓及び脾臓中PKパラメータ（平均値）

Tissue	Dose (mg/kg)	t _{max} (h)	C _{max} (µg/g)	AUC _{0-t} (µg•h/g)	t _{1/2} (h)
Liver	1.0	1.00	0.799	201	159 ^a
Spleen	1.0	24.0	2.12	196	76.8
Plasma	1.0	0.083	15.8	22.0	21.3 ^b

Abbreviations: AUC_{0-t}= area under the concentration-time curve calculated from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) concentration; t_{1/2}=elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration.

a Data represents Male only.

b Data represents Female only.

ALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG₂₀₀₀-C-DMGの分布（対投与量%）：

パチシラン-LNPを1.0 mg/kg投与したときのALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG₂₀₀₀-C-DMGの投与量に対する肝臓及び脾臓中の各成分の総量の割合を算出した。なお、この割合は臓器単位の値として算出している（表34）。パチシラン-LNPを静脈内ボラス投与したとき、ALN-18328の肝臓及び脾臓への分布は投与後1時間に最高値に達し（それぞれ約25.6%及び0.242%）、投与後24時間までにそれぞれ、0.56%及び0.03%まで低下した。DLin-MC3-DMAの肝臓及び脾臓への分布は、投与後24時間に最高値に達し（それぞれ約77.7%及び0.98%）、投与後60日目までにそれぞれ、約3.14%及び0.14%まで低下した。PEG₂₀₀₀-C-DMGの肝臓及び脾臓への分布は、投与後それぞれ1及び24時間に最高値に達し（それぞれ約48.9%及び0.82%）、投与後168時間までにそれぞれ、約0.81%及び0.13%まで低下した。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 34 - Sprague-Dawley ラットに 1.0 mg/kg のパチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与したときの ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の組織中分布（対投与量%平均値）

Time	Mean % of Dose in Liver	Mean % of Dose in Spleen	Total % of Dose in liver and spleen ^a
ALN-18328			
1 hour	25.6	0.242	28.2
24 hours	0.56	0.03	0.59
DLin-MC3-DMA			
1 hour	67.3	0.510	70.6
24 hours	77.7	0.980	78.9
7 days	50.1	0.56	50.8
14 days	25.0	0.57	25.7
28 days	10.5	0.36	10.9
60 days	3.14	0.14	3.28
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG			
1 hour	48.9	0.52	59.7
24 hours	10.4	0.82	11.6
7 days	0.81	0.13	0.94

a Includes the % of dose in plasma.

4.2.2 ラットを用いた生体内分布試験（定量的全身オートラジオグラフィー法）

(CTD: 4.2.2.5-1, ■■■-319-1103)

脂肪鎖リンカーのカルボニル位を放射性炭素で標識した ¹⁴C-DLin-MC3-DMA (図 1) を含むパチシラン-LNP (¹⁴C-パチシラン-LNP) を用いて、QWBA 法を用いたラットでの生体内分布試験を実施した。

本試験では、雄 Sprague-Dawley ラット及び部分有色雄 Long Evans ラットに ¹⁴C-パチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与した。雄 Sprague-Dawley ラットでは、¹⁴C-DLin-MC3-DMA の血漿中 PK、尿、糞及び胆汁中の総放射能排泄量及び QWBA 法を用いた生体内分布を評価した。部分有色雄 Long Evans ラットでは、¹⁴C-DLin-MC3-DMA の血漿中 PK 及び QWBA 法を用いた生体内分布を評価した。また本試験では、代謝物同定及び代謝プロファイリング試験並びに ¹⁴C-DLin-MC3-DMA 由来放射能の測定によるマイクロオートラジオグラフィー (MARG) 試験用の試料を採取した (表 35)。本試験では、投与時点において約 7 週齢、体重 214~250 g の合計 36 例のラットを用い、雄 Sprague-Dawley ラットは 4 群に、雄 Long Evans ラットは 1 群に割り当てた。すべてのラットに用量 0.3 mg/kg の ALN-18328 (siRNA) 及び 2.1 mg/kg の ¹⁴C-DLin-MC3-DMA を含む ¹⁴C-パチシラン-LNP (194.7 µCi/kg) を単回静脈内投与した。投与液は PBS と ¹⁴C-パチシラン-LNP で調製され、投与液中の ALN-18328 (siRNA) 濃度は 0.27 mg/mL であり、放射能濃度は 178.76 µCi/g であった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 35 - 定量的全身オートラジオグラフィー法によるラット生体内分布試験の試験デザイン

Group	Strain	N (Sex)	Purpose
1 (intact)	Sprague Dawley	4 (M)	Mass Balance (6.1.1項)
2 (BDC)	Sprague Dawley	4 (M)	Biliary Excretion (6.1.1項)
3 (intact)	Sprague Dawley	12 (M)	QWBA
4 (intact)	Long-Evans	8 (M)	QWBA
5 (intact)	Sprague Dawley	8 (M)	MARG (4.2.3項)

Abbreviations: BDC=bile duct cannulated; M=male; MARG=microautoradiography; QWBA=quantitative whole-body autoradiography. For these studies, the dosing route was IV, the dose (mg/kg) based on ALN-18328 siRNA was 0.3 mg/kg, the dose volume was 1 mL/kg, the dose formulation concentration based on ALN-18328 (siRNA), diluted in vehicle was 0.3 mg/mL, and the radioactivity level was 194.7 μ Ci/kg.

グループ 1 及び 2 では、 ^{14}C -DLin-MC3-DMA のマスバランスを評価し、また採取した排泄物及び胆汁中の放射能は LSC を用いて測定した。また安楽殺時の血液試料も採取した。グループ 3 及び 4 (並びにグループ 1 の動物 1 例) では、QWBA 法により生体内分布を評価し、安楽殺時の血液試料も採取したグループ 4 の生体内分布結果は、ヒトにおける ^{14}C 標識体の投与量の設定のために利用した。グループ 5 では、MARG 用又は生物学的分析用の組織を採取し、安楽殺時の血液試料も採取した。

グループ 1 では、すべてのラットを投与後 1344 時間に安楽殺した。グループ 2 (マスバランス用) では、すべてのラットを投与後 144 時間に安楽殺した。グループ 3 (QWBA 法用) では、投与後 0.08、0.25、0.5、1、3.5、4、6、24、48、168、672 及び 1008 時間に、各時点につき 1 例のラットを安楽殺した。グループ 4 (QWBA 法用) では、投与後 1、6、24、48、168、672、1008 及び 1344 時間に、各時点につき 1 例のラットを安楽殺した。グループ 5 (MARG 用及び生物学的分析用) では、投与後 0.25、0.5、1、2、4、6、24 及び 48 時間に、各時点につき 1 例のラットを安楽殺した。

雄 Sprague-Dawley ラット及び雄 Long Evans ラットに 0.3 mg/kg の ALN-18328 及び 2.1 mg/kg の ^{14}C -DLin-MC3-DMA を含む ^{14}C -パチシラン-LNP を単回静脈内投与したとき、製剤由来放射能は投与後 1344 時間まで全身組織中に広く検出された。最高血中放射能濃度は、雄 Sprague-Dawley ラットで投与後 5 分 (25.5 $\mu\text{g equiv/g}$)、雄 Long Evans ラットで投与後 1 時間 (0.832 $\mu\text{g equiv/g}$) に認められた。両系統のラットにおいて、血中放射能は主に血漿画分に局在し、細胞画分への分布は少なかった。両系統のラットにて高い放射能濃度 (>10 $\mu\text{g eqiv/g}$) が認められた器官は、リンパ系、肝臓及び副腎であった (表 36)。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 36 - Sprague-Dawley ラットに ¹⁴C-パチシラン-LNP (¹⁴C-DLin-MC3-DMA) を静脈内投与したときの組織中放射能濃度

Tissue	Concentration (µg equiv/g) ^a											
	0.25 h	0.5 h	1 h	3.5 h	4 h	6 h	24 h	48 h	168 h	672 h	1008 h	1344 h
Blood	4.80	3.41	1.96	0.692	0.455	0.265	0.284	0.133	0.070	0.008	0.003	0.006
Bone marrow	1.27	2.36	1.06	1.63	1.20	1.06	0.760	0.940	1.08	0.640	0.365	0.310
Lymph node, anterior	0.082	0.212	0.445	0.275	0.358	0.477	0.306	0.487	0.600	0.192	0.253	0.312
Lymph node, posterior	12.3	1.73	0.623	0.78	0.714	1.94	86.3 ^b	276^b	8.94	0.310	0.740	145 ^b
Spleen, white pulp	0.870	2.85	3.71	3.45	2.57	4.18	2.45	2.54	2.93	1.47	0.901	0.900
Spleen, red pulp	1.93	7.30	8.88	9.72	7.84	7.50	4.04	4.98	12.0	5.09	2.52	1.82
Spleen, total	1.54	5.74	7.44	7.61	5.56	6.14	3.56	3.59	5.20	2.90	1.49	1.33
Thymus	0.085	0.112	0.066	0.094	0.097	0.068	0.096	0.103	0.085	0.073	0.063	0.092
Bile (in duct)	0.270	10.5	1.92	1.87	1.79	3.50	2.38	0.790	0.380	0.180	0.040	0.0700
Kidney, cortex	0.710	0.950	0.574	0.800	0.651	0.470	0.340	0.280	0.430	0.100	0.059	0.0800
Kidney, medulla	1.02	1.16	0.629	0.600	0.534	0.400	0.270	0.290	0.260	0.0700	0.036	0.0400
Liver	12.7	53.1	60.1 ^b	69.5^b	53.5	66.5 ^b	19.0	21.6	10.3	0.730	0.135	0.230
Urinary bladder	0.116	0.181	0.130	0.197	0.107	0.413	0.400	0.234	0.049	0.010	0.035	0.036
Urinary bladder, contents	0.070	0.575	0.271	5.87	2.84	5.11	1.77	1.48	0.261	0.013	0.013	0.009
Brain (cerebrum)	0.040	0.036	0.023	0.032	0.024	0.017	0.014	0.019	0.023	0.012	0.010	0.007
Brain (cerebellum)	0.068	0.068	0.039	0.042	0.040	0.027	0.019	0.024	0.027	0.016	0.008	0.008
Brain (medulla)	0.036	0.042	0.028	0.043	0.030	0.028	0.018	0.025	0.026	0.013	0.012	0.006
Meninges	4.20	3.05	1.90	0.556	0.396	0.231	0.213	0.134	0.063	0.013	0.010	0.006
Spinal cord	0.046	0.018	0.047	0.061	0.033	0.020	0.018	0.026	0.020	0.021	0.013	0.009

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

Concentration (µg equiv/g) ^a												
Tissue	0.25 h	0.5 h	1 h	3.5 h	4 h	6 h	24 h	48 h	168 h	672 h	1008 h	1344 h
Adrenal gland, cortex	1.01	4.84	8.06	11.4	6.19	7.97	12.1	10.8	12.3	7.22	6.24	7.44
Adrenal gland, medulla	1.13	3.20	3.26	2.76	1.63	2.25	3.73	3.02	2.62	3.19	1.75	1.06
Pituitary gland	0.272	0.274	0.292	0.208	0.349	0.156	0.146	0.140	0.200	0.067	0.018	0.074
Thyroid	0.553	0.582	0.509	0.640	0.575	0.639	0.398	0.459	0.390	0.093	0.057	0.086
Harderian gland	0.163	0.050	0.044	0.097	0.120	0.085	0.068	0.073	0.084	0.036	0.015	0.031
Mammary gland region	0.101	0.227	0.092	0.115	0.112	0.127	0.177	0.099	0.154	0.039	0.073	0.150
Pancreas	0.317	0.278	0.149	0.299	0.252	0.238	0.199	0.188	0.151	0.054	0.030	0.045
Salivary gland	0.153	0.178	0.105	0.123	0.127	0.120	0.093	0.088	0.082	0.052	0.021	0.042
Adipose (white)	0.457	1.25	0.341	0.464	0.216	0.299	0.250	0.177	0.146	0.062	0.053	0.059
Adipose (brown)	0.093	0.130	0.058	0.050	0.026	0.029	0.023	0.036	0.052	0.028	0.029	0.018
Skin nonpigmented	0.089	0.185	0.066	0.079	0.068	0.114	0.082	0.087	0.079	0.045	0.027	0.040
Epididymis	0.095	0.123	0.107	0.156	0.165	0.154	0.111	0.100	0.194	0.088	0.052	0.039
Prostate gland	0.146	0.292	0.118	0.095	0.091	0.081	0.081	0.074	0.086	0.042	0.015	0.027
Seminal vesicles	0.034	0.083	0.047	0.042	0.023	0.039	0.040	0.023	0.023	0.003	BQL	0.008
Testis	0.041	0.051	0.044	0.056	0.051	0.057	0.065	0.070	0.076	0.036	0.024	0.038
Bone	0.055	0.030	0.016	0.091	0.065	0.075	0.023	0.045	0.012	0.024	BQL	0.022
Heart	1.38	1.04	0.583	0.520	0.490	0.390	0.230	0.180	0.410	0.200	0.070	0.0700
Skeletal muscle	0.039	0.147	0.071	0.057	0.060	0.047	0.044	0.045	0.065	0.020	0.017	0.010
Lung	2.17	2.01	1.33	0.850	0.626	0.410	0.240	0.290	0.360	0.100	0.053	0.0400
Cecum	0.274	0.356	0.295	0.449	0.387	0.479	0.108	0.541	0.429	0.115	0.035	0.035
Cecum (contents)	BQL	0.004	0.008	0.019	0.227	0.010	0.597	0.308	0.207	0.020	0.004	0.024

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

Concentration ($\mu\text{g equiv/g}$) ^a												
Tissue	0.25 h	0.5 h	1 h	3.5 h	4 h	6 h	24 h	48 h	168 h	672 h	1008 h	1344 h
Colon	0.117	0.204	0.071	0.134	0.129	0.175	0.127	0.222	0.202	0.031	0.023	0.024
Colon (contents)	BQL	BQL	BQL	0.010	0.011	0.351	0.831	0.584	0.262	0.032	0.005	0.029
Esophagus	0.159	0.234	0.114	0.198	0.109	0.112	0.086	0.115	0.110	0.033	0.041	0.021
Large intestine	0.112	0.089	0.110	0.126	0.119	0.140	0.147	0.510	0.189	0.048	0.025	0.025
Large intestine (contents)	BQL	BQL	BQL	BQL	0.012	BQL	0.379	0.487	0.393	0.025	0.007	0.026
Oral mucosa	0.060	0.139	0.114	0.119	0.143	0.116	0.113	0.131	0.077	0.029	0.026	0.011
Small intestine	0.311	0.489	1.97	0.630	1.46	1.92	0.331	0.426	0.526	0.087	0.064	0.063
Small intestine (contents)	0.011	0.033	2.81	5.16	8.55	12.5	0.610	0.411	0.299	0.019	0.006	0.019
Stomach (gastric mucosa)	0.496	0.409	0.165	0.196	0.163	0.134	0.164	0.159	0.213	0.062	0.036	0.034
Stomach (contents)	0.129	3.23	11.2	1.33	0.511	0.004	0.195	0.012	0.059	0.003	BQL	0.004
Eye (uveal tract)	0.120	0.123	0.091	0.230	0.134	0.072	0.069	0.067	0.084	0.030	0.015	0.041
Eye (lens)	BQL	BQL	0.003	0.007	0.011	0.009	0.006	0.007	0.004	0.004	0.003	BQL

Abbreviations: BQL=value is below the lower limit of quantification or tissue could not be visualized on autoradioluminograph due to BQL radioactivity; C_{max}=maximum (peak) drug concentration; ULOQ=upper limit of quantification.

a One rat/time point.

b Value is above the ULOQ.

Notes: C_{max} value for each tissue is listed in **bold**.

LLOQ = 0.0003372 $\mu\text{Ci/g}$ / 0.085125 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ x 0.8828 purity correction factor = 0.003 $\mu\text{g equiv/g}$ tissue

ULOQ = 5.3824631 $\mu\text{Ci/g}$ / 0.085125 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ x 0.8828 purity correction factor = 55.820 $\mu\text{g equiv/g}$ tissue

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

放射能は肝臓中で最も高く、投与後約4時間の時点で投与量の約90%が検出された(表37)。膀胱及び腸管内容物に高い放射能濃度が検出され、腎臓及び胆汁を介した排泄が示唆された。両系統のラットにおいて、中枢神経系組織中の放射能濃度は低く(≤0.070 μg equiv/g)、投与後8時間以降では定量下限未満(<0.003 μg equiv/g)であった。Long Evans ラットでは、メラニン含有組織への選択的分布は認められなかった。心臓中の放射能量は微量であり、最大で投与後0.25時間の時点で投与量の0.24%の放射能が検出され、1344時間(56日)までに0.01%へと低下した。

表 37 - Sprague Dawley ラットにおける脾臓、腎臓、肝臓、脳、副腎、心臓及び肺中放射能分布(対投与量%)

		% Recovery of Administered Dose (1 Rat/Time Point)				
Tissue Type	Tissue	0.25 h	4 h	24 h	168 h	1344 h
Vascular/Lymphatic	Liver	22.3	90.2	34.5	18.4	0.45
Excretory/Metabolic	Spleen-Total	0.20	0.70	0.48	0.69	0.19
	Kidney	0.61	0.40	0.22	0.25	0.04
Respiratory Tract	Lung	0.57	0.16	0.070	0.10	0.01
Skeletal/Muscular	Heart	0.24	0.08	0.04	0.07	0.01
Endocrine	Adrenal	0.02	0.06	0.14	0.13	0.08
Central Nervous System	Brain (cerebrum cerebellum, medulla)	0.04	0.03	0.00	0.03	0.00

Notes: % Recovery = μCi/g tissue x weight tissue g/μCi dose/rat x100

Assumes subregions of organs weigh as much as total weight; assumes body weight of 250 g

Tissue weights used for calculation: spleen 0.75 g; kidney 2 g; liver 10 g; adrenal gland 0.05 g; heart 1 g; lung 1.5 g; brain 1.8 g

4.2.3 ラットを用いた組織内分布試験(マイクロオートラジオグラフィ法)

(CTD: 4.2.2.3-3, ■■■ 319D-1202)

■■■ 319-1103 試験で得られた組織を用いて、マイクロオートラジオグラフィ(MARG)法により、Sprague-Dawley 雄ラットにおける¹⁴C-パチシラン-LNPの組織内分布を評価した。QWBAの結果に基づいて特定時点の副腎、肝臓、腎臓及び精巣組織試料を選択してMARG法による分析を実施した。精巣組織は、ラットを用いた6週間(q2w x 4)投与毒性試験で毒性所見が認められたため(TTR02-NCD10-005 試験; 2.6.6, 3.1.1 項参照)、評価の対象とした。投与後0.25、0.5、1、2、4、6、24及び48時間に、各時点につき1例のラットを安楽殺した。

QWBA法の結果では、肝臓中の¹⁴C-パチシラン-LNP由来放射能濃度は投与後1時間に最高値に達した。肝細胞の細胞質及び血管領域に明らかな放射能が検出されたものの、放射能は主に肝臓の類洞腔内に認められたことから、肝細胞への初期取り込みは小さく、局在の可視化のためにはより長時間の曝露が必要であった。類洞で検出された放射能は投与後1、6及び24時間でわずかに減少した一方、肝細胞の細胞質及び肝臓の血管領域での放射能は増加し、48時間後には肝臓内の放射能は

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

血管系、類洞及び細胞部分により均等に分布した。類洞の周囲にある程度の放射能が検出されたものの、凍結保存／凍結切片化した MARG 法用試料に典型的な特徴としてみられる細胞形態不良のため、クッパー細胞への共局在化は確認できなかった。

QWBA 法の結果では、脾臓中の ^{14}C -パチシラン-LNP 由来放射能濃度は投与後 24 時間に最高値に達した。放射能は主に赤脾髄の細胞質にて検出され、赤脾髄中の放射能濃度は 48 時間後まで増加したか又は一定値を示した。脾臓中放射能は、初期時点では白脾髄中の細胞の核及び細胞質への分布を、後期時点では赤脾髄中の細胞内への分布をそれぞれ反映することが示唆された。

QWBA 法の結果では、腎臓中の ^{14}C -パチシラン-LNP 由来放射能濃度は投与後 6 時間に最高値に達した。 ^{14}C -パチシラン-LNP 由来放射能は腎臓への浸潤は相対的に少なく、初期時点では、主に糸球体に分布した。放射能は糸球体の細胞質及び一部の核に顕著に検出された他、糸球体での検出量と比較するとはるかに低いものの、尿細管、主にその細胞質にも検出された。投与後 48 時間の時点で放射能は依然として糸球体及び間質組織に局在化し、尿細管には少量の放射能のみ検出された。尿細管の管腔及び腎乳頭細胞では、検討したすべての時点においてわずかな放射能しか検出されなかった。

QWBA 法の結果では、副腎中の ^{14}C -パチシラン-LNP 由来放射能濃度は投与後 6 時間に最高値に達した。MARG 法の解析により放射能は副腎全体に分布することが示された。

放射能は皮質及び髄質の細胞質及び間質腔に分布し、検討したすべての試料で血管系及び近位細胞に最も高い放射能が検出された。投与後 24 及び 48 時間後の放射能分布は、血管に富んだ領域内及びその周辺で高く、副腎細胞では低い傾向であった。

QWBA 法の結果では、精巣中の ^{14}C -パチシラン-LNP 由来放射能濃度は投与後 168 時間に最高値に達した (4.2.2 項)。検討したすべての時点において、精巣中の放射能はわずかであった。放射能は精細管の管腔及び精原細胞の細胞質に検出された。精子細胞への特異的な局在化は認められなかった。一部の血管内で放射能が認められたが、その量は少なく、管腔内に限られていた。

4.2.4 サルにおける生体内分布

(CTD: 4.2.2.3-4, TTR02-NCD10-018)

雌雄のサル (1 群当たり雌雄各 4 例) を用いた PK 試験の一部として、0.03、0.3 及び 1 mg/kg のパチシラン-LNP を 1 時間で単回静脈内持続投与したときの ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の肝臓内分布をスパースサンプリングにより試料を採取し評価した (TTR02-NCD10-018 試験及び 3.1.4.1.2 項)。ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の肝臓中の PK に明らかな性差は認められなかったため、表 38 には雌雄を統合した平均データを示す。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 38 - サルにパチシラン-LNP を単回 1 時間静脈内持続投与したときの ALN-18328、DLin-MC3-DMA
及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の肝臓中 PK パラメータ (平均値)

Analyte	Dose (mg/kg)	t _{max} (day)	C _{max} (µg/g)	AUC _{0-t} (µg•day/g)
ALN-18328	0.03	NE	NE	NE
	0.3	2	0.0765	NE
	1.0	2	0.184	NE
DLin-MC3-DMA	0.03	3.5	7.00	97.4
	0.3	9.0	83.7	1360
	1.0	3.5	273	4110
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	0.03	ND	ND	ND
	0.3	ND	ND	ND
	1.0	2	2.66	9.44

Abbreviations: AUC_{0-t}= area under the concentration-time curve calculated from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) concentration; ND=not determined; NE=not evaluated due to insufficient sample size; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration.

ALN-18328 の組織中 PK :

ALN-18328 の最高血漿中濃度は、0.03、0.3 及び 1.0 mg/kg 投与群でそれぞれ、0.23、3.7 及び 17.3 µg/mL であった。肝臓中 ALN-18328 濃度は概して 2 日目 (スパスサンプリングでの初回試料採取時点) に最高値に達した。1.0 mg/kg 投与群の 2 日目の血漿中濃度は約 0.1 µg/mL であり、5 日目までに定量下限 (25 ng/mL) 未満に低下した。

DLin-MC3-DMA の組織中 PK :

肝臓中 DLin-MC3-DMA 濃度は 3~9 日目に最高値に達した。DLin-MC3-DMA の最高血漿中濃度は、0.03、0.3 及び 1.0 mg/kg 投与群でそれぞれ、1.92、29.4 及び 128.9 µg/mL であった。肝臓中の DLin-MC3-DMA は 29 日目 (最終試料採取時点) においても残存していた。DLin-MC3-DMA の AUC_{0-t} は ALN-18328 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG に比べて顕著に高値を示したことから、DLin-MC3-DMA の消失はより緩徐であることが示唆された。

PEG₂₀₀₀-C-DMG の組織中 PK :

肝臓中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は概して 2 日目 (初回試料採取時点) に最高値に達し、肝臓中の PEG₂₀₀₀-C-DMG は 22 日目まで残存していた。1.0 mg/kg 投与群の PEG₂₀₀₀-C-DMG の最高血漿中濃度は 17.5 µg/mL であった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の分布（対投与量%）：

1.0 mg/kg 投与群にて（非標識）ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の投与量に対する血漿及び肝臓中の各成分の総量の割合を算出した（表 39）。

表 39 - サルに 1.0 mg/kg のパチシラン-LNP を単回静脈内持続投与したときの ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の組織中分布（対投与量%平均値）

Day	Mean % of Dose in Plasma	Mean % of Dose in Liver	Total % of Dose
ALN-18328			
2	0.133	0.552	1.05
5	0.0250	0.161	0.730
DLin-MC3-DMA			
2	0.840	97.6	98.5
8	0.170	96.5	96.7
29	0.120	24.5	24.6
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG			
2	2.30	10.5	12.8
8	0.0800	0.860	0.940
22	0.0100	0.810	0.820

血漿中 ALN-18328 は投与終了時に最も高い対投与量%がみられ、投与後 96 時間より以降では検出されなかった。投与終了時の血漿中 ALN-18328 の対投与量%は 15.0%であり、24 時間後までに 0.133%へと減少した。肝臓中 ALN-18328 は投与後 96 時間まで定量可能であり、その対投与量%は概して 1%未満であった。肝臓中 ALN-18328 の対投与量%は、2 日目（初回試料採取時点）で 0.552%であり、これは血漿中（0.133%）に比べてわずかに高値を示した。

血漿中 DLin-MC3-DMA は最終測定時点（29 日目）まで残存し、対投与量%は投与終了時に最高値 16.4%に達した後、24 時間後までに 0.84%へと減少した。肝臓中 DLin-MC3-DMA は 29 日目（最終肝臓試料採取時点）まで測定可能であった。肝臓中 DLin-MC3-DMA の対投与量%は、2 日目の時点で 97.6%であり、29 日目までに 24.5%へと減少した。

血漿中 PEG₂₀₀₀-C-DMG は 22 日目まで定量可能であり、対投与量%は投与終了時に最高値 20.2%に達した後、24 時間後までに 2.30%へと減少した。肝臓中 PEG₂₀₀₀-C-DMG の対投与量%は、2 日目の時点で最高値（10.5%）に達した後、22 日目までに 0.81%へと減少した。

4.3 その他の分布試験

生殖発生毒性試験の一部として、ラット及びウサギを用いてパチシラン-LNP 投与後の TK を評価した（2.6.6, 6 項参照）。生殖組織への分布を検討した組織分布試験を以下に要約した。

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

4.3.1 Sprague-Dawley ラットを用いた静脈内投与による受胎能並びに胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験

(CTD: 4.2.3.5.1-2, TTR02-NCD13-003)

発生毒性試験のための用量設定試験 (TTR02-NCD13-003 試験) の一部として、雌 Sprague-Dawley ラットにパチシラン-LNP 又は AF-011-18534 を 1 時間静脈内持続投与した後、投与 1 日目 (無処置雄ラットとの同居 2 日前) 又は妊娠推定 13 日での ALN-18328 又は ALN-18534 (PD 作用である TTR タンパク質の減少を観察するためのラット/マウスサロゲート) の TK を評価した。パチシラン-LNP (0.03、0.1、0.3 又は 1 mg/kg) 又は AF-011-18534 (0.3 又は 1 mg/kg) は、投与 1 日目 (雄ラットとの同居 2 日前) 並びに妊娠 6 及び 13 日に投与した。投与 1 日目、妊娠 6 日 (投与後 0.083 時間のみ) 及び妊娠 13 日に TK 評価用の血液試料を採取した (2.6.6, 6.2.1.1 項参照)。ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG のラット胎児組織への分布を評価し、その結果を以下に要約した。

ALN-18328 :

ラット胎児で ALN-18328 が検出されなかったことから、母体血漿から胎児へパチシラン-LNP は移行しないことが示された。

DLin-MC3-DMA :

0.3 及び 1 mg/kg のパチシラン-LNP を投与したときにラット胎児で認められた DLin-MC3-DMA 濃度が母体血漿中 C_{max} の 0.3% 未満であったことから、母体血漿から胎児に DLin-MC3-DMA は極微量しか移行しないことが示唆された (表 40)。

表 40 - パチシラン-LNP を静脈内持続投与したときの妊娠 19 日におけるラット胎児中 DLin-MC3-DMA 濃度 (平均値)

Dose (mg/kg)	Mean Concentration of DLin-MC3-DMA (ng/g) ±SD
0.3	8.74±1.75
1.0	22.6±6.18

PEG₂₀₀₀-C-DMG :

ラット胎児中の PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は定量下限未満であり、胎児は PEG₂₀₀₀-C-DMG の曝露を受けなかった。

4.3.2 Sprague-Dawley ラットを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験

(CTD: 4.2.3.5.1-3; TTR02-DSM15-015)

胚・胎児発生に関する試験の至適用量を選択するため、雌ラットを用いた受胎能、胚・胎児発生に関する試験のための 2 番目の用量設定試験 (GLP 非適用) を実施した。また、この試験の一部と

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

して、パチシラン-LNP 及び AF-011-18534 の胎盤通過性についても評価した。雌 Sprague-Dawley ラットに生理食塩水、AF-011-18534 (0.15、0.5 又は 1.5 mg/kg) 又はパチシラン-LNP (1.5 mg/kg) を同居前に3回(同居15、8及び1日前)及び妊娠6、13及び19日に静脈内投与した。妊娠19日の投与後0、5、1、2、8及び24時間にTK評価用動物から血液試料を採取した(2.6.6, 6.1.1.3項参照)。組織中濃度分析用の試料を妊娠20日に採取し、その結果を以下に要約した。

ALN-18328 及び AD-18534 :

妊娠20日において、0.15 mg/kg AF-011-18534 投与群のラット胎盤中に AD-18534 は検出されなかった。0.5 及び 1.5 mg/kg AF-011-18534 投与群のラット胎盤中 AD-18534 濃度はそれぞれ、128 ng/g (1例) 及び 90.6±58.2 ng/g であった。いずれの AF-011-18534 投与群についても、胎児組織試料中に AD-18534 が検出されなかったことから、AD-18534 はラット母体血漿から胎児へ移行しないことが示された(表41)。また、1.5 mg/kg パチシラン-LNP 投与群でのラット胎盤及び胎児組織中に ALN-18328 が検出されなかったことから、ALN-18328 も母体血漿から胎盤又は胎児へ移行しないことが示された。

表 41 - ラットに AF-011-18534 又はパチシラン-LNP を反復静脈内持続投与したときの妊娠20日の母体肝臓、胎盤及び胎児組織中の ALN-18328 及び ALN-18534 siRNA 濃度 (平均値±SD)

Test Article	AF-011-18534			Patisiran-LNP
	Dose (mg/kg)	0.15	0.5	1.5 ^a
Analyte	AD-18534			ALN-18328
Tissue	Concentration (µg/g)			
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Liver	0.0819±0.0133	0.192±0.0468	0.290±0.0627	0.194±0.0815
Placenta	<LLOQ	0.128 ^b	0.0906±0.0582	<LLOQ
Fetal Tissue ^c	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ

Abbreviations: LLOQ=lower limit of quantification; LNP=lipid nanoparticle; SD=standard deviation.

Note: Liver AD-18534 LLOQ = 5 ng/g; liver ALN-18328 LLOQ = 20 ng/g. Placenta AD-18534 LLOQ=40 ng/g; placenta ALN-18328 LLOQ=40 ng/g. Fetal tissue AD-18534 LLOQ=2 ng/g; fetal tissue ALN-18328 LLOQ=20 ng/g. Values converted to µg/g.

^a Liver tissue samples were collected from 7 of the 9 animals in the 1.5-mg/kg AF-011-18534 dose group.

^b Value represents n=1.

^c n=5 fetuses per animal.

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

DLin-MC3-DMA :

AF-011-18534 投与群の妊娠 20 日の母体肝臓及び胎盤中 DLin-MC3-DMA 濃度は用量に比例して増加し、胎児組織中の DLin-MC3-DMA 濃度は用量比を下回り増加した。但し、1.5 mg/kg の AF-011-18534 又はパチシラン-LNP を反復投与したとき、妊娠 20 日の胎盤中に検出された DLin-MC3-DMA はわずかであった（母体血漿中 C_{max} の 3% 未満）。

DLin-MC3-DMA の胎児への移行性は極めて低く、AF-011-18534 投与群及びパチシラン-LNP 投与群のいずれについても、胎児組織中 DLin-MC3-DMA 濃度は、母体血漿中 C_{max} の 0.05% 未満であった。1.5 mg/kg の AF-011-18534 又はパチシラン-LNP を投与したとき、母体肝臓、胎盤及び胎児中 DLin-MC3-DMA 濃度は同程度であった（表 42）。

表 42 - ラットに 1.5 mg/kg の AF-011-18534（ラットサロゲート）又はパチシラン-LNP を反復静脈内持続投与したときの妊娠 20 日の母体肝臓、胎盤及び胎児組織中 DLin-MC3-DMA 濃度（平均値±SD）

Dose (mg/kg)	AF-011-18534			Patisiran-LNP
	0.15	0.5	1.5 ^a	1.5
	Concentration (µg/g)			
Tissue	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Liver	515±10.8	221±98.5	539±233	725±195
Placenta	0.325±0.107	1.35±0.350	2.90±0.871	2.23±0.549
Fetal Tissue ^b	0.00757±0.00306	0.0202±0.0176	0.0271±0.0316	0.0178±0.0229

Abbreviations: LLOQ=lower limit of quantification; LNP=lipid nanoparticle; SD=standard deviation.

Note: DLin-MC3-DMA LLOQ=4 ng/g

^a Liver tissue samples were collected from 7 of the 9 animals in the 1.5 mg/kg AF-011-18534 dose group.

^b Five fetuses per animal.

PEG₂₀₀₀-C-DMG :

妊娠 20 日のラット母体肝臓及び胎盤中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は、検討した用量範囲で用量にほぼ比例して増加した。妊娠 20 日の母体肝臓及び胎盤中に PEG₂₀₀₀-C-DMG は検出されたが、胎児組織では検出されなかった。母体肝臓中の PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は、胎盤中濃度に比べて約 10 倍高かった。1.5 mg/kg のパチシラン-LNP を反復静脈内持続投与したときの胎盤中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は、母体血漿中 C_{max} の 1.43±0.26% であった（表 43）。1.5 mg/kg の AF-011-18534 又はパチシラン-LNP を投与したときの母体肝臓、胎盤及び胎児中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は同程度であった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 43 - ラットに AF-011-18534 又はパチシラン-LNP を反復静脈内持続投与したときの妊娠 20 日の母体肝臓、胎盤及び胎児組織中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度 (平均値±SD)

Test Article	AF-011-18534			Patisiran LNP
	0.15	0.5	1.5 ^a	1.5
Dose (mg/kg)				
Tissue	Concentration (µg/g)			
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Liver	0.890±0.205	2.60±1.10	4.87±1.53	5.21±1.38
Placenta	0.0924±0.0269	0.257±0.0780	0.603±0.114	0.527±0.0942
Fetal ^b	NC	NC	NC	NC

Abbreviations: LLOQ=lower limit of quantification; LNP=lipid nanoparticle; NC=not calculated – insufficient values to calculate parameter or all concentration values <LLOQ; SD=standard deviation.

^a Liver tissue samples were collected from 7 of the 9 animals in the 1.5 mg/kg AF-011-18534 dose group. n=5 fetuses per animal.

^b n=5 fetuses per animal.

Note: PEG₂₀₀₀-C-DMG LLOQ=40 ng/g.

4.3.3 パチシラン-LNP (ALN-TTR02) 及び AF-011-18534 の乳汁中分泌：ラットを用いた静脈内投与による出生前及び出生後の発生に関する試験

(CTD: 4.2.3.5.3-1, TTR02-GLP16-003)

交配雌ラット (F0 世代) に生理食塩水、パチシラン-LNP 又は AF-011-18534 を投与した。グループ 1 の TK 評価用雌ラット (4 例) には、生理食塩水を、グループ 2~4 の TK 評価用雌ラット (各群 10 例) には、それぞれ 0.15、0.5 又は 1.5 mg/kg のパチシラン-LNP を、グループ 5 の TK 評価用雌ラット (10 例) には、1.5 mg/kg の AF-011-18534 を投与した。各製剤又は生理食塩水は、妊娠期間及び授乳期間中 6 日毎に 1 回の頻度で 6 回 (妊娠 7、13、19 日及び授乳 6、12、18 日)、1 時間静脈内持続投与した。ラット乳汁試料は、グループ 1 の動物 3 例、グループ 2 及び 3 の動物各 10 例、グループ 4 及び 5 の動物各 9 例から授乳 12 日の投与後 2 時間に採取した。

授乳 12 日の投与終了後 2 時間の乳汁中 ALN-18328、AD-18534、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度及び母体血漿中濃度を測定した (2.6.6, 6.3.1 項参照)。1.5 mg/kg 以下のパチシラン-LNP 及び 1.5 mg/kg の AF-011-18534 を投与したとき、ALN-18328 及び AD-18534 は乳汁中に検出されなかった。乳汁中 DLin-MC3-DMA 濃度は、同時点の母体血漿中濃度のそれぞれ、4.7%以下及び 8.3%であった。PEG₂₀₀₀-C-DMG は、0.15 mg/kg パチシラン-LNP 投与群の乳汁中に検出されなかったが、0.5 mg/kg 以上のパチシラン-LNP 投与群及び 1.5 mg/kg AF-011-18534 投与群の乳汁中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は、それぞれの母体血漿中濃度の 6.6%以下及び 2.6%であった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

4.3.4 ニュージーランドホワイトウサギを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験

(CTD: 4.2.3.5.2-1, TTR02-DSM15-012)

胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験では、安全性及び胎児移行性を検討するため、妊娠ウサギ（TK 評価用動物各群 3 例）にパチシラン-LNP を投与し、母体血漿中 TK、母体肝臓、胎盤及び胎児組織中濃度を評価した。0.3、1 又は 2 mg/kg のパチシラン-LNP を、妊娠 7、13 及び 19 日に 3 回静脈内持続投与した。妊娠 7 及び 19 日の投与後 0、0.083、1、2、8 及び 24 時間に血液試料を採取し（2.6.6, 6.2.2.1 項参照）、組織試料（肝臓、胎盤及び胎児）は妊娠 29 日に採取した。

ALN-18328 :

妊娠 20 日に胎盤及び胎児組織中 ALN-18328 濃度を測定し、妊娠 19 日の母体血漿中 C_{max} と比較した。妊娠 20 日における ALN-18328 の胎盤及び胎児組織中の濃度及び妊娠 19 日の母体血漿中 C_{max} に対する割合を表 44 に要約した。本試験で検討した用量範囲では、妊娠 20 日の胎盤中 ALN-18328 濃度は無視しうる程度であり、母体血漿中 C_{max} の 0.37~9.63% であった。胎児組織中には ALN-18328 は検出されなかった。例外として、2 mg/kg パチシラン-LNP 投与群の胎児 1 例において ALN-18328 が検出されたものの、母体血漿中 C_{max} の 0.10% 未満であった。これらの結果より、検討した用量範囲でパチシラン-LNP を投与したとき、ALN-18328 の胎盤通過及び胎児への曝露は無視しうる程度であることが示された。

表 44 - ニュージーランドホワイトウサギに対して妊娠 7、13 及び 19 日にパチシラン-LNP を静脈内持続投与したときの妊娠 20 日（剖検時）における胎盤及び胎児中 ALN-18328 濃度及び母体血漿中 C_{max} に対する割合（平均値±SD）

Tissue	Dose (mg/kg) ^c	Concentration (µg/g)	Mean Percent (%) of Maternal ALN-18328 Plasma C_{max} (±SD)
		Mean	
Placenta (GD 20)	0.3	0.147 ^a	9.63 ± NR
	1	0.0658 ^b	0.37 ^b ± NR
	2	1.04 ^a	2.18 ± 2.86
Fetus (GD 20)	0.3	NR	0 ± NR
	1	NR	0 ± NR
	2	0.0474 ^b	0.1 ^b ± NR

Abbreviations: C_{max} =maximum (peak) drug concentration; GD=presumed day of gestation; LLOQ=lower limit of quantification; NR=not reported –values were LLOQ; SD=standard deviation.

^a Concentration value represents mean of n=2. No SD was calculated.

^b Concentration value represents n=1. No SD was calculated.

^c N= 3 TK rabbits per group

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

DLin-MC3-DMA :

妊娠 20 日に胎盤及び胎児組織中の DLin-MC3-DMA 濃度を測定し、妊娠 19 日の母体血漿中 C_{max} と比較した。妊娠 20 日の胎盤及び胎児組織中の DLin-MC3-DMA 濃度及び妊娠 19 日の母体血漿中 C_{max} に対する割合を表 45 に要約した。本試験で検討したパチシラン-LNP の用量範囲では、胎盤中 DLin-MC3-DMA 濃度は母体血漿中 C_{max} の 26.8~86.1%であった一方、胎児組織中濃度は母体血漿中 C_{max} の 0.04~0.18%であり、無視しうる程度であった。

表 45 - ニュージーランドホワイトウサギに妊娠 7、13 及び 19 日にパチシラン-LNP を静脈内持続投与したときの妊娠 20 日（剖検時）における胎盤及び胎児中 DLin-MC3-DMA 濃度及び母体血漿中 C_{max} に対する割合（平均値±SD）

Tissue	Dose (mg/kg) ^a	Concentration (µg/g)	Mean Percent of Maternal DLin-MC3-DMA Plasma C_{max} (± SD)
Placenta (GD 20)	0.3	3.81± 3.05	86.1±115
	1	28.8±19.0	30.0±21.4
	2	64.8±91.6	26.8±33.1
Fetus (GD 20)	0.3	0.00967±0.00377	0.18±0.16
	1	0.0485±0.0159	0.12±0.11
	2	0.0772±0.0539	0.04±0.02

Abbreviations: C_{max} =maximum (peak) concentration; GD=presumed day of gestation; SD=standard deviation; TK=toxicokinetic(s).

^a N=3 TK rabbits per group

PEG₂₀₀₀-C-DMG :

胎盤中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は母体血漿中 C_{max} の 10.6~15.2%であった。胎児組織中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度は母体血漿中 C_{max} の 0~0.24%と非常に低かった。これらの結果より、検討した用量範囲でパチシラン-LNP を投与したとき、PEG₂₀₀₀-C-DMG の胎盤通過及び胎児曝露は極わずかであることが示された。

表 46 - ニュージーランドホワイトウサギに妊娠 7、13 及び 19 日にパチシラン-LNP を静脈内持続投与したときの妊娠 20 日（剖検時）における胎盤及び胎児中 PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度及び母体血漿中 C_{max} に対する割合（平均値±SD）

Tissue	Dose (mg/kg) ^a	Concentration (µg/g)	Mean Percent (%) of Maternal PEG ₂₀₀₀ -C-DMG Plasma C_{max} (± SD)
Placenta (GD 20)	0.3	0.399±0.144	15.2±7.27
	1	1.95±1.35	12.1±5.39
	2	3.79±3.28	10.6±6.39
Fetus (GD 20)	0.3	NR	0 ± NA
	1	0.0612±0.00471	0.21 ± 0.23
	2	0.0890±0.0403	0.24 ± 0.17

Abbreviations: C_{max} =maximum (peak) concentration; GD=presumed day of gestation; LLOQ=lower limit of quantification; NA=not applicable; NR=not reported - insufficient values to calculate parameter or all concentration values <LLOQ; SD=standard deviation; TK = toxicokinetic(s).

^a N=3 TK rabbits per group

5 代謝（動物種間の比較）

パチシランの siRNA 成分である ALN-18328（製剤化されていない原薬及びパチシラン-LNP として製剤化された封入型 ALN-18328）及び製剤に使用した新規脂質である DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝特性を検討するため、*in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。実施したこれらの試験の一覧を表 47 に示す。

表 47 - ALN-18328 及びパチシラン-LNP 成分の代謝試験

Study #	Species/Matrix/Study Type	Analyte Evaluated
In vitro studies:		
TTR-ST10-008	Mouse, rat, monkey, and human liver cytosol metabolism	ALN-18328
TTR-ST10-002	Mouse, rat, monkey, and human sera (serum stability)	ALN-18328 in patisiran-LNP
TTR-ST10-001	Mouse, rat, monkey, and human liver cytosol metabolism	ALN-18328 in patisiran-LNP
BA16027	Metabolic Stability and Metabolic Profiling in Mouse, Rat, Monkey, and Human Serum and Liver S9-fractions	ALN-18328
319 N-1001	Mouse, rat, monkey, and human liver microsomes and S9 metabolic stability	DLin-MC3-DMA
319 N-1305		PEG ₂₀₀₀ -C-DMG
319 N-1002	Mouse, rat, monkey, and human liver microsomes and S9 metabolic profiling and identification	DLin-MC3-DMA
319 N-1616	In Vitro CYP Isozymes Identification in the Metabolism of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG using Human Supersomes: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4	ALN-18328
319 D-1304		DLin-MC3-DMA
319 N-1615		PEG ₂₀₀₀ -C-DMG
319 N-1004	CYP inhibition studies in human liver microsomes	ALN-18328
319 N-1003		DLin-MC3-DMA
319 N-1303		PEG ₂₀₀₀ -C-DMG
319 N-1807		ALN-18328, DLin-MC3-DMA and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG
319 N-1306	Assessment of potential to induce expression of Human hepatic isoforms CYP1A2, CYP2B6 & CYP3A4 in Human Hepatocytes	ALN-18328
319 N-1307		DLin-MC3-DMA
319 N-1308		PEG ₂₀₀₀ -C-DMG
319 N-1808		Patisiran-LNP
319-1103	Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague Dawley and Long-Evans Rats	¹⁴ C- Patisiran-LNP

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

Study #	Species/Matrix/Study Type	Analyte Evaluated
Ex vivo studies		
319 N-1105	Evaluation of Patisiran-LNP Effects on Cytochrome P450 and UGT Enzyme Activities using Liver Microsomes from Monkeys	Patisiran-LNP
In vivo studies		
TTR02-DSM17-002	In vivo metabolic profiling in rat plasma	Patisiran-LNP component for ALN-18328, PEG ₂₀₀₀ -C-DMG, and DLin-MC3-DMA
319 N-1201	Rat plasma, bile, excreta, and tissues metabolic profiling and identification	DLin-MC3-DMA
TTR02-DSM16-013	Monkey single dose IV in vivo metabolism profiling of ¹⁴ C-DLin-MC3-DMA and ALN-18328	¹⁴ C-DLin-MC3-DMA and ALN-18328 components of patisiran-LNP

Abbreviations: CYP=cytochrome P450; GLP=Good Laboratory Practice; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle.

5.1 *In vitro* 代謝試験

5.1.1 ALN-18328（原薬）の肝サイトゾル中での代謝安定性

(CTD: 4.2.2.4-1, TTR-ST10-008)

マウス、ラット、サル及びヒト由来の肝サイトゾルにおける ALN-18328 原薬の代謝安定性を *in vitro* 試験にて評価したところ、いずれの動物種においても類似した結果が得られた。ALN-18328 を CD-1 マウス、ラット、サル及びヒト肝サイトゾルとともに 37°C で 6 時間インキュベートしたときの ALN-18328 アンチセンス鎖の残存率はそれぞれ、約 90、95、92 及び 98% であった。ALN-18328 センス鎖の残存率はそれぞれ、約 84 (4 時間インキュベーション後)、91、86 及び 98% であった。以上より、ALN-18328 は肝サイトゾル中で安定であることが示された。

5.1.2 パチシラン-LNP 中の ALN-18328 の血清及び肝サイトゾル中での代謝安定性

(CTD: 4.2.2.4-2, TTR-ST10-002, CTD: 4.2.2.4-3, TTR-ST10-001)

パチシラン-LNP をマウス、ラット、サル及びヒト血清中で 37°C、24 時間インキュベートしたときの ALN-18328 アンチセンス鎖の残存率はそれぞれ、約 66、65、42 及び 102% であった。ALN-18328 センス鎖の残存率はそれぞれ、約 62、71、44 及び 102% であった (TTR-ST10-002 試験)。以上より、製剤中の ALN-18328 は、非臨床試験用動物種に比べてヒト血清中でより安定であることが示された。

パチシラン-LNP をマウス、ラット、サル及びヒト由来の肝サイトゾルとともに 37°C で 6 時間インキュベートしたときの ALN-18328 アンチセンス鎖の残存率はそれぞれ、約 85、88、84 及び 102% であり、ALN-18328 センス鎖の残存率はそれぞれ、約 77、82、83 及び 100% であった (TTR-ST10-001 試験)。この知見から、肝サイトゾル中での ALN-18328 の代謝安定性は高く、すべての非臨床試験用動物種にて同様の結果が得られた。ヒト肝サイトゾル中では、6 時間までのインキュベーションでは検出可能なアンチセンス鎖及びセンス鎖の代謝は認められなかった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

5.1.3 マウス、ラット、サル及びヒト血清並びに肝 S9 画分中での ALN-18328 (原薬) の代謝安定性及び代謝プロファイリング

(CTD: 4.2.2.4-4, BA16027)

LNP に製剤化されていない原薬である ALN-18328 の安定性を評価するため、C57BL/6 マウス、Sprague-Dawley ラット、サル及びヒト由来のプール血清及び肝 S9 画分を用いた *in vitro* 試験を実施し、ALN-18328 のセンス鎖及びアンチセンス鎖の安定性及び代謝プロファイルを評価した。マウス、ラット、サル及びヒト血清 (表 48) 及び肝 S9 画分 (pH 7 条件下) (表 49) 中で ALN-18328 を 37°C でインキュベートしたとき、24 時間後にはアンチセンス鎖及びセンス鎖はほとんど検出されなかった。ALN-18328 はヒト肝 S9 画分に比べヒト血清中にてより素早く分解され、ヒト肝 S9 画分中で 2 時間インキュベートしたときのアンチセンス鎖及びセンス鎖の残存率はそれぞれ 71% 及び 74% であったのに対し、ヒト血清中ではそれぞれ 4% 及び 1% であった。

表 48 - *in vitro* におけるマウス、ラット、サル及びヒト血清中での ALN-18328 の代謝安定性

Time (h)	Average Antisense and Sense Remaining (%) to Baseline in Serum							
	Mouse		Rat		Monkey		Human	
	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense
0	100	100	100	100	100	100	100	100
0.5	17.0	16.0	7.00	4.00	46.0	33.0	43.0	31.0
2	0.0700	0.0500	0.0400	0.0300	4.00	1.00	4.00	1.00
4	0.0100	0.0400	0.0100	0.0200	0.210	0.0700	0.260	0.100
8	ND	0.0200	0.0100	0.0100	ND	0.01	ND	0.0100
24	ND	0.0100	ND	0.0100	ND	ND	ND	0.0100

Abbreviations: ND=not detected.

表 49 - *in vitro* におけるマウス、ラット、サル及びヒト肝 S9 画分中での ALN-18328 の代謝安定性

Time (h)	Average Antisense and Sense Remaining (%) to Baseline in Liver S9 Fractions							
	Mouse		Rat		Monkey		Human	
	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense
0	100	100	100	100	100	100	100	100
0.5	75.0	82.0	14.0	14.0	67.0	65.0	83.0	81.0
2	43.0	47.0	0.0900	0.110	4.00	3.00	71.0	74.0
4	15.0	19.0	0.0700	0.0800	0.100	0.0800	55.0	54.0
8	2.00	3.00	0.0400	0.0800	0.0400	0.0500	23.0	17.0
24	0.0700	0.110	0.0700	0.0500	0.0500	0.0600	0.730	0.380

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

マウス、ラット、サル及びヒトでの *in vitro* 代謝プロファイリングから、4 種いずれの動物種の血清及び肝 S9 画分から類似した ALN-18328 の代謝物が生成することが示され、ヒト特異的な代謝物は認められなかった。マウス、ラット、サル及びヒト由来の血清及び肝 S9 画分とともに ALN-18328 を 37°C で 24 時間インキュベートしたとき、エキソヌクレアーゼによる切断を介したセンス鎖及びアンチセンス鎖両方の分解物が認められた。センス鎖の主代謝物として、代謝物 a*、代謝物 b*、代謝物 c* 及び代謝物 d* が検出され、また、エキソヌクレアーゼを介した切断による 代謝物 o*、代謝物 p* 及び代謝物 q* が認められた。アンチセンス鎖の主代謝物として、代謝物 e*、代謝物 f*、代謝物 g*、代謝物 h*、代謝物 i* 及び 代謝物 r* が検出され、さらに、アンチセンス鎖 [REDACTED] 及び [REDACTED] でエキソヌクレアーゼにより切断された代謝物も認められた。これらの結果に基づいて推定した代謝経路を 図 12 に示した。

図 12 - *in vitro* 血清及び肝 S9 画分中の ALN-18328 の推定代謝経路



2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

ALN-18328のアンチセンス鎖(A-32346)の末端が切断された代謝物のTTR mRNA抑制活性を*in vitro*で評価した結果 [REDACTED] [REDACTED] まで薬理的活性が認められ、n-1切断ごとに活性は低下した(2.6.2, 2.1.3 項参照)。

5.1.4 DLin-MC3-DMA の肝ミクロソーム及び S9 画分中での代謝安定性

(CTD: 4.2.2.4-5, [REDACTED]-319N-1001、CTD: 4.2.2.4-6, [REDACTED]-319N-1002)

In vitro 試験にて、2 µmol/L (1284 ng/mL) の DLin-MC3-DMA をマウス、ラット、サル及びヒト由来の肝ミクロソーム及び肝 S9 画分とともに 37°C で 60 分間インキュベートしたときの代謝安定性を評価した。代謝されずに残存した DLin-MC3-DMA は、マウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソームでそれぞれ 80.8、78.3、73.2 及び 76.4% であり、4 種いずれの動物種由来の肝ミクロソームにおいても DLin-MC3-DMA の代謝はわずかであった。また、DLin-MC3-DMA はマウス、ラット、サル及びヒト肝 S9 画分中では比較的安定であり、残存率はそれぞれ、89.2、90.1、94.3 及び 95.7% であった ([REDACTED] 319N-1001 試験)。

肝ミクロソーム及び S9 画分における DLin-MC3-DMA (20 µmol/L) の代謝プロファイルは、検討したいずれの動物種においても類似していた。マウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソームでは、一酸化体及び二酸化体の生成が確認された。外因性グルタチオン (GSH) の添加により、一酸化体の GSH 付加体が生成し、エポキシド生成が示唆されたものの、エポキシドの化学的加水分解物として予想されるジオール体の生成は確認されなかった ([REDACTED] 319N-1002 試験)。更に、ヒト CYP Supersome を用いたその後の *in vitro* 試験においては、DLin-MC3-DMA の代謝によるエポキシドの生成は示唆されなかった ([REDACTED] 319D-1304 試験、5.1.7 項参照)。

肝 S9 画分とともにインキュベーションしたとき、硫酸抱合及びグルクロン酸抱合のような第 II 相抱合代謝物は認められなかった。生成した一酸化体に対する二酸化体の比は、肝ミクロソーム中と比べ肝 S9 画分中で高かった。ヒト特異的な代謝物は検出されなかった。

5.1.5 肝ミクロソーム及び S9 画分中での PEG₂₀₀₀-C-DMG 代謝に関する動物種間比較 (マウス、ラット、サル及びヒト)

(CTD: 4.2.2.4-8, [REDACTED]-319N-1305)

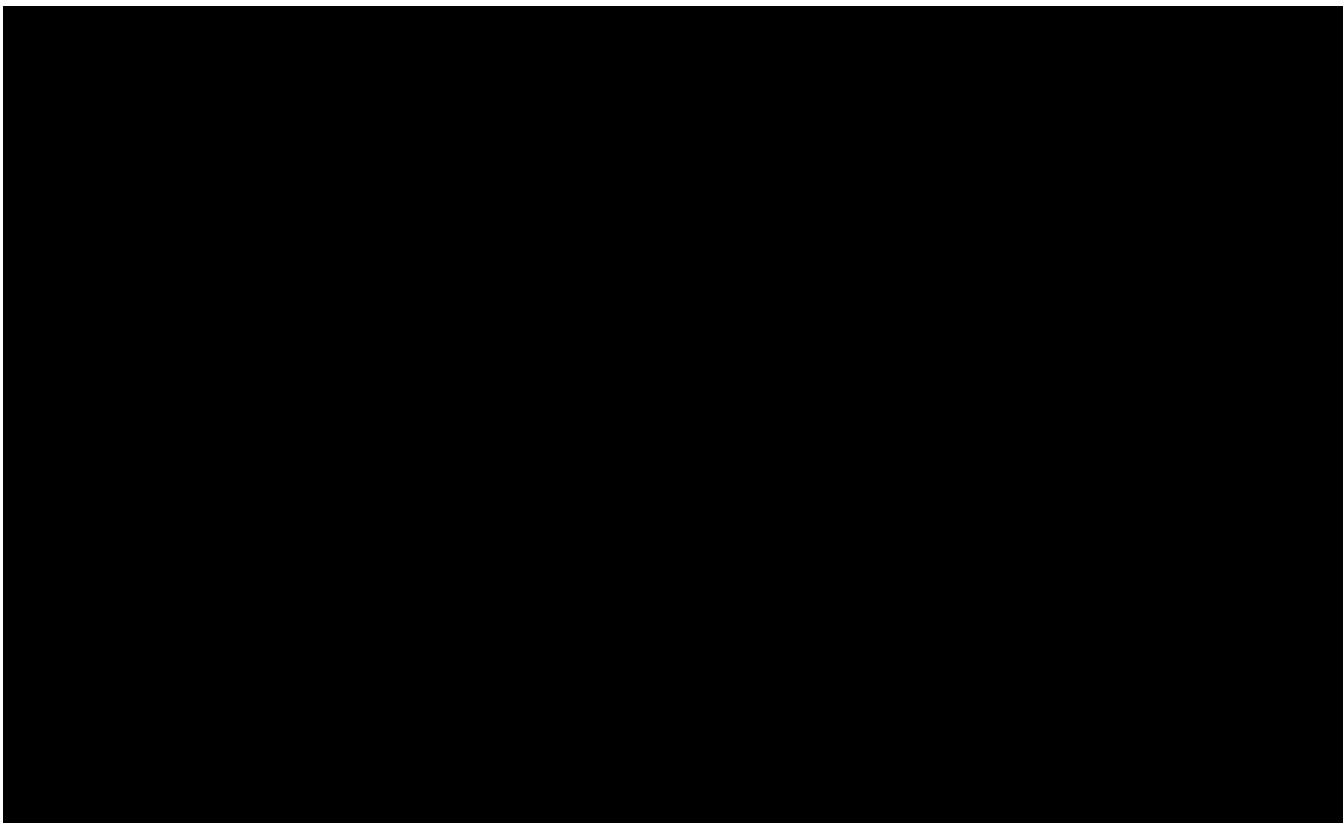
In vitro 試験にて、CD-1 マウス、Sprague-Dawley ラット、サル及びヒト由来の肝ミクロソーム及び S9 画分を用いて、PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝安定性及び代謝プロファイルの評価並びに代謝物を同定した。肝ミクロソームを用いた代謝安定性試験では、PEG₂₀₀₀-C-DMG を CD-1 マウス、Sprague-Dawley ラット、サル又はヒト肝ミクロソームとともに 37°C でインキュベートした (n=3)。肝ミクロソームを用いた代謝安定性試験のインキュベーション混合液には、補酵素 NADPH を添加した。代謝プロファイリング及び代謝物同定試験では、実験時最終濃度 20 µmol/L の PEG₂₀₀₀-C-DMG を代謝安定性試験と同様にインキュベートし、0、30 及び 60 分後に試料を採取した。肝 S9 画分を用いた代謝安定性試験のインキュベーション混合液には、NADPH (CYP 媒介性の酸化的代謝用)、3'-ホスホア

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

デノシン-5'-ホスホ硫酸 (硫酸抱合用) 及びウリジン 5'-ジホスホグルクロン酸 (グルクロン酸抱合用) を添加した。試料は LC-MS 及び LC-MS/MS を用いて分析した。

マウス、ラット、サル及びヒト由来の肝ミクロソーム及び肝 S9 画分を用いて 60 分間インキュベートしたときの PEG₂₀₀₀-C-DMG の残存率は、90~107%であった。このことから、4 種いずれの動物種においても PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝にシトクロム P450 は重要ではないことが示された。マススペクトル解析により、PEG₂₀₀₀-C-DMG を構成する複数の要素は、分子量 2100~3400 Da の 4 つのホモログシリーズに分類された。シリーズ 3 のホモログは PEG₂₀₀₀-C-DMG の構造式と一致し、シリーズ 1、2 及び 4 のホモログの構造式は不明であった。マウス及びラット肝ミクロソーム及び肝 S9 画分中での PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝プロファイリングでは、主代謝物は確認されなかった。一方、サル及びヒト肝ミクロソーム及び肝 S9 画分中では、シリーズ 1、2 及び 3 の各ホモログから脱テトラデシル化代謝物が特定され、O-脱テトラデシル化により少なくとも 6 種類の代謝物が生成することが示唆された。以上、PEG₂₀₀₀-C-DMG は肝ミクロソーム及び肝 S9 画分によってわずかしか代謝されなかった。また、ヒト肝ミクロソーム及び肝 S9 画分による PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝プロファイルはサルと類似していた (図 13)。本試験ではヒト特異的な代謝物は認められなかった。

図 13 - [REDACTED]



2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

5.1.6 ALN-18328 : ヒト Supersome とのインキュベーションによる ALN-18328 代謝に関する CYP 分子種の特定

(CTD: 4.2.2.4-9, [REDACTED]-319N-1616)

遺伝子組換え CYP 酵素である rCYP1A2、rCYP2B6、rCYP2C8、rCYP2C9、rCYP2C19、rCYP2D6、rCYP3A4 及び rCYP3A5 を用いて、ALN-18328 の代謝に関する CYP 分子種特定試験を実施した。ALN-18328 の濃度は、10 µg/mL (0.745 µmol/L) 及び 100 µg/mL (7.45 µmol/L) を用いた。検討した最高濃度は、臨床での定常状態における ALN-18328 の血漿中 C_{max} (7.15 µg/mL) に比べて約 14 倍高かった。陰性対照は、ALN-18328 を NADPH 非存在下で酵素とともにインキュベートした。ALN-18328 は LC-TOF-MS を用いて分析した。いずれの rCYP 酵素でも ALN-18328 は代謝されず、各 rCYP とともに 45 分間インキュベーション後の未変化体残存率は約 90%、あるいはそれ以上であった。以上の結果から、ALN-18328 は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 及び CYP3A5 の基質ではないことが示された。

5.1.7 DLin-MC3-DMA : ヒト Supersome とのインキュベーションによる DLin-MC3-DMA 代謝に関する CYP 分子種の特定

(CTD: 4.2.2.4-7; [REDACTED]-319D-1304)

In vitro 試験にて DLin-MC3-DMA の代謝に関する CYP 分子種を特定するため、20 µmol/L (12842 ng/mL) の DLin-MC3-DMA をヒト CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 又は CYP3A4 Supersome (タンパク質濃度として 30 pmol/mL) とそれぞれ 60 分間インキュベートした。インキュベーション後の DLin-MC3-DMA の残存率は、CYP3A4、CYP2C8、CYP2A6、CYP2C9 及び CYP2C19 ではそれぞれ、73.9、88.1、89.4、94.8 及び 99.6% であり、CYP1A2、CYP2B6 及び CYP2D6 では 100% であったことから、DLin-MC3-DMA は CYP により代謝をほとんど受けなかった。なお、代謝の程度は低かったものの、LC-MS/MS 法により一酸化体、多重酸化体及びカルボキシル化体など数種の代謝物が検出された。エポキシドの生成は確認されなかった ([REDACTED] 319N-1002 試験、5.1.4 項参照)。

5.1.8 PEG₂₀₀₀C-DMG : ヒト Supersome とのインキュベーションによる PEG₂₀₀₀C-DMG 代謝に関する CYP 分子種の特定

(CTD: 4.2.2.4-10, [REDACTED]-319N-1615)

遺伝子組換え CYP 酵素である rCYP1A2、rCYP2B6、rCYP2C8、rCYP2C9、rCYP2C19、rCYP2D6、rCYP3A4 及び rCYP3A5 を用いて、PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝に関する CYP 分子種特定試験を実施した。PEG₂₀₀₀-C-DMG の濃度は、10 µg/mL (3.60 µmol/L) 及び 100 µg/mL (36.0 µmol/L) を用いた。検討した最高濃度は、臨床での定常状態における PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中 C_{max} に比べて約 20 倍高かった。陰性対照は、PEG₂₀₀₀-C-DMG を NADPH 非存在下で酵素とともにインキュベートした。いずれの rCYP 酵素でも PEG₂₀₀₀-C-DMG は代謝されず、各 rCYP とともに 45 分間インキュベーション後の未変化体残存率は約 90% 以上であった。以上の結果から、PEG₂₀₀₀-C-DMG は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 及び CYP3A5 の基質ではないことが示された。

2.6.4 薬物動態試験の概要文

パチシランナトリウム

5.1.9 ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG のシトクロム P450 阻害試験

(CTD: 4.2.2.4-11, ■■■-319N-1004、CTD: 4.2.2.4-12, ■■■-319N-1003、CTD: 4.2.2.4-13, ■■■-319N-1303、
CTD: 4.2.2.4-20, ■■■ 319N-1807)

ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG に関して実施した CYP 阻害試験結果を以下に要約した。

ALN-18328 :

ヒト肝ミクロソーム (プール) を用いて、ヒトでの主要な薬物代謝酵素である 5 種類のシトクロム P450 (CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5) 活性に対する ALN-18328 の阻害作用を評価した。それぞれのプローブ基質として、フェナセチン、トルブタミド、S-メフェニトイン、デキストロメトルファン、ミダゾラム及びテストステロンを使用し、ALN-18328 の阻害作用を 6.344 µmol/L (85.2 µg/mL) まで検討した (■■■ 319N-1004 試験)。

ALN-18328 又は陽性対照阻害剤をミクロソーム (最終タンパク濃度 0.5 mg/mL) 及びすべての CYP 分子種プローブ基質とともに、37°C で 15 分間 (CYP1A2、CYP2C9 及び CYP2D6) 又は 30 分間 (CYP2C19) インキュベートした。CYP3A4/5 のプローブ基質であるミダゾラム及びテストステロンは、それぞれ 2 及び 5 分間インキュベートした。

ALN-18328 が CYP2B6 及び CYP2C8 の直接阻害剤として作用する可能性を、ヒト肝ミクロソーム (プール) 及びシトクロム P₄₅₀ (CYP) 特異的プローブ基質を用いて検討した (■■■ 319N-1807 試験)。CYP 活性を、ALN-18328 非存在下 (溶媒対照) 及び 0、0.00745、0.0224、0.224、2.24、7.45、22.4 及び 74.5 µM (0、0.1、0.3、3、30、100、300 及び 1000 µg/mL) 濃度の ALN-18328 存在下でプローブ基質の代謝物の生成を測定することにより評価した。

時間依存的阻害作用の可能性を、2 セットの試料を同時にインキュベーションして評価した：一方の試料では、ヒト肝ミクロソーム (1 mg/mL) に、ALN-18328 を 0、0.00745、0.0224、0.224、2.24、7.45、22.4 及び 74.5 µM 濃度で添加して NADPH 存在下でプレインキュベーションした。他方の試料ではヒト肝ミクロソームに、上記と同濃度の ALN-18328 を添加して NADPH 非存在下でプレインキュベーションした。プレインキュベーションした各混合物より一定量を分取し、それに各プローブ基質反応混合物 (10 倍希釈) を加えてインキュベーションすることにより、CYP 分子種の残存活性を評価した。当該 CYP 分子種の選択的阻害剤を陽性対照として 1 段階のみの濃度でヒト肝ミクロソームに添加したものを 3 セット目の試料として同時にプレインキュベーションして、酵素活性の確認と阻害作用の比較を行った。

陽性対照阻害剤は各 CYP 分子種に対して強力な阻害作用を示し、算出した IC₅₀ 値は文献報告値と一致していた。ALN-18328 は検討した最高濃度までヒト肝ミクロソーム中の CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 に対して直接阻害作用を示さなかった。ALN-18328 はまた、CYP2C8 に対して濃度依存的な阻害作用を示さなかった。ALN-18328 は、検討した最高濃度 (74.5 µmol/L) で CYP2C8 の活性を僅かに 23% 低下させた。したがって、ALN-18328 の CYP2C8 に対する IC₅₀ 値は 74.5 µmol/L を超えると考えられる。ALN-18328 は、CYP2B6 に対しても濃度依存的な阻害作用を示

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

し、IC₅₀値は45.3 µmol/Lであった。ALN-18328はCYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6又はCYP3A4に対する時間依存的阻害剤ではなかった。ALN-18328のCYP2B6に対するIC₅₀比(NADPH存在下/非存在下)は2.9であることから、ALN-18328は、CYP2B6に対しては弱い時間依存的阻害剤であることが示唆された(12)。検討した最高濃度である85.2 µg/mLは、ヒトに0.3 mg/kgを反復静脈内投与したときに認められたC_{max}の10倍を超える濃度であった。したがって、臨床濃度においてALN-18328が主要なCYP分子種の活性を阻害し、薬物間相互作用を誘発する可能性は低いと考えられる。

DLin-MC3-DMA :

ヒト肝ミクロソーム(プール)を用いて、ヒトでの主要な薬物代謝酵素である8種類のシトクロムP450(CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6及びCYP3A4/5)活性に対するDLin-MC3-DMAの直接及び時間依存的阻害作用を評価した。DLin-MC3-DMAの阻害作用は30 µmol/L(19.3 µg/mL)まで検討した(■ 319N-1003試験及び■ 319N-1807試験)。

陽性対照阻害剤は各CYP分子種に対して強力な阻害作用を示し、算出したIC₅₀値は文献報告値と一致していた。DLin-MC3-DMAは検討した最高濃度までヒト肝ミクロソーム中のCYP1A2、CYP2B6、CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6及びCYP3A4/5に対して直接阻害作用も時間依存的阻害作用も示さなかった。検討した最高濃度19.3 µg/mLは、ヒトに0.3 mg/kgを反復静脈内投与したときに認められたC_{max}(約40 µg/mL)に比べて低かったが、本試験中で用いた溶媒中でのDLin-MC3-DMAの溶解度の制限により、これ以上の濃度は実施できなかった。

PEG₂₀₀₀-C-DMG :

ヒト肝ミクロソーム(プール)を用いて、ヒトでの主要な薬物代謝酵素である8種類のシトクロムP450(CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6及びCYP3A4/5)活性に対するPEG₂₀₀₀-C-DMGの阻害作用を評価した。PEG₂₀₀₀-C-DMGの阻害作用は150 µmol/L(420 µg/mL)まで検討した(■ 319N-1303試験及び■ 319N-1807試験)。

当該結果から、PEG₂₀₀₀-C-DMGは、溶媒対照と比較してCYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6及びCYP3A4/5の酵素活性を直接又は時間依存的に阻害しないことが認められた。しかし、プローブ基質の代謝物の生成を測定することにより酵素活性を評価したところ、CYP1A2及びCYP2C19については37.5 µmol/L(105 µg/mL)以上、CYP2B6及びCYP2C19については7.5 µmol/L(21 µg/mL)以上の濃度のPEG₂₀₀₀-C-DMGにより僅かな酵素活性の上昇(対照値の約1.3倍)がみられた。これらの濃度は、臨床でみられたPEG₂₀₀₀-C-DMGの最高血漿中濃度(5 µg/mL)に比べて約4~21倍高いため、臨床で薬物間相互作用が生じる可能性は低いことが示唆された。

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

5.1.10 ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG のシトクロム P450 誘導試験

(CTD: 4.2.2.4-14, ■■■-319N-1306、CTD: 4.2.2.4-15, ■■■-319N-1307、CTD: 4.2.2.4-16, ■■■-319N-1308、
CTD: 4.2.2.4-21, ■■■ 319N-1808)

ALN-18328、DLin-MC3-DMA、PEG₂₀₀₀-C-DMG 及びパチシラン-LNP に関して実施した CYP 誘導試験結果を以下に要約した。

ALN-18328 :

サンドイッチ培養凍結保存ヒト肝細胞を用いて、0.55~275 µg/mL までの ALN-18328 による CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の誘導作用を評価した (■■■ 319N-1306 試験)。検討した最高濃度は、臨床でみられた定常状態における ALN-18328 濃度 (C_{max}) の約 40 倍であった。3 例の成人ドナー由来の凍結保存ヒト肝細胞をコラーゲン被覆プレートで培養し、溶媒のみ、陽性対照及び陰性対照化合物、又は ALN-18328 を添加して、48 又は 72 時間インキュベートした (それぞれ、mRNA 発現量及び酵素活性を測定)。CYP 誘導陽性と判定する基準は、mRNA 発現量が陰性対照値と比較して 4 倍以上増加するか、又は酵素活性が陽性対照による誘導の 40% 以上 (又は 0.4 倍以上) 上昇することとした。肝細胞を ALN-18328 とともにインキュベートしたとき、検討した濃度では CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現量は有意に増加せず、また、CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の酵素活性も上昇しなかった。これらの結果より、275 µg/mL (20.5 µmol/L) 以下の ALN-18328 は CYP を誘導せず、臨床で薬物間相互作用が生じる可能性は低いと示唆された。

DLin-MC3-DMA :

サンドイッチ培養凍結保存ヒト肝細胞を用いて、3 濃度 (1、10 及び 30 µmol/L) の DLin-MC3-DMA による CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の誘導作用を *in vitro* で評価した (■■■ 319N-1307 試験)。DLin-MC3-DMA 濃度は、試験溶媒中での溶解度により制限され、検討した最高濃度は、臨床での定常状態 (反復静脈内投与) における C_{max} の約 0.5 倍であった。3 例の成人ドナー由来の凍結保存ヒト肝細胞をコラーゲン被覆プレートで培養し、溶媒のみ、陽性対照及び陰性対照化合物、又は被験物質を添加して、48 又は 72 時間インキュベートした (それぞれ、mRNA 発現量及び酵素活性を測定)。CYP 誘導陽性と判定する基準は、mRNA 発現量が対照値の 4 倍以上増加するか、又は酵素活性が陽性対照による誘導の 40% 以上 (又は 0.4 倍以上) 上昇することとした。検討したいずれの濃度においても、DLin-MC3-DMA による CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現量及び酵素活性の増加は認められなかった。これらの結果により、30 µmol/L (19.3 µg/mL) 以下の DLin-MC3-DMA が CYP を誘導する可能性は低いと考えられた。

PEG₂₀₀₀-C-DMG :

サンドイッチ培養凍結保存ヒト肝細胞を用いて、0.42、4.2 及び 210 µg/mL の PEG₂₀₀₀-C-DMG による CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の誘導作用を *in vitro* で評価した (■■■ 319N-1308 試験)。検討し

2.6.4 薬物動態試験の概要文

パチシランナトリウム

た最高濃度は、臨床でみられた定常状態における血漿中 C_{max} の約 40 倍であった。CYP 誘導陽性と判定する基準は、mRNA 発現量が対照値の 4 倍以上増加するか、酵素活性が陽性対照による誘導の 40% 以上 (又は 0.4 倍以上) 上昇することとした。検討したいずれの濃度においても、PEG₂₀₀₀-C-DMG による CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現量及び酵素活性の増加は認められなかった。これらの結果より、ヒトでの定常状態における血漿中 C_{max} の約 40 倍の濃度までは PEG₂₀₀₀-C-DMG が CYP を誘導する可能性は低いことが示された。

パチシラン-LNP :

3 例の成人ドナー由来の凍結保存ヒト肝細胞をコラーゲンコートプレートで培養し、溶媒のみ (陰性対照)、陽性対照誘導物質、又は被験物質を添加して 48 時間インキュベートした。パチシラン-LNP は、以下の 4 濃度を用いて評価した : 0.5、2、6 及び 18% (v/v) (それぞれ ALN-18328 を 10、40、120、360 µg/mL 含有) (■ 319N-1808 試験)。CYP 誘導陽性と判定する基準は、mRNA 発現量が溶媒対照値の 2 倍以上増加するか、又は酵素活性が陽性対照による誘導の 20% 以上増加することとした。誘導作用の評価には、細胞の生存性を確保するために、エンドポイント測定による細胞毒性アッセイ (乳酸脱水素酵素 [LDH] の放出) を用いた。更に、最終投与間隔 (24~48 時間) 中のパチシラン-LNP 濃度を、ALN-18328、PEG₂₀₀₀-C-DMG 及び DLin-MC3-DMA の濃度をモニタリングすることにより測定した。投与間隔中のパチシラン-LNP の消失は極めて軽微で (<50%)、LDH 放出の増加は認められず、また 3 例のドナー由来の凍結保存ヒト肝細胞全てにおいて、典型的誘導物質により顕著な誘導作用が認められたことから、当該試験条件は、パチシラン-LNP の誘導作用の評価に適することが示された。検討した 3 例のドナー由来の凍結保存ヒト肝細胞のいずれにおいても、CYP1A2 又は CYP3A4 の mRNA 発現量の溶媒対照値の 2 倍を超える濃度依存的な増加は認められなかった。パチシラン-LNP は CYP1A2 又は CYP3A4 の誘導物質ではないことから、CYP1A2 及び CYP3A4 の基質の臨床意義のある誘導は起こらないと予測された。2 例のドナー由来の凍結保存ヒト肝細胞では、パチシラン-LNP により、CYP2B6 の mRNA 量が濃度依存的に増加した。しかし 1 例のドナー由来の凍結保存ヒト肝細胞においてのみ、CYP2B6 の mRNA 量が対照値の 2 倍以上かつ、陽性対照による誘導の 20% 以上、濃度依存的に増加した。これらの結果により、パチシラン-LNP は CYP1A2 又は CYP3A4 を誘導する可能性は低いが、*in vitro* では CYP2B6 の誘導物質であると考えられた。

5.2 Ex Vivo 代謝試験

5.2.1 パチシラン-LNP 処理サル由来肝ミクロソームを用いたシトクロム P450 及び UGT 酵素活性に対するパチシラン-LNP の影響

(CTD: 4.2.2.4-17, ■-319N-1105)

サルを用いて CYP (第 I 相代謝) 及びウリジン 5'-ジホスホグルクロン酸転移酵素 (UGT) (第 II 相代謝) の酵素活性に対するパチシラン-LNP 投与の影響を評価した。1 mg/kg/日のパチシラン-LNP 又は溶媒 (PBS) を 1 時間静脈内持続投与により隔週で 4 回投与したサルから調製した肝ミクロソームを用いて、CYP 分子種 (CYP1A1/2、CYP2C76、CYP2C43、CYP2D6 及び CYP3A4) の酵素活性

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

を測定した。また、これらのサル由来肝マイクロソームの UGT 活性も測定した。肝臓試料は、毒性試験「A Multidose (once biweekly x 4 doses) Study of Patisiran by Intravenous Infusion in the Monkey with a 60-Day Recovery Period」(TTR02-NCD10-011 試験；表 2.6.5.4.H 参照)にて PBS 又はパチシラン-LNP を投与したサルから採取した。肝臓試料はマイクロソーム調製のために処理するまで-70°C で保存した。マイクロソームは、各肝臓試料から分画遠心法により調製した。

パチシラン-LNP を投与したサル肝マイクロソームを用いた *ex vivo* 試験では、CYP1A1/2、CYP2C76、CYP2C43、CYP2D6、CYP3A4 (基質として、ミダゾラム及びテストステロンを使用) 及び UGT1A1 の活性にパチシラン-LNP による有意な変化は認められなかった。

5.3 *In vivo* 代謝試験

5.3.1 ラットを用いた *In vivo* 代謝プロファイリング試験

(CTD: 4.2.2.4-18, TTR02-DSM17-002)

本試験では、雌雄の Sprague-Dawley ラットに 0.3 mg/kg のパチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与したときの血漿、肝臓及び尿中の ALN-18328 代謝プロファイルを検討した。また、尿中の PEG₂₀₀₀-C-DMG の代謝プロファイルも検討した。

雌雄各 21 例の Sprague-Dawley ラットに 0.3 mg/kg のパチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与した。1、2、3、8、15 及び 29 日目に動物を安楽殺し、血漿、肝臓及び尿中の ALN-18328 代謝物を評価した。また、尿中の PEG₂₀₀₀-C-DMG 代謝物についても評価した。

ラット血漿及び肝臓中の ALN-18328 は、主に完全長センス鎖及びアンチセンス鎖として認められた。ラット尿中には完全長センス鎖及びアンチセンス鎖は認められず、センス鎖由来の代謝物 c* 及び代謝物 d*、並びにアンチセンス鎖由来の代謝物 g* が主代謝物として認められた。さらに、代謝物 s* 及び代謝物 t* (同一質量)、代謝物 u* 及び代謝物 v* (同一質量)、代謝物 r* 並びに代謝物 i* などの代謝物も認められた。ALN-18328 の *in vivo* 推定代謝経路を以下の図 14 に示す。PEG₂₀₀₀-C-DMG 及びその代謝物はラット尿中には検出されなかった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

図 14 - 血漿、肝臓及び尿を介した ALN-18328 の推定代謝経路



5.3.2 ラット血漿、尿、胆汁、糞及び組織中の ^{14}C -DLin-MC3-DMA 及び代謝物の同定、プロファイリング及び定量

(CTD: 4.2.2.4-19, ■■■-319N-1201)

^{14}C -DLin-MC3-DMAを含むパチシラン-LNPをラットに投与したマスバランス試験(■■■319-1103試験)より得られた血漿、胆汁、尿、糞、肝臓、脾臓及び腎臓試料を用いて、代謝プロファイリングの評価及び代謝物を同定した。DLin-MC3-DMAの ^{14}C 標識位置を図1に示した。代謝プロファイリング及び代謝物同定には、LC-MS/MS法を使用した。フルスキャン、ニュートラルロススキャン及びプリカーサーイオンスキャンモードを用いて代謝物の分子イオンを探索し、そのマスペクトルに基づいて代謝物の構造を推定した。

Sprague-Dawley ラットに 2.1 mg/kg の ^{14}C -DLin-MC3-DMA (194.7 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$) を含むパチシラン-LNP (用量 0.3 mg/kg の ALN-18328) を単回静脈内ボラス投与したとき、血漿、肝臓及び脾臓中で検出された放射能は主に ^{14}C -DLin-MC3-DMA であり、腎臓及び糞中でも検出された。二酸化体 (M1、M2) 及び N-オキシド体 (M5) は血漿中で検出された。一酸化体 M3 及び酸化代謝物 M4 は、血漿、肝臓及び脾臓中で検出された。加水分解により生成する代謝物 M6 は、血漿、胆汁、尿、糞、肝臓、腎臓及び脾臓を含むすべての生体試料中で検出され、胆汁、尿及び糞中では唯一の放射性成分であった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

代謝物の推定構造を図 15 に示す。代謝物 M1 及び M2 (いずれも m/z 値 676.6) は、二酸化体 (+32Da) と推定した。 m/z 値 132 のプロダクトイオンは脂肪酸鎖の酸化と推定した。代謝物 M3 (m/z 値 660) は、 ^{14}C -DLin-MC3-DMA の一酸化体で酸素原子 1 個がアルキル鎖に付加したものと推定した。代謝物 M4 (m/z 値 658) は、 ^{14}C -DLin-MC3-DMA の酸化体で酸素原子 1 個がアルキル鎖に付加したものと推定した (DLin-MC3-DMA に比べて 14 Da 大きい)。代謝物 M5 (m/z 値 660) は、 ^{14}C -DLin-MC3-DMA の一酸化体で酸素原子 1 個が *N,N*-ジメチル酪酸部分に付加したものと推定した。この代謝物は HPLC により DLin-MC3-DMA の後に溶出されたため、*N*-オキシド体と推定した。代謝物 M6 は加水分解代謝物である *N,N*-ジメチル酪酸と推定され、その構造は市販されている標準品と比較して確認した。

血漿中に検出された放射能の大部分は未変化体 ^{14}C -DLin-MC3-DMA であり、非カニューレ処置 (無処置) ラットの血漿中 AUC の約 81% を占めていた。血漿中には投与量の 10% 以上を占める DLin-MC3-DMA の主代謝物は認められなかったものの、M1、M2、M3、M4、M5 及び M6 の 6 種類の代謝物が検出され、血漿中 AUC に占めるそれぞれの割合は、2.56、0.11、8.39 (M3 と M4 の合計)、4.30 及び 3.15% であった。投与後 0.08 時間に 1 つの小さな未知のピークが検出されたが、その試料中総放射能に占める割合はわずか 2% であった。

肝臓中では、投与後 0.25 時間の試料で M6 が定量下限未満であったことを除けば、M6、M3/M4 及び DLin-MC3-DMA は採取したすべての試料中で定量可能であった。肝臓中では、大部分が DLin-MC3-DMA として存在し、肝臓中 DLin-MC3-DMA 濃度は投与後 2 時間で最高値に達し、64.72 $\mu\text{g eq/g}$ と推定した。

腎臓中の M6、M3/M4 及び DLin-MC3-DMA 濃度は、肝臓に比べてはるかに低く、投与後 0.25 及び 0.5 時間の試料でのみ定量可能であった。M6 は分析したすべての試料で定量可能であり、腎臓中 M6 濃度は投与後 0.5 時間で最高値に達し、0.75 $\mu\text{g eq/g}$ と推定した。M3 及び M4 は初回試料採取時点である投与後 0.25 時間にのみ検出された。

脾臓中では、主に DLin-MC3-DMA が検出され、脾臓中 DLin-MC3-DMA 濃度は投与後 2 時間で最高値に達し、7.10 $\mu\text{g eq/g}$ と推定した。脾臓中 M6 及び M3/M4 濃度は投与後 1 時間で最高値に達し、それぞれ、0.19 及び 0.83 $\mu\text{g eq/g}$ であった。

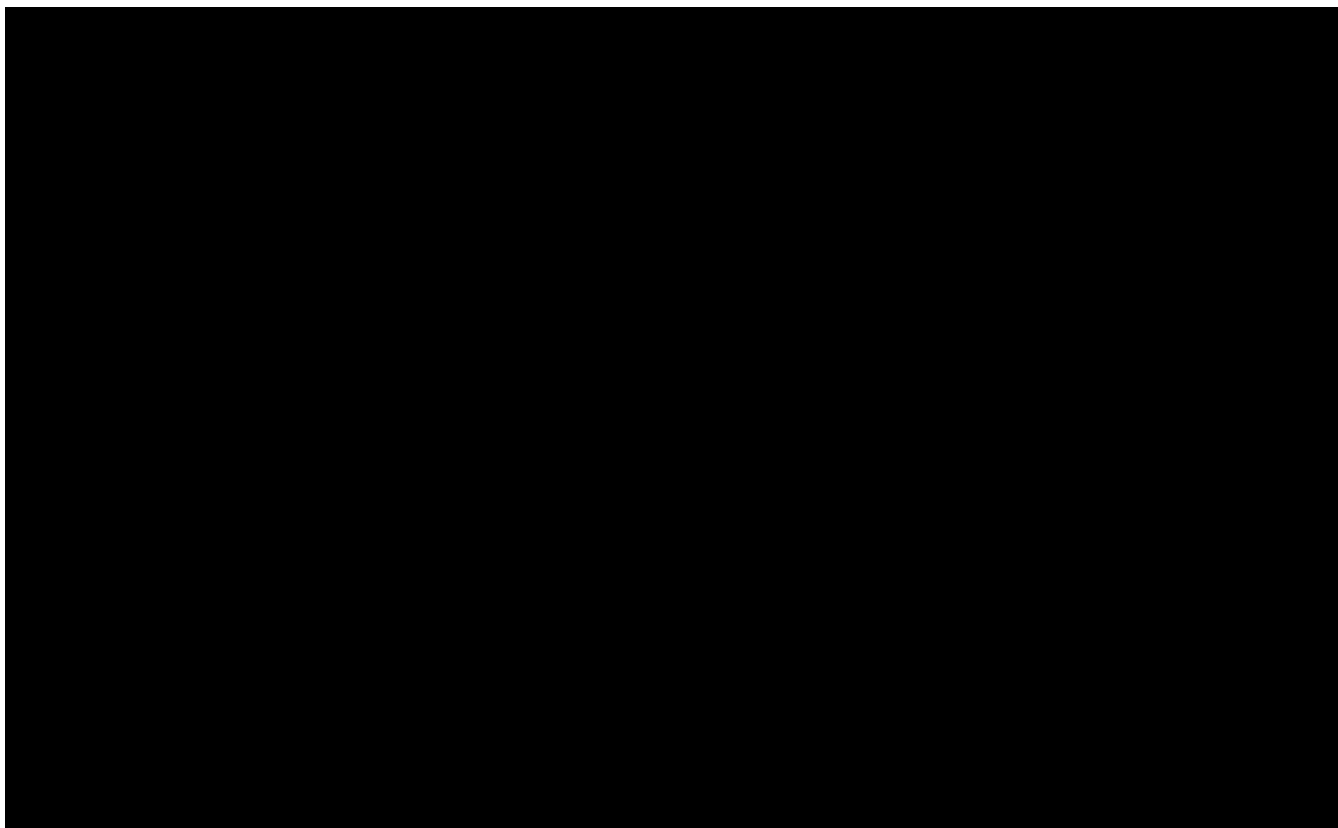
マスバランス試験 (319-1103 試験) で得られた尿及び糞試料を分析し、代謝プロファイリングを評価した。ラットに ^{14}C -DLin-MC3-DMA を含むパチシラン-LNP を静脈内投与したとき、総放射能の 49.02% が尿中から回収され、回収された放射能はすべて M6 に由来した。また、総放射能の約 23.7% は糞中から回収され、回収された放射能中には投与量の約 19.7% に相当する M6 が認められた。

胆管カニューレ処置 (BDC) ラットに ^{14}C -DLin-MC3-DMA を含むパチシラン-LNP を静脈内投与したとき、総放射能の 43.62% 及び 11.96% がそれぞれ、胆汁及び尿中に回収され、回収された放射能はすべて M6 に由来した。糞中には総放射能の 1.06% が回収され、回収された放射能の大部分は ^{14}C -DLin-MC3-DMA に由来した (総放射能の 1.02%)。尿中排泄は、非カニューレ処置ラットでは主要な排泄経路であるが、BDC ラットでは副次的排泄経路であったことから、ラットにおいてトラン

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

スポーターを介した M6 の腸肝循環とそれに伴う排泄の遅延が示唆された (表 51)。エポキシドに分類される代謝物は観察されなかった。

図 15 -



5.3.3 サルに静脈内投与したときの ^{14}C -DLin-MC3-DMA の吸収、代謝、排泄及び血漿、尿、糞中代謝物

(CTD: 4.2.2.5-2, TTR02-DSM16-013)

雌雄のサルに ^{14}C -DLin-MC3-DMA を含むパチシラン-LNP を 60 分間静脈内持続投与したときの ^{14}C -DLin-MC3-DMA の吸収、代謝及び排泄を評価した。2.1 mg/kg の ^{14}C -DLin-MC3-DMA (194.7 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$) を含むパチシラン-LNP (用量 0.3 mg/kg の ALN-18328) を静脈内投与した。DLin-MC3-DMA の ^{14}C 標識位置は図 1 に示した。投与後 4392 時間 (約 183 日) までの予め定められた時点における全血及び血漿中の放射能濃度を測定した。また、尿及び糞中への放射能の排泄については、投与後 4032 時間 (約 168 日) まで測定した。血漿、尿及び糞ホモジネート試料を用いて代謝プロファイリングを行った。

雌雄のサルに静脈内投与したときの全血及び血漿中放射能濃度は、試験期間を通して緩徐に低下した。雄サルの全血及び血漿中放射能の消失半減期 (平均値) はそれぞれ、909 及び 823 時間 (37.9 及び 34.3 日) であり、雌サルの全血及び血漿中放射能の消失半減期 (平均値) はそれぞれ、868 及び 885 時間 (36.2 及び 36.9 日) であった。

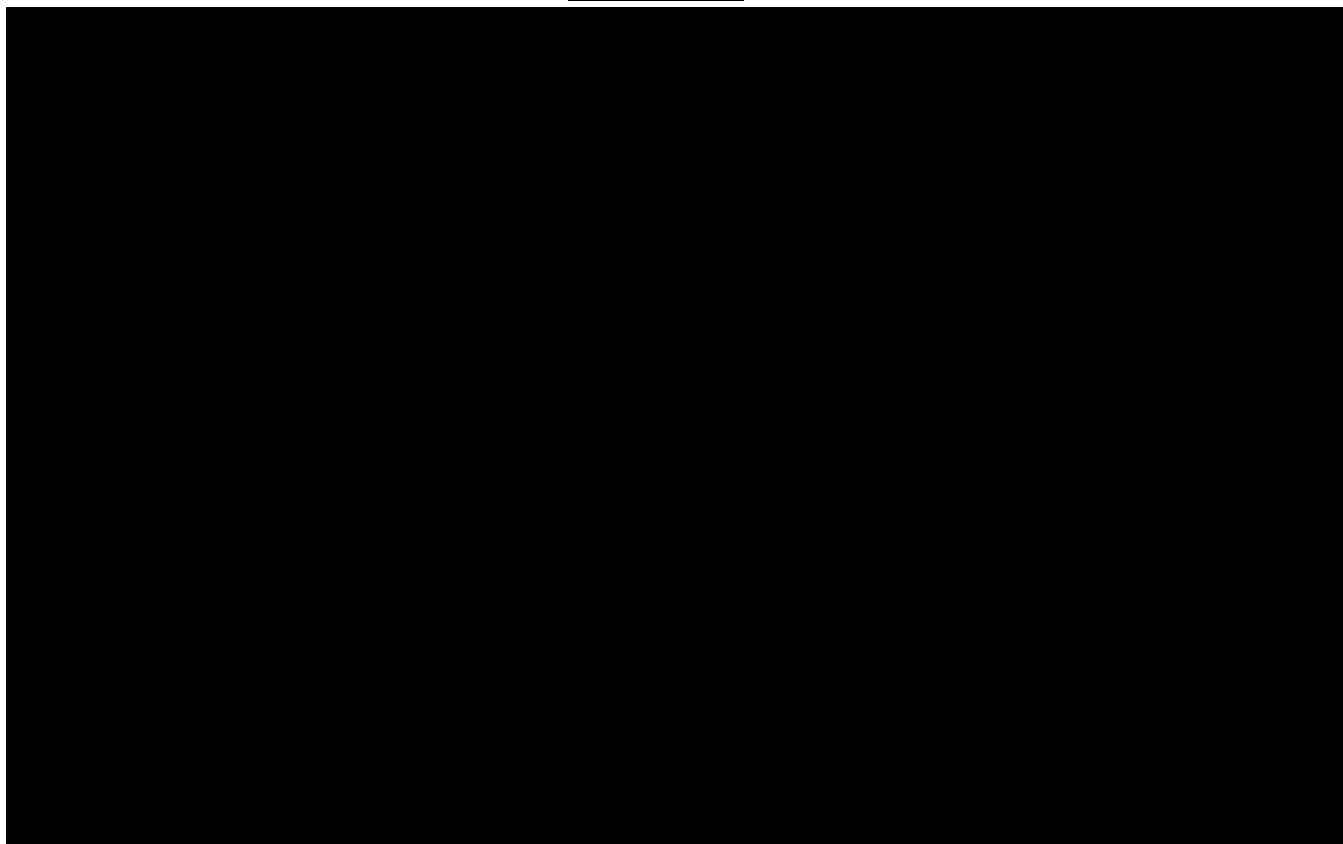
2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

雌雄のサルにおいて、 ^{14}C -DLin-MC3-DMA は酸化及び加水分解を介して代謝され、加水分解が主要な代謝経路であった。代謝プロファイルは雌雄で類似しており、性差はみられなかった。雌雄いずれのサルにおいても血漿中放射能の大部分は ^{14}C -DLin-MC3-DMAの未変化体として存在しており、投与後 2352 時間 (98 日) までの総放射能曝露量 (AUC_{0-2352}) に占める割合は、雌雄それぞれ約 68 及び 65%であった。雌雄いずれの血漿中でも二酸化体 (M2) が特定されたが、総放射能曝露量 (AUC_{0-2352}) に占める割合は雌雄でそれぞれ約 2 及び 5%であった。投与量の 10%以上を占める ^{14}C -DLin-MC3-DMA の代謝物は認められなかった。

尿中では、雌雄いずれにおいても ^{14}C -DLin-MC3-DMAの未変化体は検出されず、尿中の主代謝物はDMBAであった。投与後 2352 時間 (98 日) までに尿中に回収されたDMBAの放射エネルギーは、雌雄それぞれ投与量の 32.9 及び 37.4%を占めていた。また、オキシ-4-ジメチルアミノ酪酸も雌雄いずれも尿中に十分に検出され、投与後 2352 時間 (98 日) までに尿中に回収されたオキシ-4-ジメチルアミノ酪酸の放射エネルギーは、雌雄それぞれ投与量の 10.6 及び 9.26%であった。

雌雄いずれも糞中排泄量は少なく、 ^{14}C -DLin-MC3-DMAの未変化体はわずかであり、DMBAが主な代謝物として検出された。投与後 2352 時間 (98 日) までに糞中に回収されたDMBAの放射エネルギーは、雌雄それぞれ、投与量の 2.13 及び 2.62%であった。代謝プロファイリング及び代謝物同定の結果、サルにおいて ^{14}C -DLin-MC3-DMAは主に代謝を介して消失することが示唆された (図 16)。

図 16 - [REDACTED]



6 排泄

ラット及びサルにおける ^{14}C -DLin-MC3-DMA、ALN-18328 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の排泄を検討するため、*in vivo* 試験を実施した。これらの試験の一覧を表 50 に示した。

表 50 - パチシラン-LNP の排泄試験

Study #	Species/Matrix/Study Type	Analyte Evaluated
■ 319-1103	Mass Balance of ^{14}C -DLin-MC3-DMA Following IV Administration of ^{14}C -Patisiran-LNP to Sprague Dawley Rats	DLin-MC3-DMA, ALN-182328, PEG ₂₀₀₀ -C-DMG
TTR02-DSM16-013	Mass Balance of ^{14}C -DLin-MC3-DMA Following IV Administration of ^{14}C -Patisiran-LNP to Monkeys	DLin-MC3-DMA, ALN-182328, PEG ₂₀₀₀ -C-DMG, 4-(DMA)-butyric acid

Abbreviations: IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle.

6.1 ラット

6.1.1 Sprague-Dawley ラットを用いた ^{14}C -DLin-MC3-DMA の静脈内投与マスバランス試験

(CTD: 4.2.2.5-1, ■-319-1103)

脂肪鎖リンカーのカルボニル位を放射性炭素で標識した ^{14}C -DLin-MC3-DMA を用いて製剤化したパチシラン-LNP を使用し (図 1)、ラットを用いたマスバランス試験を実施した。非カニューレ処置ラット (4 例) 及び胆管カニューレ処置 (BDC) ラット (4 例) に 2.1 mg/kg の ^{14}C -DLin-MC3-DMA を含むパチシラン-LNP (用量 0.3 mg/kg の ALN-18328) を単回静脈内ボラス投与したときの ^{14}C -DLin-MC3-DMA 由来放射能の排泄経路を検討した。非カニューレ処置ラットでは、静脈内投与後 1344 時間までの予め規定した時点で尿及び糞試料を採取した。BDC ラットでは、静脈内投与後 144 時間までの予め規定した時点で尿、糞及び胆汁試料を採取した。尿、糞、胆汁、屍体及びケージ洗浄液の放射能は LSC 法により測定した。

非カニューレ処置ラットに ^{14}C -DLin-MC3-DMA を含むパチシラン-LNP を単回静脈内投与したとき、放射能の総回収率は 83.9% であり、尿中に 49.0%、糞中に 23.7%、屍体中に 6.9%、ケージ洗浄液/ケージ拭取り紙/ケージ残渣に 6.0% が回収された (表 51)。

BDC ラットに ^{14}C -DLin-MC3-DMA を含むパチシラン-LNP を単回静脈内投与したときの投与後 144 時間までの放射能の総回収率は 97.8% であり、胆汁中に 43.6%、屍体中に 40.1%、尿中に 12.0%、糞中に 1.1%、ケージ洗浄液/ケージ拭取り紙/ケージ残渣に 1.1% が回収された (表 51)。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 51 - ラットにおける ^{14}C -DLin-MC3-DMA の排泄 (平均値)

	Intact Sprague Dawley Rats (0-1344 h) ^a	Intact Sprague Dawley Rats (0-144 h)	BDC Sprague Dawley Rats (0-144 h)
Urine	49.0 ± 6.61	32.8 ± 9.70	12.0 ± 1.23
Feces	23.7 ± 4.77	13.1 ± 3.77	1.06 ± 0.263
Bile	ND	ND	43.6 ± 6.13
Cage Residues	5.98 ± 1.32	2.77 ± 1.25	1.06 ± 0.235
Carcass	6.93 ± 6.64	ND	40.1 ± 7.36
Total Recovery	83.9 ± 10.4 ^b	48.7 ± 13.7	97.8 ± 0.625

Abbreviations: BDC=bile duct cannulated; ND=not determined; QWBA=quantitative whole-body autoradiography.

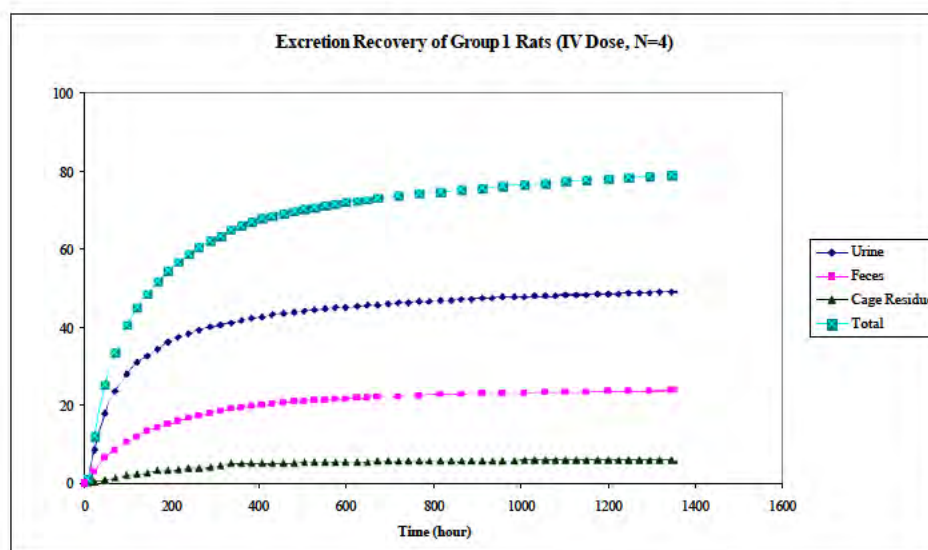
^a Includes Rat 4 in mean total, which did not have carcass digest analyzed, as it was used for QWBA.

^b Group 1 (Intact Sprague Dawley Rats) Total without Rat 4 (0-1344 h)=88.9±2.7.

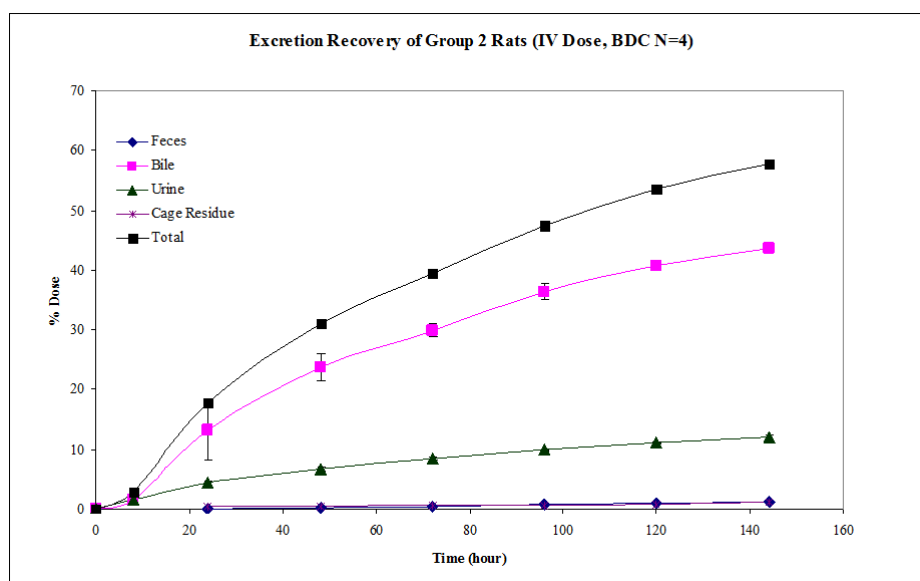
非カニューレ処置（無処置）ラットにおける ^{14}C -DLin-MC3-DMA 由来放射能の排泄は比較的緩徐であり、投与後 144 時間かけて総放射能の約 32.8%が尿中に排泄された（図 17、上図）。これらの結果から、 ^{14}C -DLin-MC3-DMA 由来放射能は一部糞中にも排泄されるが、尿中排泄が主要な排泄経路であることが示唆された。

BDC ラットでは、胆汁中に比較的高い割合の放射能が回収されたのに対して、糞中に回収された放射能量は比較的少なかった（図 17、下図）。これらの結果から、 ^{14}C -DLin-MC3-DMA 由来放射能は胆汁を介して排泄された後、再吸収され、尿中へ排泄されることが示唆された。

図 17 - 非カニューレ処置ラット（上図）及び BDC ラット（下図）に 2.1 mg/kg の ^{14}C -DLin-MC3-DMA を含む ^{14}C -パチシラン LNP を静脈内投与したときの放射能の排泄推移



2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム



6.2 サル

6.2.1 サルを用いた ^{14}C -DLin-MC3-DMA、ALN-18328 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の単回静脈内投与 マスバランス試験（尿及び糞）

(CTD: 4.2.2.5-2, TTR02-DSM16-013)

雌雄のサルに 2.1 mg/kg の ^{14}C -DLin-MC3-DMA (194.7 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$) を含むパチシラン-LNP (用量 0.3 mg/kg の ALN-18328) を単回 60 分間静脈内持続投与したときの ^{14}C -DLin-MC3-DMA の吸収、代謝及び排泄を検討した。DLin-MC3-DMA の ^{14}C 標識位置は図 1 に示した。投与後 4392 時間 (約 183 日) までの予め規定した時点の全血及び血漿中放射能濃度を測定した。また、雌雄のサルに静脈内投与したときの投与後 4032 時間 (約 168 日) までの放射能の尿及び糞中排泄量を測定し、結果を表 52 に要約した。また、血漿、尿及び糞試料を用いて、代謝プロファイリングを評価した。

本試験を通して、静脈内投与した ^{14}C -DLin-MC3-DMA 由来放射能は緩徐に排泄された。雄サルでは、静脈内投与後 4032 時間 (約 168 日) までに投与した放射能の 49.8 及び 8.83% がそれぞれ尿及び糞中に排泄され、雌サルでは、54.7 及び 10.1% がそれぞれ、尿及び糞中に排泄された。投与後 4008 時間 (約 168 日) までに、雄及び雌で投与した放射能の 10.2 及び 7.42% にあたる放射エネルギーがケージ洗浄液中に回収された。大部分の ^{14}C -DLin-MC3-DMA 由来放射能は投与後 1680 時間 (70 日) までに尿及び糞中に排泄され、雄及び雌でケージ洗浄液を含めて、それぞれ投与量の約 61 及び 67% が排泄された。雄及び雌のいずれについても、 ^{14}C -DLin-MC3-DMA 由来放射能の主な排泄経路は尿中排泄であった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 52 - サルにおける ¹⁴C-パチシラン-LNP の排泄 (平均値)

	Monkeys (0-4032 h) ^a	
	Males	Females
Urine	49.8 ± 5.10	54.7 ± 6.26
Feces	8.83 ± 0.667	10.1 ± 2.38
Cage Residues	10.2 ± 2.44	7.42 ± 1.62
Total Recovery ^b	73.4 ± 4.31	75.6 ± 2.10

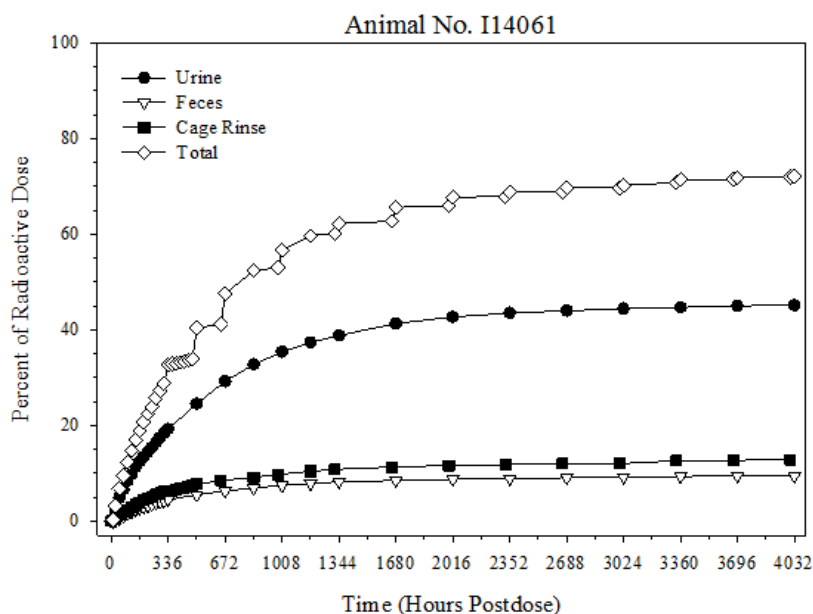
a Includes 3 monkeys/sex in mean total; total accumulation for cage rinse was at 4008h.

b Total Recovery also includes cage debris, cage wash, and cage wipe

排泄プロファイルは雄及び雌で類似しており、明らかな性差は認められなかった。雄及び雌サルにおける代表的な累積排泄率プロファイルをそれぞれ、図 18及び図 19に示した。雄及び雌サルに静脈内投与したときの放射能の総回収率 (平均値) はそれぞれ、73.4 及び 75.6%であった。回収率が低かった明確な原因は不明であるが、放射能の体内への残存及びケージへの付着による未回収が考えられた。

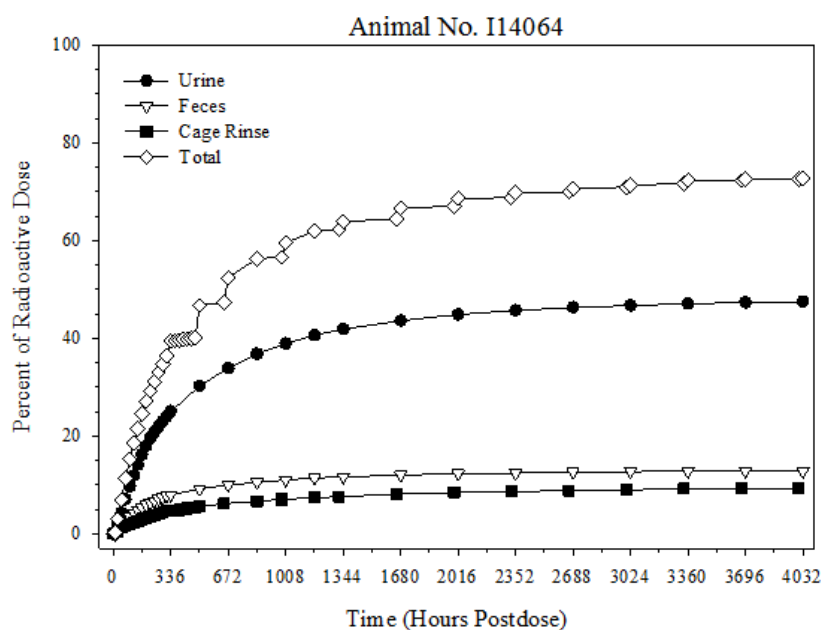
ALN-18328 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の尿中及び糞中濃度を LC-MS/MS 法を用いて測定した。ALN-18328 の尿中排泄は極わずかであり (0.4%未満)、糞中に ALN-18328 は検出されなかった。PEG₂₀₀₀-C-DMG は、0.3 mg/kg のパチシラン-LNP を静脈内投与後 168 時間までに投与量の約 44% が糞中に排泄された。PEG₂₀₀₀-C-DMG は尿中に検出されなかった。

図 18 - 雄サルにパチシラン-LNP を単回 60 分間静脈内持続投与したときの ¹⁴C-DLin-MC3-DMA 由来放射能の尿、糞及びケージ洗浄液中の累積放射能排泄率を示した代表的プロファイル



2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

図 19 - 雌サルにパチシラン-LNP を単回 60 分間静脈内持続投与したときの ^{14}C -DLin-MC3-DMA 由来放射能の尿、糞及びケージ洗浄液中の累積放射能排泄率を示した代表的プロファイル



7 薬物動態学的薬物相互作用

ALN-18328、DLin-MC3-DMA、PEG₂₀₀₀-C-DMG 及び DMBA (DLin-MC3-DMA の主代謝物) がトランスポーターの阻害剤又は基質となる可能性については、*in vitro* 試験にて評価した。主要な CYP 分子種については、DLin-MC3-DMA が CYP3A4 によって一部代謝された (約 26%) ことを除けば、ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG はいずれも基質、誘導剤及び阻害剤とならないことが示唆された。パチシラン-LNP の構成成分 (ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG) の酵素阻害/誘導、CYP 基質、タンパク結合及びトランスポーター相互作用に関する *in vivo* 及び *ex vivo* の結果を総合すると、パチシラン-LNP と併用投与される薬物との間で薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

7.1 *In vitro* 薬物トランスポーター

(CTD: 4.2.2.6-1; Alnylam-01-10Apr2013)

ALN-18328 (パチシラン-LNP の siRNA 成分)、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG (パチシラン-LNP の脂質成分) 又は DMBA (DLin-MC3-DMA の主代謝物) が、ATP binding cassette (ABC) 排出トランスポーター (多剤耐性タンパク質 1[MDR1]、乳癌耐性タンパク質[BCRP]及び胆汁酸塩排出ポンプ[BSEP])、solute carrier (SLC) トランスポーター (有機アニオン輸送ポリペプチド 1B1 及び 1B3[OATP 1B1 及び OATP 1B3]、有機アニオントランスポーター 1 及び 3[OAT1 及び OAT3]、有機カチオントランスポーター 1 及び 2[OCT1 及び OCT2])、並びに multidrug and toxin extrusion トランスポーター 1 及び

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

2-K (MATE1 及び MATE2-K) を含む様々な薬物トランスポーターの阻害剤又は基質となる可能性を評価した。

OATP1B1 (CHO 細胞)、OATP1B3 (CHO 細胞)、OAT3 (HEK293 細胞)、OCT2 (CHO 細胞)、MATE1 (MDCKII 細胞) 及び MATE2-K (MDCKII 細胞) を発現する非極性化細胞株を用いて、それぞれのトランスポーターに対する ALN-18328 の阻害作用を評価した。検討した最高濃度 (40.7 $\mu\text{mol/L}$) は、ヒトに 0.3 mg/kg のパチシラン-LNP を投与したときの ALN-18328 の C_{max} (平均値) の約 40 倍に相当した。検討したすべてのトランスポーターに対して、最高濃度の ALN-18328 によるプローブ基質の能動的取り込みの阻害率は、OATP1B1 (estrone-3-sulfate) で 22.3%、OATP1B3 (fluo-3) で 6.37%、OAT3 (estrone-3-sulfate) で 17.6%、OCT2 (metformin) で 6.17%、MATE1 (metformin) で 11.0%、MATE2-K (metformin) で 4.75% であり、いずれも 25% 未満であった。いずれも阻害率が 50% 未満であったため、 IC_{50} 値は算出できなかった。これらの結果から、ALN-18328 は臨床濃度においてこれらのトランスポーターの阻害剤とならないことが示された。

上記の ALN-18328 で評価した同様のトランスポーターに対して、PEG₂₀₀₀-C-DMG の阻害作用を評価した。細胞傷害を示さない検討した最高濃度 (84.8 $\mu\text{mol/L}$) は、ヒトに 0.3 mg/kg のパチシラン-LNP を投与したときの PEG₂₀₀₀-C-DMG の C_{max} (平均値) の約 20 倍に相当した。検討したすべてのトランスポーターについて、PEG₂₀₀₀-C-DMG によるプローブ基質の能動的取込みの阻害率は、OATP1B1 (estrone-3-sulfate) で 7.01%、OATP1B3 (fluo-3) で 0.23%、OAT3 (estrone-3-sulfate) で 12.0%、OCT2 (metformin) で 8.17%、MATE1 (metformin) で 20.1%、MATE2-K (metformin) で 2.24% であり、いずれも 25% 未満であった。いずれも阻害率が 50% 未満であったため、 IC_{50} 値は算出できなかった。これらの結果から、PEG₂₀₀₀-C-DMG は臨床濃度においてこれらのトランスポーターの阻害剤とならないことが示された。

上記の ALN-18328 で評価した同様のトランスポーターに対して、DMBA (DLin-MC3-DMA の主代謝物) の阻害作用を評価した。検討した最高濃度 (305 $\mu\text{mol/L}$) は、ヒトに 0.3 mg/kg のパチシラン-LNP を投与したときの DMBA の尿中濃度 (平均値) の約 50 倍に相当した (2.7.2, 2.1 項参照)。検討したすべてのトランスポーターについて、DMBA によるトランスポーターを介したプローブ基質の能動的取込みの阻害率は、OATP1B1 (estrone-3-sulfate) で 9.22%、OATP1B3 (fluo-3) で 21.3%、OAT3 (estrone-3-sulfate) で 8.44%、OCT2 (metformin) で 24.7%、MATE1 (metformin) で 6.85%、MATE2-K (metformin) で 4.27% であり、いずれも 25% 未満であった。いずれも阻害率が 50% 未満であったため、 IC_{50} 値は算出できなかった。これらの結果から、DMBA はこれらのトランスポーターの阻害剤とならないことが示唆された。

DLin-MC3-DMA は、溶解度の制限により 3 $\mu\text{mol/L}$ を検討した最高濃度とし、すべてのトランスポーターに関する試験を実施した。検討した最高濃度の DLin-MC3-DMA は MDR1、BCRP、BSEP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K を阻害せず (阻害率 50% 未満)、またこれらの基質にもならなかった。

8 その他の薬物動態試験

8.1 サルを用いた単回静脈内持続投与ブリッジング同等性試験

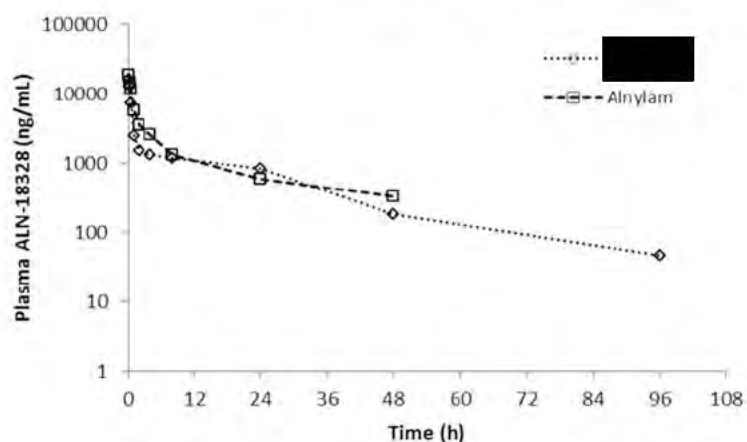
(CTD: 4.2.2.7-1, TTR02-NCD13-001)

パチシラン-LNP の開発中、初期の製造スケールは [REDACTED] で製造された [REDACTED] kg であった（製剤は同施設で製造及び無菌充填された）。その後、製造スケールは [REDACTED] kg に増量し、[REDACTED] からパルク製剤の製造は Alnylam, Inc. (Cambridge, MA, USA) へ、無菌最終製剤の製造は [REDACTED] へ変更した。この製造元及び製造スケールの変更に伴い、siRNA の溶解緩衝液も変更した。[REDACTED] での製造過程で使用した siRNA 溶解緩衝液は [REDACTED] を含んでいたが、Alnylam では [REDACTED] を含まなかった。それ以外のプロセスパラメータは基本的に各製造所間で変更はなかった。

[REDACTED] 又は Alnylam が製造したパチシラン-LNP をサルに 1 mg/kg の用量で単回 1 時間静脈内持続投与し、PK、PD 及び安全性の同等性について検討した。1 群当たり雌雄各 3 例のサルに生理食塩水、1 mg/kg の [REDACTED] 製造（[REDACTED] kg バッチ）又は Alnylam 製造（[REDACTED] kg バッチ）パチシラン-LNP を単回 1 時間静脈内持続投与（20 mL/kg/時間）した。[REDACTED] 製造バッチでは、最終製剤中 [REDACTED] が残存していた。

結論として、[REDACTED] 製又は Alnylam 製のパチシラン-LNP を投与したときの ALN-18328 の C_{max} 及び AUC は類似していた（図 20）。ALN-18328 の C_{max} 、 AUC_{0-t} 及び $AUC_{0-\infty}$ の比（Alnylam/[REDACTED]）はそれぞれ、1.14、0.94 及び 0.92 であり、2 製剤投与後の ALN-18328 の PK に明らかな違いは認められなかった。

図 20 - カニクイザルにパチシラン-LNP（[REDACTED] 又は Alnylam 製）を 1 mg/kg の用量で 1 時間静脈内持続投与したときの ALN-18328 の血漿中濃度－時間推移（平均値）^a



2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

^a Alnylam 製では 48 時間より以降の試料中 ALN-18328 濃度は LLOQ 以下であった。

更に、これら 2 製剤バッチ中の [REDACTED] の有無及び製造元変更による、PD（血清中 TTR 濃度）への影響についても評価した。いずれかのバッチのパチシラン-LNP を投与したとき、血清中 TTR 濃度は、投与後 14 日目までにベースラインに比べて 90%以上減少し、その TTR 低下の程度は両パチシラン-LNP 投与群で類似していた。PD において [REDACTED] 製と Alnylam 製のパチシラン-LNP の間で差は認められなかった。

その他、物性、製造及び品質に関する詳細は Module 3 を、臨床での同等性/同質性評価については 2.7.1 「生物薬剤学試験及び関連する分析法」を参照とする。

8.2 ラットにおける探索的 2 週毎 7 回 13 週間あるいは 3 週毎 7 回 19 週間皮下投与忍容性試験

(CTD: 4.2.3.2-4, TTR02-NCD14-001)

雄 Sprague-Dawley ラットにパチシラン-LNP を q2w×7（13 週間）又は q3w×7（19 週間）で 7 回反復皮下投与したときの忍容性を評価した。その試験での TK パラメータを表 53 に要約した。

表 53 - 雄 Sprague-Dawley ラットにパチシラン-LNP を皮下投与したときの 85 又は 127 日目における ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中 TK パラメータ（平均値）

Day (Regimen)	85 (q2w)		127 (q3w)	
Analyte	ALN-18328			
Dose (mg/kg)	0.3	1.0	0.3	1.0
t _{max} (h)	4.00	4.00	NR	NR
C _{max} (µg/mL)	0.002	0.039	NR	NR
AUC _{0-t} (µg•h/mL) ^a	0.043	0.488	NR	NR
Analyte	DLin-MC3-DMA			
Dose (mg/kg)	0.3	1.0	0.3	1.0
t _{max} (h)	24.0	4.00	24.0	24.0
C _{max} (µg/mL)	0.104	0.350	0.104	0.381
AUC _{0-t} (µg•h/mL) ^a	2.03	7.53	1.82	5.63
Analyte	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG			
Dose (mg/kg)	0.3	1.0	0.3	1.0
t _{max} (h)	4.00	24.0	4.00	24.0
C _{max} (µg/mL)	0.0500	0.0550	0.110	0.162
AUC _{0-t} (µg•h/mL) ^a	1.02	1.10	2.08	2.77

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

Day (Regimen)	85 (q2w)		127 (q3w)	
Analyte	ALN-18328			
Dose (mg/kg)	0.3	1.0	0.3	1.0

Abbreviations: C_{max}=maximum (peak) drug concentration; LNP=lipid nanoparticle; NR=not reported - TK parameter could not be calculated due to an error in sample labeling; q2w=once every two weeks; q3w=once every three weeks; TK=toxicokinetic(s); t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration

a AUC_{0-t} (μg·h/mL) values were calculated using 2 or 3 quantifiable concentration-time points.

0.3又は1 mg/kgのパチシラン-LNPを隔週 (q2w) 又は3週毎 (q3w) に皮下投与したときのALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の全身曝露量は低かった。更に、いずれの投与レジメンについても、0.3 mg/kg 投与群では肝臓中にパチシラン-LNP の siRNA 成分は検出されず、1 mg/kg 投与群でも siRNA 成分の肝臓中曝露は極わずかであった。

8.3 薬物動態に対する免疫原性の影響に関する評価

パチシラン-LNP の免疫原性は、ラット及びサル反復投与試験並びにサル単回投与ブリッジング同等性試験において、パチシラン-LNP の脂質成分である PEG₂₀₀₀-C-DMG に対する ADA について評価した。パチシラン-LNP を投与したラット及びサルにおいて、PEG₂₀₀₀-C-DMG に対する ADA が一部で検出されたものの、その大部分、特にサルにおいては、ALN-18328、DLin-MC3-DMA 又は PEG₂₀₀₀-C-DMG の曝露量又は消失への明らかな影響は認められなかった。但し、ラットを用いた 26 週間毒性試験では、パチシラン-LNP を反復投与後にこれら 3 成分すべての曝露量は減少し、パチシラン-LNP 投与動物の約 50% で 15 及び 183 日目の両時点で PEG₂₀₀₀-C-DMG に対する ADA 陽性反応が認められた。この試験においては、1 日目に比べて 183 日目のパチシラン-LNP 成分の全身曝露量が減少又は変化したこと、ADA によるパチシラン-LNP 製剤の崩壊が誘導された可能性が考えられる。

8.4 サルを用いた各種工程バッチの 10 週間静脈内投与同等性試験

(CTD: 4.2.3.2-7, TTR02-GLP17-007)

異なる 2 つの工程バッチでのパチシラン-LNP の毒性 (2.6.6, 8.12.2 項参照) 及び薬力学 (2.6.2, 2.2.4 項参照)、並びに ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の TK を検討するために、サルを用いた 10 週間試験を実施した。パチシラン-LNP は、3 週間ごとに計 4 回静脈内投与した。

本試験の TK 試験期において、第 1 群のサル (雌雄各 4 匹) には溶媒 (0.9% 塩化ナトリウム注射液 USP)、第 2 群及び第 4 群のサル (1 群あたり雌雄各 4 匹) にはパチシラン-LNP (ロット [REDACTED]; [REDACTED] kg 工程バッチ) をそれぞれ 0.3 及び 2.0 mg/kg 用量で、第 3 群及び第 5 群のサル (1 群あたり雌雄各 4 匹) にはパチシラン-LNP (ロット [REDACTED]; [REDACTED] kg 工程バッチ) をそれぞれ 0.3 及び 2.0 mg/kg 用量で投与した。投与は、1 時間静脈内持続投与 (点液速度=20 mL/kg/時間) にて 3 週間ごとに計 4 回行った (投与日: 1、22、43 及び 64 日目)。血漿検体を、第 1~5 群のサル全てから、1 日目及び

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

43 日目の点滴開始前 (0 時間)、点滴終了 (EOI) 後 0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24、48、96 及び 120 時間目に採取した。

TK データ解析では、個々のサルにおける点滴開始 (SOI) 後の ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中濃度-時間プロファイルについて、Phoenix WinNonlin™ の静脈内持続投与モデルを用いて、ノンコンパートメント解析を実施した。血漿中 ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG 濃度の群平均値の算出、及び TK パラメータの算出では、定量下限未満 (<LLOQ) で測定不能な場合は、欠測値として処理した。

ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の AUC_{0-t} 値を自然対数変換し、自然対数変換した値を Windows (ver. 9.3) 版 SAS® ソフトウェアの GLM プロシジャを用いて統計解析した。異なる 2 プロセスバッチ (ロット ████████、████ kg プロセスバッチとロット ████████、████ kg プロセスバッチ) を同用量で投与したときの ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の平均 AUC_{0-t} 値を、1 日目及び 43 日目とで 2 プロセスバッチ間で分散分析 (ANOVA) を用いて比較し、その差を検討した ($p \leq 0.05$)。

異なる 2 バッチのパチシラン-LNP を 1 時間静脈内持続投与した結果、ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の曝露量に性差は認められなかった。したがって、性別のデータを統合して、2 バッチのパチシラン-LNP の曝露量についての統計解析に用いた。

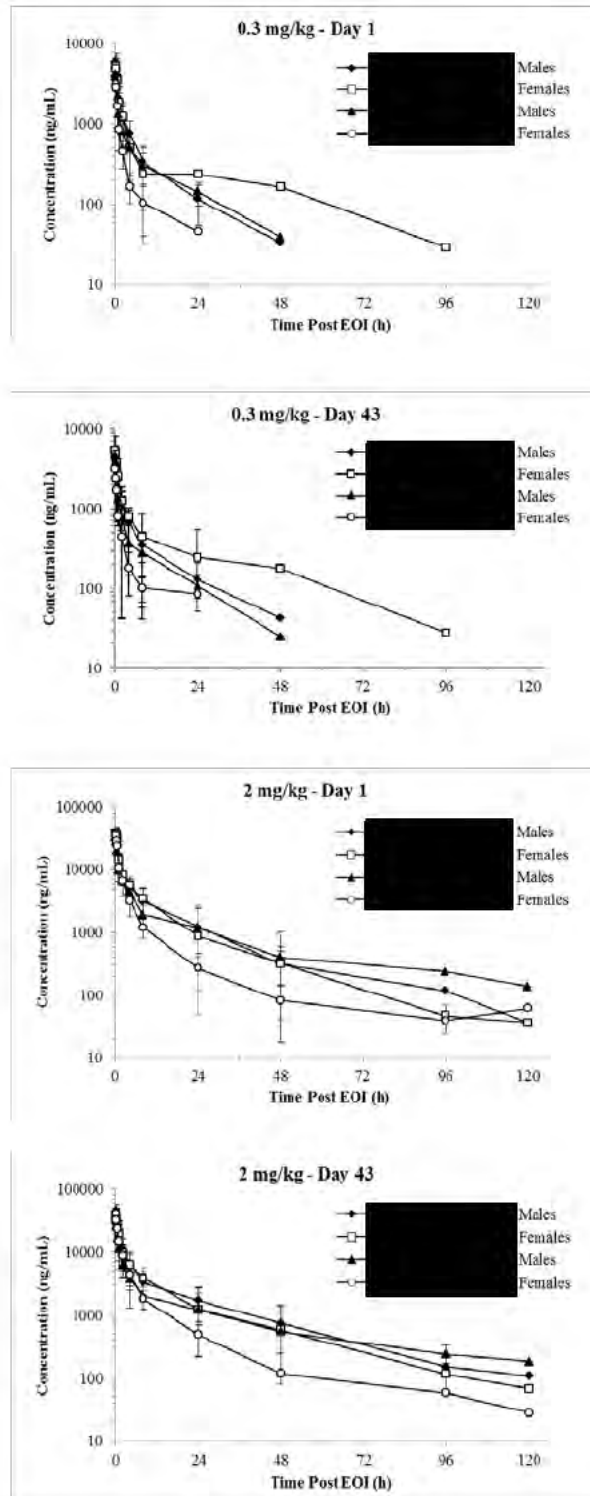
ALN-18328 :

2 バッチのパチシラン-LNP をサルに投与したとき、ALN-18328 への曝露量にはばらつきが認められ、概して █████-kg バッチの方で曝露量が少なかった。パチシラン-LNP を 0.3 及び 2 mg/kg 用量で投与したときの ALN-18328 の最終測定時点 (t_{last}) までの時間中央値は、1 日目ではロット ████████ ; █████ kg バッチで SOI 後 25 及び 73 時間、No. ████████ ; █████ kg バッチで SOI 後 17 及び 49 時間、43 日目ではロット ████████ ; █████ kg バッチで SOI 後 25 及び 97 時間、No. ████████ ; █████ kg バッチで SOI 後 25 及び 49 時間であった。パチシラン-LNP ロット ████████ ; █████ kg プロセスバッチ (7.08~9.64 倍増加) 及びパチシラン-LNP ロット ████████ ; █████ kg プロセスバッチ (9.02~13.5 倍増加) を投与したサルにおいて、ALN-18328 への曝露量は、ALN-TTR02 の用量範囲 0.3~2.0 mg/kg でほぼ用量に比例して、又は用量比例性を僅かに上回って増加した。雌雄のサルにおける TK プロファイルを図 21、TK パラメータの要約を表 54 に示す。

全般的にみて、パチシラン-LNP の █████ kg バッチでは、████ kg バッチに比べて平均 ALN-18328 AUC_{0-t} 値が低かった。平均 ALN-18328 AUC_{0-t} 値についての █████ kg バッチと █████ kg バッチ間の差は、1 日目の 0.3 mg/kg 用量、43 日目の 0.3 及び 2.0 mg/kg 用量で統計学的に有意であった。これとは対照的に、ALN-18328 の平均 C_{max} 値は 2 バッチ間で、1 日目及び 43 日目のいずれにおいても 0.3 及び 2.0 mg/kg の両用量で概ね同等であった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

図 21- 異なる2工程パッチのパチシラン-LNP を0.3 mg/kg 及び2 mg/kg 用量にて3週間毎に1時間静脈内持続投与したときの1日目及び43日目におけるサル雌雄の平均 (±SD) ALN-18328 血漿中濃度-時間プロファイル



2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

Abbreviations: EOI=end of infusion; IV=intravenous; SD=standard deviation.

表 54- サルに異なる 2 工程バッチのパチシラン-LNP を 3 週間毎に 1 時間静脈内持続投与したときの 1 日目及び 43 日目における ALN-18328 のトキシコキネティクスパラメータ

ALN-18328												
	Lot No.: ██████ ; █████ kg Batch Process						Lot No.: ██████ ; █████ kg Batch Process					
	Males		Females		Combined		Males		Females		Combined	
siRNA (mg/kg)	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0
Day 1												
C_{max} (µg/mL)	6.05	40.5	5.47	41.2	5.76	40.8	4.27	32.8	3.29	35.5	3.78	34.1
t_{max} (h)	1.167	1.25	1.083	1.083	1.083	1.167	1.167	1.083	1.167	1.083	1.167	1.083
t_{last} (h)	37	49	17	97	25	73	37	49	9	73	17	49
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	17.2	152	16.4	149	16.8	150	13.0	123	5.34	86.0	9.19	105
$C_{max}/Dose$	20.2	20.3	18.2	20.6	19.2	20.4	14.2	16.4	11.0	17.7	12.6	17.1
$AUC_{0-t}/Dose$	57.2	76.1	54.7	74.3	56.0	75.2	43.5	61.6	17.8	43.0	30.6	52.3
Day 43												
C_{max} (µg/mL)	5.68	45.2	5.48	37.8	5.58	41.5	4.64	33.4	3.22	40.7	3.93	37.1
t_{max} (h) ^a	1.25	1.083	1.083	1.083	1.167	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
t_{last} (h) ^a	37	97	25	97	25	97	25	73	17	49	25	49
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	17.4	196	20.9	174	19.2	185	11.5	128	5.98	108	8.73	118
$C_{max}/Dose$	18.9	22.6	18.3	18.9	18.6	20.7	15.5	16.7	10.7	20.3	13.1	18.5
$AUC_{0-t}/Dose$	57.9	98.1	69.8	87.0	63.9	92.5	38.3	64.0	19.9	54.0	29.1	59.0

Abbreviations: AUC_{0-t} =area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} =maximum (peak) drug concentration; IV=intravenous; siRNA=small interfering RNA; SOI=start of infusion; t_{last} =last observed drug concentration; t_{max} =time to reach maximum (peak) drug concentration.

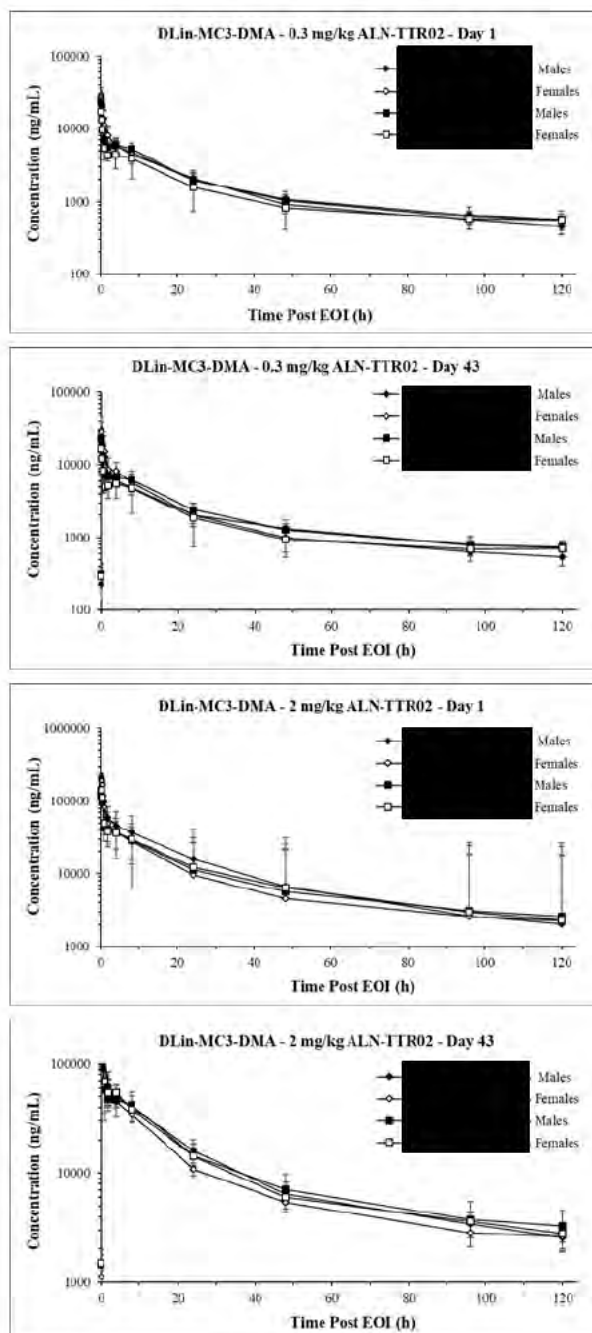
^a Parameters were calculated using sampling times post SOI.

DLin-MC3-DMA :

名目上同一用量で ALN-TTR02 ロット ██████ ; █████ kg 工程バッチを投与したサルと ALN-TTR02 ロット ██████ ; █████ kg 工程バッチを投与したサルにおいて、DLin-MC3-DMA への曝露量は同等であった。ALN-TTR02 ロット ██████ ; █████ kg 工程バッチ (6.36~7.43 倍増加) 及び ALN-TTR02 ロット ██████ ; █████ kg 工程バッチ (6.49~9.09 倍増加) を投与したサルの双方において、DLin-MC3-DMA への曝露量は、0.3~2.0 mg/kg の用量範囲でほぼ用量に比例して増加した。サル雌雄の TK プロファイルを図 22、TK パラメータの要約を表 55 に示す。1 日目又は 43 日目のいずれにおいても、検討した投与量で、2 バッチ間で DLin-MC3-DMA への曝露量について統計学的有意差は認められなかった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

図 22- 異なる 2 工程パッチのパチシラン-LNP を 0.3 mg/kg 及び 2 mg/kg 用量にて 3 週間毎に 1 時間静脈内持続投与したときの 1 日目及び 43 日目におけるサル雌雄の平均 (±SD) DLin-MC3-DMA 血漿中濃度-時間プロファイル



Abbreviations: EOI=end of infusion; IV=intravenous; SD=standard deviation.

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 55 - サルに異なる 2 工程バッチの ALN-TTR02 を 3 週間毎に 1 時間静脈内持続投与したときの 1 日目
及び 43 日目における DLin-MC3-DMA のトキシコキネティクスパラメータ

DLin-MC3-DMA												
	Lot No.: [REDACTED] ; [REDACTED] kg Batch Process						Lot No.: [REDACTED] ; [REDACTED] kg Batch Process					
	Males		Females		Combined		Males		Females		Combined	
siRNA (mg/kg)	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0
Lipid Dose (mg/kg)	2.01	13.4	2.01	13.4	2.01	13.4	1.85	12.3	1.85	12.3	1.85	12.3
Day 1												
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	31.9	218	28.6	191	30.2	205	24.0	148	17.3	142	20.6	145
t_{max} (h) ^{a, b}	1.083	1.083	1.083	1.25	1.083	1.25	1.083	1.167	1.083	1.25	1.083	1.25
t_{last} (h) ^a	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) ^a	215	1590	225	1200	220	1400	214	1220	167	1260	191	1240
C_{max}/Dose	15.9	16.3	14.2	14.3	15.0	15.3	13.0	12.0	9.33	11.5	11.2	11.8
AUC_{0-t}/Dose ^a	107	119	112	89.7	110	104	116	99.2	90.4	103	103	101
Day 43												
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	29.5	233	28.1	195	28.8	214	23.2	168	16.2	190	19.7	179
t_{max} (h) ^{a, b}	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
t_{last} (h) ^a	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) ^a	225	1690	258	1400	242	1550	253	1570	196	1550	224	1560
C_{max}/Dose	14.7	17.4	13.9	14.5	14.3	15.9	12.5	13.7	8.76	15.4	10.6	14.5
AUC_{0-t}/Dose ^a	112	126	128	104	120	115	136	127	106	126	121	127

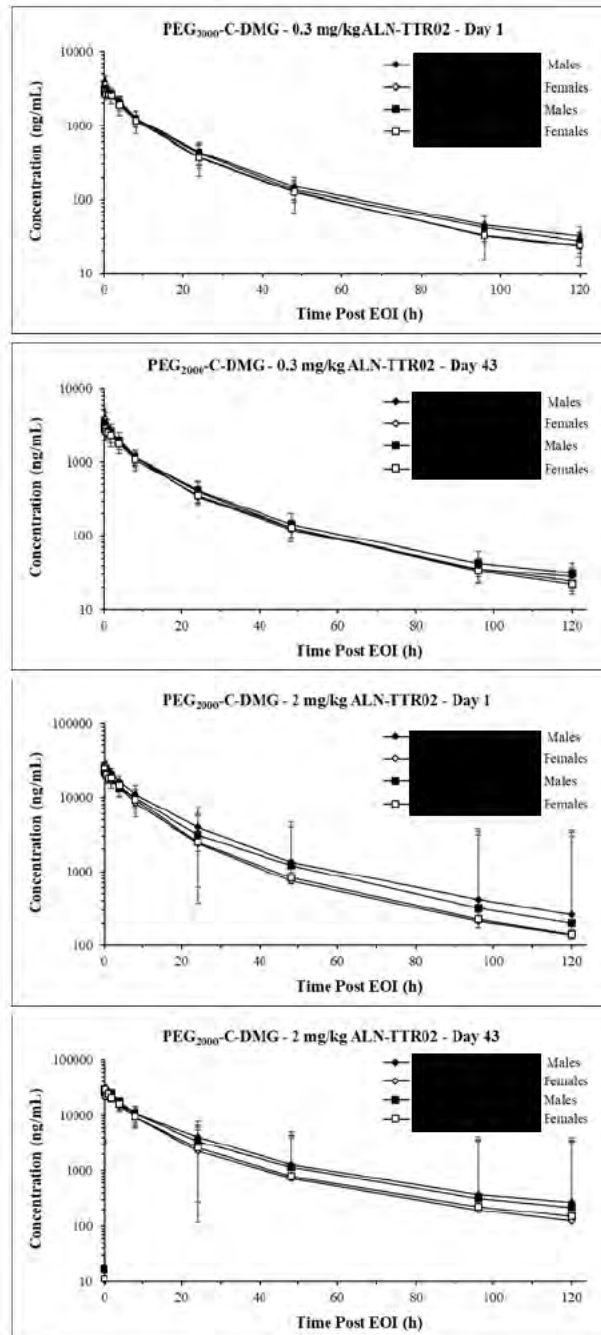
Abbreviations: AUC_{0-t} =area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} =maximum (peak) drug concentration; IV=intravenous; siRNA=small interfering RNA; t_{last} =last observed drug concentration; t_{max} =time to reach maximum (peak) drug concentration.

PEG₂₀₀₀-C-DMG :

名目上同一用量で ALN-TTR02 ロット [REDACTED] ; [REDACTED] kg 工程バッチを投与したサルと ALN-TTR02 ロット [REDACTED] ; [REDACTED] kg 工程バッチを投与したサルにおいて、PEG₂₀₀₀-C-DMG への曝露量は同等であった。ALN-TTR02 ロット [REDACTED] ; [REDACTED] kg 工程バッチ (7.52~8.37 倍増加) 及び ALN-TTR02 ロット [REDACTED] ; [REDACTED] kg 工程バッチ (7.54~8.91 倍増加) を投与したサルの双方において、PEG₂₀₀₀-C-DMG への曝露量は 0.3~2.0 mg/kg の用量範囲でほぼ用量に比例して増加した。サル雌雄の TK プロファイルを図 23、TK パラメータの要約を表 56 に示す。1 日目又は 43 日目のいずれにおいても、検討した投与量で、2 バッチ間で PEG₂₀₀₀-C-DMG への曝露量について統計学的有意差は認められなかった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

図 23- サル雌雄に異なる 2 工程バッチのパチシラン-LNP を 0.3 mg/kg 及び 2 mg/kg 用量にて 3 週間毎に 1 時間静脈内持続投与したときの 1 日目及び 43 日目における平均 (±SD) PEG₂₀₀₀-C-DMG 血漿中濃度-時間プロファイル



Abbreviations: EOI=end of infusion; IV=intravenous; SD=standard deviation.

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

表 56- サルに異なる 2 工程バッチのパチシラン-LNP を 3 週間毎に 1 時間静脈内持続投与したときの
1 日目及び 43 日目における PEG₂₀₀₀-C-DMG のトキシコキネティクスパラメータ

PEG ₂₀₀₀ -C-DMG												
	Lot No.: [REDACTED]; [REDACTED] kg Batch Process		[REDACTED]; [REDACTED] kg Batch Process		[REDACTED]; [REDACTED] kg Batch Process		[REDACTED]; [REDACTED] kg Batch Process		[REDACTED]; [REDACTED] kg Batch Process		[REDACTED]; [REDACTED] kg Batch Process	
	Males	Females	Males	Females	Combined	Combined	Males	Females	Males	Females	Combined	Combined
siRNA (mg/kg)	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0
Lipid Dose (mg/kg)	0.24	1.6	0.24	1.6	0.24	1.6	0.23	1.5	0.23	1.5	0.23	1.5
Day 1												
C _{max} (µg/mL)	3.98	27.9	3.82	31.3	3.90	29.6	3.27	23.3	2.97	24.2	3.12	23.7
t _{max} (h) ^{a, b}	1.083	1.75	1.083	1.083	1.083	1.375	1.167	1.083	1.167	1.083	1.167	1.083
t _{last} (h) ^a	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121
AUC _{0-t} (µg·h/mL) ^a	46.1	385	42.7	282	44.4	334	43.0	329	39.7	295	41.4	312
C _{max} /Dose	16.6	17.5	15.9	19.6	16.2	18.5	14.2	15.5	12.9	16.1	13.6	15.8
AUC _{0-t} /Dose ^a	192	241	178	176	185	209	187	220	173	197	180	208
Day 43												
C _{max} (µg/mL)	3.89	32.7	3.83	27.1	3.86	29.9	3.42	27.9	3.15	30.7	3.29	29.3
t _{max} (h) ^{a, b}	1.083	1.292	1.25	1.083	1.167	1.083	1.083	2.125	1.625	1.167	1.167	1.25
t _{last} (h) ^a	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121
AUC _{0-t} (µg·h/mL) ^a	41.5	390	40.8	299	41.1	344	43.1	368	38.0	314	40.5	341
C _{max} /Dose	16.2	204	16.0	17.0	16.1	18.7	14.9	18.6	13.7	20.4	14.3	19.5
AUC _{0-t} /Dose ^a	173	244	170	187	171	215	187	245	165	209	176	227

Abbreviations: AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) drug concentration; IV=intravenous; siRNA=small interfering RNA; SOI=start of infusion; t_{last}=last observed drug concentration; t_{max}=time to reach maximum (peak) drug concentration.

Note: C_{max}/Dose units: [(µg/mL)/(mg/kg)]; AUC_{0-t}/Dose units: [(µg·h/mL)/(mg/kg)]

^a Time-dependent parameters were calculated using times post start of infusion (SOI).

^b t_{max} is shown as median.

全般的にみて、ALN-18328 の TK に 2 バッチ間で差が認められたが、これは本試験で用いた動物数が相対的に少なかったこと (n=8) から勘案し予期されていたことであった。ALN-18328 については、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG に比べて濃度-時間プロファイルにばらつきが多くみられ、このことは、0.3 mg/kg 用量群で特に顕著に認められた。ALN-18328 の AUC について雌雄間で統計学的差は認められないものの、雌では雄に比べて濃度-時間プロファイルにばらつきが多く認められ、ALN-18328 曝露量の比較における頑健性が低下した (図 21)。ALN-18328 の変動性並びにその AUC の統計学的差は、ALN-18328 が血漿中で相対的に不安定であることにより交絡した可能性がある。ALN-18328 は脂質ナノ粒子により保護されているが、それ以外にも、ヌクレアーゼ (核酸分解酵素) による代謝を広く受ける。しかし、DLin-MC3-DMA と PEG₂₀₀₀-C-DMG は、ヌクレアーゼによる代謝を広く受けることはないため、血漿中で相対的に安定であることから、その濃度-時間プロファイル

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

は一貫して再現性がある。実際 DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿中濃度-時間プロファイルは変動性が少なく一貫している。したがって、バッチ間の同等性については3種類全ての構成成分を用いることにより、最良の評価を行うことができる；特に DLin-MC3-DMA は、肝細胞内取込みを促進する上で重要であるので、バッチ間の同等性評価には重要である。ALN-18328 の TK は変動性が高いように見えるものの、PD への影響（血清 TTR タンパク質により測定）は軽微で、雄では 0.3 mg/kg 以上で、雌では 2 mg/kg で影響は見られず（2.6.2, 2.2.4 項参照）、PK の変動性との明らかな相関関係は認められなかった。0.3 mg/kg ■ kg バッチ) 投与では、0.3 mg/kg ■ kg バッチ) 投与に比して、血清 TTR タンパク質の平均低下幅が少なかったが、これは主として雌 1 匹に起因するものであった。

要約すると、ALN-18328 AUC により測定されたパチシラン-LNP のバッチ間の差は、ALN-18328 の TK の変動性が高いことにより交絡した可能性がある。バッチ間の差は、DLin-MC3-DMA 又は PEG₂₀₀₀-C-DMG AUC あるいは PD 評価項目で測定した場合、顕著ではなかった。ヒトでも ALN-18328 の PK 挙動全般に変動性が認められ、一方 DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の PK 挙動は相対的に安定であった（2.7.2, 表 21 参照）。

9 考察及び結論

パチシラン-LNP は、パチシラン原薬（ALN-18328、ヒト *TTR* mRNA [野生型及び変異型両方] の 3'非翻訳領域で高度に保存された配列を標的とする siRNA) 2 mg/mL、及び脂質添加剤 (DLin-MC3-DMA、DSPC、コレステロール及び PEG₂₀₀₀-C-DMG) から構成され、等張リン酸緩衝生理食塩水を分散液として製剤化された脂質ナノ粒子製剤 (LNP) である。本剤を静脈内投与したとき、siRNA は主に肝臓に送達され、標的である *TTR* mRNA を特異的に抑制し、その結果 TTR タンパク質を低下させる (2.6.1 「緒言」参照)。

パチシラン-LNP の構成成分のうち、ALN-18328 (有効成分である siRNA 原薬) の他、パチシラン-LNP を肝細胞への取り込み及び ALN-18328 の細胞質への送達に必須となる2種類の新規脂質である DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG について ADME 特性を評価するため、非臨床 *in vitro*、*ex vivo* 及び *in vivo* 試験を実施した。ピボタルな反復投与毒性試験はマウス、ラット、ウサギ及びサルを用いて実施した。パチシラン-LNP の重要構成成分の ADME 特性は、ラット及びサルを用いて評価した。また、がん原性及び生殖発生毒性試験のためマウス及びウサギの PK を評価した。LNP には4種の脂質が使用され、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は新規脂質であり、コレステロール及び DSPC は既承認製剤にて使用されている。コレステロール及び DSPC は人工的な合成製造物質であるが、コレステロールは内因性物質であり、DSPC は自然界に存在するホスファチジルコリンと非常に類似した構造を持つ。また、コレステロール及び DSPC は米国食品医薬品局 (FDA) による承認製剤の不活性成分として記載されているため、安全性への懸念がないと考えられる (2.6.6, 9.1 項参照)。

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

静脈内投与したパチシラン-LNP は速やかに分布し、肝臓に取り込まれる。これは、血漿中では PEG₂₀₀₀-C-DMG 成分が LNP をオプソニン化から保護し、細網内皮細胞への LNP の取込みを抑制する一方、肝細胞ではアポリポタンパク質 E (ApoE) が表面に結合した LNP が ApoE 受容体を介して肝細胞内への標的型取込みが促進されることによると考えられる。この ApoE 結合受容体を介したエンドサイトーシスにより肝細胞内に取り込まれた後、エンドソーム内での pH の低下によってイオン性 DLin-MC3-DMA 脂質はプロトン化し、エンドソーム膜が破壊される。その結果、siRNA である ALN-18328 が細胞質に放出され、内因性 RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) との相互作用が可能となる。標的 TTR mRNA はハイブリダイゼーション依存的に分解され、その結果として血漿中の TTR タンパク質濃度が低下する (4)。そのため、LNP の脂質成分には薬理的活性はないが、全身循環血中での siRNA の分解を回避し、細網内皮細胞への LNP の取込みを抑制するとともに、ALN-18328 の肝細胞質への放出を媒介する上で不可欠である (詳細については 2.6.1「緒言」参照)。

サル雌雄に異なる 2 工程バッチのパチシラン-LNP を反復投与し、その後 ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の TK を測定した。ALN-18328 AUC により測定した場合、パチシラン-LNP のバッチ間に差が有るように見えたが、これは ALN-18328 の TK の変動性が高いことにより交絡した可能性がある。バッチ間の差は、DLin-MC3-DMA 又は PEG₂₀₀₀-C-DMG AUC あるいは PD 評価項目で測定した場合、顕著ではなかった。ヒトでも ALN-18328 の PK 挙動全般に変動性が認められ、一方 DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の PK 挙動には相対的安定性が認められた。

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

パチシラン-LNP を投与したラット及びサルにおいて、一部の事例で PEG₂₀₀₀-C-DMG に対する ADA が検出されたものの、その大部分においては、ALN-18328、DLin-MC3-DMA 又は PEG₂₀₀₀-C-DMG の曝露量又は消失への明らかな影響は認められなかった。なお、ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験 (q2w で 14 回投与) では、最終投与後 (183 日目) の ALN-18328 及び 2 種類の脂質の血漿中濃度は、初回投与後に比べて著しく低かった。183 日目の時点で約 50% のラットに ADA (抗 PEG₂₀₀₀-C-DMG 抗体を測定) の産生が認められたため、最終投与後の ALN-18328 の曝露量の減少の

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

原因として PEG₂₀₀₀-C-DMG に対する ADA によりパチシラン-LNP 製剤の崩壊が誘導された可能性が考えられた。但し、サルを用いた 39 週間毒性試験 (0.3、1.0 及び 3.0/2.0 mg/kg [試験 1 日目以降、用量を 3 mg/kg から 2 mg/kg へ変更] q3w で 14 回投与) では、39 週間の投与期間又は 13 週間の回復期間後に低用量群の雌 2 例に ADA が検出されたのみであり、最終投与後の曝露量 (AUC) は、いずれの成分においても初回投与後と比較して変化はみられなかった (2.6.6, 3.2.2 項参照)。

RSA、HSA 及び AAG への *in vitro* 結合率は、それぞれ約 0.89%、0.46% 及び 2.07% と低かったことから、パチシラン-LNP の分布がタンパク結合の影響を受ける可能性は低いと考えられる。ヒト血漿中では PEG₂₀₀₀-C-DMG 成分は、脂質又はリポタンパク質と結合し、高いタンパク結合率を示した (タンパク結合率 97%)。 *In vivo* での生体内分布は、ラット、サル、及び限られた例数のウサギ (生殖発生毒性試験の一部として) を用いて検討した。パチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与したとき、非標識 ALN-18328、DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG は、肝臓 (ラット及びサル) 及び脾臓 (ラット) に高濃度に分布した。ラットでは、肝臓及び脾臓中の ALN-18328 濃度は投与後 1~4 時間に最高値に達し、肝臓中の投与量に対する分布率は脾臓に比べて約 100 倍高かった。肝臓及び脾臓中での最高組織中分布率 (対投与量%の平均値) は、ALN-18328 でそれぞれ、25.6% 及び 0.25%、DLin-MC3-DMA で 77.7% 及び 0.98%、PEG₂₀₀₀-C-DMG で 48.9% 及び 0.52% であった。雄 Sprague-Dawley ラット及び雄 Long Evans ラットを用いた QWBA 試験で、¹⁴C-DLin-MC3-DMA を用いて製剤化したパチシラン-LNP を単回静脈内ボラス投与したとき、肝臓、脾臓、リンパ節及び副腎で高い放射エネルギーが認められた。肝臓中の放射エネルギーが最も多く、投与後 4 時間で投与量の約 90% が検出された。中枢神経系及び心臓組織の放射エネルギーは極わずかであったことから、パチシラン-LNP は筋肉に蓄積せず、脳組織にほとんど移行しないことが示唆された。更に、¹⁴C-パチシラン-LNP 由来放射能はメラニンに結合しなかった。以上をまとめると、パチシラン-LNP が薬力学的作用を誘導する主要部位である肝臓に取り込まれる、という予想された組織分布と矛盾がなかった。

肝 S9 画分中でのパチシラン-LNP (ALN-18328 の安定性として評価) 及び各成分である ALN-18328、DLin-MC3-DMA、PEG₂₀₀₀-C-DMG の *in vitro* での代謝安定性は、試験に用いたいずれの動物種 (マウス、ラット、サル及びヒト) においても類似していた。パチシラン-LNP はヒト以外の血清中ではやや不安定であったが (24 時間後の残存率 42~71%)、ヒト血清中では非常に安定であった (残存率 102%)。また、パチシラン-LNP は動物由来の肝サイトゾル中で安定であり (6 時間後の残存率 77~88%)、ヒト肝サイトゾル中ではより安定であった (残存率 100~102%)。LNP 製剤化されていない原薬である ALN-18328 は、4 種のいずれの動物種の肝サイトゾル中でも安定であるものの、肝 S9 画分及び血清中では速やかに代謝された。この代謝にはエキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼが関与していると推定された(5)。これらの試験結果より、LNP 中に封入されていない ALN-18328 は全身循環血中から速やかに消失/分解され、薬理的活性を示さないと考えられる。なお、LNP を破壊せずに遊離型 siRNA のみを透過させる Amicon Ultra-4 フィルターを用いて *In vivo* 試験のラット血漿試料をろ過した結果、全身循環血中の siRNA の 98.5% 以上が LNP 封入型であったことから、循環血中の遊離型 ALN-18328 は極わずかであった。さらに、非製剤化 ALN-18328 をサルに単回投与

2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

した試験では、いずれの試料採取時点（投与後 15～360 分）においても血漿中に ALN-18328 は検出されなかったことから、製剤化しない場合、静脈内投与後の ALN-18328 は速やかに消失し、薬理的活性を示さないことが示唆された。パチシラン-LNP を投与後の *in vivo* 代謝プロファイリングより、ラット血漿及び肝臓中に認められた主要なピークは、ALN-18328 の完全長センス鎖及びアンチセンス鎖であった。対照的に、ラット尿中では完全長センス鎖及びアンチセンス鎖は認められず、主代謝物としてセンス鎖由来の代謝物 c* 及び代謝物 d*（センス鎖の [REDACTED] 欠失）、並びにアンチセンス鎖由来の代謝物 g*（アンチセンス鎖の [REDACTED] 欠失）が認められた。ラット及びサル尿及び糞中に ALN-18328 が検出されなかったことから、ALN-18328 は未変化体では排泄されないことが示唆された。特定した ALN-18328 の代謝物より、ALN-18328 はヌクレオチド単位で切断されることが示され、切断後のヌクレオチドは排泄されずにサルベージ経路に利用されることが示唆された。

DLin-MC3-DMA は *in vitro* 試験に用いたいずれの動物種においても類似した代謝を示し、主代謝物として一酸化体又は二酸化体が同定された。標識体である ¹⁴C-DLin-MC3-DMA を用いて製剤化したパチシラン-LNP をラット及びサルに投与したマスバランス試験から、一酸化、二酸化及び加水分解経路により生成する DLin-MC3-DMA の代謝物が特定された。胆汁（ラットのみ）、糞（ラット及びサル）及び尿（ラット及びサル）中には、¹⁴C-DLin-MC3-DMA 由来の放射能は、主にその代謝物である DMBA として回収された。血漿中の DMBA は未変化体に比べて少なく、投与量の 3% 未満であり、また、投与量の 10% 以上に相当する他の DLin-MC3-DMA の代謝物も検出されなかった。*In vitro* では、DLin-MC3-DMA は CYP3A4 によって軽度代謝され、酸化体の生成のみ認められた。しかし、ラット及びサルを用いた *in vivo* 試験では、CYP を介さずに加水分解により DMBA を生成する経路が主要な代謝経路であることが示された。¹⁴C-DLin-MC3-DMA を用いて製剤化したパチシラン-LNP の排泄プロファイルは、ラット及びサルで類似していた。放射能は主に尿中に回収され（ラットで約 49%、サルで約 50%）、一部は糞中に排泄された（ラットで約 24%、サルで約 10%）。尿及び糞中のいずれについても、放射能は主に DMBA として検出された。また、非カニューレ処置ラットの尿中排泄率（対投与量%）は約 33% であったのに対して、胆管カニューレ処置（BDC）ラットでは約 12% であり、尿中排泄に差が認められた。このことから、DLin-MC3-DMA 関連成分が胆汁中に排泄され、再吸収された後、腎排泄を受けることが示唆された。結論として、DLin-MC3-DMA は CYP を介さずに（DMBA へと）代謝された後、主に尿中に排泄されることで消失すると考えられた。

PEG₂₀₀₀-C-DMG は、*in vitro* でのマウス、ラット、サル及びヒト由来の肝ミクロソーム及び S9 画分中で比較的安定であった。*In vitro* での代謝は極わずかであり、サル及びヒトで唯一の代謝経路として *O*-脱テトラデシル化が特定されたが、CYP を介したものではないと考えられた。PEG 型分子に関する文献報告によると、PEG の代謝は分子量に依存し、PEG₂₀₀₀-C-DMG と同程度の分子量をもつ PEG はほとんど代謝されなかった(1)。ラット及びサルでは PEG₂₀₀₀-C-DMG は尿中に検出されず、サルでは PEG₂₀₀₀-C-DMG の約 44% が糞中に排泄された。これらの代謝及び排泄の結果より、PEG₂₀₀₀-C-DMG は代謝されず、主に胆汁を介して未変化体として糞中に排泄されることが示唆された。

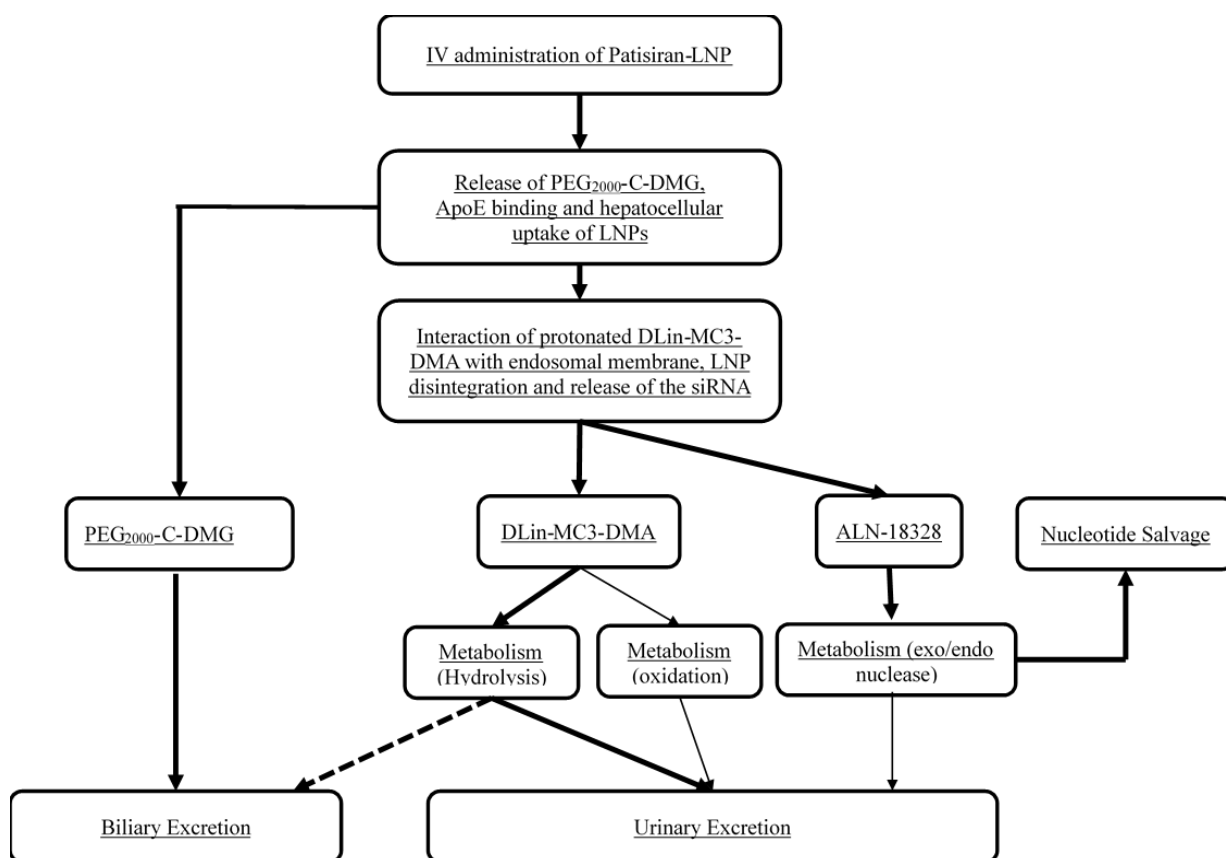
2.6.4 薬物動態試験の概要文 パチシランナトリウム

パチシラン-LNPが薬物動態学的相互作用を惹起する、又はその影響を受ける可能性は低いと考えられる。ALN-18328は、主要なCYP分子種（1A2、2C8、2C9、2C19、2D6又は3A4）に対して直接阻害作用も、時間依存的阻害作用も示さなかったが、CYP2B6に対しては直接阻害作用と時間依存的阻害作用の双方を示した。但し阻害作用を示した濃度は、臨床的影響を及ぼす可能性は低いと判断される濃度であった。DLin-MC3-DMA及びPEG₂₀₀₀-C-DMGも、主要なCYP分子種（1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6又は3A4）に対して直接阻害作用も、時間依存的阻害作用も示さなかった。ALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG₂₀₀₀-C-DMGは、CYP1A2、CYP2B6又はCYP3A4を誘導しないように見えたが、パチシラン-LNPは*in vitro*においてCYP2B6誘導作用を示した。これはALN-18328に起因した可能性があったが、ALN-18328はLNP製剤化されていないと肝細胞（試験系）の細胞膜を通過できないため、ALN-18328単独で試験を行った場合、CYP2B6誘導作用について完全な評価を行うことができなかつた可能性がある。パチシラン-LNPによるCYP2B6誘導作用は、臨床用量をヒトに投与したときに認められる最高血漿中濃度（C_{max}）（7.15 µg/mL）の約17倍、及び定常状態時の平均血漿中濃度（C_{avg,ss}）（0.355 µg/mL）の340倍の濃度で認められたが、このような濃度は臨床で発現する可能性は低く、従って臨床的影響は低いと判断された。何故なら、パチシラン-LNPをこのような投与間隔（3週間毎）で静脈内投与したときに得られるC_{max}は一過性で、血漿中濃度は半減期1時間未満で速やかに低下するためである。更にCYP2B6によってのみ代謝される基質はない。ブプロピオン及びエファビレンツは、規制当局により、臨床において適用可能なCYP2B6のプロローブ基質と指定されているが、CYP3A4がブプロピオン及びエファビレンツ双方の代謝に関与していることから、ブプロピオン及びエファビレンツのいずれも、CYP2B6に選択的で感受性が高いとは言えない(14)。したがって、CYP2B6誘導のみがエファビレンツ又はブプロピオンに影響を与える可能性は、実質的に少ないと考えられる。ALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG₂₀₀₀-C-DMGは主要なCYPの誘導剤でも、阻害剤でもなかった。また、ALN-18328及びPEG₂₀₀₀-C-DMGは主要なCYPの基質ではなかった。DLin-MC3-DMAはヒトCYP Supersomeを用いた*in vitro*試験において、複数のCYP（特にCYP3A4）により軽度に代謝されたが、*in vivo*試験では、主にCYPを介さない加水分解によって代謝されることが示された。ALN-18328、PEG₂₀₀₀-C-DMG及びDLin-MC3-DMAの加水分解代謝物であるDMBAは、0.3 mg/kgのパチシラン-LNPを投与したヒトで認められる血漿中C_{max}（7.15 µg/mL）の50倍の濃度まで、OATP1B1、OATP1B3、OAT3、OCT2、MATE1及びMATE2-Kのトランスポーターに対して阻害作用を示さず、また基質でもなかった。DLin-MC3-DMAは、溶解度上限である3 µmol/Lを最高濃度として検討した場合、これら主要なトランスポーターの基質及び、阻害剤にならないことが示された。したがって、臨床においてパチシラン-LNPがこれらのトランスポーター介した相互作用が起こる可能性は低いと考えられる。パチシラン-LNPの構成成分（ALN-18328、DLin-MC3-DMA及びPEG₂₀₀₀-C-DMG）の酵素阻害／誘導、タンパク結合及びトランスポーター相互作用に関する*in vivo*及び*ex vivo*データを総合して、パチシラン-LNPと併用投与される薬物との間に薬物間相互作用が生じる可能性は低いことが示唆された。

2.6.4 薬物動態試験の概要文
パチシランナトリウム

以上、*in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施し、パチシラン-LNP 及び 3 種類の構成成分の PK、分布、代謝及び排泄を評価した (図 24)。パチシラン-LNP は、*in vivo* 試験で検討した非臨床試験用動物種、並びに *in vitro* 試験で検討したヒト及び動物種にて、類似した分布、代謝及び排泄プロファイルが認められた。また複数の動物種にて、パチシラン-LNP の投与により標的器官である肝臓に siRNA を曝露させることが可能であることが示された。これらの試験結果から、毒物学試験の解釈、ヒトの投与レジメン (0.3 mg/kg/q3w) でのパチシラン-LNP の特徴づけ、及び、パチシラン-LNP の臨床使用が支持された。

図 24- パチシラン-LNP の成分である ALN-18328 の分布、代謝及び排泄



10 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. Gillmore JD, Hawkins PN. Drug Insight: emerging therapies for amyloidosis. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006;2(5):263-70.
3. Henry SP et al. Toxicologic properties of 2'-O-Methoxyethyl chimeric antisense inhibitors in animals and man. ed. S.T. Crooke. 2008;Boca Raton: CRC Press.
4. Tam YY, Chen S, and Cullis PR. Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery. *Pharmaceutics*. 2013;5(3): 498-507.
5. Yang W. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Q Rev Biophys*, 2011; 44(1):1-93.
6. Garay RP, et al. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012;9(11):1319-23.
7. Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1482(1-2):157-71.
8. EMA. Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins (Draft). 2015.
9. Sands H., et al. Biodistribution and metabolism of internally 3H-labeled oligonucleotides. I. Comparison of a phosphodiester and a phosphorothioate. *Mol Pharmacol*. 1994;45(5):932-43.
10. Fasano M, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*. 2005;57(12):787-96.
11. Kremer JM, Wilting J, and Janssen LH. Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev*. 1988;40(1):1-47.
12. Obach, R.S., R.L. Walsky, and K. Venkatakrisnan, Mechanism-based inactivation of human cytochrome p450 enzymes and the prediction of drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos*, 2007. 35(2): p. 246-55.
12. Webster R, et al. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. *Drug Metab Dispos*, 2007;35(1):9-16.
14. Fahmi, O.A., et al., Evaluation of CYP2B6 Induction and Prediction of Clinical Drug-Drug Interactions: Considerations from the IQ Consortium Induction Working Group-An Industry Perspective. *Drug Metab Dispos*, 2016. 44(10): p. 1720-30.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

2.6.5 薬物動態試験概要表

目 次

2.6.5 薬物動態試験概要表	1
目 次	2
表 目 次	3
略号と用語の定義	7
1 薬物動態試験一覧表	10
2 薬物動態試験—分析法及びバリデーション試験	18
3 薬物動態試験—単回投与後の吸収	56
4 薬物動態試験—反復投与後の吸収	65
5 薬物動態試験—分布	94
6 薬物動態試験—たん白結合	105
7 薬物動態試験—妊娠または授乳動物における試験	107
8 薬物動態試験—その他の分布試験	130
9 薬物動態試験—In Vivoにおける代謝	132
10 薬物動態試験—In Vitroにおける代謝	138
11 薬物動態試験—推定代謝経路	151
12 薬物動態試験—薬物代謝酵素の誘導/阻害	152
13 薬物動態試験—累積排泄	165
14 薬物動態試験—胆汁中排泄	169
15 薬物動態試験—薬物相互作用	171
16 薬物動態試験—その他	174

表 目 次

表2.6.5.1 Pharmacokinetics: Overview.....	10
表2.6.5.2.A.1 Validated Bioanalytical Methods Supporting the Patisiran-LNP Nonclinical Safety Pharmacology and Toxicology Program.....	18
表2.6.5.2.A.2 Validated Bioanalytical Methods Supporting the Patisiran-LNP Nonclinical Pharmacokinetics Program	26
表2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries.....	27
表2.6.5.3.A A Single Dose Intravenous Toxicity Study of Patisiran (ALN-18328) in Cynomolgus Monkeys	56
表2.6.5.3.B A Single Intravenous Pharmacokinetic Study in Sprague Dawley Rats	57
表2.6.5.3.C A Single Dose Intravenous PK/PD Study in Cynomolgus Monkeys.....	60
表2.6.5.3.D A Single Dose Intravenous Safety Pharmacology Study in Cynomolgus Monkeys.....	63
表2.6.5.4.A A Repeat (q2w x4) Intravenous Range-Finding Toxicity Study in C57BL/6 Mice	65
表2.6.5.4.B A Repeat (q2w x5) Intravenous Range-Finding Toxicity Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice	68
表2.6.5.4.C A Repeat (q2w x14) Intravenous Carcinogenicity Study in TgRasH2 Mice	74
表2.6.5.4.D A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats	75
表2.6.5.4.E A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats	80
表2.6.5.4.F A Repeat (q2w x14) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats	82
表2.6.5.4.G A Repeat (q2w x7 or q3w x7) Subcutaneous Toxicity Study in Male Sprague Dawley Rats	85
表2.6.5.4.H A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys	87
表2.6.5.4.I A Repeat (q3w x14) Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys.....	91
表2.6.5.5.A Tissue Distribution after a Single Intravenous Administration in Sprague Dawley Rats	94
表2.6.5.5.B Tissue Distribution after a Repeat (q2wx7 or q3wx7) Subcutaneous Toxicity Study in Male Sprague Dawley Rats.....	99
表2.6.5.5.C Tissue Distribution after a Single Dose Intravenous PK/PD Study in Cynomolgus Monkeys.....	100
表2.6.5.5.D Rat Tissue Distribution by Quantitative Whole Body Autoradiography	103

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表2.6.5.5.E Rat Tissue Distribution by Micro-Autoradiography.....	104
表2.6.5.6.A Protein Binding	105
表2.6.5.6.B Protein Binding for PEG2000-C-DMG.....	106
表2.6.5.7.A An Intravenous (q2w x7) Fertility and General Reproduction Study in Male Sprague Dawley Rats	107
表2.6.5.7.B ALN-TTR02: An Intravenous Dosage Range-finding Development Toxicity Study in Rats Including a Toxicokinetic Evaluation	111
表2.6.5.7.C An Intravenous (q1w x6) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats.....	115
表2.6.5.7.D An Intravenous (q1w x6) Fertility and Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats	119
表2.6.5.7.E An Intravenous (q6d x6) Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study in Sprague Dawley Rats	121
表2.6.5.7.F An Intravenous (q1w x3) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study in New Zealand White Rabbits	123
表2.6.5.7.G An Intravenous (q1w x3) Embryo-Fetal Development Study in New Zealand White Rabbits	127
表2.6.5.8.A Lacteal Secretion Analysis from an Intravenous Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study in Sprague Dawley Rats.....	130
表2.6.5.9.A Metabolic Profiling Study of ALN-18328 and PEG2000-C-DMG Following a Single Intravenous Bolus Injection of Patisiran to Male and Female Sprague Dawley Rats	132
表2.6.5.9.B Identification, Profiling, and Quantitation of [14C]-DLin-MC3-DMA and Metabolites in Rat Plasma, Urine, Bile, Feces, and Tissues; and Bioanalysis of ALN-18328 in Rat Plasma, Plasma Ultrafiltrate, and Tissues.....	134
表2.6.5.9.C Profiling and Identification of Metabolites of 14C-ALN-TTR02 in Selected Plasma, Urine, and Feces Samples after a Single Intravenous Administration of 14C-ALN-TTR02 to Monkeys	136
表2.6.5.10.A In Vitro Metabolic Stability of Unformulated ALN-18328 in Mouse, Rat, Monkey, and Human Liver Cytosol	138
表2.6.5.10.B In Vitro Metabolic Stability of ALN-TTR02 as Determined by the Stability of the siRNA Component ALN-18328, in Mouse, Rat, Monkey and Human Serum	139
表2.6.5.10.C In Vitro Metabolic Stability of ALN-TTR02 as Determined by the Stability of the siRNA Component ALN-18328, in Mouse, Rat, Monkey, and Human Liver Cytosol.....	140

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表2.6.5.10.D In Vitro Metabolic Stability and Metabolic Profiling of ALN-18328 in Mouse, Rat, Monkey, and Human Serum and Liver S9 Fractions	141
表2.6.5.10.E In Vitro Metabolic Stability of DLin-MC3-DMA Using Liver Microsomes and Liver S9 Fractions from CD-1 Mice, Sprague Dawley Rats, Cynomolgus Monkeys, and Humans (as quantified by LC/MS/MS) ..	143
表2.6.5.10.F In Vitro Metabolic Stability of DLin-MC3-DMA Using Liver Microsomes and Liver S9 Fractions from CD-1 Mice, Sprague Dawley Rats, Cynomolgus Monkeys, and Humans (as quantified by LC/MS/MS) ..	144
表2.6.5.10.G In Vitro Metabolic Stability and Metabolite Profiling and Identification of PEG2000-C-DMG Using Liver Microsomes and S9 Fractions from CD-1 Mice, Sprague Dawley Rats, Cynomolgus Monkeys, and Humans.....	145
表2.6.5.10.H Evaluation of Potential Human Cytochrome P450 Isoforms Involved in the Metabolism of ALN-18328 using cDNA Expressed Enzymes	146
表2.6.5.10.I Metabolite Profiling and Identification of DLin-MC3-DMA Using Human Supersomes: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4	147
表2.6.5.10.J Evaluation of Potential Human Cytochrome P450 Isoforms Involved in the Metabolism of PEG2000-C-DMG using cDNA Expressed Enzymes.....	149
表2.6.5.12.A Evaluation of the Inhibitory Potential of siRNA ALN-18328 Against Five Principal Human Cytochrome P450 Isozymes Using Human Liver Microsomes	152
表2.6.5.12.B Evaluation of the Inhibitory Potential of DLin-MC3-DMA against Eight Principal Human Cytochrome P450 Isozymes Using Human Liver Microsomes	153
表2.6.5.12.C Evaluation of the Inhibitory Potential of PEG2000-C-DMG Against Eight Principal Human Cytochrome P450 Isozymes Using Human Liver Microsomes	154
表2.6.5.12.D Evaluation of the Potential of ALN-18328 to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes	155
表2.6.5.12.E Evaluation of the Potential of DLin-MC3-DMA to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes	157
表2.6.5.12.F Evaluation of the Potential of PEG2000-C-DMG to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes	159
表2.6.5.12.G Evaluation of ALN-TTR02 Effects on Cytochrome P450 and UGT Enzyme Activities in Liver Microsomes from Cynomolgus Monkeys Treated with ALN-TTR02	161
表2.6.5.12.H ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG2000-C-DMG: In Vitro Inhibitory Potential Towards Multiple Human Cytochrome P450 Isoforms	162

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表2.6.5.12.I Evaluation of the Potential of Patisiran-LNP to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes	164
表2.6.5.13.A Excretion Mass Balance and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague Dawley and Long-Evans Rats Following a Single Intravenous Bolus Administration of 14C-ALN-TTR02	165
表2.6.5.13.B Urine and Feces Accumulation Analysis from “Absorption, Metabolism, and Excretion of 14C-ALN-TTR02 Following Intravenous Administration to Monkeys”	167
表2.6.5.14.A Excretion Mass Balance and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague Dawley and Long Evans Rats Following a Single Intravenous Bolus Administration of 14C-ALN-TTR02	169
表2.6.5.15.A In vitro Transporter Assay	171
表2.6.5.16.A ALN-TTR02: A Single Dose Intravenous Infusion Bridging Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Safety Study in Cynomolgus Monkeys	174
表2.6.5.16.B Toxicokinetics of Patisiran (ALN-TTR02): A 10-Week Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Pharmacodynamic Study in Cynomolgus Monkeys with Different Batch Processes	175

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

略号と用語の定義

略号、用語	定義
A	Adenosine
AD-1955	siRNA targeting the insect luciferase gene
ADA	Anti-drug antibody
AF-011	Second generation lipid nanoparticle formulation used in patisiran. Lipid excipients are DLin-MC3-DMA, DSPC, cholesterol and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG formulated as lipid nanoparticles (LNPs).
AF-011-1955	Vehicle control comprising the siRNA AD-1955 (targeting the insect luciferase gene) in the AF-011 formulation
ALN-18328	siRNA drug substance in ALN-TTR01 and ALN-TTR02
ALN-PCS02	Drug product with same second generation AF-011 formulation as ALN-TTR02
ALN-TTR01	Drug product, an RNAi therapeutic comprised of ALN-18328, an siRNA targeting TTR mRNA, and first generation SNALP formulated as lipid nanoparticles in isotonic phosphate buffered saline.
ALN-TTR02	Patisiran drug product, an RNAi therapeutic comprised of 2 mg/mL patisiran drug substance (ALN 18328, an siRNA targeting TTR mRNA) and lipid excipients DLin-MC3-DMA, DSPC, cholesterol and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG formulated as lipid nanoparticles (LNPs, AF-011) in isotonic phosphate buffered saline.
AUC _{0-t}	Area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration
Bb	Split product of complement factor B
BDC	Bile duct cannulated
BLQ	Below the limit of quantification
BSEP	Bile salt export pump
C	Cytidine
¹⁴ C	Carbon isotope with atomic weight of 14
C3a	Complement component 3a
cDNA	Complimentary deoxyribonucleic acid
CL	Total body clearance
C _{max}	Maximum (peak) concentration
CRP	C-reactive protein
CV	Coefficient of variance

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

略号、用語	定義
CYP	Cytochrome P450
DLin-DMA	N,N-dimethyl-2,3-bis(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yl)oxy)propan-1-amine
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
dT	Deoxythymidylate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
G	Guanosine
GD	Presumed day of gestation
GLP	Good Laboratory Practice
IC ₅₀	Inhibitor concentration which inhibits maximal activity by 50%
IFN- α	Interferon- α
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1RA	Interleukin-1 receptor antagonist
IL-6	Interleukin-6
IV	Intravenous
LCMS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LD	Lactation day
LLOQ	Lower limit of quantification
LNP	Lipid nanoparticle
MDR1	Multidrug resistance protein 1
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NA	Not applicable
NC	Not calculable
ND	Not determined
NR	Not reportable
Patisiran-LNP	Patisiran drug product
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PD	Pharmacodynamic(s)
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	(R)-2,3-bis(tetradecyloxy)propyl 1-(methoxy poly(ethylene glycol)2000)propylcarbamate

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

略号、用語	定義
pH	Scale for expressing hydrogen ion concentration [(-1) x base ten logarithm of hydrogen ion concentration]
PK	Pharmacokinetic(s)
q2w	Once every two weeks
q3w	Once every three weeks
q4w	Once every four weeks
RNAi	Ribonucleic acid interference
SC	Subcutaneous
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
t _{1/2}	Terminal elimination half-life
TK	Toxicokinetic(s)
TTR	Transthyretin
U	Uridine
USP	United States Pharmacopeia
V _{ss}	Volume of distribution at steady state
wt	Wild type

パチシラン-LNP 開発中に用いられた用語

Name(s)	Description	Purpose and Studies Employed
AD-18328 ALN-18328 Patisiran	siRNA targeting monkey and human TTR mRNA (not pharmacologically active in mice, rats, or rabbits).	siRNA that was evaluated in one single dose toxicity study and in in vitro studies.
Patisiran-LNP ALN-TTR02	ALN-18328 formulated in AF-011 LNP formulation.	Nomenclature for patisiran formulated as lipid nanoparticles; evaluated in the majority of pharmacokinetic and toxicology studies.
AF-011-1955	siRNA targeting the firefly luciferase gene formulated in AF-011 LNP (same LNP as patisiran-LNP).	Negative control siRNA-LNP used in toxicology studies to evaluate the effects of the AF-011 LNP formulation independent of ALN-18328 mediated reduction of TTR mRNA.
AD-18534 AF-011-18534	siRNA targeting rodent TTR mRNA formulated in AF-011 (same LNP as patisiran-LNP).	Pharmacologically active control formulation used in rodent toxicology studies.

Abbreviations: LNP=lipid nanoparticle; mRNA=messenger ribonucleic acid; siRNA=small interfering ribonucleic acid; TTR=transthyretin.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

1 薬物動態試験一覧表

表 2.6.5.1 Pharmacokinetics: Overview

Type of Study	Test System	Test Article(s), Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Absorption				
Absorption After a Single Dose				
Studies Conducted with Patisiran Drug Substance (siRNA ALN-18328)				
TK study in support of a GLP single dose toxicology & TK study of siRNA	Cynomolgus Monkey	ALN-18328, single IV bolus injection	██████████ Canada	TTR-NCD09-004 (██████████ 503213)
Studies Conducted with Patisiran-LNP and AF-011-18534				
Non-GLP single dose PK study	Sprague Dawley Rat	Patisiran-LNP, IV bolus injection	Anylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	TTR02-NCD10-006
Non-GLP single dose PK & pharmacodynamics study	Cynomolgus Monkey	Patisiran-LNP, 1-h IV infusion (0.03, 0.3, & 1.0 mg/kg) or 15 min (0.3 mg/kg only)	██████████ USA	TTR02-NCD10-018 (██████████ 8235671)
TK study in support of a GLP safety pharmacology study	Cynomolgus Monkey	Patisiran-LNP, 1-h IV infusion	██████████ USA	TTR02-NCD10-003 (██████████ 20002866)

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.1 Pharmacokinetics: Overview (続き)

Type of Study	Test System	Test Article(s), Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Absorption After Repeated Doses				
Studies Conducted with Patisiran-LNP and AF-011-18534				
6-week once every 2 weeks (4 doses) non-GLP DRF study	Mouse (C57BL/6)	Patisiran-LNP and AF-011-18534, IV bolus	Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	TTR02-NCD14-003
10-week once every 2 weeks (5 doses) non-GLP DRF study	Mouse (wt and TgRasH2 hemizygous)	Patisiran-LNP and AF-011-18534, IV bolus	██████████ Canada	TTR02-NCD14-004
TK study in support of the 26-week once every 2 weeks (14 doses) carcinogenicity study in the TgRasH2 mouse	TgRasH2 mouse	Patisiran-LNP, IV bolus	██████████ Canada	TTR02-GLP15-024 (████ 5001193)
TK study in support of a 6-week once every 2 weeks (4 doses) GLP toxicology study	Sprague Dawley Rat	Patisiran-LNP, 1-h IV infusion	██████████ Canada	TTR02-NCD10-005 (████ 503491)
TK study in support of a 4-week once every 4 weeks (2 doses) GLP toxicology study	Sprague Dawley Rat	Patisiran-LNP, 1-h IV infusion	██████████ Canada	TTR02-NCD11-002 (████ 504512)
TK study in support of a 26-week once every 2 weeks (14 doses) GLP toxicology study	Sprague Dawley Rat	Patisiran-LNP; 1-h IV infusion	██████████ Canada	TTR02-NCD12-003 (████ 504264)
TK study in support of a SC dose administration in rats once every 2 weeks for 13 weeks, or every 3 weeks for 19 weeks	Sprague Dawley Rat	Patisiran-LNP, SC injection	Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	TTR02-NCD14-001
TK study in support of a 6-week once every 2 weeks (4 doses) GLP toxicology study	Cynomolgus Monkey	Patisiran-LNP, 1-h IV infusion	██████████ Canada	TTR02-NCD10-011 (████ 504210)
TK study in support of a 39-week once every 3 weeks (14 doses) GLP toxicology study	Cynomolgus Monkey	Patisiran-LNP 1-h IV infusion	██████████ Canada	TTR02-NCD12-001 (████ 504265)

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.1 Pharmacokinetics: Overview (続き)

Type of Study	Test System	Test Article(s), Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Distribution – Organ Distribution				
Non-GLP single dose PK study	Sprague Dawley Rat	Patisiran-LNP, IV bolus injection	Anylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	TTR02-NCD10-006
Non-GLP repeat dose tolerability study	Sprague Dawley Rat	Patisiran-LNP, SC (0.3, 1.0, & 10.0 mg/kg)	Anylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	TTR02-NCD14-001
GLP Mass balance and tissue distribution by QWBA	Sprague Dawley and Long Evans Rat	¹⁴ C-ALN-TTR02, single IV bolus injection	██████████ USA	██████████ 319-1103
Non-GLP tissue distribution by MARG in support of a GLP mass balance and tissue distribution by QWBA	Sprague Dawley and Long Evans Rat	¹⁴ C-ALN-TTR02, single IV bolus injection	██████████ USA	██████████ 319D-1202 (from ██████████ 319-1103)
Non-GLP single dose PK & pharmacodynamics study	Cynomolgus Monkey	Patisiran-LNP, IV infusion over 1 h (0.03, 0.3, & 1.0 mg/kg) or 15 min (0.3 mg/kg only)	██████████ USA	TTR02-NCD10-018 (██████████ 8235671)
Distribution – Protein Binding				
Protein binding study, non-GLP	Rat and human serum albumin and human α1-acid glycoprotein	In vitro	Anylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	BA11010
Protein binding study for PEG ₂₀₀₀ -C-DMG, non-GLP	Human plasma	In vitro	██████████ USA	TTR02-DSM18-024 (██████████ 319N-1815)
Distribution - Studies in Pregnant Animals				
TK from a GLP fertility and reproduction study in male rats	Sprague Dawley Rat	Patisiran-LNP and AF-011-18534, 1-h IV infusion	██████████ USA	TTR02-GLP15-035 (██████████ 20086421)
TK from GLP dose range-finding development toxicity study	Sprague Dawley Rat	Patisiran-LNP 1-h IV infusion; AF-011-18534 (rat-specific siRNA in AF-011 formulation)	██████████ USA	TTR02-NCD13-003 (██████████ 20030143)

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.1 Pharmacokinetics: Overview (続き)

Type of Study	Test System	Test Article(s), Method of Administration	Testing Facility	Study Number
TK from non-GLP dose range-finding embryo-fetal study	Sprague Dawley Rat	Patisiran-LNP and AF-011-18534, 1-h IV infusion	██████████ USA	TTR02-DSM15-015 (██████████ 20073945)
TK from GLP embryo-fetal study	Sprague Dawley Rat	Patisiran-LNP and AF-011-18534, 1-h IV infusion	██████████ USA	TTR02-GLP15-031 (██████████ 20050742)
TK from GLP perinatal/postnatal study	Sprague Dawley Rat	Patisiran-LNP and AF-011-18534, 1-h IV infusion	██████████ USA	TTR02-GLP16-003 (██████████ 20073943)
TK from non-GLP DRF embryo-fetal study	New Zealand White Rabbit	Patisiran-LNP and AF-011-18534, 1-h IV infusion	██████████ USA	TTR02-DSM15-012 (██████████ 20050744)
TK from GLP embryo-fetal study	New Zealand White Rabbit	Patisiran-LNP 1-h IV infusion	██████████ USA	TTR02-GLP15-034 (██████████ 20050745)
Distribution – Other Studies				
Lacteal transfer after single IV bolus in rat milk	Sprague Dawley Rat	ALN-18328, AF-011-18534	██████████ USA	TTR02-GLP16-003
Metabolism – In Vivo				
Rat metabolism profiling study- in vivo	Sprague Dawley Rat	IV	Anylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	TTR02-DSM17-002
Non-GLP metabolite profiling and identification study in support of a GLP mass balance and tissue distribution by QWBA study	Sprague Dawley and Long Evans Rat	¹⁴ C-patisiran-LNP, single IV bolus injection	██████████ USA	██████████ 319N-1201 (samples from ██████████ 319-1103)
Profiling and Identification of Metabolites of ¹⁴ C-ALN-TTR02 in Selected Plasma, Urine, and Feces Samples after a Single Intravenous Administration of ¹⁴ C -ALN-TTR02 to Monkeys	Cynomolgus Monkey	¹⁴ C-patisiran-LNP, single IV bolus injection	██████████ USA	██████████ 8336181 (samples from TTR02-DSM16-013)

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.1 Pharmacokinetics: Overview (続き)

Type of Study	Test System	Test Article(s), Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Metabolism – In Vitro				
Non-GLP in vitro liver cytosol metabolism study (ALN-18328)	Mouse, rat, monkey, and human liver cytosol	In vitro	Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	TTR-ST10-008
Non-GLP in vitro serum stability study (patisiran-LNP as measured by ALN-18328)	Mouse, rat, monkey, and human serum	In vitro	Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	TTR-ST10-002
Non-GLP in vitro liver cytosol metabolism study (patisiran-LNP as measured by ALN-18328)	Mouse, rat, monkey, and human liver cytosol	In vitro	Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	TTR-ST10-001
Non-GLP in vitro Metabolic Stability in Mouse, Rat, Monkey, and Human Serum and Liver S9-fractions, and in vitro Metabolic Profiling	Mouse, Sprague Dawley Rat, Cynomolgus Monkey, and Human	In vitro	Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA	TTR02-DSM16-031 (BA16027)
Non-GLP in vitro liver microsome and S9 metabolic stability study (DLin-MC3-DMA)	Mouse, rat, monkey, and human liver microsomes and S9 fractions	In vitro	██████████ USA	██████ 319N-1001
Non-GLP in vitro metabolite profiling and identification study (DLin-MC3-DMA)	Mouse, rat, monkey, and human liver microsomes and S9 fractions	In vitro	██████████ USA	██████ 319N-1002
Non-GLP in vitro liver microsome and S9 metabolic stability study (PEG ₂₀₀₀ -C-DMG)	Mouse, rat, monkey and human liver microsomes and S9	In vitro	██████████ USA	██████ 319N-1305
Non-GLP in vitro CYP 450 Isoforms Identification in the Metabolism of ALN-18328 Incubation with Human Supersomes	Human supersomes	In vitro	██████████ USA	██████ 319N-1616

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.1 Pharmacokinetics: Overview (続き)

Type of Study	Test System	Test Article(s), Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Non-GLP in vitro CYP Isozymes Identification in the Metabolism of DLin-MC3-DMA Incubation with Human Supersomes	Human supersomes	In vitro	██████████ USA	██████ 319D-1304
Non-GLP in vitro CYP 450 Isoforms Identification in the Metabolism of PEG ₂₀₀₀ -C-DMG Incubation with Human Supersomes	Human supersomes	In vitro	██████████ USA	██████ 319N-1615
Non-GLP in vitro CYP Direct and Time-Dependent Inhibitory Potential of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Human liver microsomes	In vitro	██████████ USA	TTR02-DSM18-013 (██████ 319N-1807)
Non-GLP in vitro Induction Potential of Patisiran-LNP	Human hepatocytes	In vitro	██████████ USA	TTR02-DSM18-014 (██████ 319N-1808)
Inhibition/Induction of Drug Metabolizing Enzymes				
Non-GLP in vitro liver CYP inhibition study (ALN-18328)	Human liver microsomes	In vitro	██████████ USA	██████ 319N-1004
Non-GLP in vitro liver CYP inhibition study (DLin-MC3-DMA)	Human liver microsomes	In vitro	██████████ USA	██████ 319N-1003
Non-GLP in vitro liver CYP inhibition study (PEG ₂₀₀₀ -C-DMG)	Human liver microsomes	In vitro	██████████ USA	██████ 319N-1303
Non-GLP in vitro CYP induction study (ALN-18328)	Human liver hepatocytes	In vitro	██████████ USA	██████ 319N-1306
Non-GLP in vitro CYP induction study (DLin-MC3-DMA)	Human liver hepatocytes	In vitro	██████████ USA	██████ 319N-1307
Non-GLP in vitro CYP induction study (PEG ₂₀₀₀ -C-DMG)	Human liver hepatocytes	In vitro	██████████ USA	██████ 319N-1308

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.1 Pharmacokinetics: Overview (続き)

Type of Study	Test System	Test Article(s), Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Non-GLP in vitro CYP enzyme isoform study	Cynomolgus monkey liver microsomes	In vitro	██████████ USA	██████████ 319N-1105
Excretion				
GLP Bile duct cannulation and mass balance and tissue distribution by QWBA	Sprague Dawley and Long Evans Rat	¹⁴ C-patisiran-LNP (containing ¹⁴ C-Dlin-MC3-DMA) single IV bolus injection	██████████ USA	██████████ 319-1103
GLP Mass balance and tissue distribution	Cynomolgus Monkey	¹⁴ C-patisiran-LNP (containing ¹⁴ C-Dlin-MC3-DMA) single IV bolus injection	██████████ USA	TTR02-DSM16-013
Excretion into Bile				
GLP Bile duct cannulation and mass balance and tissue distribution by QWBA	Sprague Dawley and Long Evans Rat	¹⁴ C-patisiran-LNP (containing ¹⁴ C-Dlin-MC3-DMA) single IV bolus injection	██████████ USA	██████████ 319-1103
Pharmacokinetic Drug Interactions				
Non-GLP in vitro transporters study	ABC efflux transporters MDR1, BCRP, and BSEP; SLC transporters OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, MATE1, and MATE2-K	ALN-18328, Dlin-MC3-DMA, PEG ₂₀₀₀ -C-DMG and 4-Dimethylaminobutyric Acid, In vitro	██████████ Hungary	Alnylam-01-10Apr2013
Other PK Studies				
GLP; comparison of patisiran-LNP manufactured by 2 different processes and by 2 different manufacturers	Cynomolgus Monkey	Patisiran-LNP, single IV dose; 1-h infusion, 1 mg/kg	██████████ Canada	TTR02-NCD13-001 (██████████-5000132)

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.1 Pharmacokinetics: Overview (続き)

Type of Study	Test System	Test Article(s), Method of Administration	Testing Facility	Study Number
GLP; comparison of patisiran manufactured by 2 different processes	Cynomolgus Monkey	Patisiran-LNP IV dose; 1-h infusion, 0.3 or 2.0 mg/kg	██████████ Canada	TTR02-GLP17-007 (██████████ 5002401)

Abbreviations: BSEP=bile salt export pump; ¹⁴C=radiocarbon; ██████████ CYP=cytochrome P450; DRF=dose range-finding; GLP=Good Laboratory Practice; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; MARG=microautoradiography; PK=pharmacokinetic(s); QWBA=quantitative whole body autoradiography; SC=subcutaneous; siRNA=small interfering ribonucleic acid; TK=toxicokinetic(s); wt=wild type.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

2 薬物動態試験－分析法及びバリデーション試験

表 2.6.5.2.A.1 Validated Bioanalytical Methods Supporting the Patisiran-LNP Nonclinical Safety Pharmacology and Toxicology Program

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method Reference / Method / GLP Status ^a
Mouse / C57BL/6	TTR02-NCD14-003	DRF repeat-dose toxicity (6-weeks)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02), AF-011-18534	ALN-18328, AD-18534	Plasma	TTR02-NCD14-003 (TK memo) / Atto-Probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
				DLin-MC3-DMA, PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TTR02-NCD14-003 (TK memo) / LC-MS/MS / Non-GLP
Mouse / wild type and hemizygous TgRasH2	TTR02-NCD14-004 (5000211)	DRF carcinogenicity study (2 months)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02), AF-011-18534	ALN-18328, AD-18534	Plasma	TTR02-NCD14-004 (TK memo) / Atto-Probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TTR02-NCD14-004 (TK memo) / LC-MS/MS / Non-GLP
Mouse / TgRasH2	TTR02-GLP15-024 (5001193)	Carcinogenicity study (26 weeks)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma	TSLS13-131 / LC/MS-HRAM / GLP
				DLin-MC3-DMA		TSLS13-132 / LC-MS/MS / GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG		TSLS13-130 / LC-MS/MS / GLP
Rat / Sprague Dawley	TTR02-NCD14-001	Repeat dose tolerability (19 weeks)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma, Liver	TTR02-NCD14-001 (TK memo) / Atto-Probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
				DLin-MC3-DMA, PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TTR02-NCD14-001 (TK memo) / LC-MS/MS / Non-GLP

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.A.1 Validated Bioanalytical Methods Supporting the Patisiran-LNP Nonclinical Safety Pharmacology and Toxicology Program (続き)

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method Reference / Method / GLP Status ^a
Rat / Sprague Dawley	TTR02-NCD10-005 (████ 503491)	Repeat dose toxicity (dosing once every other week for 4 doses)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02), AF-011-1955	ALN-18328	Plasma	TSL10-135 / LC-MS/MS / GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSL10-039 / LC-MS/MS / GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSL10-047 / LC-MS/MS / GLP
				ADA	Serum	503491 Appendix 16 / ELISA / Non-GLP
Rat / Sprague Dawley	TTR02-NCD11-002 (████ 504512)	Repeat dose toxicity (dosing once monthly for 2 doses)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma	TSL10-135 / LC-MS/MS / GLP
				ADA	Serum	BIO11030 / ELISA / Non-GLP
Rat / Sprague Dawley	TTR02-NCD12-003 (████ 504264)	Repeat dose toxicity (26 weeks)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma	TSL10-135 / LC-MS/MS / GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSL10-039 / LC-MS/MS / GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSL10-047 / LC-MS/MS / GLP
				ADA	Serum	████ 281821 / ELISA / GLP
Rat / Sprague Dawley	TTR02-GLP15-035 (████ 20086421)	Fertility study in male animals (dosing began 70 days prior to and through cohabitation (total of 7 doses))	Patisiran-LNP (ALN-TTR02), AF-011-18534	ALN-18328	Plasma	TSL10-135 / LC-MS/MS / GLP
				AD-18534	Plasma	TSL15-159 / LC/MS-HRAM / GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSL10-039 / LC-MS/MS / GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSL10-047 / LC-MS/MS / GLP

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.A.1 Validated Bioanalytical Methods Supporting the Patisiran-LNP Nonclinical Safety Pharmacology and Toxicology Program (続き)

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method Reference / Method / GLP Status ^a
Rat / Sprague Dawley	TTR02-NCD13-003 (■■■■ 20030143)	DRF development toxicity (GD6 to GD13)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02), AF-011-18534	ALN-18328	Plasma	TSL10-135 / LC-MS/MS / GLP
					Fetus	BA13011 / Atto-Probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
				AD-18534	Plasma	BA13002 / Atto-Probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
					Fetus	BA13011 / Atto-Probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	BA13001 / LC-MS/MS / Non-GLP
					Plasma	TSL10-039 / LC-MS/MS / GLP
					Fetus	BA13011 / LC-MS/MS / Non-GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	BA13001 / LC-MS/MS / Non-GLP
					Plasma	TSL10-047 / LC-MS/MS / GLP
					Fetus	BA13011 / LC-MS/MS / Non-GLP
				ADA	Serum	BA15005 (Based on ■■■■ 281821) / ELISA / Non-GLP
				Rat / Sprague Dawley	TTR02-DSM15-015 (20073945)	DRF embryo-fetal toxicity (GD6 to GD19)
DLin-MC3-DMA	Plasma, liver, fetus, placenta	BA16021 / LC-MS/MS / Non-GLP				
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	BA16021 / LC-MS/MS / Non-GLP				
	Liver, fetus, placenta	BA16021 / LC-MS/MS / Non-GLP				

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.A.1 Validated Bioanalytical Methods Supporting the Patisiran-LNP Nonclinical Safety Pharmacology and Toxicology Program (続き)

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method Reference / Method / GLP Status ^a
Rat / Sprague Dawley	TTR02-GLP15-031 (████ 20050742)	Embryo-fetal toxicity (GD6 to GD19)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02), AF-011-18534	ALN-18328	Plasma	TSL10-135 / LC-MS/MS / GLP
				AD-18534	Plasma	TSL15-159 / LC/MS-HRAMS / GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSL10-039 / LC-MS/MS / GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSL10-047 / LC-MS/MS / GLP
Rat / Sprague Dawley	TTR02-GLP16-003 (████ 20076943)	Perinatal/postnatal reproduction toxicity (GD7 to LD18)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02), AF-011-18534	ALN-18328	Plasma	TSL10-135 / LC-MS/MS / GLP
					Milk	8346955 / LC/MS-HRAM / Non-GLP BA17004 / RT-qPCR / Non-GLP
				AD-18534	Plasma	TSL15-159 / LC/MS-HRAM / GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSL10-039 / LC-MS/MS / GLP
					Milk	8346955 / LC/MS-HRAM / Non-GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSL10-047 / LC-MS/MS / GLP
					Milk	TSL15-253 / LC-MS/MS / GLP
Rabbit / New Zealand White	TTR02-DSM15-012 (████ 20050744)	DRF embryo-fetal toxicity (GD7 to GD19); non-gravid (15 days)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02) AF-011-18534	ALN-18328	Plasma, liver, fetus, spleen, kidney, placenta	BA16014 / Atto-Probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma, liver, spleen, kidney, placenta, fetus	BA16014 / LC-MS/MS / Non-GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma, liver, kidney, spleen, fetus, placenta	BA16014 / LC-MS/MS / Non-GLP
Rabbit / New Zealand White	TTR02-GLP15-034 (████ 20050745)	Embryo-fetal toxicity (GD7 to GD19)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma	TSL15-065 / LC/MS-HRAM / GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSL15-067 / LC-MS/MS / GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSL15-068 / LC-MS/MS / GLP

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.A.1 Validated Bioanalytical Methods Supporting the Patisiran-LNP Nonclinical Safety Pharmacology and Toxicology Program (続き)

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method Reference / Method / GLP Status ^a
Monkey / Cynomolgus	TTR02-NCD10-003 (████ 20002866)	Single dose safety pharmacology (CNS, cardiovascular, respiratory)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma	TSLS10-136 / LC-MS/MS / GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSLS10-040 / LC-MS/MS / GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSLS10-048 / LC-MS/MS / GLP
Monkey / Cynomolgus	TTR-NCD09-004 (████ 503213)	Single dose toxicity	ALN-18328	ALN-18328	Plasma	BA09001 / Hybridization ELISA / Non-GLP
				Complement Bb fragment	Plasma	████ 27873 / ELISA / GLP
				Cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ)	Serum	████ 27556, █████ 27813 / Multiplex Luminex / GLP
				Cytokine IFN- α	Serum	████ 27812 / ELISA / GLP
Monkey / Cynomolgus	TTR02-NCD13-001 (████ 5000132)	Single dose PK/PD/safety bridging study	Patisiran-LNP (ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma	TSLS10-136 / LC-MS/MS / GLP
				TTR Protein	Serum	████ 302417 / ELISA / GLP
						████ 302834 / ELISA / GLP
				Complement Bb fragment	Plasma	████ 27873 / ELISA / GLP
				Complement C3a	Plasma	████ 30257 / ELISA / GLP
				Cytokines (IL-1RA, IL-6)	Plasma	████ 30250 / Multiplex Luminex / GLP
ADA	Serum	████ 281818 / ELISA / GLP				

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.A.1 Validated Bioanalytical Methods Supporting the Patisiran-LNP Nonclinical Safety Pharmacology and Toxicology Program (続き)

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method Reference / Method / GLP Status ^a
Monkey / Cynomolgus	TTR02-NCD10-011 (████ 504210)	Repeat-dose toxicity (dosing once every other week for 4 doses)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma	TSL10-136 / LC-MS/MS / GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSL10-040 / LC-MS/MS / GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSL10-048 / LC-MS/MS / GLP
				TTR Protein	Serum	████ 302417 / ELISA / GLP
						████ 302834 / ELISA / GLP
				Complement C3a	Plasma	████ 30257 / ELISA / GLP
				Complement Bb fragment	Plasma	████ 27873 / ELISA / GLP
				Cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ)	Serum	████ 27556, █████ 27813 / Multiplex Luminex / GLP
				IL-1RA	Serum	████ 30271 / Multiplex Luminex / GLP
				Cytokine IFN- α	Serum	████ 27812 / ELISA / GLP
				CRP	Serum	████ 30196 / ELISA / GLP
ADA	Serum	504210 Appendix 21 / ELISA / Non-GLP				

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.A.1 Validated Bioanalytical Methods Supporting the Patisiran-LNP Nonclinical Safety Pharmacology and Toxicology Program (続き)

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method Reference / Method / GLP Status ^a
Monkey / Cynomolgus	TTR02-NCD12-001 (████ 504265)	Repeat-dose toxicity (dosing once every 3 weeks for 14 doses)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma	TSLS10-136 / LC-MS/MS / GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSLS10-040 / LC-MS/MS / GLP
					Plasma	TSLS11-042 (High Range) / LC-MS/MS / GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSLS10-048 / LC-MS/MS / GLP
				TTR Protein	Serum	████ 302417 / ELISA / GLP
						████ 302834 / ELISA / GLP
				Complement C3a	Plasma	████ 30257 / ELISA / GLP
				IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ)	Serum	████ 27556, █████ 27813 / Multiplex Luminex / GLP
				IL-1RA	Serum	████ 30271 / Multiplex Luminex / GLP
				Cytokine IFN- α	Serum	████ 27812 / ELISA / GLP
ADA	Serum	████ 281818 / ELISA / GLP				

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.A.1 Validated Bioanalytical Methods Supporting the Patisiran-LNP Nonclinical Safety Pharmacology and Toxicology Program (続き)

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method Reference / Method / GLP Status ^a
Monkey / Cynomolgus	TTR02-DSM16-013 (████████ 8336181)	Absorption, Metabolism, and Excretion of ¹⁴ C-ALN-TTR02 Following Intravenous Administration	¹⁴ C-ALN-TTR02	ALN-18328	Plasma	TSLS10-136 / LC-MS/MS / GLP
					Plasma Ultrafiltrate	TSLS15-087 / LC-MS/MS / Non-GLP
					Urine	TSLS15-087 / LC-MS/MS / Non-GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSLS10-040 / LC-MS/MS / GLP
					Urine	TSLS15-087 / LC-MS/MS / Non-GLP
					Feces	TSLS15-087 / LC-MS/MS / Non-GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSLS10-048 / LC-MS/MS / GLP
					Urine	TSLS15-087 / LC-MS/MS / Non-GLP
					Feces	TSLS15-087 / LC-MS/MS / Non-GLP
				4-(dimethylamino) butyric acid	Urine	TSLS15-087 / LC-MS/MS / Non-GLP
Monkey / Cynomolgus	TTR02-GLP17-007 (████████ 5002401)	Repeat-dose toxicity (dosing once every three weeks for 4 doses)	Patisiran-LNP (ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma	TSLS10-136 / LC/MS/MS / GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSLS10-040 / LC/MS/MS / GLP
					Plasma	TSLS11-042 (High Range) / LC/MS/MS / GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSLS10-048 / LC/MS/MS / GLP

Abbreviations: ADA=anti-drug antibody; DRF=dose range-finding; CNS=central nervous system; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; GD=presumed day of gestation; GLP=Good Laboratory Practice; HPLC=high performance liquid chromatography; LC/MS-HRAM= liquid chromatography mass spectrometry high resolution accurate mass; LC-MS/MS=liquid chromatography tandem mass spectrometry; LD=lactation day; LNP=lipid nanoparticle; PD=pharmacodynamic(s); PK=pharmacokinetic(s); TK=toxicokinetic(s); TTR=transthyretin.

^a Methods indicated as Non-GLP were not validated. A brief method description may be found within the listed samples analysis report.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.A.2 Validated Bioanalytical Methods Supporting the Patisiran-LNP Nonclinical Pharmacokinetics Program

Species	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Validated Method
Rat / Sprague Dawley	TTR02-NCD10-006	Single dose absorption	Patisiran-LNP (ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma	TSLS10-135 / LC-MS/MS / GLP
					Liver, spleen	BA11013 / PNA-Probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSLS10-039 / LC-MS/MS / GLP
					Liver, spleen	TSLDR10-062A / LC-MS/MS / GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSLS10-047 / LC-MS/MS / GLP
					Liver, spleen	TSLDR10-062A / LC-MS/MS / GLP
Rat / Sprague Dawley & Long-Evans	319-1103	Single dose tissue distribution and excretion	¹⁴ C-Patisiran-LNP (¹⁴ C-ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma, plasma ultrafiltrate, liver, kidney, spleen	319N-1201 / Atto-Probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
Monkey / Cynomolgus	TTR02-NCD10-018 (████████ 8235671)	Single dose PK/PD study	Patisiran-LNP (ALN-TTR02)	ALN-18328	Plasma	TSLS10-136 / LC-MS/MS / GLP
					Liver	BA11014 / PNA-Probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
				DLin-MC3-DMA	Plasma	TSLS10-040 / LC-MS/MS / GLP
					Liver	TSLD10-063A / LC-MS/MS / Non-GLP
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	Plasma	TSLS10-048 / LC-MS/MS / GLP
					Liver	TSLD10-063A / LC-MS/MS / Non-GLP
				TTR Protein	Serum	████████ 302417 / ELISA / GLP
						████████ 302834 / ELISA / GLP

Abbreviations: ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; GLP=Good Laboratory Practice; HPLC=high performance liquid chromatography; LC-MS/MS=liquid chromatography tandem mass spectrometry; LNP=lipid nanoparticle; PD=pharmacodynamic(s); PK=pharmacokinetic(s); PNA=peptide nucleic acid; TTR=transthyretin.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TTR02-NCD14-003 (TK memo)	Atto-Probe with HPLC/Fluorescence detection	Mouse	Plasma (K ₂ EDTA)	ALN-18328	1.00 to 800 ng/mL	1 ng/mL	Not validated
				AD-18534	1.00 to 600 ng/mL	1 ng/mL	Not validated
	LC-MS/MS	Mouse	Plasma (K ₂ EDTA)	DLin-MC3-DMA	0.5 to 1000 ng/mL	0.5 ng/mL	Not validated
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	10 or 100 to 6250 or 7500 ng/mL	10 or 100 ng/mL	Not validated
TTR02-NCD14-004 (TK memo)	Atto-Probe with HPLC/Fluorescence detection	Mouse	Plasma (K ₂ EDTA)	ALN-18328	1.00 or 2.00 to 800a ng/mL	2 ng/mL	Not validated
				AD-18534	1.00 or 2.00 to 600a ng/mL	1ng/mL	Not validated
	LC-MS/MS	Mouse	Plasma (K ₂ EDTA)	DLin-MC3-DMA	2.00 to 1000 ^a ng/mL	0.5 ng/mL	Not validated

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL13-131	LC/MS-HRAM	Mouse	Plasma (K2EDTA)	ALN-18328	25.0 to 1000 ng/mL	25.0 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 25.0 (LLOQ), 75.0 (Low), 400 (Med), 800 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: 2.0 to 10.5% difference; 1.8 to 11.5% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: 3.0 to 6.3% difference; 0.0 to 3.3% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles Long-term storage stability (-70°C): 253 days</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Carryover, Recovery, Reinjection reproducibility, LLOQ reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability, Extract stability, Whole blood stability</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL13-132	LC-MS/MS	Mouse	Plasma (K ₂ EDTA)	DLin-MC3-DMA	0.100 to 100 ng/mL	0.100 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 0.100 (LLOQ), 0.300 (Low), 10.0 (Low-Med), 40.0 (Med), 80.0 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Low-Med, Med, High QC: -5.3 to 9.7% difference; 1.0 to 5.9% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Low-Med, Med, High QC: -0.3 to 3.9% difference; 1.6 to 7.0% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles</p> <p>Long-term storage stability (-70°C): 80 days for DLin-MC3-DMA in mouse plasma</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Carryover, Recovery, Reinjection reproducibility, LLOQ reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability, Extract stability, Whole blood stability</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL13-130	LC-MS/MS	Mouse	Plasma (K ₂ EDTA)	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	10.0 to 10,000 ng/mL	10.0 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 10.0 (LLOQ), 30.0 (Low), 350 (Low-Med), 4000 (Med), 8000 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Low-Med, Med, High QC: -9.4 to 3.4% difference; 1.5 to 5.7% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Low-Med, Med, High QC: -7.3 to -0.3% difference; 2.5 to 4.8% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles</p> <p>Long-term Storage Stability (-70°C): 155 days for PEG2000-C-DMG in mouse plasma</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Carryover, Recovery, Reinjection reproducibility, LLOQ reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability, Extract stability, Whole blood stability</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TTR02-NCD14-001 (TK memo)	Atto-Probe with HPLC/Fluorescence detection	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	ALN-18328	1.00 to 800 ^a ng/mL	1 ng/mL	Not validated
			Liver	ALN-18328	10.0 to 8000 ^a ng/g	10 ng/g	Not validated
	LC-MS/MS	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	DLin-MC3-DMA	2.00 to 1000 ^a ng/mL	2 ng/mL	Not validated
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	10.0 to 6250 ^a ng/mL	10 ng/mL	Not validated
TSL10-135	LC-MS/MS	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	ALN-18328	25.0 to 5000 ng/mL	25.0 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 25.0 (LLOQ), 75.0 (Low), 800 (Med), 4000 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -9.9 to 13.3% difference; 1.2 to 7.4% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: 0.0 to 8.3% difference; 5.6 to 8.8% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles Long-term storage (-70°C): 196 days for ALN-18328 in rat plasma</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Carryover, Interference, Recovery, Reinjection reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL10-039	LC-MS/MS	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	DLin-MC3-DMA	0.100 to 100 ng/mL	0.100 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 0.100 (LLOQ), 0.300 (Low), 10.0 (Med), 80.0 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -2.1 to 8.8% difference; 1.9 to 12.1% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: 2.0 to 7.1% difference; 0.0% to 4.1% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles</p> <p>Long-term storage (-70°C): 103 days for DLin-MC3-DMA in rat plasma</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Specificity, Carryover, Recovery, Reinjection reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL10-047	LC-MS/MS	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	5.00 to 5000 ng/mL	5.00 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 5.00 (LLOQ), 15.0 (Low), 500 (Med), 4,000 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -3.3 to 10.6 % difference; 1.6 to 6.7% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -0.7 to 5.4% difference; 2.9 to 5.2% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles</p> <p>Long-term storage (-70°C): 161 days for PEG₂₀₀₀-C-DMG in rat plasma</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Specificity, Carryover, Recovery, Reinjection reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability, Extract stability, Whole blood stability</p>
BIO11030	ELISA	Rat	Serum	ADA	NA	NA	Not validated
BA15005	ELISA	Rat	Serum	ADA	CF = 0.138 CCP = 53.7% signal inhibition (A450 nm)	NA	Not validated
503491 (Appendix 16)	ELISA	Rat	Serum	ADA	NA	NA	Not validated

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
■ 281821	ELISA	Rat	Serum	ADA	CF = 0.138 CCP = 53.7% signal inhibition (A450 nm)	NA	<p>PC Levels (ng/mL): 750 (LLOQ), 1000 (Low), 5000 (Mid), 20000 (High)</p> <p>Intra-day precision: Low low, Low, Mid, High PC: 1.0 to 23.2% CV</p> <p>Inter-day precision: Low low, Low, Mid, High PC: 20.1 to 27.3% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 8 cycles Long-term storage (-80°C): 277 days</p> <p>Sensitivity: 1000 ng/mL</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Specificity, Drug Tolerance, Prozone, Benchtop and Room Temperature stability, and Precision of Titers</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL15-159	LC/MS-HRAM	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	AD-18534	40.0 to 4000 ng/mL	40.0 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 40.0 (LLOQ), 120 (Low), 1600 (Med), 3200 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -10.8 to 9.1% difference; 2.2 to 7.0% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -5.0 to 4.1% difference; 0.0% to 5.0% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles Long-term storage (-70°C): 273 days for AD-18534 in rat plasma</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Carryover, Recovery, Reinjection reproducibility, LLOQ reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability, Whole blood stability</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
BA13011	Atto-Probe with HPLC/Fluorescence detection	Rat	Fetus	ALN-18328	20 to 10,000 ng/g	20 ng/g (Run 1) 40 ng/g (Run 2)	Not validated
				AD-18534	10 to 6000 ng/g	10 ng/g	Not validated
	LC-MS/MS			DLin-MC3-DMA	4.5 to 9000 ng/g	4.5 ng/g	Not validated
	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG			45 to 45,000 ng/g	45 ng/g	Not validated	
BA13002	Atto-Probe with HPLC/Fluorescence detection	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	AD-18534	1 to 600 ng/mL	1 ng/mL	Not validated
BA13001	LC-MS/MS	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	DLin-MC3-DMA	2 to 1000 ng/mL	2 ng/mL	Not validated
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	5 to 5000 ng/mL	5 ng/mL	Not validated

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters	
BA16021	Atto-Probe with HPLC/Fluorescence detection	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	ALN-18328	2 to 1000 ng/mL	2 ng/mL	Not validated	
			Liver, fetus		20.0 to 10,000 ng/g	20 ng/g	Not validated	
			Placenta		40.0 to 20,000 ng/g	40 ng/g	Not validated	
		LC-MS/MS	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	AD-18534	0.2 to 1000 ng/mL	0.5 ng/mL	Not validated
				Liver, fetus		2 to 10,000 ng/g	5 ng/g (liver) 2 ng/g (fetus)	Not validated
				Placenta		4.0 to 20,000 ng/g	4 ng/g	Not validated
	Plasma (K ₂ EDTA)			DLin-MC3-DMA		0.5 to 1000 ng/mL	0.5 ng/mL	Not validated
	Liver, fetus, placenta	4 to 8000 ng/g	4 ng/g		Not validated-			
	Rat	Plasma (K ₂ EDTA)	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	5 to 7000 ng/mL	5 ng/mL	Not validated		
				Liver, placenta, fetus	40 to 56,000 ng/g	40 ng/g (liver, placenta) 4 ng/g (fetus)	Not validated	
BA17004	RT-qPCR	Rat	Milk	AD-18328	0.0034 or 0.0172 to 10.7 or 53.7 ng/mL	0.0034 or 0.0172 ng/mL	Not Validated	

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
8346955	LC/MS-HRAM	Rat	Milk	AD-18534	400 to 40000 ng/mL	400 ng/mL	Not validated
TSL515-253	LC-MS/MS	Rat	Milk	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	10.0 to 10,000 ng/mL	10.0 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 10.0 (LLOQ), 30.0/350 (Low), 4000 (Med), 8000 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -14.0 to 1.4% difference; 1.2 to 14.0% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles</p> <p>Long-term storage (-70°C): 319 days for PEG₂₀₀₀-C-DMG in rat milk</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Carryover, Recovery, Reinjection reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability</p>
319N-1201	Atto-Probe with HPLC/Fluorescence detection	Rat	Plasma, Plasma Ultrafiltrate, Liver	ALN-18328	3 to 600 ng/mL ^b	3 ng/mL ^b	Not validated
			Kidney, spleen		10 to 600 ng/mL ^c	10 ng/mL ^c	Not validated

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
BA16014	Atto-Probe with HPLC/Fluorescence detection	Rabbit	Plasma (K ₂ EDTA)	ALN-18328	4 to 1000 ng/mL	4 ng/mL	Not validated
			Liver, fetus		20 to 10,000 ng/g	20 ng/g	Not validated
			Spleen, kidney, placenta		40 to 20,000 ng/g	40 ng/g	Not validated
	LC-MS/MS		Plasma (K ₂ EDTA)	DLin-MC3-DMA	0.5 to 1000 ng/mL	0.5 ng/mL	Not validated
			Liver, spleen, kidney, placenta, and fetus		4.0 to 8000 ng/g	4 ng/g	Not validated
			Plasma (K ₂ EDTA)	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	5 to 7000 ng/mL	5 ng/mL	Not validated
			Liver and kidney		40 to 56,000 ng/g	40 ng/g	Not validated
			Placenta and fetus		40 to 40,000 ng/g	40 ng/g	Not validated
			Spleen		80 to 56,000 ng/g	80 ng/g	Not validated

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL15-065	LC/MS-HRAM	Rabbit	Plasma (K ₂ EDTA)	ALN-18328	20.0 to 2000 ng/mL	20.0 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 20.0 (LLOQ), 60.0 (Low), 800 (Med), 1600 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -14.3 to 10.6% difference; 1.2 to 7.5% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -4.8 to 8.1% difference; 2.1 to 8.6% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles Long-term storage (-70°C): 128 days for ALN-18328 in rabbit plasma</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Carryover, Recovery, Reinjection reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability, Extract stability, Whole blood stability</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL15-067	LC-MS/MS	Rabbit	Plasma (K ₂ EDTA)	DLin-MC3-DMA	0.100 to 100 ng/mL	0.100 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 0.100 (LLOQ), 0.300 (Low), 10.0/40.0 (Med), 80.0 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -6.3 to 6.8% difference; 0.7 to 7.6% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -3.7 to 2.3% difference; 2.2 to 4.3% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 6 cycles Long-term storage (-70°C): 259 days for DLin-MC3-DMA in rabbit plasma</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Carryover, Interference, Recovery, Reinjection reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability, Extract stability, Whole blood stability</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL15-068	LC-MS/MS	Rabbit	Plasma (K ₂ EDTA)	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	10.0 to 10,000 ng/mL	10.0 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 10.0 (LLOQ), 30.0/350 (Low), 4000 (Med), 8000 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -12.3 to 8.8 % difference; 0.8 to 10.8% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -5.1 to 5.9% difference; 2.6 to 8.3% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 7 cycles</p> <p>Long-term storage (-70°C): 275 days for PEG₂₀₀₀-C-DMG in rabbit plasma</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Carryover, Interference, Recovery, Reinjection reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability, Extract stability, Whole blood stability</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL10-136	LC-MS/MS	Monkey	Plasma (K ₂ EDTA)	ALN-18328	25.0 to 5000 ng/mL	25.0 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 25.0 (LLOQ), 75.0 (Low), 800 (Med), 4000 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: 3.5 to 11.6% difference; 2.1 to 8.7% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: 6.8 to 7.6% difference; 0.0 to 3.6% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles</p> <p>Long-term storage (-70°C): 168 days for ALN-18328 in monkey plasma</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Carryover, Interference, Recovery, Reinjection reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability</p>
TSLD15-087	LC-MS/MS	Monkey	Plasma Ultrafiltrate (K ₂ EDTA)	ALN-18328	25.0 to 5000 ng/mL	25.0 ng/mL	Not validated
TSLD15-087	LC-MS/MS	Monkey	Urine	ALN-18328	25.0 to 5000 ng/mL	25.0 ng/mL	Not validated

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL10-040	LC-MS/MS	Monkey	Plasma (K ₂ EDTA)	DLin-MC3-DMA	0.100 to 100 ng/mL	0.100 ng/mL	<p>QC levels (ng/mL): 0.100 (LLOQ), 0.300 (Low), 10.0 (Med), 80.0 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -6.9 to 6.7% difference; 0.9 to 4.4% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -2.3 to 1.7% difference; 3.5 to 4.4%</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles</p> <p>Long-term storage (-70°C): 111 days for DLin-MC3-DMA in monkey plasma</p> <p>Additional Parameters assessed: Selectivity, Carryover, Interference, Recovery, Reinjection reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability</p>
TSLD15-087	LC-MS/MS	Monkey	Urine	DLin-MC3-DMA	0.100 to 100 ng/mL	0.100 ng/mL	Not validated
TSLD15-087	LC-MS/MS	Monkey	Feces	DLin-MC3-DMA	0.100 to 100 ng/mL	0.100 ng/mL	Not validated

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL10-048	LC-MS/MS	Monkey	Plasma (K ₂ EDTA)	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	5.00 to 5000 ng/mL	5.00 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 5.00 (LLOQ), 15.0 (Low), 500 (Med), 4000 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -8.0 to 7.2% difference; 1.2 to 6.1% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -4.0 to 1.0% difference; 5.2% to 9.4% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles</p> <p>Long-term storage (-70°C): 647 days for PEG₂₀₀₀-C-DMG in monkey plasma</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Specificity, Carryover, Reinjection reproducibility, Recovery, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability, Extract stability, Whole blood stability.</p>
TSLD15-087	LC-MS/MS	Monkey	Urine	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	5.00 to 5000 ng/mL	5.00 ng/mL	Not validated
TSLD15-087	LC-MS/MS	Monkey	Feces	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	5.00 to 5000 ng/mL	5.00 ng/mL	Not validated
TSLD15-087	LC-MS/MS	Monkey	Urine	4-(dimethylamino) butyric acid	0.916 to 915 ng/mL	0.916 ng/mL	Not validated

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
BA09001	Hybridization ELISA	Monkey	Plasma (K ₂ EDTA)	ALN-18328	8 to 100 ng/mL	8 ng/mL	Not validated
504210 (Appendix 21)	ELISA	Monkey	Serum	ADA	NA	NA	Not validated
■ 281818	ELISA	Monkey	Serum	ADA	CF = 0.177 CCP = 45.2% signal inhibition (A450 nm)	NA	<p>PC Levels (ng/mL): 100 (LLOQ), 150 (Low), 500 (Mid), 1000 (High)</p> <p>Intra-day precision: Low low, Low, Mid, High PC: 1.4 to 37.3% CV</p> <p>Inter-day precision: Low low, Low, Mid, High PC: 21.1 to 32.2% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 6 cycles Long-term storage (-80°C): 345 days</p> <p>Sensitivity: 150 ng/mL</p> <p>Additional parameters evaluated: Selectivity, Specificity, Drug Tolerance, Prozone, and Precision of Titers</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
302417	ELISA	Monkey	Serum	TTR Protein	1.13 to 69.44 ng/mL	1.13 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 1.13 (LLOQ), 3.00 (QC1), 11.00 (QC2), 28.00 (QC3), 69.44 (ULOQ)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: 83.2 to 118.3% theoretical 0.3 to 16.8% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: 94.6 to 104.9% theoretical 8.2 to 17.7% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles at -80° Long-term (-80°C): 126 days</p> <p>Additional Parameters assessed: Selectivity, Specificity, Recovery, Dilution linearity, Matrix stability, Parallelism, Prozone effect, Drug Interference</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
302834	ELISA	Monkey	Serum	TTR Protein	1.19 to 38.00 ng/mL	1.19 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 1.19 (LLOQ), 3.42 (QC1), 11.40 (QC2), 22.80 (QC3), 38.00 (ULOQ)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: 77.6 to 115.7% theoretical 0.0 to 16.0% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: 95.7 to 103.1% theoretical 4.1 to 10.8% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles at -80°C Long-term (-80°C): 126 days</p> <p>Additional Parameters assessed: Selectivity, Specificity, Dilution linearity, Matrix stability, Parallelism, Prozone effect, Drug Interference</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
■ 30257	ELISA	Monkey	Plasma (K ₂ or K ₃ EDTA)	Complement C3a	32.06 to 2052.00 pg/mL	32.06 pg/mL	<p>QC Levels (pg/mL): 32.06 (LLOQ), 75.00 (QC1), 500.00 (QC2), 1500.00 (QC3), 2052.00 (ULOQ)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: 64.8 to 133.0% theoretical 2.4 to 23.4% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: 82.4 to 97.3% theoretical 2.9 to 26.4% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: With Futhan: 4 cycles at -80°C Without Futhan: 3 cycles at -80°C</p> <p>Long-term (-80°C): With Futhan: 201 days Without Futhan: 205 days</p> <p>Additional Parameters assessed: Selectivity, Specificity, Matrix stability, Parallelism, Prozone effect, Comparison between K₂EDTA and K₃ EDTA</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
■ 27873	ELISA	Monkey	Plasma (EDTA)	Complement Bb fragment	50.03 to 745.00 ng/mL	50.03 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL):50.03 (LLOQ), 96.30 (QC1), 212.17 (QC2), 337.58 (QC3), 745.00 (ULOQ)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: 83.2 to 109.8% theoretical 0.4 to 12.6% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: 90.8 to 101.5% theoretical 6.8 to 8.6% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 5 cycles at -80°C Long-term (-80°C): 89 days</p> <p>Additional Parameters assessed: Selectivity, Specificity, Dilution linearity, Matrix stability, Parallelism,</p>
■ 30250	Multiplex Luminex	Monkey	Plasma	Cytokines (IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-12/23, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , and TNF- α)	Varies	Varies	<p>Parameters Evaluated: Precision and Accuracy, Selectivity, Linearity of Dilution, Matrix stability, Parallelism, Prozone effect</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
27556 27813	Multiplex Luminex	Monkey	Serum	Cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , GM-CSF, IFN- γ)	Varies	Varies	Parameters Evaluated: Cross reactivity, Specificity, Selectivity, Linearity of Dilution, Precision and Accuracy, and Stability
30271	Multiplex Luminex	Monkey	Serum	IL-1RA	439.06 to 28100.00 pg/mL	439.06 pg/mL	QC Levels (pg/mL): 439.06 (LLOQ), 702.50 (QC1), 1405.00 (QC2), 5620.00 (QC3), 28100.00 (ULOQ) Intra-day accuracy and precision: 89.0 to 120.7% theoretical 1.7 to 11.5% CV Inter-day accuracy and precision: 99.8 to 108.8% theoretical 2.9 to 7.6% CV Stability: Freeze/thaw: 4 cycles at -80°C Long-term (-80°C): 92 days Additional parameters assessed: Selectivity, Interference, Linearity of Dilution, Matrix stability, Parallelism, Prozone effect

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
■ 27812	ELISA	Monkey	Serum	Cytokine IFN- α	12.50 to 800.00 pg/mL	12.50 pg/mL	<p>QC Levels (pg/mL): 12.50 (LLOQ), 30.00 (QC1), 120.00 (QC2), 300.00 (QC3), 800.00 (ULOQ)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: 78.0 to 117.0% theoretical 0.2 to 30.4% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: 86.8 to 114.0% theoretical 5.1 to 22.8% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles at -80°C Long-term (-80°C): 184 days</p> <p>Additional Parameters assessed: Selectivity, Linearity of Dilution, Matrix stability, Parallelism, Prozone effect, Cross-reactivity</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
■ 30196	ELISA	Monkey	Serum	CRP	2.34 to 200.00 ng/mL	2.34 ng/mL	<p>QC Levels (ng/mL): 2.34 (LLOQ), 6.00 (QC1), 30.00 (QC2), 120.00 (QC3), 200.00 (ULOQ)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: 78.8 to 107.9% theoretical 0.3 to 24.4% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: 89.6 to 98.1% theoretical 4.7 to 10.5% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles at -80°C Long-term (-80°C): 102 days</p> <p>Additional Parameters assessed: Selectivity, Specificity, Linearity of Dilution, Matrix stability, Parallelism, Prozone effect</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
TSL11-042 (High Range)	LC-MS/MS	Monkey	Plasma (K ₂ EDTA)	DLin-MC3-DMA	50.0 to 50,000 ng/mL	50.0 ng/mL	<p>QC levels (ng/mL): 50.0 (LLOQ), 150 (Low), 1700 (Low-Med), 20,000 (Med), 40,000 (High)</p> <p>Intra-day accuracy and precision: Low, Low-Med, Med, High QC: -7.3 to 11.5% difference; 1.2 to 8.2% CV</p> <p>Inter-day accuracy and precision: Low, Med, High QC: -2.7 to 6.3% difference; 0.0 to 4.2% CV</p> <p>Stability: Freeze/thaw: 4 cycles Long-term storage (-70°C): 405 days for DLin-MC3-DMA in monkey plasma</p> <p>Additional Parameters assessed: Selectivity, Specificity, Carryover, Reinjection reproducibility, LLOQ reproducibility, Recovery, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability, Extract stability, Whole blood stability</p>

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.2.B Analytical Methods and Validation Reports: Individual Summaries (続き)

Validation Report No.	Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	Validation Parameters
BA11013	PNA-Probe with HPLC/Fluorescence detection	Rat	Spleen	ALN-18328	10 to 400 ng/g and 400 to 10,000 ng/g	10 ng/g	Not validated
			Liver		20 to 400 ng/g and 400 to 20,000 ng/g	20 ng/g	Not validated
TSLDR10-062A	LC-MS/MS	Rat	Liver	DLin-MC3-DMA	0.100 to 100 ng/mL ^d	0.100 ng/mL ^d	Not validated
			Spleen				Not validated
			Liver	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	5.00 to 5000 ng/mL ^d	5.0 ng/mL ^d	Not validated
			Spleen				Not validated
BA11014	PNA-Probe with HPLC/Fluorescence detection	Monkey	Liver	ALN-18328	40 to 4000 ng/g	40 ng/g	Not validated
TSLD10-063A	LC-MS/MS	Monkey	Liver	DLin-MC3-DMA	0.100 to 100 ng/mL ^e	0.100 ng/mL ^e	Not validated
				PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	5.00 to 5000 ng/mL ^e	5.00 ng/mL ^e	Not validated

Abbreviations: ADA=anti-drug antibody; CCP=confirmatory cut-point; CF= correction factor; CRO=contract research organization; CV=coefficient of variance; EDTA=ethylenediaminetetraacetic acid; ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay; HPLC=high performance liquid chromatograph; LC/MS-HRAM=liquid chromatography mass spectrometry high resolution accurate mass; LC-MS/MS=liquid chromatography tandem mass spectrometry; LLOQ=lower limit of quantification; Med=medium; NA=not applicable; PNA=peptide nucleic acid; QC=quality control; TK=toxicokinetic(s); TTR=transthyretin; ULOQ=upper limit of quantification.

a ULOQ information not available in the final report. Indicated value retrieved and verified against the raw data.

b Tissue dilution factor applied to convert to ng/g was ~11.

c Tissue dilution factor applied to convert to ng/g was ~21.

d Tissue dilution factor applied to convert to ng/g was 10, as confirmed by the sample analysis CRO.

e Tissue dilution factor applied to convert to ng/g was 35, as confirmed by the sample analysis CRO.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

3 薬物動態試験－単回投与後の吸収

表 2.6.5.3.A A Single Dose Intravenous Toxicity Study of Patisiran (ALN-18328) in Cynomolgus Monkeys

Study Title: An Acute Intravenous Injection Toxicity Study of ALN-18328 (With a 14-day Observation Period) in the Cynomolgus Monkey		Test Article: Patisiran (ALN-18328)		
		Study No. TTR-NCD09-004		
Species/Strain:	Cynomolgus Monkey (<i>Macaca fascicularis</i>)			
Sex (M/F)/Number of animals:	M/3; F/3	M/2; F/1	M/1; F/2	M/3; F/3
Feeding condition:	Fed			
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP			
PK timepoints	predose, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 6 h postdose			
Method of Administration:	Single IV Bolus (ALN-18328)			
Dose (mg/kg):	0 (vehicle)	10	30	100
Sample/Assay:	Plasma/nuclease-dependent ELISA/hybridization assay			
Analyte:	ALN-18328			
PK Parameters:	Toxicokinetic parameters could not be determined because the plasma concentrations of ALN-18328 after a single IV bolus administration to monkeys were below the LLOQ of the assay (8 ng/mL)			
Additional Information:	Absence of detectable ALN-18328 may be due to free ALN-18328 (not in LNP formulation) being rapidly metabolized in monkey plasma.			

Abbreviations: ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; F=female; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; LLOQ=lower limit of quantification; M=male; PK=pharmacokinetic(s); USP=United States Pharmacopeia.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.3.B A Single Intravenous Pharmacokinetic Study in Sprague Dawley Rats

Study Title: The Pharmacokinetics of ALN-TTR02 in Male and Female Sprague Dawley Rats After a Single IV Bolus Administration				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD10-006		
Species/Strain:	Sprague Dawley Rats					
Method of Administration:	IV Bolus (Patisiran-LNP)					
Dose (mg/kg):	0.03	0.3	1.0	0.03	0.3	1.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/20	F/20	F/20	M/20	M/20	M/20
Feeding conditions:	Fed					
Vehicle formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP					
PK timepoints:	Blood samples (2 rats/sex/time point) were collected at 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 240, 336, 504, 672, and 1440 hours postdose.					
Analyte:	ALN-18328					
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	0.23	NR	0.44	0.28	0.29	NR
t_{max} (h)	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	0.595	7.73	25.1	0.587	7.07	26.7
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	0.294	4.06	13.8	0.212	3.36	12.7
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	0.308	NR	13.8	0.298	3.40	NR
CL (mL/h/kg)	97.3	NR	72.3	101	88.2	NR
V_{ss} (mL/kg)	32.8	NR	31.2	39.8	27.5	NR

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.3.B A Single Intravenous Pharmacokinetic Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: The Pharmacokinetics of ALN-TTR02 in Male and Female Sprague Dawley Rats After a Single IV Bolus Administration				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD10-006		
Dose (mg/kg):	0.03	0.3	1.0	0.03	0.3	1.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/20	F/20	F/20	M/20	M/20	M/20
Analyte:	DLin-MC3-DMA					
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	177	184	288	82.3	200	246
t_{\max} (h)	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
C_{\max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	3.55	43.2	141	3.72	40.9	151
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	6.23	70.3	218	5.97	67.7	227
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	6.26	70.5	221	6.01	67.9	228
CL ($\text{mL}/\text{h}/\text{kg}$)	32.0	28.8	30.6	33.3	29.9	29.6
V_{ss} (mL/kg)	4040	4760	5970	2130	3850	3795

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.3.B A Single Intravenous Pharmacokinetic Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: The Pharmacokinetics of ALN-TTR02 in Male and Female Sprague Dawley Rats After a Single IV Bolus Administration		Test Article: Patisiran-LNP
		Study No. TTR02-NCD10-006
Dose (mg/kg):	1.0	1.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/20	M/20
Analyte:	PEG₂₀₀₀-C-DMG	
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	21.3	NR
t_{\max} (h)	0.083	0.083
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	15.1	16.5
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	20.6	23.5
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	20.8	NR
CL (mL/h/kg)	36.5	NR
V_{ss} (mL/kg)	304	NR

Abbreviations: $\text{AUC}_{0-\infty}$ =area under the concentration-time curve from time zero to infinity AUC_{0-t} =area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; CL=total body clearance from plasma; C_{\max} =maximum (peak) drug concentration; F=female; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M=male; PEG=polyethylene glycol; MRT=mean residence time; NR=not reportable; PK=pharmacokinetic(s); $t_{1/2}$ =elimination half-life; siRNA=small interfering ribonucleic acid; t_{\max} =time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopeia; V_{ss} =volume of distribution at steady state.

Additional Information: There were no apparent sex differences in the plasma pharmacokinetics of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG after a single IV bolus administration of patisiran-LNP to rats at doses of 0.03, 0.3, and 1 mg/kg. The concentration-time profiles of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG declined rapidly after peaking at 0.083 hours postdose. The ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG C_{\max} and AUC_{0-t} or $\text{AUC}_{0-\infty}$ values increased in an approximately dose proportional manner over the dose range tested. The CL values of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG were less than the rat's glomerular filtration rate suggesting that renal CL is probably not the major elimination pathway for ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG. The apparent elimination $t_{1/2\beta}$ values for ALN-18328 were 0.23 to 0.44 hours with MRT values of 0.19 to 0.42 hours. The apparent elimination $t_{1/2\beta}$ values for DLin-MC3-DMA were ~3.4 to 12 days with MRT values of ~ 2.5 to 7.2 days. The apparent elimination $t_{1/2\beta}$ value for PEG₂₀₀₀-C-DMG in females was ~ 0.9 days with an MRT value of 7.01 hours. ALN-18328 V_{ss} values were less than the blood volume in the rat, suggesting that ALN-18328 distribution was similar to rat blood volume after IV bolus administration. DLin-MC3-DMA V_{ss} values were 39.3 to 110-fold the blood volume in the rat, suggesting that DLin-MC3-DMA is highly distributed after IV bolus administration. PEG₂₀₀₀-C-DMG V_{ss} value in females was ~5.6-fold the blood volume in the rat, suggesting that PEG₂₀₀₀-C-DMG is distributed after IV bolus administration. The percent ratio of free to encapsulated (total) siRNA in plasma was less than 2% (0.81 to 1.50%).

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.3.C A Single Dose Intravenous PK/PD Study in Cynomolgus Monkeys

Study Title: The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ALN-TTR02 After a Single Intravenous Administration to Cynomolgus Monkeys					Test Article: Patisiran-LNP			
					Study No. TTR02-NCD10-018			
Species/Strain:	Cynomolgus Monkeys							
Method of Administration:	IV Infusion over 1 hour (0.03, 0.3, & 1.0 mg/kg) or 15 minutes (0.3 mg/kg) (Patisiran)							
Dose (mg/kg):	0.03 (1h)	0.3 (1h)	1.0 (1h)	0.3 (15 min)	0.03 (1h)	0.3 (1h)	1.0 (1h)	0.3 (15 min)
Sex (M/F)/Number of animals:	F/4	F/4	F/4	F/4	M/4	M/4	M/4	M/4
Feeding condition:	Fasted							
Vehicle formulation:	Phosphate buffered saline							
PK timepoints:	Blood samples were collected just prior to the end of infusion, and at 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, 120, 168, 216, 240, 288, 336, 360, 432, 504, 600, 672, 840, 1008, 1176, 1344, 1512, 1680, 1848, 2016, 2184, 2352, 2520, 2688, 2856, 3024, 3192, 3360, 3528, 3696, 3864, 4032, 4200, and 4368 hours (Day 183) postdose.							
Sample/Assay:	Plasma/LC/MS/MS							
Analyte:	ALN-18328							
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	10.2	NR	19.1	1.11	3.52	8.44	14.7	3.81
t_{\max} (h)	1.02	1.08	1.08	0.27	1.06	1.04	1.02	0.27
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	0.203	3.92	18.1	4.16	0.258	3.50	16.5	3.67
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	0.336	3.95	28.8	2.66	0.292	5.13	19.9	2.74
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	0.754	NR	36.6	1.59	0.402	6.68	20.7	3.40
CL (mL/h/kg)	135	NR	29.8	189	164	46.3	49.5	114
V_{ss} (mL/kg)	409	NR	264	123	278	447	328	328

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.3.C A Single Dose Intravenous PK/PD Study in Cynomolgus Monkeys (続き)

Study Title: The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ALN-TTR02 After a Single Intravenous Administration to Cynomolgus Monkeys					Test Article: Patisiran-LNP			
					Study No. TTR02-NCD10-018			
Dose (mg/kg):	0.03 (1h)	0.3 (1h)	1.0 (1h)	0.3 (15 min)	0.03 (1h)	0.3 (1h)	1.0 (1h)	0.3 (15 min)
Sex (M/F)/Number of animals:	F/4	F/4	F/4	F/4	M/4	M/4	M/4	M/4
Analyte:	DLin-MC3-DMA							
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	428	441	766	542	508	780	550	610
t_{max} (h)	1.02	1.08	1.06	0.292	1.08	1.08	1.17	0.312
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.82	31.5	136	28.5	2.02	27.4	122	25.3
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	50.7	726	1550	623	63.0	643	1850	669
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	50.7	727	1560	625	63.1	645	1860	674
CL ($\text{mL}/\text{h}/\text{kg}$)	4.04	2.92	4.49	3.32	3.19	3.24	3.83	3.06
V_{ss} (mL/kg)	1460	1510	2190	1810	1310	1550	2090	1830

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.3.C A Single Dose Intravenous PK/PD Study in Cynomolgus Monkeys (続き)

Study Title: The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ALN-TTR02 After a Single Intravenous Administration to Cynomolgus Monkeys		Test Article: Patisiran-LNP
		Study No. TTR02-NCD10-018
Dose (mg/kg):	1.0 (1h)	1.0 (1h)
Sex (M/F)/Number of animals:	F/4	M/4
Analyte:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	
Apparent t _{1/2β} (h)	162	160
t _{max} (h)	1.02	1.04
C _{max} (μg/mL)	18.2	16.8
AUC _{0-t} (μg•h/mL)	220	225
AUC _{0-∞} (μg•h/mL)	221	226
CL (mL/h/kg)	3.49	3.48
V _{ss} (mL/kg)	128	141

Abbreviations: AUC_{0-∞}=area under the concentration-time curve from time zero to infinity; AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; CL=total body clearance from plasma; C_{max}=maximum (peak) drug concentration; F=female; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M=male; MRT=mean residence time; NR=not reportable; siRNA= small interfering ribonucleic acid; t_{1/2}=elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopeia; V_{ss}=volume of distribution at steady state.

Additional Information: There were no apparent sex differences in the plasma pharmacokinetics of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG after a single 1-hour IV infusion administration of patisiran-LNP to monkeys at nominal doses of 0.03, 0.3, and 1 mg/kg or a 15-minute IV infusion at a nominal dose of 0.3 mg/kg. The plasma concentration-time profiles of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG declined after peaking at the end of infusion or shortly after the end of infusion. The plasma ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG C_{max} and AUC_{0-t} or AUC_{0-∞} values increased in an approximately dose proportional manner over the dose range tested. The CL values for ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG were less than the monkey's glomerular filtration rate suggesting that renal clearance is not the major elimination pathway for patisiran-LNP. The mean (female + male) apparent elimination t_{1/2β} values for ALN-18328 were 2.91 to 16.2 hours with MRT values of 1.57 to 5.93 hours. The mean apparent elimination t_{1/2β} values for DLin-MC3-DMA were ~19.5 to 27.4 days with MRT values of ~15.9 to 23 days. The mean apparent elimination t_{1/2β} value for PEG₂₀₀₀-C-DMG was ~6.7 days with a MRT value of ~33.7 hours (~ 1.4 days). ALN-18328 mean V_{ss} values were approximately 3.6- to 6.1-fold the blood volume in the monkey, suggesting that ALN-18328 is distributed after IV infusion administration. DLin-MC3-DMA mean V_{ss} values were 19- to 29.3-fold the blood volume in the monkey, suggesting that DLin-MC3-DMA is highly distributed after IV infusion administration. PEG₂₀₀₀-C-DMG mean V_{ss} was 1.8-fold the blood volume in the rat, suggesting that PEG₂₀₀₀-C-DMG is distributed after an IV infusion administration. ALN-18328 plasma pharmacokinetic parameter estimates were comparable after administration of patisiran-LNP at 0.3 mg/kg via a single 15-minute or a 1-hour infusion. The plasma and liver pharmacokinetics of DLin-MC3-DMA after a 15-minute or 1-hour infusion of patisiran-LNP at 0.3 mg/kg were similar. The percent ratio of free to encapsulated (total) siRNA in plasma was less than 10%.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.3.D A Single Dose Intravenous Safety Pharmacology Study in Cynomolgus Monkeys

Study Title: A Safety Pharmacology Study (with Evaluation of Cardiovascular, Respiratory, and Central Nervous Systems) of ALN-TTR02 Administered to Cynomolgus Monkeys by Intravenous Infusion				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD10-003		
Species/Strain:	Cynomolgus Monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>)					
Sex/Number of animals:	M/12	M/3	M/3	M/3 (Phase 1: Day 7)	M/3 (Phase 2: Day 1)	M/3
Feeding condition:	Fed					
Vehicle/Formulation:	Phosphate buffered saline					
Method of Administration:	Continuous IV infusion over a 1-hour period (Phase I: Day 1 (control) and Day 7 (patisiran); Phase II: Day 1 (patisiran))					
PK timepoints:	Blood samples were taken on Day 1 prior to dosing, 30 minutes into the infusion, and at 75, 90, 120, 135, 150, 180, 300, 540, and 1500 minutes post start of infusion.					
Dose (mg/kg):	0 (PBS control)	0.1	1	3 (Phase 1: Day 7)	3 (Phase 2: Day 1)	6
Sample (eg, whole blood, plasma, serum):	Plasma-Day 1					
Assay:	LC/MS/MS					
Analyte:	ALN-18328	DLin-MC3-DMA		PEG2000-C-DMG		
PK Parameters^a:	Mean					
t_{max} (h)	1.25	1.25		1.25		
C_{max} (µg/mL)	49.9	420.5		60.8		
AUC_{0-t} (µg•h/mL)	423	2710		506		

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.3.D A Single Dose Intravenous Safety Pharmacology Study in Cynomolgus Monkeys (続き)

Study Title: A Safety Pharmacology Study (with Evaluation of Cardiovascular, Respiratory, and Central Nervous Systems) of ALN-TTR02 Administered to Cynomolgus Monkeys by Intravenous Infusion	Test Article: Patisiran-LNP
	Study No. TTR02-NCD10-003

Abbreviations: AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) drug concentration; IV=intravenous; LC/MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LNP=lipid nanoparticle; M=male; PBS=phosphate buffered saline; PK=pharmacokinetic(s); t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration.

Additional Information: Half-life values were not determined for ALN-18328, DLin-MC3-DMA and PEG₂₀₀₀-C-DMG since the sampling schedule did not capture the elimination phase. AUC_{0-t} was calculated to the last time point of 25 hours post start of infusion. Following a 1-hour IV infusion of patisiran-LNP at 3 mg/kg to cynomolgus monkeys, plasma levels of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG declined after peaking at 1.25 hours.

a Concentrations of ALN-18328, DLin-MC3-DMA and PEG₂₀₀₀-C-DMG were lower in Monkey 1005 compared to the other 2 monkeys (Monkey 1004 and Monkey 1006) as it appeared that an unknown volume of the dose was administered subcutaneously for 1 animal (Monkey 1005). Based on this information, the toxicokinetic data for Monkey 1005 was not included in this report.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

4 薬物動態試験－反復投与後の吸収

表 2.6.5.4.A A Repeat (q2w x4) Intravenous Range-Finding Toxicity Study in C57BL/6 Mice

Study Title: Patisiran-LNP (ALN-TTR02): A Repeat Intravenous Dose Range-finding Tolerability and Toxicokinetics Study in C57BL/6 Mice				Test Article: Patisiran-LNP and AF-011-18534	
				Study No. TTR02-NCD14-003	
Species/Strain:	C57BL/6 Mice				
Method of Administration and Schedule:	IV Bolus Days 1, 15, 29, and 43				
Dose (mg/kg):	0.3	1.0	3.0	10.0	1.0
Sex (M/F)/Number of animals:	M/63	M/63	M/63	M/63	M/63
Test Articles:	Patisiran-LNP			AF-011-18534	
Sample:	Plasma			Plasma	
Feeding condition:	Fed				
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP				
PK timepoints	3 male mice/group on Days 1 and 43 (0.083, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 168, and 336 hours postdose)				
Analyte	ALN-18328			AD-18534	
Time Point:	Day 1				
$t_{1/2\beta}$ (h)	NR	1.4	1.3	9.4	5.28
t_{max} (h)	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
C_{max} (µg/mL)	2.34	9.90	18.1	215	15.0
AUC_{0-t} (µg•h/mL)	1.07	5.58	8.67	172	13.0

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.A A Repeat (q2w x4) Intravenous Range-Finding Toxicity Study in C57BL/6 Mice (続き)

Study Title: Patisiran-LNP (ALN-TTR02): A Repeat Intravenous Dose Range-finding Tolerability and Toxicokinetics Study in C57BL/6 Mice			Test Article: Patisiran-LNP and AF-011-18534		
			Study No. TTR02-NCD14-003		
Time Point:	Day 43				
$t_{1/2\beta}$ (h)	1.6	1.6	3.9	4.3	4.12
t_{\max} (h)	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	0.323	10.1	3.05	244	9.76
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	0.319	4.87	7.21	129	7.03
Dose (mg/kg):	0.3 patisiran-LNP	1.0 patisiran-LNP	3.0 patisiran-LNP	10.0 patisiran-LNP	1.0 AF-011-18534
Sex (M/F)/Number of animals:	M/63	M/63	M/63	M/63	M/63
Analyte:	DLin-MC3-DMA				
Time Point:	Day 1				
$t_{1/2\beta}$ (h)	51.0	74.0	66.1	64.0	153.2
t_{\max} (h)	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	16.3	25.5	299	2010	59.0
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	41.9	108	428	2695	177
Analyte:	DLin-MC3-DMA				
Time Point:	Day 43				
$t_{1/2\beta}$ (h)	208	243	142	76.4	172
t_{\max} (h)	0.50	0.083	0.50	0.083	0.083
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	7.15	22.6	23.3	1410	32.7
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	59.9	184	339	2080	168

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.A A Repeat (q2w x4) Intravenous Range-Finding Toxicity Study in C57BL/6 Mice (続き)

Study Title: Patisiran-LNP (ALN-TTR02): A Repeat Intravenous Dose Range-finding Tolerability and Toxicokinetics Study in C57BL/6 Mice		Test Article: Patisiran-LNP and AF-011-18534			
		Study No. TTR02-NCD14-003			
Analyte:	PEG₂₀₀₀-C-DMG				
Time Point:	Day 1				
$t_{1/2\beta}$ (h)	4.58	4.89	5.13	7.92	4.62
t_{\max} (h)	0.50	0.50	0.083	0.083	0.083
C_{\max} (μg/mL)	2.31	6.94	29.5	112	6.28
AUC_{0-t} (μg•h/mL)	5.05	18.6	84.3	338	15.7
Analyte:	PEG₂₀₀₀-C-DMG				
Time Point:	Day 43				
$t_{1/2\beta}$ (h)	5.15	4.40	4.59	7.87	3.50
t_{\max} (h)	0.50	0.50	0.50	0.083	0.50
C_{\max} (μg/mL)	3.23	4.95	15.5	126	4.49
AUC_{0-t} (μg•h/mL)	8.56	23.1	56.6	228	13.7

Abbreviations: AUC_{0-t} =area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{\max} =maximum (peak) drug concentration; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; $t_{1/2}$ =elimination half-life; t_{\max} =time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopeia.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.B A Repeat (q2w x5) Intravenous Range-Finding Toxicity Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice

Study Title: Patisiran-LNP (ALN-TTR02): A 2-Month Intravenous Injection Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice		Test Article: Patisiran-LNP and AF-011-18534	
		Study No. TTR02-NCD14-004	
Species/Strain:	Wild Type Mice		
Method of Administration and Schedule:	IV Infusion on Days 1 and 57		
Sample:	Plasma		
Feeding condition:	Fed		
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP		
PK timepoints	Days 1 and 57: predose (Day 57 only), 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 168, and 336 hours postdose along with TgRasH2 hemizygous mice at bridging time points (15/sex/group; samples were collected on Days 1 and 57: predose [Day 57 only], 0.083, and 48 hours postdose)		
Test Article	Patisiran-LNP		
Analyte	ALN-18328		
Dose (mg/kg):	3		
Sex (M/F)/Number of animals:	F/63	M/63	M/63
PK Parameters:			
Time Point:	Day 1		Day 57
$t_{1/2\beta}$ (h)	5.34	6.85	4.92
t_{max} (h)	0.083	0.083	0.083
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	45.1	48.8	62.3
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	33.0	40.8	80.9
V_{ss} (mL/kg)	151	150	103
CL (mL/h/kg)	91.0	73.4	37.1
V_z (mL/kg)	701	725	263

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.B A Repeat (q2w x5) Intravenous Range-Finding Toxicity Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice (続き)

Study Title: Patisiran-LNP (ALN-TTR02): A 2-Month Intravenous Injection Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice		Test Article: Patisiran-LNP and AF-011-18534		
		Study No. TTR02-NCD14-004		
Test Article:	AF-011-18534			
Analyte	AD-18534			
Dose (mg/kg):	3			
Sex (M/F)/Number of animals:	F/63	M/63	F/63	M/63
Time Point:	Day 1		Day 57	
$t_{1/2\beta}$ (h)	5.66	8.76	6.01	6.21
t_{\max} (h)	0.083	0.083	0.083	0.083
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	15.2	10.6	28.2	32.7
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	11.7	9.54	17.8	25.3
V_{ss} (mL/kg)	2380	3550	224	434
CL (mL/h/kg)	257	314	169	118
V_z (mL/kg)	2100	3970	1460	1060

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.B A Repeat (q2w x5) Intravenous Range-Finding Toxicity Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice (続き)

Study Title: Patisiran-LNP (ALN-TTR02): A 2-Month Intravenous Injection Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice		Test Article: Patisiran-LNP and AF-011-18534			
		Study No. TTR02-NCD14-004			
Test Article:	Patisiran-LNP				
Analyte	DLin-MC3-DMA				
Dose (mg/kg):	3				
Sex (M/F)/Number of animals:	F/63	M/63	F/63	M/63	
Time Point:	Day 1			Day 57	
t _{1/2β} (h)	61.1	62.4	95.6	79.0	
t _{max} (h)	0.083	0.083	0.083	0.083	
C _{max} (μg/mL)	245	235	203	234	
AUC _{0-t} (μg•h/mL)	573	955	509	932	
V _{ss} (mL/kg)	249	150	381	165	
CL (mL/h/kg)	5.10	3.06	5.49	3.08	
V _z (mL/kg)	450	275	757	351	

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.B A Repeat (q2w x5) Intravenous Range-Finding Toxicity Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice (続き)

Study Title: Patisiran-LNP (ALN-TTR02): A 2-Month Intravenous Injection Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice		Test Article: Patisiran-LNP and AF-011-18534			
		Study No. TTR02-NCD14-004			
Test Article:	AF-011-18534				
Analyte	DLin-MC3-DMA				
Dose (mg/kg):	3				
Sex (M/F)/Number of animals:	F/63	M/63	F/63	M/63	
PK Parameters:					
Time Point:	Day 1		Day 57		
t _{1/2β} (h)	53.1	49.2	49.1	53.8	
t _{max} (h)	0.083	0.50	0.083	0.083	
C _{max} (μg/mL)	217	68.3	112	185	
AUC _{0-t} (μg•h/mL)	584	954	909	1190	
V _{ss} (mL/kg)	238	155	135	123	
CL (mL/h/kg)	5.06	3.11	3.27	2.49	
V _z (mL/kg)	387	221	232	193	

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.B A Repeat (q2w x5) Intravenous Range-Finding Toxicity Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice (続き)

Study Title: Patisiran-LNP (ALN-TTR02): A 2-Month Intravenous Injection Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice						Test Article: Patisiran-LNP and AF-011-18534					
						Study No. TTR02-NCD14-004					
Overall Terminal (Male and Female) Mean ± SD Plasma Concentrations (µg/mL) of ALN-18328 or DLin-MC3-DMA in Wild Type or Hemizygous RasH2 Mice After Intravenous Administration of ALN-TTR02 or AF-011-18534											
Species/Strain:						Wild Type Mice, Hemizygous RasH2 Mice					
Method of Administration and Schedule:						IV Infusion over 1 hour on Days 1 and 57					
Sex (M/F)/Number of animals:						15/sex/group					
Test Article:						Patisiran-LNP					
Analyte:						ALN-18328 (µg/mL)					
Dose 3 mg/kg						Dose 3 mg/kg					
Wild Type RasH2 Mice			Hemizygous RasH2 Mice			Wild Type RasH2 Mice			Hemizygous RasH2 Mice		
Day 1			Day 1			Day 57			Day 57		
Time (h)	Mean	SD	Time (h)	Mean	SD	Time (h)	Mean	SD	Time (h)	Mean	SD
0.083	46.3	6.5	0.083	41.7	16.1	0.083	56.4	6.95	0.083	44.1	7.1
48	0.00382	0.000523	48	0.00582	0.00245	48	0.00582	0.000168	48	0.00975	0.00305
Test Article:						AF-011-18534					
Analyte:						AD-18534 (µg/mL)					
Dose 3 mg/kg						Dose 3 mg/kg					
Wild Type RasH2 Mice			Hemizygous RasH2 Mice			Wild Type RasH2 Mice			Hemizygous RasH2 Mice		
Day 1			Day 1			Day 57			Day 57		
Time (h)	Mean	SD	Time (h)	Mean	SD	Time (h)	Mean	SD	Time (h)	Mean	SD
0.083	12.9	7.50	0.083	18.8	5.02	0.083	16.0	13.3	0.083	23.2	4.98
48	0.00399	0.000414	48	0.00284	0.000326	48	0.00344	0.00125	48	0.00540	0.000777

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.B A Repeat (q2w x5) Intravenous Range-Finding Toxicity Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice (続き)

Study Title: Patisiran-LNP (ALN-TTR02): A 2-Month Intravenous Injection Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in Wild Type and Hemizygous TgRasH2 Mice						Test Article: Patisiran-LNP and AF-011-18534					
Overall (Male and Female) Mean ± SD Plasma Concentrations of ALN-18328 or DLin-MC3-DMA in Wild Type or Hemizygous RasH2 Mice After Intravenous Administration of patisiran-LNP or AF-011-18534											
Test Article:						Patisiran-LNP					
Analyte:						DLin-MC3-DMA (µg/mL)					
Dose 3 mg/kg						Dose 3 mg/kg					
Wild Type RasH2 Mice			Hemizygous RasH2 Mice			Wild Type RasH2 Mice			Hemizygous RasH2 Mice		
Day 1			Day 1			Day 57			Day 57		
Time (h)	Mean	SD	Time (h)	Mean	SD	Time (h)	Mean	SD	Time (h)	Mean	SD
0.083	240	88.0	0.083	191.2	71.0	0.083	218.5	56.1	0.083	236	45.1
48	3.50	1.06	48	0.323	0.095	48	2.85	1.10	48	0.217	0.0929
Test Article:						AF-011-18534					
Analyte:						AD-18534 (µg/mL)					
Dose 3 mg/kg						Dose 3 mg/kg					
Wild Type RasH2 Mice			Hemizygous RasH2 Mice			Wild Type RasH2 Mice			Hemizygous RasH2 Mice		
Day 1			Day 1			Day 57			Day 57		
Time (h)	Mean	SD	Time (h)	Mean	SD	Time (h)	Mean	SD	Time (h)	Mean	SD
0.083	128	169	0.083	238	284	0.083	149	53.5	0.083	198	24.9
48	0.324	0.146	48	0.527	0.0707	48	7.29	3.07	48	0.395	0.114

Abbreviations: AUC_{0-t}=area under the concentration time curve from time zero to the last measurable concentration; CL=total body clearance; C_{max}=maximum (peak) drug concentration; F=female; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M=male; PK=pharmacokinetic(s); SD=standard deviation; t_{1/2}=elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; V_{ss}=volume of distribution at steady state; USP=United States Pharmacopeia; V_z=terminal phase volume.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.C A Repeat (q2w x14) Intravenous Carcinogenicity Study in TgRasH2 Mice

Report Title: Patisiran (ALN-TTR02): A 26-week Intravenous Injection Carcinogenicity Study in TgRasH2 Mice							Test Article: Patisiran-LNP			
Study No. TTR02-GLP15-024										
Animal Species	TgRasH2 Mice, male and female									
Method of Administration	IV injection q2w x 14									
Feeding condition:	Fed									
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP									
PK timepoints	Predose, 0.083, 0.5, 1, 4, 8, 24, 168, and 336 hours postdose on Day 183									
PK parameters:	Toxicokinetics (Day 183)									
Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.5		2		6		75 (MNU)	
Number of Animals/Sex/Group: (Toxicokinetic):	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
	12	12	47	47	47	47	47	47	-	-
Analytes										
ALN-18328										
C _{max} (µg/mL)	<LLOQ	<LLOQ	7.90	7.05	32.4	31.0	79.6	81.1	NA	NA
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	<LLOQ	<LLOQ	12.6	9.68	54.8	32.6	209	183	NA	NA
DLin-MC3-DMA										
C _{max} (µg/mL)	<LLOQ	<LLOQ	29.5	31.7	119	123	370	330	NA	NA
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	<LLOQ	<LLOQ	96.3	67.0	29.1	202	835	695	N/A	N/A
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG										
C _{max} (µg/mL)	<LLOQ	<LLOQ	5.31	6.06	23.4	21.9	66.8	51.7	NA	NA
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	<LLOQ	<LLOQ	17.9	15.9	61.8	36.3	178	113	NA	NA

Abbreviations: AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) drug concentration; F=female; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M=male; MNU=N-Methyl-N-Nitrosurea; NA=not applicable; LLOQ=lower limit of quantification; PK=pharmacokinetic(s); USP=United States Pharmacopoeia.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.D A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats

Study Title: A Multi-Dose (Once Biweekly x 4 Doses) Study of ALN-TTR02 by Intravenous Infusion in the Albino Rat with a Minimum 60-Day Recovery Period					Test Article: Patisiran-LNP			
					Study No. TTR02-NCD10-005			
Species/Strain:	Sprague Dawley Rats							
Method of Administration:	IV Infusion over 1 hour on Days 1, 15, 29, and 43 (Patisiran)							
Feeding condition:	Fed							
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP							
PK timepoints	Day 1 at 0.083, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 240, and 336 hours postinfusion and on Day 43 at 0.083, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 240, 336, 504, 672, 1008, 1056, and 1464 hours postinfusion (measured until approximately 60 days after the last dose).							
Dose (mg/kg):	0.15	0.8	1.8	3.0	0.15	0.8	1.8	3.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/14	F/14	F/14	F/14	M/14	M/14	M/14	M/14
Analyte/Assay:	ALN-18328							
Time Point:	Day 1							
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	2.28	1.60	1.48	2.16	NR	1.81	1.89	1.92
t_{\max} (h)	0.50	1.083	1.083	1.083	1.083	0.50	1.083	1.083
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	1.05	7.47	14.2	26.0	1.03	5.89	13.1	24.9
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	1.47	11.6	23.9	42.1	1.5	6.87	21.7	37.0
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	1.60	11.7	24.0	42.7	NR	6.96	21.9	37.6
CL (mL/h/kg)	93.5	68.4	74.9	70.3	NR	115	82.0	79.8
V_{ss} (mL/kg)	118	64.9	78.7	70.9	NR	119	81.0	80.1

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.D A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: A Multi-Dose (Once Biweekly x 4 Doses) Study of ALN-TTR02 by Intravenous Infusion in the Albino Rat with a Minimum 60-Day Recovery Period						Test Article: Patisiran-LNP		
						Study No. TTR02-NCD10-005		
Time Point:	Day 43							
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	NC	NR	0.52	0.66	NC	NC	NR	NR
t_{\max} (h)	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
C_{\max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.19	1.65	15.2	32.9	0.819	4.51	18.7	35.4
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	1.22	2.60	18.2	35.8	NC	4.63	19.3	38.5
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	NC	NR	18.2	35.9	NC	NC	NR	NR
CL ($\text{mL}/\text{h}/\text{kg}$)	NC	NR	98.6	83.6	NC	NC	NR	NR
V_{ss} (mL/kg)	NC	NR	77.4	59.6	NC	NC	NR	NR

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.D A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: A Multi-Dose (Once Biweekly x 4 Doses) Study of ALN-TTR02 by Intravenous Infusion in the Albino Rat with a Minimum 60-Day Recovery Period						Test Article: Patisiran-LNP		
						Study No. TTR02-NCD10-005		
Dose (mg/kg):	0.15	0.8	1.8	3.0	0.15	0.8	1.8	3.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/14	F/14	F/14	F/14	M/14	M/14	M/14	M/14
Analyte/Assay:	DLin-MC3-DMA							
Time Point:	Day 1							
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	178	159	157	293	77.1	53.4	132	120
t_{max} (h)	0.50	1.083	1.083	1.083	1.083	0.50	1.083	1.083
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	6.66	46.7	109	200	8.31	40.6	106	153
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	19.4	118	280	484	20.3	106	310	604
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	21.8	128	300	568	NR	NR	NR	643
CL (mL/h/kg)	46.3	42.1	40.7	35.8	47.9	47.5	36.7	31.6
V_{ss} (mL/kg)	4839	3276	2708	4955	2360	3587	2324	2041
Time Point:	Day 43							
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	253	245	238	222	294	162	238	191
t_{max} (h)	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	7.53	9.97	93.3	229	4.14	29.5	110.5	248
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	20.8	77.7	257.6	695.4	21.9	123	281	624
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	21.1	78.4	260.1	701.8	22.2	123	283	634
CL (mL/h/kg)	47.8	69.0	46.9	28.9	45.4	44.0	43.1	32.0
V_{ss} (mL/kg)	9560	16000	6890	6060	8780	9450	7830	4340

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.D A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: A Multi-Dose (Once Biweekly x 4 Doses) Study of ALN-TTR02 by Intravenous Infusion in the Albino Rat with a Minimum 60-Day Recovery Period						Test Article: Patisiran-LNP		
Study No. TTR02-NCD10-005								
Dose (mg/kg):	0.15	0.8	1.8	3.0	0.15	0.8	1.8	3.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/14	F/14	F/14	F/14	M/14	M/14	M/14	M/14
Analyte:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG							
Time Point:	Day 1							
Apparent t _{1/2β} (h)	5.53	NR	39.8	63.9	12.7	24.5	21.4	104
t _{max} (h)	0.50	1.083	1.083	1.083	1.083	0.50	1.083	1.083
C _{max} (μg/mL)	0.709	5.01	11.9	20.5	0.921	4.47	11.3	23.4
AUC _{0-t} (μg•h/mL)	1.92	14.3	34.5	61.8	2.28	13.4	36.1	78.0
AUC _{0-∞} (μg•h/mL)	1.96	NR	35.0	62.3	2.37	13.7	36.5	78.8
CL (mL/h/kg)	56.1	NR	39.2	36.8	46.4	44.7	37.6	29.1
V _{ss} (mL/kg)	203	NR	571	615	353	504	281	579
Time Point:	Day 43							
Apparent t _{1/2β} (h)	17.9	87.5	NR	NR	NR	NR	NR	128
t _{max} (h)	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
C _{max} (μg/mL)	0.870	2.09	11.6	25.0	0.802	3.60	12.2	26.0
AUC _{0-t} (μg•h/mL)	2.19	12.3	35.6	57.5	2.51	17.0	35.4	54.4
AUC _{0-∞} (μg•h/mL)	2.41	13.7	NR	NR	NR	NR	NR	55.4
CL (mL/h/kg)	45.7	44.7	NR	NR	NR	NR	NR	41.4
V _{ss} (mL/kg)	679	3360	NR	NR	NR	NR	NR	987

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.D A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: A Multi-Dose (Once Biweekly x 4 Doses) Study of ALN-TTR02 by Intravenous Infusion in the Albino Rat with a Minimum 60-Day Recovery Period	Test Article: Patisiran-LNP
	Study No. TTR02-NCD10-005

Abbreviations: AUC_{0-∞}=area under the concentration-time curve from time zero to infinity; AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; CL=total body clearance from plasma; C_{max}=maximum (peak) concentration; F=female; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M=male; NC=not calculable ;NR=not reportable; PK=pharmacokinetic(s); t_{1/2}=elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopoeia; V_{ss}=volume of distribution at steady state.

Additional Information: Following a 1-hour IV infusion of patisiran-LNP to albino rats, plasma levels of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG declined biexponentially after peaking at the end of the 1 hour infusion. ALN-18328, DLin-MC3-DMA and PEG₂₀₀₀-C-DMG C_{max} and AUC values increased in an approximately dose proportional manner over the dose range with the exception of the female 0.8 mg/kg dose group on Day 43. C_{max} and AUC were similar on Days 1 and 43 except for ALN-18328 in the female 0.8 mg/kg dose group. No apparent sex differences were observed in the toxicokinetics of patisiran-LNP. No apparent differences were observed in the toxicokinetics of patisiran-LNP after multiple dosing.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.E A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats

Study Title: A 2-Dose (once Monthly for 2 months) Intravenous Infusion Toxicity Study of ALN-TTR02 in the Albino Rat				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD11-002		
Species/Strain:	Sprague Dawley Rats					
Method of Administration:	IV Infusion over 1 hour on Days 1 and 29					
Feeding condition:	Fed					
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP					
PK timepoints	Predose, 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 hours after dosing on Days 1 and 29.					
Dose (mg/kg):	0.1	0.3	1.0	0.1	0.3	1.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/12	F/12	F/12	M/12	M/12	M/12
Sample:	Plasma					
Analyte:	ALN-18328					
Time Point:	Day 1					
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	0.44	0.69	NR	NR	1.07	0.56
t_{max} (h)	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	0.563	1.81	7.76	0.732	2.29	9.76
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	0.599	2.12	8.45	0.679	2.48	9.79
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	0.616	2.15	NR	NR	2.53	9.84
CL (mL/h/kg)	162	140	NR	NR	119	102
V_{ss} (mL/kg)	139	138	NR	NR	112	82.9

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.E A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: A 2-Dose (once Monthly for 2 months) Intravenous Infusion Toxicity Study of ALN-TTR02 in the Albino Rat				Test Article: Patisiran-LNP		
Time Point:	Day 29					
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	NR	1.13	NR	0.55	0.93	0.84
t_{max} (h)	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.17	3.67	13.0	1.31	3.24	10.8
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	1.04	3.41	12.5	1.15	3.06	10.3
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	NR	3.45	NR	1.17	3.11	10.3
CL ($\text{mL}/\text{h}/\text{kg}$)	NR	86.8	NR	85.5	96.5	96.6
V_{ss} (mL/kg)	NR	72.8	NR	62.7	85.3	78.2

Abbreviations: $AUC_{0-\infty}$ =area under the concentration-time curve from time zero to infinity; AUC_{0-t} =area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; CL=total body clearance from plasma; C_{max} =maximum (peak) drug concentration; F=female; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M=male; NR=not reportable; PK=pharmacokinetic(s); $t_{1/2}$ =elimination half-life; t_{max} =time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopoeia; V_{ss} =volume of distribution at steady state.

Additional Information: Following a 1-hour IV infusion of patisiran-LNP to albino rats, plasma levels of ALN-18328 declined rapidly after peaking at the end of the 1 hour infusion. ALN-18328 C_{max} and AUC values increased in an approximately dose proportional manner over the dose range. C_{max} and AUC were similar on Days 1 and 29 after allowing for the variability in plasma concentrations. There was no apparent accumulation of ALN-18328 after administration of 2 doses of patisiran-LNP. No apparent sex differences were observed in the toxicokinetics of patisiran-LNP. No apparent differences were observed in the toxicokinetics of patisiran-LNP after dosing on 2 separate occasions.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.F A Repeat (q2w x14) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats

Study Title: ALN-TTR02: A 26-Week Chronic Toxicity and Toxicokinetics Study in Sprague Dawley Rats with a 12-Week Recovery Period				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD12-003		
Species/Strain:	Sprague Dawley Rats					
Method of Administration:	IV Infusion over 1 hour, every other week for 26 weeks (total of 14 doses)					
Feeding condition:	Fed					
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP					
PK timepoints	Days 1 and 183 at 0.083, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 240, and 336 hours postdose (approximately 14 days post-dose) and extended further on Day 183 to include timepoints at 504, 672, 1008, 1344, 1680, and 2016 hours postdose (approximately 84 days postdose).					
Analyte:	ALN-18328					
Time Point:	Plasma – Day 1			Plasma – Day 183		
Dose (mg/kg):	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3
Sexes combined (M +F)/Number of animals:	21 M + 21 F	21 M + 21 F	21 M + 21 F	21 M + 21 F	21 M + 21 F	21 M + 21 F
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h) ^a	ND	1.26	1.29	ND	ND	ND
t_{\max} (h) ^a	1.083	1.083	1.083	ND	1.083	2
C_{\max} (µg/mL)	0.111	1.12	2.22	ND	0.333	0.066
AUC_{0-336h} (µg•h/mL) ^a	ND	2.14	3.12	ND	ND	ND
$AUC_{0-\infty}$ (µg•h/mL) ^a	ND	2.13	3.11	ND	ND	ND
CL (mL/h/kg) ^a	ND	47.0	96.5	ND	ND	ND
V_{ss} (mL/kg)	ND	77.2	119	ND	ND	ND

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.F A Repeat (q2w x14) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: ALN-TTR02: A 26-Week Chronic Toxicity and Toxicokinetics Study in Sprague Dawley Rats with a 12-Week Recovery Period				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD12-003		
Analyte/Assay:	DLin-MC3-DMA by LC/MS/MS					
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h) ^a	101	114	102	487	319	779
t_{\max} (h) ^a	1.083	1.083	1.083	5	1.083	2
C_{\max} (μg/mL)	0.480	6.55	18.0	0.0226	2.32	0.973
AUC_{0-336h} (μg•h/mL) ^a	2.56	21.4	63.5	1.85	7.38	21.8
$AUC_{0-\infty}$ (μg•h/mL) ^a	2.74	22.5	67.2	3.48	14.5	62.4
CL (mL/h/kg) ^a	80.2	32.0	32.3	63.2	49.5	34.8
V_{ss} (mL/kg)	7770	1990	2490	32300	26500	35600

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.F A Repeat (q2w x14) Intravenous Toxicity Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: ALN-TTR02: A 26-Week Chronic Toxicity and Toxicokinetics Study in Sprague Dawley Rats with a 12-Week Recovery Period				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD12-003		
Dose (mg/kg):	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3
Sexes combined (M +F)/Number of animals:	21 M + 21 F	21 M + 21 F	21 M + 21 F	21 M + 21 F	21 M + 21 F	21 M + 21 F
Analyte:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG					
Time Point:	Plasma – Day 1			Plasma – Day 183		
Apparent t _{1/2β} (h) ^a	1.89	5.92	10.7	ND	23.4	275
t _{max} (h) ^a	1.083	1.083	1.083	5	1.083	2
C _{max} (μg/mL)	0.0727	0.969	2.24	0.0121	0.244	0.370
AUC _{0-336h} (μg•h/mL) ^a	0.196	2.56	7.04	0.0972	1.20	6.40
AUC _{0-∞} (μg•h/mL) ^a	0.206	2.53	6.96	ND	1.28	9.20
CL (mL/h/kg) ^a	145	35.5	37.3	ND	70.6	28.3
V _{ss} (mL/kg)	384	143	254	ND	1990	8170

Abbreviations: AUC_{0-∞}=area under the concentration-time curve from time zero to infinity; AUC_{0-336h}=area under the concentration-time curve from time zero to 336 hours; CL=total body clearance; C_{max}=maximum (peak) drug concentration; F=female; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M= male; ND=not determined (r² <0.85), or insufficient data (<3 consecutive quantifiable concentrations); PK=pharmacokinetic(s); SOI=start of infusion; t_{1/2}=elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopoeia; V_{ss}=volume of distribution at steady state.

Additional Information: Following a 1-hour IV infusion of patisiran-LNP to rats, plasma concentrations of ALN-18328, Dlin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG declined biexponentially after peaking at the end of the 1-hour infusion. Increases in patisiran-LNP doses resulted in increases in exposure to ALN-18328, Dlin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG over the dose range studied. On Day 183, ALN-18328 exposure was not observed. There was a decrease in Dlin-MC3-DMA and PEG₂₀₀₀-C-DMG exposure with repeated dosing of patisiran-LNP, indicating little or no drug accumulation in the body with repeated dosing, possibly due to the formation of anti-drug antibody. There were no apparent sex-related differences in the toxicokinetics of ALN-18328, Dlin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG following IV infusion doses of patisiran-LNP.

^a Time from SOI was used to calculate the parameter.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.G A Repeat (q2w x7 or q3w x7) Subcutaneous Toxicity Study in Male Sprague Dawley Rats

Study Title: Patisiran (ALN-TTR02): A Repeat Subcutaneous Dose Tolerability Study in Male Sprague Dawley Rats				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD14-001		
Species	Male Sprague Dawley Rats					
Method of Administration:	Subcutaneous, q2w for 13 weeks, or q3w for 19 weeks (7 total doses)					
Feeding condition:	Fed					
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP					
PK timepoints	predose, 1, and 4 hours postdose on Day 85 (q2w group) and Day 127 (q3w group)					
Sample:	Plasma – Day 85 (q2w)			Plasma – Day 127 (q3w)		
Dose (mg/kg):	0.3	1	10a	0.3	1	10a
Sex/Number of animals:	M/5	M/5	M/5	M/5	M/5	M/5
Analyte:	ALN-18328					
t _{max} (h)	4.00	4.00	NA ^a	1.00	24.0	NA ^a
C _{max} (µg/mL)	0.037	0.298	NA ^a	0.088	0.064	NA ^a
AUC _{0-t} (µg•h/mL) ^b	0.66	3.98	NA ^a	1.9	0.656	NA ^a
Analyte:	DLin-MC3-DMA					
t _{max} (h)	24.0	4.00	NA ^a	24.0	24.0	NA ^a
C _{max} (µg/mL)	0.104	0.35	NA ^a	0.104	0.381	NA ^a
AUC _{0-t} (µg•h/mL) ^b	2.03	7.53	NA ^a	1.82	5.63	NA ^a

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.G A Repeat (q2w x7 or q3w x7) Subcutaneous Toxicity Study in Male Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: Patisiran (ALN-TTR02): A Repeat Subcutaneous Dose Tolerability Study in Male Sprague Dawley Rats			Test Article: Patisiran-LNP			
Analyte:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG					
t _{max} (h)	4.00	24.0	NA ^a	4.00	24.0	NA ^a
C _{max} (µg/mL)	0.0500	0.0550	NA ^a	0.110	0.162	NA ^a
AUC _{0-t} (µg•h/mL) ^b	1.02	1.10	NA ^a	2.08	2.77	NA ^a

Abbreviations: AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) concentration; F=female; LNP=lipid nanoparticle; M=male; PK=pharmacokinetic(s); q2w=once every two weeks; q3w=once every 3 weeks; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopoeia.

^a Animals in both 10 mg/kg dose groups were euthanized on Day 3 due to adverse clinical signs.

^b Values calculated using 2 or 3 quantifiable concentration time points.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.H A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys

Study Title: A Multi-Dose (once biweekly x 4 doses) Study of ALN-TTR02 by Intravenous Infusion in the Cynomolgus Monkey with a 60-Day Recovery Period				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD10-011		
Species/Strain:	Cynomolgus Monkeys					
Method of Administration:	IV Infusion over 1 hour on Days 1, 15, 29, and 43					
Feeding Condition:	Fed					
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP					
PK timepoints	Day 1 predose, 0.5 h after start of infusion, 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 120, 168, and 336 h (14 days) postdose and on Day 43 at predose, 0.5 h after start of infusion, 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 120, 168, 336, 504, 672, 840, 1008, 1176, 1344, and 1464 h (approximately 60 days) postdose.					
Dose (mg/kg):	0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	3.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/2	F/2	F/2	M/2	M/2	M/2
Analyte:	ALN-18328					
Sample	Plasma - Day 1					
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	10.2	8.15	12.3	7.19	3.99	9.37
t_{max} (h)	0.79	1.083	1.083	0.50	1.083	1.083
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	2.95	13.3	67.7	2.92	16.2	56.7
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	7.72	43.7	196	5.03	33.7	138
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	8.76	45.2	197	5.45	35.0	140
CL (mL/h/kg)	34.4	23.9	16.4	55.7	28.9	21.5
V_{ss} (mL/kg)	297	174	119	311	94.4	112

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.H A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys (続き)

Study Title: A Multi-Dose (once biweekly x 4 doses) Study of ALN-TTR02 by Intravenous Infusion in the Cynomolgus Monkey with a 60-Day Recovery Period				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD10-011		
Dose (mg/kg):	0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	3.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/2	F/2	F/2	M/2	M/2	M/2
Analyte:	ALN-18328					
Sample:	Plasma - Day 43					
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	16.1	13.4	17.0	9.63	8.04	13.3
t_{\max} (h)	0.79	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	2.40	19.9	62.4	4.22	16.9	77.9
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	7.74	56.3	145	8.49	33.8	167
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	8.77	57.1	146	9.36	34.2	131
CL (mL/h/kg)	44.6	17.7	21.1	32.5	29.3	18.7
V_{ss} (mL/kg)	544	204	190	224	124	93.8
Analyte:	DLin-MC3-DMA					
Sample:	Plasma - Day 1					
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	277	623	222	560	506	NC
t_{\max} (h)	0.79	1.083	1.083	0.79	1.083	1.083
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	23.8	121	583	29.2	119	486
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	337	1030	3970	360	963	4150
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	493	1720	4550	744	1430	NR
CL (mL/h/kg)	4.12	3.97	4.46	3.02	4.84	4.82
V_{ss} (mL/kg)	1230	2240	560	1880	2050	277

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.H A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys (続き)

Study Title: A Multi-Dose (once biweekly x 4 doses) Study of ALN-TTR02 by Intravenous Infusion in the Cynomolgus Monkey with a 60-Day Recovery Period				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD10-011		
Dose (mg/kg):	0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	3.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/2	F/2	F/2	M/2	M/2	M/2
Analyte:	DLin-MC3-DMA					
Sample:	Plasma – Day 43					
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	512	1040	721	963	934	988
t_{\max} (h)	0.79	1.083	1.50	1.083	1.083	1.083
C_{\max} (µg/mL)	15.8	143	279	33.3	122.3	479
AUC_{0-t} (µg•h/mL)	675	2440	5060	896	2390	7410
$AUC_{0-\infty}$ (µg•h/mL)	773	3770	6470	1270	3730	10009
CL (mL/h/kg)	2.63	1.84	3.15	1.62	1.89	2.03
V_{ss} (mL/kg)	1630	2360	2360	2030	2340	2080
Analyte:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG					
Sample:	Plasma – Day 1					
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	95.9	77.3	79.9	92.9	95.6	74.0
t_{\max} (h)	1.29	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
C_{\max} (µg/mL)	4.19	16.8	55.5	3.90	16.4	53.8
AUC_{0-t} (µg•h/mL)	58.4	217	612	76.7	259	965
$AUC_{0-\infty}$ (µg•h/mL)	59.2	219	615	77.8	264	977
CL (mL/h/kg)	3.90	3.50	3.73	2.97	2.90	2.35
V_{ss} (mL/kg)	118	107	74.4	106	112	91.2

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.H A Repeat (q2w x4) Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys (続き)

Study Title: A Multi-Dose (once biweekly x 4 doses) Study of ALN-TTR02 by Intravenous Infusion in the Cynomolgus Monkey with a 60-Day Recovery Period				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD10-011		
Dose (mg/kg):	0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	3.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/2	F/2	F/2	M/2	M/2	M/2
Analyte:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG					
Sample:	Plasma – Day 43					
Apparent t _{1/2β} (h)	91.8	158	165	81.3	326	211
t _{max} (h)	2.50	1.083	1.083	1.54	2.04	1.083
C _{max} (μg/mL)	3.54	16.2	51.5	4.98	16.7	61.9
AUC _{0-t} (μg•h/mL)	58.4	257	479	76.6	315	915
AUC _{0-∞} (μg•h/mL)	59.2	259	481	77.7	318	917
CL (mL/h/kg)	3.89	3.00	4.78	2.97	2.42	2.60
V _{ss} (mL/kg)	133	138	139	115	173	149

Abbreviations: AUC_{0-∞}=area under the concentration-time curve from time zero to infinity; AUC_{0-t}=area under the concentration time curve from time zero to the last measurable concentration; CL=total body clearance; C_{max}=maximum (peak) concentration; F=female; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M=male; NC=not calculated; NR=not reportable; PK=pharmacokinetic; t_{1/2}=elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP= United States Pharmacopeia; V_{ss}=volume of distribution at steady state.

Additional Information: Following a 1-hour IV infusion of patisiran-LNP to cynomolgus monkeys, plasma levels of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG declined biexponentially after peaking at the end of the 1 hour infusion. ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG C_{max} and AUC values increased in an approximately dose proportional manner over the dose range. C_{max} and AUC were similar on Days 1 and 43. No apparent sex differences were observed in the toxicokinetics of patisiran-LNP. No apparent differences were observed in the toxicokinetics of patisiran-LNP with multiple dosing.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.1 A Repeat (q3w x14) Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys

Study Title: ALN-TTR02: A 39-Week Chronic Toxicity and Toxicokinetics Study in Cynomolgus Monkeys with a 13-Week Recovery Period				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD12-001		
Species	Cynomolgus Monkeys					
Method of Administration:	IV Infusion over 1 hour, every 3 weeks for 39 weeks (total of 14 doses)					
Feeding condition:	Fed					
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP					
PK timepoints	Day 1 at 0, 0.083, 1, 4, 8, 24, 48, 168, 336, and 504 hours (approximately 21 days) postdose, on Day 43 at 0 and 3 hours post dose, and on Day 274 at 0, 0.83, 1, 4, 8, 24, 48, 168, 336, 504, 672, and 2184 hours (approximately 90 days) postdose.					
Sample: Plasma	Day 1			Day 274		
Dose (mg/kg):	0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	2.0
Sexes combined (M + F)/3 MS and 3 Rec animals/sex/group:	6 M + 6 F	6 M + 6 F	6 M + 6 F	6 M + 6 F	6 M + 6 F	6 M + 6 F
Analyte:	ALN-18328					
C_{max} (µg/mL)	3.34	10.2	46.9	4.58	13.3	35.2
t_{max} (h) ^a	1.159	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
AUC_{0-48h} (µg•h/mL) ^a	10.6	24.7	145	17.0	45.9	124
AUC_{0-504h} (µg•h/mL) ^a	NR	NR	NR	NR	NR	NR
$AUC_{0-\infty}$ (µg•h/mL) ^a	12.3	24.8	168	23.9	57.9	117
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h) ^a	12.6	8.43	16.1	12.7	15.4	16.1
CL (mL/h/kg) ^a	32.1	46.1	26.3	25.8	22.6	21.5
V_{ss} (mL/kg)	349	303	211	194	310	255

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.I A Repeat (q3w x14) Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys (続き)

Study Title: ALN-TTR02: A 39-Week Chronic Toxicity and Toxicokinetics Study in Cynomolgus Monkeys with a 13-Week Recovery Period				Test Article: Patisiran-LNP					
				Study No. TTR02-NCD12-001					
Sample: Plasma	Day 1			Day 274					
Dose (mg/kg):	0.3	1.0	3.0	0.3		1.0		2.0	
Sexes combined (M +F)/3 MS and 3 Rec animals/sex/group:	6 M + 6 F	6 M + 6 F	6 M + 6 F	6 M + 6 F		6 M + 6 F		6 M + 6 F	
Analyte:	DLin-MC3-DMA								
C _{max} (µg/mL)	31.7	86.7	271	38.0		121		325	
t _{max} (h) ^a	1.159	1.083	1.083	1.409		1.083		1.083	
AUC _{0-48h} (µg•h/mL) ^a	246	654	2500	315		923		1920	
				MS	Rec	MS	Rec	MS	Rec
AUC _{0-504h} (µg•h/mL) ^a	496	1430	4340	NR	826	NR	2330	NR	4040
AUC _{0-∞} (µg•h/mL) ^a	855	2720	5020	360	1980	995	5780	2040	8220
Apparent t _{1/2β} (h) ^a	788	634	267	18.0	729	20.1	853	15.0	823
CL (mL/h/kg) ^a	2.57	2.78	4.18	5.88	1.14	7.62	1.21	6.84	1.81
V _{ss} (mL/kg)	1990	1600	759	128	881	183	1320	120	1490

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.4.I A Repeat (q3w x14) Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys (続き)

Study Title: ALN-TTR02: A 39-Week Chronic Toxicity and Toxicokinetics Study in Cynomolgus Monkeys with a 13-Week Recovery Period				Test Article: Patisiran-LNP					
				Study No. TTR02-NCD12-001					
Analyte:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG								
C _{max} (µg/mL)	3.51	12.6	51.9	4.34	15.8	33.1			
t _{max} (h) ^a	1.562	1.542	1.312	1.312	1.639	1.439			
AUC _{0-48h} (µg•h/mL) ^a	46.7	190	575	61.7	241	459			
				MS	Rec	MS	Rec	MS	Rec
AUC _{0-504h} (µg•h/mL) ^a	NR	258	789	NR	NR	NR	322	NR	646
AUC _{0-∞} (µg•h/mL) ^a	62.1	259	793	67.8	78.9	247	326	469	654
Apparent t _{1/2β} (h) ^a	62.4	118	116	13.6	48.2	12.5	183	12.3	167
CL (mL/h/kg) ^a	3.76	2.99	3.23	3.46	3.00	3.14	2.36	3.36	2.59
V _{ss} (mL/kg)	122	116	105	58.3	81.3	49.1	87.9	48.2	90.9

Abbreviations: AUC_{0-∞}=area under the concentration-time curve from time zero to infinity; AUC_{0-48h}=area under the concentration-time curve from time zero to 48 hours; AUC_{0-504h}=area under the plasma concentration-time curve from time zero to 504 hours; CL=total body clearance; C_{max}=maximum (peak) plasma drug concentration; EOI=end of infusion; F=female; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M=male; MS=main study; NA=not applicable; NC=not calculated; NR=not reportable; PK=pharmacokinetic(s); Rec=recovery; t_{1/2}=elimination half-life; SOI=start of infusion; t_{1/2β}=terminal elimination half-life; TK=toxicokinetic(s); t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopeia; V_{ss}=volume of distribution at steady state.

Additional Information: The high-dose group received patisiran-LNP at 3 mg/kg on Day 1, after which the dose was decreased on Day 22 to 2.0 mg/kg. Samples were collected out to 504 h post end of infusion (EOI) in all animals on Day 1. On Day 274, samples were collected out to 48 h post EOI in main study animals and out to 2184 h post EOI in recovery animals. siRNA doses of 0.3, 1.0, and 3.0/2.0 mg/kg correspond to DLin-MC3-DMA doses of 2.03, 6.76, and 20.3/13.5 mg/kg and PEG₂₀₀₀-C-DMG doses of 0.23, 0.76, and 2.29/1.52 mg/kg, respectively, which were used to calculate the TK parameters.

Following a 1-hour IV infusion of patisiran-LNP to monkeys, plasma concentrations of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG declined in a multiphasic manner after peaking at the end of the 1-hour infusion. Increases in patisiran-LNP doses resulted in approximately dose-proportional increases in exposure to ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG over the dose range studied. Elimination half-life, systemic clearance, and volume of distribution were consistent among the dose groups and days studied when sample collection interval was considered. There was little to no drug accumulation for ALN-18328, DLin-MC3-DMA, or PEG₂₀₀₀-C-DMG exposure with repeated dosing of patisiran-LNP. The AUC_{48h} mean accumulation factor values for the 0.3, 1.0, and 3.0/2.0 mg/kg dose groups were 1.60, 1.86, and 1.28 for ALN-18328; 1.28, 1.41, and 1.15 for DLin-MC3-DMA; and 1.32, 1.27, and 1.20 for PEG₂₀₀₀-C-DMG, respectively. There were no consistent sex-related differences in the toxicokinetics of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG following IV infusion doses of patisiran-LNP.

^a Time from SOI was used to calculate the parameter.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

5 薬物動態試験一分布

表 2.6.5.5.A Tissue Distribution after a Single Intravenous Administration in Sprague Dawley Rats

Study Title: The Pharmacokinetics of ALN-TTR02 in Male and Female Sprague Dawley Rats After a Single IV Bolus Administration				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD10-006		
Species/Strain:	Sprague Dawley Rats					
Method of Administration:	IV Bolus					
Dose (mg/kg):	0.03	0.3	1.0	0.03	0.3	1.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/20	F/20	F/20	M/20	M/20	M/20
Sample:	Liver					
Analyte/Assay:	ALN-18328 by PNA-Probe HPLC/Fluorescence Detection					
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	NE	NE	5.27	NE	NE	NR
t_{\max} (h)	NE	1	1	NE	1	1
C_{\max} ($\mu\text{g/g}$)	NE	1.39	5.64	NE	1.67	5.32
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$)	NE	4.40	39.4	NE	7.03	21.2
Sample:	Liver					
Analyte/Assay:	DLin-MC3-DMA by LC/MS/MS					
Apparent $t_{1/2\beta}$ (h)	280	267	396	245	199	281
t_{\max} (h)	24	24	4	4	24	4
C_{\max} ($\mu\text{g/g}$)	3.09	33.3	122	3.28	34.2	136
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/g}$)	933	12800	483	464	666	251

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.5.A Tissue Distribution after a Single Intravenous Administration in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: The Pharmacokinetics of ALN-TTR02 in Male and Female Sprague Dawley Rats After a Single IV Bolus Administration				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD10-006		
Dose (mg/kg):	1.0			1.0		
Sex (M/F)/Number of animals:	F/20			M/20		
Sample:	Liver					
Analyte/Assay:	PEG₂₀₀₀-C-DMG by LC/MS/MS					
Apparent t _{1/2β} (h)	NR			159		
t _{max} (h)	1			1		
C _{max} (μg/g)	7.27			8.71		
AUC _{0-t} (μg•h/g)	196			207		
Dose (mg/kg):	0.03	0.3	1.0	0.03	0.3	1.0
Sex (M/F)/Number of animals:	F/20	F/20	F/20	M/20	M/20	M/20
Sample:	Spleen					
Analyte/Assay:	ALN-18328 by PNA-Probe HPLC/Fluorescence Detection					
Apparent t _{1/2β} (h)	NC	84.7	128	NC	NR	NR
t _{max} (h)	4	1	1	4	1	1
C _{max} (μg/g)	0.242	1.19	1.13	0.118	0.479	0.972
AUC _{0-t} (μg•h/g)	0.566	13.4	21.4	0.370	8.76	9.00
Sample:	Spleen					
Analyte/Assay:	DLin-MC3-DMA by LC/MS/MS					
Apparent t _{1/2β} (h)	712	461	560	337	487	397
t _{max} (h)	4	1	24	4	168	24
C _{max} (μg/g)	2.44	10.6	22.2	1.55	6.95	22.6

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.5.A Tissue Distribution after a Single Intravenous Administration in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: The Pharmacokinetics of ALN-TTR02 in Male and Female Sprague Dawley Rats After a Single IV Bolus Administration				Test Article: Patisiran-LNP		
AUC _{0-t} (μg•h/g)	476	3940	12540	361	3740	11800
Dose (mg/kg):	1.0			1.0		
Sex (M/F)/Number of animals:	F/20			M/20		
Sample:	Spleen					
Analyte/Assay:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG by LC/MS/MS					
Apparent t _{1/2β} (h)	67.2			86.4		
t _{max} (h)	24			24		
C _{max} (μg/g)	2.25			2.00		
AUC _{0-t} (μg•h/g)	210			183		

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.5.A Tissue Distribution after a Single Intravenous Administration in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: The Pharmacokinetics of ALN-TTR02 in Male and Female Sprague Dawley Rats After a Single IV Bolus Administration		Test Article: Patisiran-LNP	
Dose (mg/kg):		1.0	
Sex (M/F)/Number of animals:		Males and Females Combined (20M+20F)	
Time Point	Mean % of Dose in Liver	Mean % of Dose in Spleen	Total % of Dose (including % of dose in plasma)
Analyte:	ALN-18328		
1 hour	25.6	0.242	28.2
24 hours	0.56	0.03	0.59
Analyte:	DLin-MC3-DMA		
1 hour	67.3	0.51	70.6
24 hours	77.7	0.98	78.9
7 days	50.1	0.56	50.8
14 days	25.0	0.57	25.7
28 days	10.5	0.36	10.9
60 days	3.14	0.14	3.28
Analyte:	PEG₂₀₀₀-C-DMG		
1 hour	48.9	0.52	59.7
24 hours	10.4	0.82	11.6
7 days	0.81	0.13	0.94

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.5.A Tissue Distribution after a Single Intravenous Administration in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: The Pharmacokinetics of ALN-TTR02 in Male and Female Sprague Dawley Rats After a Single IV Bolus Administration	Test Article: Patisiran-LNP
---	------------------------------------

Abbreviations: AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) concentration; F=female; HPLC=high performance liquid chromatography; IV=intravenous; LC=liquid chromatography; LNP=lipid nanoparticlelipid nanoparticle; M=male; MS=mass spectrometry; NC=calculated; NE=not estimable (insufficient data); NR=not reportable; PNA-Probe HPLC/Fluorescence Detection=peptide nucleic acid probe with analysis by ion exchange high performance liquid chromatography and fluorescence detection; t_{1/2}=elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration.

Additional Information: There were no apparent sex differences in the liver and spleen PK of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG. ALN-18328 and DLin-MC3-DMA liver and spleen C_{max} and AUC_{0-t} values generally increased in an approximately dose proportional manner over the dose range tested. The highest mean percent of ALN-18328 dose in liver and spleen was approximately 25.6% and 0.242% and declined by 24 hours postdose to 0.56% and 0.03%, respectively. The highest mean percent of DLin-MC3-DMA dose in liver and spleen was approximately 77.7% and 0.98% at 24 hours postdose and declined to approximately 3.14% and 0.14% by 60 days postdose, respectively. The mean highest percent of PEG₂₀₀₀-C-DMG dose in liver and spleen were approximately 48.9% at 1 hour postdose and 0.82% at 24 hours postdose and declined to approximately 0.81% and 0.13% by 168 hours postdose, respectively.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.5.B Tissue Distribution after a Repeat (q2wx7 or q3wx7) Subcutaneous Toxicity Study in Male Sprague Dawley Rats

Study Title: Patisiran-LNP (ALN-TTR02): A Repeat Subcutaneous Dose Tolerability Study in Male Sprague Dawley Rats				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-NCD14-001		
Species	Male Sprague Dawley Rats					
Method of Administration:	Subcutaneous, q2w for 13 weeks, or q3w for 19 weeks (7 total doses)					
Sample:	Liver – Day 85 (Q2W)			Liver – Day 127 (Q3W)		
Dose (mg/kg):	0.3	1	10^a	0.3	1	10^a
Sex (M/F)/Number of animals:	M/5	M/5	M/5	M/5	M/5	M/5
Analyte:	ALN-18328					
Mean concentration ± SD (µg/g)	<LLOQ	0.0519 ^b	NA ^a	<LLOQ	0.0227 ± 0.0117	NA ^a

Abbreviations: LLOQ=lower limit of quantification; LNP=lipid nanoparticle; M=male; NA=not applicable; q2w=once every 2 weeks; q3w=once every 3 weeks; SD=standard deviation.

^a Animals in both 10 mg/kg dose groups were euthanized on Day 3 due to adverse clinical signs.

^b The value from only 1 animal in the group was above the LLOQ (1.0 ng/g).

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.5.C Tissue Distribution after a Single Dose Intravenous PK/PD Study in Cynomolgus Monkeys

Study Title: The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ALN-TTR02 After a Single Intravenous Infusion Administration to Cynomolgus Monkeys						Test Article: Patisiran-LNP		
						Study No. TTR02-NCD10-018		
Species	Cynomolgus Monkeys							
Method of Administration:	IV Infusion over 1 hour (0.03, 0.3, & 1.0 mg/kg) or 15 minutes (0.3 mg/kg)							
Dose (mg/kg):	0.03 (1h)	0.3 (1h)	1.0 (1h)	0.3 (15 min)	0.03 (1h)	0.3 (1h)	1.0 (1h)	0.3 (15 min)
Sex (M/F)/Number of animals:	F/4	F/4	F/4	F/4	M/4	M/4	M/4	M/4
Sample:	Liver							
Analyte/Assay:	ALN-18328 by PNA-Probe HPLC/Fluorescence Detection							
t _{max} (day)	NE	2	2	2	NE	2	2	3
C _{max} (µg/g)	NE	0.0880	0.162	0.0490	NE	0.0650	0.205	0.0600
AUC _{0-t} (day•µg/g)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Sample:	Liver							
Analyte/Assay:	DLin-MC3-DMA by LC/MS/MS							
t _{max} (day)	2	3	2	3	5	15	5	3
C _{max} (µg/g)	7.42	82.3	281	83.0	6.58	85.1	264	100
AUC _{0-t} (day•µg/g)	92.7	1480	4530	1290	102	1250	3680	1400

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.5.C Tissue Distribution after a Single Dose Intravenous PK/PD Study in Cynomolgus Monkeys (続き)

Study Title: The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ALN-TTR02 After a Single Intravenous Infusion Administration to Cynomolgus Monkeys		Test Article: Patisiran-LNP	
		Study No. TTR02-NCD10-018	
Dose (mg/kg):	1.0 (1h)	1.0 (1h)	
Sex (M/F)/Number of animals:	F/4	M/4	
Sample:	Liver		
Analyte/Assay:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG by LC/MS/MS		
t _{max} (day)	2	2	
C _{max} (μg/g)	3.40	1.92	
AUC _{0-t} (day•μg/g)	6.19	5.52	

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.5.C Tissue Distribution after a Single Dose Intravenous PK/PD Study in Cynomolgus Monkeys (続き)

Study Title: The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ALN-TTR02 After a Single Intravenous Infusion Administration to Cynomolgus Monkeys		Test Article: Patisiran-LNP	
		Study No. TTR02-NCD10-018	
Mean % of Dose in Liver			
Dose (mg/kg):	1.0 (1 h)		
Sex (M/F)/Number of animals:	Males and Females Combined		
Time Point	ALN-18328	DLin-MC3-DMA	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG
24 hours	0.552	97.6	10.5
48 hours	0.388	109	4.66
96 hours	0.161	108	2.08
168 hours	NA	96.5	0.86
288 hours	NA	83.7	0.89
336 hours	NA	43.2	<LOQ
504 hours	NA	40.5	0.81
672 hours	NA	24.5	<LOQ

Abbreviations: AUC_{0-t}=area under the concentration time curve from time 0 to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) concentration; F=female; M=male; NE=not estimable (insufficient data); LNP=lipid nanoparticle; LOQ=limit of quantification; NA=not applicable; NR=not reportable; PD=pharmacodynamic(s); PK=pharmacokinetic(s); PNA-Probe HPLC/Fluorescence Detection=peptide nucleic acid probe with analysis by ion exchange high performance liquid chromatography and fluorescence detection; t_{1/2}=elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration.

Additional Information: Maximum liver concentrations of ALN-18328 and 5'-phosphorylated ALN-18328 (A100150) in the liver were mostly observed on Day 2 and Day 3, respectively. ALN-18328 mean liver C_{max} values ranged from 0.0545 to 0.184 µg/g while A100150 mean C_{max} values ranged from 0.0785 to 0.190 µg/g. DLin-MC3-DMA liver C_{max} and AUC_{0-t} values increased in an approximately dose proportional manner over the dose range tested. Maximum liver concentrations of DLin-MC3-DMA were usually observed on Day 2 or Day 3. Mean DLin-MC3-DMA liver C_{max} values ranged 7.00 to 272.5 µg/g while mean AUC_{0-t} ranged from 97.4 to 4107 µg·h/g over the dose range. Maximum liver concentrations of PEG₂₀₀₀-C-DMG were observed on Day 2. DLin-MC3-DMA liver pharmacokinetics profiles were similar after either a 15-minute or 1-hour infusion at 0.3 mg/kg patisiran-LNP.

The mean percent of ALN-18328 dose in the liver on Days 2 and 5 was approximately 0.552% and 0.161%, respectively. The mean percent of DLin-MC3-DMA dose in the liver was approximately 97.6% on Day 2 and 24.5% on Day 29. The mean percent of PEG₂₀₀₀-C-DMG dose in the liver was approximately 10.5% at on Day 2 and 0.81% on Day 22.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.5.D Rat Tissue Distribution by Quantitative Whole Body Autoradiography

Study Title: Excretion Mass Balance and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague Dawley and Long-Evans Rats Following a Single Intravenous Bolus Administration of [¹⁴ C]ALN-TTR02			Test Article: Patisiran-LNP
			Study No. ■■■ 319-1103
Analysis by Quantitative Whole-Body Autoradiography (QWBA): Euthanasia of 1 Sprague Dawley and 1 Long Evans rat at 0.08, 0.25, 0.5, 1, 3.5, 4, 6, 24, 48, 168, 672, 1008, and 1344 h after nominal dose of 0.3 mg/kg ¹⁴ C-ALN-TTR02 IV bolus (194.7 μCi/kg). Carcasses immediately frozen prior to embedding and sectioning for QWBA analysis.			
Tissues/Organs (1 Sprague Dawley Rat/Time Point)	Time of Maximum Concentration (h)	Maximum Concentration (μg equiv/g)	Approximate % Recovery of Administered Dose ^{a,b}
Liver	3.5	69.5 ^c	122
Spleen: Low (White pulp)	6	4.18	0.52
High (Red pulp)	168	12.0	1.61
Total (Red and White pulp)	3.5	7.61	1.00
Adrenal Gland: Cortex	168	12.3	0.11
Medulla	24	3.73	0.03
Lymph Node: Posterior	48	275.69 ^c	NC

Abbreviations: C_{max}=maximum (peak) concentration; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; NC=not calculated; QWBA=quantitative whole-body radiography; ULOQ=upper limit of quantification.

a % Recovery = μCi/g tissue x weight tissue g / μCi dose/rat x100.

b Assumes sub-regions of organs weigh as much as total weight; assumes body weight of 250 g.

c Value is above the ULOQ.

Additional Information: In the albino rats, ¹⁴C-ALN-TTR02 distribution as determined from the ¹⁴C-DLin-MC3-DMA-derived radioactivity was shown to rapidly and widely distributed. The C_{max} in blood occurred at 0.25 h, the first sampled time point (4.801 μg equiv/g). Concentrations in blood continued to be quantifiable through 1344 h postdose (0.006 μg equiv/g). Most tissues concentrations were lower than blood from 0.25 h through 24 h postdose, and were generally higher than blood after 24 h postdose. The ¹⁴C-ALN-TTR02 tissues C_{max} occurred at multiple different time points from 0.25 h through 168 h postdose, with C_{max} occurring at 0.5 h postdose in more tissues (14 of 45 tissues) than at any other time points. The highest tissues concentrations of >10 μg equiv/g were observed in lymph node-posterior (275.687 μg equiv/g at 48 h), liver (69.519 μg equiv/g at 3.5 h), adrenal gland-cortex (12.315 μg equiv/g at 168 h), and spleen-high (12.042 μg equiv/g at 168 h). All other tissues C_{max} concentrations were approximately <5 μg equiv/g. The tissues with concentration >5μg equiv/g at 1344 h postdose were lymph node-posterior (145.374 μg equiv/g) and adrenal gland cortex (7.442 μg equiv/g). All other tissues had approximately <5 μg equiv/g at 1344 h postdose. Elimination of radioactivity was not complete at 1344 h postdose, where all sampled tissues, except eye lens, remained above the lower limit of quantification (0.003 μg equiv/g). In addition, high concentrations of ¹⁴C-DLin-MC3-DMA-derived radioactivity were observed in the bile (10.478 μg equiv/g at 0.5 h) and urine (5.871 μg equiv/g at 3.5 h), which reflected the routes of excretion for the ¹⁴C-ALN-TTR02 derived radioactivity. Tissue distribution patterns observed for partially-pigmented rats appeared to be similar to those observed in albino rats at the equivalent times. Data for each time point were obtained from a single Sprague Dawley rat.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.5.E Rat Tissue Distribution by Micro-Autoradiography

Study Title: Discovery Tissue Distribution by Micro-Autoradiography Following a Single Intravenous Administration of [¹⁴C]ALN-TTR02 in Sprague Dawley Rats		Test Article: Patisiran-LNP
		Study No. [REDACTED] 319D-1202 (Samples from [REDACTED] 319-1103)
Analysis by Micro-Autoradiography (MARG): Tissues collection from Sprague Dawley rats at necropsy at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 24, and 48 h (1 rat/time point) following nominal dose of 0.3 mg/kg ¹⁴ C-ALN-TTR02 IV bolus (194.7 μCi/kg). Portions of tissue were frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen. The adrenal gland (0.25, 1, 6, and 48 h), liver (0.25, 1, 4, 6, 24, and 48), spleen (0.25, 1, 6, 24, and 48 h), kidney (0.25, 6, and 48 h), and testis (0.25, 6, and 48 h) were selected for MARG analysis.		
Tissues/Organs (from 1 Rat/Time Point)		
Liver	Radioactivity was initially localized primarily to the lumen of the sinusoids. Radioactivity in the cytoplasm of the hepatocytes and vascular regions of the liver was obvious. Radioactivity was slightly reduced in the sinusoids at 1, 6, and 24 h postdose, but was relatively higher in the cytoplasm of the hepatocytes and vasculature. Radioactivity appeared to be more evenly distributed into the vascular, sinusoidal, and cellular portions of the liver at 48 h.	
Spleen	Radioactivity was predominately in the cytoplasmic regions of cells in the red pulp, and levels appeared to increase or stay the same through 48 h. Radioactivity in the white pulp appeared to be associated with both the nucleus and cytoplasmic regions. Those cells contributed radioactivity in the early time points while in the later time points the radioactivity seemed to be associated with the cellular elements of the red pulp.	
Adrenal Gland	Radioactivity was distributed throughout the adrenal gland and was present in the cytoplasm and interstitial spaces of cells in the cortex and medulla with highest radioactivity observed in the vasculature and proximal cells. Radioactivity tended to be greater in and around the vascularized areas and less in the adrenal cells at 24 and 48 h.	
Kidney	Infiltration of radioactivity was relatively low and distributed primarily into the glomerulus at early time points. Radioactivity was evident in the cytoplasm and some nuclei of glomerular, and primarily in the cytoplasm of tubule cells, which had much lower levels than in the glomerulus. At 48 h, radioactivity was still localized in the glomerulus and the interstitial tissue, and only low amounts were observed in the tubule cells. Very low levels were observed in the lumen of the tubules and in the cells of the renal papilla for all time points tested.	
Testis	Little radioactivity was seen in the testis at all sampled time points. Radioactivity was observed in the lumen of the seminiferous tubules, and cytoplasm of the spermatogonia. Specific localization to spermatids was not observed. Radioactivity was seen in some blood vessels, but the amount was low and limited to within the lumen.	

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

6 薬物動態試験－たん白結合

表 2.6.5.6.A Protein Binding

Study Title: Binding of Rat Serum Albumin, Human Serum Albumin, and Human α_1-Acid Glycoprotein to ALN-TTR02			Test Article: Patisiran-LNP	
Study System: In Vitro; 1.05 mg/mL patisiran-LNP incubated for 4 hours at 37°C				
Target Entity, Test System and Method: Human Serum Albumin and Human α_1 -Acid Glycoprotein, Reconstituted lyophilized protein powder, FPLC separation with SDS-PAGE quantification				
Species	Protein Conc. Tested (mg/mL)	Patisiran-LNP Concentration (mg/mL)	% Bound	Study No.
Rat serum albumin	32	1.05	0.89%	BA11010
Human serum albumin	50		0.46%	
Human α_1 -acid glycoprotein	25		2.07%	

Abbreviations: FPLC=fast protein liquid chromatography; LNP=lipid nanoparticle; SDS-PAGE=sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

Additional Information: The plasma protein binding of rat serum albumin, human serum albumin, and human α_1 -acid glycoprotein to patisiran-LNP was low at approximately 0.89%, 0.46%, and 2.07%, respectively.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.6.B Protein Binding for PEG₂₀₀₀-C-DMG

Study Title: In Vitro Protein Binding Determination for PEG₂₀₀₀-C-DMG in Human Plasma							Test Article: PEG₂₀₀₀-C-DMG				
							Study No. TTR02-DSM18-024 () 319N-1815)				
Study System: In Vitro; 5-20 µM PEG₂₀₀₀-C-DMG in human plasma											
Target Entity, Test System and Method: Protein binding was evaluated in human plasma at nominal concentrations of 5 and 20 µM. The spiked human plasma (0.5 mL) at each concentration was incubated at 37°C for 30 minutes before ultracentrifugation. Ultracentrifugation was conducted in triplicate at approximately 500,000×g-force at 37°C for 18 hours. A positive control was included (2 µM [¹⁴C]warfarin) and found to be 1.3% unbound.											
Nominal Conc. (µM)	Spiked Plasma PAR	Mean	Supernatant Sample Layer (from top to bottom)	Supernatant PAR			Conc. Ratio Relative to Spiked Conc. (%)			Mean	SD
				Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 1	Tube 2	Tube 3		
5	0.76516	0.82277	1	0.10902	0.11648	0.13882	13.3	14.2	16.9	14.8	1.9
	0.88764		2	0.02432	0.02844	0.02076	3.0	3.5	2.5	3.0	0.5
	0.81550		3	0.04934	0.03720	0.02980	6.0	4.5	3.6	4.7	1.2
20	3.52970	3.55840	1	0.29634	0.47938	0.57302	8.3	13.5	16.1	12.6	4.0
	3.68570		2	0.11268	0.13934	0.08096	3.2	3.9	2.3	3.1	0.8
	3.45980		3	0.17904	0.14622	0.20246	5.0	4.1	5.7	4.9	0.8

Abbreviations: Conc.=concentration; PAR=peak area ratio; SD=standard deviation.

Additional Information: PAR=measured peak area ratio in mixed matrix (plasma/supernatant, v/v=1:1) × dilution factor of 2

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

7 薬物動態試験－妊娠または授乳動物における試験

表 2.6.5.7.A An Intravenous (q2w x7) Fertility and General Reproduction Study in Male Sprague Dawley Rats

Title: Patisiran (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Fertility and General Reproduction Study in Male Sprague Dawley Rats						Test Articles: Patisiran-LNP or AF-011-18534			
						Study No. TTR02-GLP15-035			
Species		Rat, Male Sprague Dawley							
Method of Administration		60-min IV infusion once every 2 weeks for 12 weeks (total of 7 doses)							
Feeding condition:		Fed							
Vehicle/Formulation:		0.9% Sodium Chloride for Injection USP							
PK timepoints		3 males/group/time point at 0.083, 1, 2, 8, 24, 96, 168, and 336 on Day 1, and predose, 0.083, 1, 2, 8, 24, 96, 168, 336, 672, and 1344 h post dose on Day 85							
Sample		Plasma							
No. Animals/Group	9M	9M	9M	9M	9M	9M	9M	9M	9M
Patisiran-LNP (mg/kg)^a	ALN-18328								
	Day 1			Day 85			Accumulation Ratio^c		
	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3
$t_{1/2}$ (h) ^b	ND	ND	1.57	ND	1.89	ND	NA	NA	NA
t_{max} (h) ^b	1.1	2.0	1.1	1.1	1.1	1.1	NA	NA	NA
C_{max} (µg/mL)	0.309	1.18	1.86	0.320	1.03	1.92	1.04	0.870	1.03
AUC_{last} (µg·h/mL) ^b	0.424	3.35	4.63	0.459	2.18	3.48	1.08	0.651	0.750
$C_{max}/Dose$	10.3	11.8	6.21	10.7	10.3	6.40	1.04	0.870	1.03

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.A An Intravenous (q2w x7) Fertility and General Reproduction Study in Male Sprague Dawley Rats (続き)

Title: Patisiran (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Fertility and General Reproduction Study in Male Sprague Dawley Rats						Test Articles: Patisiran-LNP or AF-011-18534			
Study No. TTR02-GLP15-035									
No. Animals/Group	9M	9M	9M	9M	9M	9M	9M	9M	9M
Patisiran-LNP (mg/kg)^a	ALN-18328								
	Day 1			Day 85			Accumulation Ratio^c		
AUC _{last} /Dose	14.1	33.5	15.4	15.3	21.8	11.6	1.08	0.651	0.750
CL (mL/h/kg) ^b	ND	ND	63.6	ND	44.4	ND	NA	NA	NA
V _d (mL/kg) ^b	ND	ND	118	ND	86.8	ND	NA	NA	NA
Patisiran-LNP (mg/kg)^a	DLin-MC3-DMA								
	Day 1			Day 85			Accumulation Ratio^c		
	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3
t _{1/2} (h) ^b	78.9	ND	125	ND	ND	389	NA	NA	NA
t _{max} (h) ^b	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	NA	NA	NA
C _{max} (µg/mL)	1.26	6.07	22.6	2.63	6.33	12.2	2.09	1.04	0.540
AUC _{last} (µg·h/mL) ^b	8.70	20.8	82.7	12.7	18.1	107	1.46	0.874	1.29
C _{max} /Dose	6.47	9.37	11.6	13.5	9.77	6.28	2.09	1.04	0.540
AUC _{last} /Dose	44.8	32.1	42.6	65.5	28.0	55.0	1.46	0.874	1.29
CL (mL/h/kg) ^b	21.8	ND	21.8	ND	ND	17.7	NA	NA	NA
V _d (mL/kg) ^b	1000	ND	1730	ND	ND	3000	NA	NA	NA

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.A An Intravenous (q2w x7) Fertility and General Reproduction Study in Male Sprague Dawley Rats (続き)

Title: Patisiran (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Fertility and General Reproduction Study in Male Sprague Dawley Rats						Test Articles: Patisiran-LNP or AF-011-18534			
						Study No. TTR02-GLP15-035			
No. Animals/Group	9M	9M	9M	9M	9M	9M	9M	9M	9M
Patisiran-LNP (mg/kg) ^a	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG								
	Day 1			Day 85			Accumulation Ratio ^c		
	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3
t _{1/2} (h) ^b	ND	ND	ND	ND	ND	4.39	NA	NA	NA
t _{max} (h) ^b	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	NA	NA	NA
C _{max} (µg/mL)	0.0878	0.225	1.14	0.162	0.464	1.08	1.84	2.06	0.950
AUC _{last} (µg·h/mL) ^b	ND	ND	3.55	ND	ND	7.29	NA	NA	2.05
C _{max} /Dose	3.84	2.95	4.97	7.07	6.09	4.72	1.84	2.06	0.950
AUC _{last} /Dose	ND	ND	15.5	ND	ND	31.9	NA	NA	2.05
CL (mL/h/kg) ^b	ND	ND	ND	ND	ND	30.7	NA	NA	NA
V _d (mL/kg) ^b	ND	ND	ND	ND	ND	158	NA	NA	NA

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.A An Intravenous (q2w x7) Fertility and General Reproduction Study in Male Sprague Dawley Rats (続き)

Title: Patisiran (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Fertility and General Reproduction Study in Male Sprague Dawley Rats						Test Articles: Patisiran-LNP or AF-011-18534			
AF-011-18534 mg/kg ^a	AD-18534			DLin-MC3-DMA			PEG ₂₀₀₀ -C-DMG		
	Day 1	Day 85	Ratio ^c	Day 1	Day 85	Ratio ^c	Day 1	Day 85	Ratio ^c
t _{1/2} (h) ^b	ND	ND	NA	118	480	NA	ND	4.86	NA
t _{max} (h) ^b	1.1	1.1	NA	1.1	1.1	NA	1.1	1.1	NA
C _{max} (µg/mL)	1.08	2.34	2.17	5.49	8.83	1.61	0.680	1.36	2.00
AUC _{last} (µg·h/mL) ^b	1.65	3.15	1.91	26.4	43.4	1.65	1.97	3.55	1.81
C _{max} /Dose	10.8	23.4	2.17	8.12	13.1	1.61	8.76	17.5	2.00
AUC _{last} /Dose	16.5	31.5	1.91	39.1	64.3	1.65	25.3	45.8	1.81
CL (mL/h/kg) ^b	ND	ND	NA	24.2	15.1	NA	ND	21.4	NA
V _d (mL/kg) ^b	ND	ND	NA	1700	2340	NA	ND	76.4	NA

Abbreviations: AUC_{last}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; CL=total body clearance; C_{max}=maximum (peak) concentration; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M=male; No.=number; NA=not applicable; ND= not determined; PK=pharmacokinetic(s); siRNA=small interfering ribonucleic acid; SOI=start of infusion; TK=toxicokinetic(s); t_{1/2}=terminal elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration USP=United States Pharmacopeia; V_d= volume of distribution.

^a siRNA doses of 0.03, 0.1, and 0.3 mg/kg correspond to DLin-MC3-DMA doses of 0.19, 0.65, and 1.94 mg/kg, respectively, which were used to calculate the TK parameters for DLin-MC3-DMA, and corresponded to PEG₂₀₀₀-C-DMG doses of 0.02, 0.08, and 0.23 mg/kg, respectively, which were used to calculate the TK parameters for PEG₂₀₀₀-C-DMG.

^b Time from SOI was used to calculate the parameter

^c Ratio = Day 85 TK parameter/Day 1 TK parameter

Additional information: Many samples analyzed for PEG₂₀₀₀-C-DMG concentrations after patisiran-LNP dosing had no quantifiable results due to insufficient sample volume.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.B ALN-TTR02: An Intravenous Dosage Range-finding Development Toxicity Study in Rats Including a Toxicokinetic Evaluation

Study Title: ALN-TTR02: An Intravenous Dosage Range-finding Development Toxicity Study in Rats Including a Toxicokinetic Evaluation					Test Article: Patisiran-LNP			
Study No. TTR02-NCD13-003								
Species	Sprague Dawley Rats							
Method of Administration:	IV Infusion of ALN-TTR02 or AF-011-18534 over 1 hour on Day 1 (2 days prior to cohabitation) and on Day 6 and 13 of presumed gestation (GD 6 & GD 13)							
Feeding condition:	Fed							
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP							
PK timepoints	Day 1 (0.083, 1, 2, 4, 8, 24, 48, and 72 hours postdose), GD 6 (0.083 hours postdose) and GD 13 (0.083, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, and 144 hours postdose)							
Sample:	Plasma – Day 1				Plasma – GD 13			
ALN-TTR02 Dose (mg/kg):	0.03	0.1	0.3	1.0	0.03	0.1	0.3	1.0
Number of Females:	15	15	15	15	15	15	15	15
Analyte/Assay:	ALN-18328 by LC/MS/MS							
t _{max} (h) ^a	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
C _{max} (µg/mL)	0.182	0.651	2.30	7.83	0.080	0.801	2.01	2.53
AUC _{0-t} (µg•h/mL) ^a	NR	NR	NR	9.88	NR	1.16	NR	NR
Analyte/Assay:	DLin-MC3-DMA by LC/MS/MS							
t _{max} (h) ^a	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
C _{max} (µg/mL)	1.29	6.80	13.8	65.0	0.562	6.30	13.8	16.3
AUC _{0-t} (µg•h/mL) ^a	2.77	13.4	28.4	117	2.16	15.7	43.5	83.8
AUC _{0-73h} (µg•h/mL) ^a	2.77	13.4	28.4	117	1.42	12.7	33.8	50.1

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.B ALN-TTR02: An Intravenous Dosage Range-finding Development Toxicity Study in Rats Including a Toxicokinetic Evaluation (続き)

Study Title: ALN-TTR02: An Intravenous Dosage Range-finding Development Toxicity Study in Rats Including a Toxicokinetic Evaluation					Test Article: Patisiran-LNP			
					Study No. TTR02-NCD13-003			
Sample:	Plasma – Day 1				Plasma – GD 13			
ALN-TTR02 Dose (mg/kg):	0.03	0.1	0.3	1.0	0.03	0.1	0.3	1.0
Number of Females:	15	15	15	15	15	15	15	15
Analyte/Assay:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG by LC/MS/MS							
t _{max} (h) ^a	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
C _{max} (µg/mL)	0.161	0.514	1.78	6.75	.084	0.776	1.74	3.27
AUC _{0-t} (µg•h/mL) ^a	0.299	1.43	4.60	17.9	0.165	2.14	4.31	9.47
AUC _{0-73h} (µg•h/mL) ^a	0.336	1.66	4.60	17.9	0.201	1.70	4.41	8.85

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.B ALN-TTR02: An Intravenous Dosage Range-finding Development Toxicity Study in Rats Including a Toxicokinetic Evaluation (続き)

Study Title: ALN-TTR02: An Intravenous Dosage Range-finding Development Toxicity Study in Rats Including a Toxicokinetic Evaluation			Test Article: Patisiran-LNP	
Sample:	Plasma – Day 1		Plasma – GD 13	
AF-011-18534 Dose (mg/kg):	0.3	1.0	0.3	1.0
Number of Females:	15	15	15	15
Analyte:	AD-18534			
t _{max} (h) ^a	1.083	1.083	1.083	1.083
C _{max} (µg/mL)	3.43	20.2	0.929	16.7
AUC _{0-t} (µg•h/mL) ^a	6.79	29.2	2.07	24.4
AUC _{0-73h} (µg•h/mL) ^a	6.80	30.0	2.16	24.4
Analyte:	DLin-MC3-DMA			
t _{max} (h) ^a	1.083	1.083	2.000	1.083
C _{max} (µg/mL)	10.3	64.2	3.16	53.8
AUC _{0-t} (µg•h/mL) ^a	27.6	130	17.4	126
AUC _{0-73h} (µg•h/mL) ^a	27.6	130	11.8	109
Analyte:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG			
t _{max} (h) ^a	1.083	1.083	1.083	1.083
C _{max} (µg/mL)	2.51	9.90	1.02	9.00
AUC _{0-t} (µg•h/mL) ^a	6.81	23.8	3.88	20.5
AUC _{0-73h} (µg•h/mL) ^a	6.81	23.8	3.88	19.8

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.B ALN-TTR02: An Intravenous Dosage Range-finding Development Toxicity Study in Rats Including a Toxicokinetic Evaluation (続き)

Study Title: ALN-TTR02: An Intravenous Dosage Range-finding Development Toxicity Study in Rats Including a Toxicokinetic Evaluation				Test Article: Patisiran-LNP		
Sample:	Rat Fetuses – GD 19					
Analyte:	DLin-MC3-DMA					
	Patisiran-LNP			AF-011-18534		
Dose (mg/kg):	0.03	0.1	0.3	1.0	0.3	1.0
Mean (ug/g)	<LLOQ	<LLOQ	0.00874	0.0226	0.00875	0.0237
Number of Dams ^b	15	15	15	15	15	15

Abbreviations: AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) concentration; F=female; GD=presumed day of gestation; LLOQ=lower limit of quantification; LNP=lipid nanoparticle; NR=not reportable (does not meet acceptance criteria for reporting AUC [4 consecutive quantifiable time points]); Atto-Probe HPLC/Fluorescence Detection=peptide nucleic acid probe with analysis by ion exchange high performance liquid chromatography and fluorescence detection; SOI=start of infusion; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopeia.

Additional Information: Preliminary results are presented in the table. Following a 1-hour IV infusion of patisiran-LNP or AF-011-18534 to female Sprague Dawley rats on Day 1 or Day 13 of presumed gestation (GD 13), plasma concentrations of ALN-18328 or AD-18534, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG declined rapidly after peaking at approximately the end of the 1-hour infusion. ALN-18328 or AD-18534, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG C_{max} values increased with an increase in dose on Day 1, GD 6, and GD 13. The AD-18534, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG AUC values increased with an increase in dose on Day 1 and GD 13. The plasma C_{max} of ALN-18328 was comparable on GD 13 and Day 1 for the 0.1 and 0.3 mg/kg dose groups, however, C_{max} was lower on GD 13 for the 0.03 and 1 mg/kg dose groups, while both C_{max} and AUC_{0-t} in the 0.3 mg/kg AF-011-18534 dose group was lower on GD 13 compared to Day 1. The plasma exposure of DLin-MC3-DMA was comparable on Day 1 and GD 13, with the exception of the 0.3 mg/kg patisiran-LNP and AF-011-18534 dose group which was lower on GD 13 compared to Day 1. The plasma exposure of PEG₂₀₀₀-C-DMG was comparable on Day 1 and GD 13, with the exception of the 0.03 and 1 mg/kg patisiran-LNP dose groups and the 0.3 mg/kg AF-011-18534 dose group which was lower on GD 13 compared to Day 1. Additionally, ALN-18328, AD-18534 and PEG₂₀₀₀-C-DMG concentrations were below limit of quantification in rat fetuses, while the concentrations of DLin-MC3-DMA were observed in rat fetuses from the 0.3 and 1 mg/kg dose groups after administration of patisiran-LNP or AF-011-18534.

^a Time from SOI was used to calculate the parameter.

^b Fetuses from the same mother were pooled to form one sample.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.C An Intravenous (q1w x6) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats

Study Title: Patisiran (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Dose Range-finding Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats			Test Article: Patisiran-LNP	
			Study No. TTR02-DSM15-015	
Species	Sprague Dawley Rat			
Method of Administration:	IV			
Feeding condition:	Fed			
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP			
PK timepoints	0 h, 5 min, 1, 2, 8, and 24 hours h after the GD 19 dose			
Formulation:	AF-011-18534			Patisiran-LNP
Dose (mg/kg):	0.15	0.5	1.5	1.5
Number of Females:	9	9	9	9
Sample:	Plasma – GD 19			
Analyte/Assay:	AD-18534 by HPLC/Atto-probe			ALN-18328 by HPLC/Atto-probe
t _{max} (h)	1.08	1.08	1.08	1.08
C _{max} (µg/mL)	3.57	13.6	28.6	27.7
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	7.57	27.0	78.7	62.6
t _{1/2} (h)	2.4	2.0	3.3	3.5
Analyte/Assay:	DLin-MC3-DMA by LC/MS/MS			
t _{max} (h)	1.08	1.08	1.08	1.08
C _{max} (µg/mL)	12.9	46.9	118	151
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	30.9	110	373	309
t _{1/2} (h)	4.3	4.9	3.9	4.3

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.C An Intravenous (q1w x6) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: Patisiran (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Dose Range-finding Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats				Test Article: Patisiran-LNP
				Study No. TTR02-DSM15-015
Formulation:	AF-011-18534			Patisiran-LNP
Dose (mg/kg):	0.15	0.5	1.5	1.5
Number of Females:	9	9	9	9
Sample:	Plasma – GD 19			
Analyte/Assay:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG by LC/MS/MS			
t _{max} (h)	1.08	1.08	1.08	1.08
C _{max} (µg/mL)	1.97	6.24	30.9	36.9
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	5.32	17.4	91.5	87.8
t _{1/2} (h)	4.70	5.0	3.7	3.6

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.C An Intravenous (q1w x6) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: Patisiran (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Dose Range-finding Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats			Test Article: Patisiran-LNP	
			Study No. TTR02-DSM15-015	
Formulation:	AF-011-18534			Patisiran-LNP
Dose (mg/kg):	0.15	0.5	1.5 ^a	1.5
Number of Females:	9	9	9	9
Sample:	Maternal Liver – GD 20			
Analyte/Assay:	AD-18534 by HPLC/Atto-probe (µg/g)			ALN-18328 by HPLC/Atto-probe
siRNA	0.0819	0.192	0.290	0.194
DLin-MC3-DMA	515	221	539	725
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	0.890	2.60	4.87	5.21
Sample:	Placenta – GD 20			
Analyte/Assay:	DLin-MC3-DMA by LC/MS/MS (µg/g)			
siRNA	NC	0.128 ^b	0.0906	NC
DLin-MC3-DMA	0.325	1.35	2.90	2.23
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	0.0924	0.257	0.603	0.527

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.C An Intravenous (q1w x6) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: Patisiran (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Dose Range-finding Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats				Test Article: Patisiran-LNP
				Study No. TTR02-DSM15-015
Formulation:	AF-011-18534			Patisiran-LNP
Dose (mg/kg):	0.15	0.5	1.5 ^a	1.5
Number of Females:	9	9	9	9
Sample:	Fetal Tissue ^c – GD 20			
Analyte/Assay:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG by LC/MS/MS (µg/g)			
siRNA	NC	NC	NC	NC
DLin-MC3-DMA	0.00757	0.0202	0.0271	0.0178
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	NC	NC	NC	NC

Abbreviations: AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max}=maximum (peak) concentration; GD=presumed day of gestation; HPLC=high performance liquid chromatography; IV=intravenous; LC=liquid chromatography; LLOQ=lower limit of quantification; LNP=lipid nanoparticle; MS=mass spectrometry; NC=not calculated – insufficient values to calculate parameter or all concentration values <LLOQ; PK=pharmacokinetic(s); t_{1/2}=terminal elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopeia.

Additional information: Liver AD-18534 LLOQ=5 ng/g; liver ALN-18328 LLOQ=20 ng/g; placenta AD-18534 LLOQ=4 ng/g; placenta ALN-18328 LLOQ=40 ng/g; fetal tissue AD-18534 LLOQ=2 ng/g; fetal tissue ALN-18328 LLOQ=20 ng/g; DLin-MC3-DMA LLOQ=4 ng/g; PEG₂₀₀₀-C-DMG LLOQ=40 ng/g

^a Liver tissue samples were collected from 7 of the 9 animals in the 1.5 mg/kg AF-011-18534 dose group.

^b n= 1

^c n=5 fetuses per animal

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.D An Intravenous (q1w x6) Fertility and Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats

Study Title: Patisiran (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Fertility and Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Female Rats				Test Articles: Patisiran-LNP and AF-011-18534					
				Study No. TTR02-GLP15-031					
Species	Sprague Dawley Rat (female)								
Method of Administration	Patisiran-LNP and AF-011-18534 were administered by 60-min IV infusion on Day 15, Day 8, and Day 1 prior to cohabitation and on Gestation Days 6, 13, and 19 (total of 6 doses).								
Feeding condition:	Fed								
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP								
PK timepoints	0, 0.083, 1, 2, 8, and 24 hours postdose on GD 19								
Number of females	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Sample	Plasma								
Test Article (Patisiran)	Patisiran-LNP on GD 19								
Analyte/Assay	ALN-18328			DLin-MC3-DMA			PEG ₂₀₀₀ -C-DMG		
Dose Level (mg/kg) ^a	0.15	0.5	1.5	0.15	0.5	1.5	0.15	0.5	1.5
C _{max} (µg/mL)	1.99	6.28	29.0	12.5	31.5	133	1.63	4.22	17.8
t _{max} (h) ^b	1.08	1.08	1.08	1.08	1.08	1.08	1.08	1.08	1.08
t _{last} (h) ^b	9.0	9.0	25	25	25	25	25	25	25
AUC _{last} (µg•h/mL) ^b	4.62	16.0	88.0	30.1	99.1	361	3.98	11.6	41.1
AUC _{24h} (µg•h/mL) ^b	4.62	16.0	88.0	30.1	99.1	361	3.98	11.6	41.1

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.D An Intravenous (q1w x6) Fertility and Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: Patisiran (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Fertility and Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Female Rats				Test Articles: Patisiran-LNP and AF-011-18534					
				Study No. TTR02-GLP15-031					
Test Article (AF-011-18534)	AF-011-18534 on GD 19								
Analyte/Assay	AD-18534			DLin-MC3-DMA			PEG ₂₀₀₀ -C-DMG		
Dose Level (mg/kg) ^c	0.15	0.5	1.5	0.15	0.5	1.5	0.15	0.5	1.5
C _{max} (µg/mL)	NA	NA	3.98	NA	NA	91.3	NA	NA	19.4
t _{max} (h) ^b	NA	NA	2.0	NA	NA	1.08	NA	NA	1.08
t _{last} (h) ^b	NA	NA	9.0	NA	NA	25	NA	NA	25
AUC _{last} (µg•h/mL) ^b	NA	NA	16.6	NA	NA	348	NA	NA	55.5
AUC _{24h} (µg•h/mL) ^b	NA	NA	16.6	NA	NA	348	NA	NA	55.5

Abbreviations: AUC_{24h}= area under the concentration time curve from time zero to 24h; AUC_{last}= area under the concentration time curve from time zero to the last measurable time point; C_{max}=maximum (peak) concentration; GD=gestation day; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; NA=not applicable; SOI=start of infusion; t_{last}= time of last measurable concentration; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopeia.

a Patisiran-LNP doses of 0.15, 0.5, and 1.5 mg/kg correspond to DLin-MC3-DMA doses of 0.97, 3.24, and 9.72 mg/kg, respectively, which were used to calculate the TK parameters for DLin-MC3-DMA, and corresponded to PEG₂₀₀₀-C-DMG doses of 0.11, 0.38, and 1.14 mg/kg, respectively, which were used to calculate the TK parameters for PEG₂₀₀₀-C-DMG.

b The times from SOI was used to calculate the parameters.

c AF-011-18534 doses of 1.5 mg/kg correspond to a DLin-MC3-DMA dose of 10.14 mg/kg, which were used to calculate the TK parameters for DLin-MC3-DMA, and corresponded to a PEG₂₀₀₀-C-DMG dose of 1.17 mg/kg, which were used to calculate the TK parameters for PEG₂₀₀₀-C-DMG.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.E An Intravenous (q6d x6) Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study in Sprague Dawley Rats

Study Title: Patisiran (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study in Rats, Including a Postnatal Behavioral Functional Evaluation				Test Articles: Patisiran-LNP and AF-011-18534					
				Study No. TTR02-GLP16-003					
Species	Sprague Dawley Rat (female)								
Method of Administration	Patisiran-LNP and AF-011-18534 were administered by 60-min IV infusion during gestation (GD 7, 13, 19) and Lactation (LD 6, 12, and 18) (total of 6 doses)								
Feeding condition:	Fed								
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP								
PK timepoints	0, 0.083, 1, 2, 8, 24, 48, and 72 hours postdose on LD 18								
Sample	Plasma								
Test Article (Patisiran-LNP)	Patisiran-LNP Lactation Day 18								
Analyte/Assay	ALN-18328			DLin-MC3-DMA			PEG₂₀₀₀-C-DMG		
Dose Level (mg/kg)^a	0.15	0.5	1.5^c	0.15^c	0.5^c	1.5^c	0.15^c	0.5^c	1.5^c
Number of females	10	10	10	10	10	10	10	10	10
t_{1/2} (h)^b	ND	ND	ND	66	ND	62	ND	37	11
t_{max} (h)^b	2.00	1.08	1.08	2.00	1.08	3.00	1.08	1.08	2.00
C_{max} (µg/mL)	0.488	1.20	3.14	4.02	2.84	2.82	0.621	1.35	2.82
AUC_{last} (µg·h/mL)^b	1.02	1.50	6.18	19.10	27.90	72.50	3.42	5.36	15.10
C_{max}/Dose^a	3.25	2.40	2.09	4.36	0.922	0.31	5.50	3.60	2.50

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.E An Intravenous (q6d x6) Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: Patisiran (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study in Rats, Including a Postnatal Behavioral Functional Evaluation				Test Articles: Patisiran-LNP and AF-011-18534					
				Study No. TTR02-GLP16-003					
Test Article (AF-011-18534)	AF-011-18534 - Lactation Day 18								
Analyte/Assay	AD-18534			DLin-MC3-DMA			PEG ₂₀₀₀ -C-DMG		
Dose Level (mg/kg) ^c	0.15	0.5	1.5	0.15	0.5	1.5	0.15	0.5	1.5
Sex (M/F)/Number of animals	F/10	F/10	F/10	F/10	F/10	F/10	F/10	F/10	F/10
t _{1/2} (h) ^b	NA	NA	ND	NA	NA	120	NA	NA	17
t _{max} (h) ^b	NA	NA	10.8	NA	NA	2.00	NA	NA	2.0
C _{max} (µg/mL) ^a	NA	NA	13.5	NA	NA	4.17	NA	NA	2.0
AUC _{last} (µg·h/mL) ^b	NA	NA	15.9	NA	NA	109.0	NA	NA	17.0
C _{max} /Dose ^a	NA	NA	9.0	NA	NA	0.458	NA	NA	1.80

Abbreviations: ALQ = above the limit of quantification; AUC_{last}= area under the concentration time curve from time zero to the last measurable time point; C_{max}=maximum (peak) concentration; EOI=end of infusion; F=female; GD=gestation day; IV=intravenous; LD=lactation day; LNP=lipid nanoparticle; M=male; NA=not applicable; ND=not determined; PK=pharmacokinetic(s); SOI=start of infusion; TK=toxicokinetic(s); t_{1/2}=terminal elimination half-life; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopeia.

a Patisiran-LNP doses of 0.15, 0.5 and 1.5 mg/kg correspond to DLin-MC3-DMA doses of 0.923, 3.08, and 9.23 mg/kg, respectively, which were used to calculate the TK parameters for DLin-MC3-DMA, and correspond to PEG₂₀₀₀-C-DMG doses of 0.113, 0.375, and 1.13 mg/kg, respectively, which were used to calculate the TK parameters for PEG₂₀₀₀-C-DMG.

b Time-dependent parameters were calculated using times post SOI.

c TK parameter values were potentially impacted due to individual concentrations that were not quantifiable due to being above the limit of quantification with insufficient sample volume for reassay, resulting in concentration -time profiles of n <3 at the affected time points, most notably where n=0 at 0.083 h post EOI. In most instances, the affected time points where concentrations were ALQ were at or around t_{max}.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.F An Intravenous (q1w x3) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study in New Zealand White Rabbits

Study Title: A Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study by Intravenous Infusion in Rabbits, including a Preliminary Evaluation in Non-Pregnant Rabbits				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-DSM15-012		
Species	New Zealand White Rabbit					
Method of Administration:	IV infusion (60 minutes)					
Feeding condition:	Fed					
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP					
PK timepoints	0, 0.083, 1, 2, 8, and 24 hours post dose on GD7 and GD19					
Sample:	Maternal Plasma GD 7			Maternal Plasma GD 19		
Dose (mg/kg):	0.3	1.0	2.0	0.3	1.0	2.0
Number of Females:	5	5	5	5	5	5
Formulation:	ALN-18328					
t _{1/2} (h)	11.9 ^a ± NR	8.1 ± NR	9.4 ± 2.76	6.5 ± NR	9.4 ± 2.95	11.8 ± 10.7
t _{max} (h)	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00
C _{max} (µg/mL)	6.83 ± 2.36	24.6 ± 3.36	54.3 ± 4.36	2.57 ± 1.26	22.6 ± 10.8	40.0 ± 7.86
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	12.3 ± 5.61	46.8 ± 14.4	112 ± 16.2	3.46 ± 1.83	29.6 ± 16.9	124 ± 94.6
Formulation:	DLin-MC3-DMA					
t _{1/2} (h)	8.2 ± 2.06	5.0 ± 0.38	7.4 ± 1.65	9.9 ± 1.35	7.3 ± 1.31	6.1 ± 1.35
t _{max} (h)	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00
C _{max} (µg/mL)	22.9 ± 10.5	77.3 ± 26.8	281 ± 48	8.02 ± 5.86	103 ± 67.0	209 ± 61.1
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	75 ± 19.8	268 ± 74.3	611 ± 152	22.6 ± 11.3	170 ± 110	424 ± 224

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.F An Intravenous (q1w x3) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study in New Zealand White Rabbits (続き)

Study Title: A Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study by Intravenous Infusion in Rabbits, including a Preliminary Evaluation in Non-Pregnant Rabbits				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-DSM15-012		
Sample:	Maternal Plasma GD 7			Maternal Plasma GD 19		
Dose (mg/kg):	0.3	1.0	2.0	0.3	1.0	2.0
Number of Females:	5	5	5	5	5	5
Formulation:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG					
t _{1/2} (h)	5.3 ± 0.00	5.1 ± 0.21	5.0 ± 0.35	5 ± 0.10	4.8 ± 0.35	4.5 ± 0.5
t _{max} (h)	1.7 ± 0.53	1.4 ± 0.53	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00	1.08 ± 0.00
C _{max} (µg/mL)	5.46 ± 0.74	19.2 ± 3.22	53.1 ± 8.72	2.70 ± 0.81	15 ± 4.48	32.9 ± 9.42
AUC _{0-t} (µg•h/mL)	34.5 ± 5.62	115 ± 13.2	242 ± 52.7	12.9 ± 2.36	66.2 ± 33.4	140 ± 61.6

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.F An Intravenous (q1w x3) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study in New Zealand White Rabbits (続き)

Study Title: A Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study by Intravenous Infusion in Rabbits, including a Preliminary Evaluation in Non-Pregnant Rabbits		Test Article: Patisiran-LNP	
		Study No. TTR02-DSM15-012	
Dose (mg/kg):	0.3	1.0	2.0
Number of Females:	5	5	5
	Concentration (µg/g)		
Sample: Liver / GD 20			
Analyte:			
ALN-18328	0.106 ± 0.0121	0.454 ± 0.223	1.390 ± 0.384
DLin-MC3-DMA	172 ± 62.2	359 ± 145	689 ± 110
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	0.602 ± 0.247	0.808 ± 0.0575	2.39 ± 0.830
Sample: Kidney / GD 20			
Analyte:			
ALN-18328	NR	0.0406 ^a ± NR	0.116 ^b ± NR
DLin-MC3-DMA	0.191 ± 0.0256	1.17 ± 0.369	2.43 ± 0.410
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	0.162 ± 0.0182	0.880 ± 0.143	1.64 ± 0.110
Sample: Spleen / GD 20			
Analyte:			
ALN-18328	0.236 ± 0.175	0.141 ± 0.0506	0.910 ± 1.070
DLin-MC3-DMA	65.8 ± 37.8	138 ± 32.7	269 ± 97.1
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	1.06 ± 0.406	3.17 ± 1.01	12.4 ± 5.65

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.F An Intravenous (q1w x3) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study in New Zealand White Rabbits (続き)

Study Title: A Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study by Intravenous Infusion in Rabbits, including a Preliminary Evaluation in Non-Pregnant Rabbits		Test Article: Patisiran-LNP	
		Study No. TTR02-DSM15-012	
Dose (mg/kg):	0.3	1.0	2.0
Number of Females:	5	5	5
	Concentration (µg/g)		
Sample: Placenta / GD 20			
Analyte:			
ALN-18328	0.147 ^b ± NR	0.0658 ^a ± NR	1.04 ^b ± NR
DLin-MC3-DMA	3.81 ± 3.05	28.8 ± 19.0	64.8 ± 91.6
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	0.399 ± 0.144	1.95 ± 1.35	3.79 ± 3.28
Sample: Fetal / GD 20			
Analyte:			
ALN-18328	NR	NR	0.0474 ^a ± NR
DLin-MC3-DMA	0.00967 ± 0.00377	0.0485 ± 0.0159	0.0772 ± 0.0539
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	NR	0.0612 ± 0.00471	0.0890 ± 0.0403

Abbreviations: AUC_{0-t} = area under the concentration time curve from time zero to the last measurable time point; C_{max} = maximum (peak) concentration; GD = gestation day; IV = intravenous; LNP = lipid nanoparticle; NR = not reported – insufficient values to calculate parameter; PK = pharmacokinetic(s); t_{1/2} = terminal elimination half-life; t_{max} = time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP = United States Pharmacopeia.

a Concentration value represents n=1

b Concentration value represents n=2

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.G An Intravenous (q1w x3) Embryo-Fetal Development Study in New Zealand White Rabbits

Study Title: An Embryo-Fetal Development Study by Intravenous Infusion in Rabbits				Test Article: Patisiran-LNP		
Study No. TTR02-GLP15-034						
Species	New Zealand White Rabbits					
Method of Administration:	IV infusion of Patisiran-LNP on GD 7, GD 13, and GD 19					
Feeding condition:	Fed					
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection USP					
PK timepoints	0, 0.083, 1, 2, 8, and 24 hours postdose on GD 7 and 19					
Sample:	Plasma – GD 7			Plasma – GD 19		
Dose (mg/kg)a:	0.1	0.3	0.6	0.1	0.3	0.6
Number of Females:	3	3	3	3	3	3
Analyte/Assay:	ALN-18328 by LC/MS-HRAM					
$t_{1/2}^b$ (h)	ND	8.45	8.45	ND	9.42	36.1
t_{max}^b (h)	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
C_{max} (µg/mL)	0.641	3.12	8.23	0.339	1.61	3.60
t_{last}^b (h)	3.0	20	25	4.0	7.0	14
AUC_{last}^b (µg•h/mL)	0.776	10.1	24.1	ND	3.76	10.0
AUC_{24h}^b (µg•h/mL)	0.776	10.1	24.1	ND	3.76	10.0
AUC_{∞}^b (µg•h/mL)	ND	8.07	43.4	ND	6.19	15.7
CL^b (mL/h/kg)	ND	37.2	13.8	ND	48.4	38.1
V_{ss} (mL/kg)	ND	253	120	ND	487	1170

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.G An Intravenous (q1w x3) Embryo-Fetal Development Study in New Zealand White Rabbits (続き)

Study Title: An Embryo-Fetal Development Study by Intravenous Infusion in Rabbits				Test Article: Patisiran-LNP		
Sample:	Plasma – GD 7			Plasma – GD 19		
Dose (mg/kg)a:	0.1	0.3	0.6	0.1	0.3	0.6
Number of Females:	3	3	3	3	3	3
Analyte/Assay:	DLin-MC3-DMA by LC/MS/MS					
$t_{1/2}^b$ (h)	8.07	6.27	6.21	9.42	7.16	8.93
t_{max}^b (h)	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
C_{max} (µg/mL)	3.62	19.7	46.8	1.41	11.7	19.9
t_{last}^b (h)	25	25	25	25	25	25
AUC_{last}^b (µg•h/mL)	19.7	94.1	228	6.51	29.9	57.0
AUC_{24h}^b (µg•h/mL)	19.7	94.1	228	6.51	29.9	57.0
AUC_{∞}^b (µg•h/mL)	22.1	98.9	239	7.76	31.9	63.4
CL^b (mL/h/kg)	30.2	20.9	16.7	107	67.7	76.4
V_{ss} (mL/kg)	292	145	133	1020	464	772

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.7.G An Intravenous (q1w x3) Embryo-Fetal Development Study in New Zealand White Rabbits (続き)

Study Title: An Embryo-Fetal Development Study by Intravenous Infusion in Rabbits				Test Article: Patisiran-LNP		
Sample:	Plasma – GD 7			Plasma – GD 19		
Dose (mg/kg) ^a :	0.1	0.3	0.6	0.1	0.3	0.6
Number of Females:	3	3	3	3	3	3
Analyte/Assay:	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG by LC/MS/MS					
t _{1/2} ^b (h)	5.87	5.27	5.32	6.50	5.00	5.23
t _{max} ^b (h)	1.389	1.389	1.542	1.083	1.083	1.542
C _{max} (µg/mL)	1.10	3.46	8.20	0.486	2.45	3.64
t _{last} ^b (h)	25	25	25	25	25	25
AUC _{last} ^b (µg•h/mL)	7.88	23.6	52.5	2.58	10.9	18.9
AUC _{24h} ^b (µg•h/mL)	7.88	23.6	52.5	2.58	10.9	18.9
AUC _∞ ^b (µg•h/mL)	8.32	24.6	54.7	2.75	11.2	21.9
CL ^b (mL/h/kg)	9.62	9.38	8.42	29.5	20.8	21.0
V _{ss} (mL/kg)	63.7	55.0	49.3	209	98.1	100

Abbreviations: AUC_∞= area under the concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinite time; AUC_{24h} = area under the concentration-time curve from time zero to 24h; AUC_{last}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable time point; CL=total body clearance; C_{max}=maximum (peak) plasma drug concentration; GD=presumed day of gestation; HRAM=high resolution accurate mass; IV=intravenous; LC =liquid chromatography; LNP=lipid nanoparticle; MS=mass spectrometry; ND=not determined; siRNA=small interfering ribonucleic acid; SOI=start of infusion; TK=toxicokinetic(s); t_{1/2}=terminal elimination half-life; t_{last}= time of last measurable concentration; t_{max}=time to reach maximum (peak) concentration following drug administration; USP=United States Pharmacopeia; V_{ss}=volume of distribution at steady state.

a siRNA doses of 0.1, 0.3, and 0.6 mg/kg correspond to DLin-MC3-DMA doses of 0.65, 1.94, and 3.89 mg/kg, respectively, which were used to calculate the TK parameters for DLin-MC3-DMA, and corresponded to PEG₂₀₀₀-C-DMG doses of 0.08, 0.23, and 0.46 mg/kg, respectively, which were used to calculate the TK parameters for PEG₂₀₀₀-C-DMG.

b Time from SOI was used to calculate the parameter

8 薬物動態試験—その他の分布試験

表 2.6.5.8.A Lacteal Secretion Analysis from an Intravenous Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study in Sprague Dawley Rats

Study Title: Patisiran-LNP (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study in Rats, Including a Postnatal Behavioral Functional Evaluation				Test Article: Patisiran-LNP		
				Study No. TTR02-GLP16-003		
Species: Sprague Dawley Rat						
Number of Animals: 4 animals/control group, 10 animals/test article group						
Method of Administration: IV infusion on GD 7, 13, and 19 and LD 6, 12, and 18						
Assay: LC/MS-HRAM; RT-qPCR^a						
Comparisons of Mean DLin-MC3-DMA and PEG₂₀₀₀-C-DMG Rat Milk and Rat Plasma Concentrations at 2 h Postdose on LD 12 Following IV Infusion of Patisiran-LNP or AF-011-18534^b						
Dose (mg/kg)	Mean DLin-MC3-DMA Rat Milk Conc (µg/mL)	Mean Plasma DLin-MC3-DMA Conc (µg/mL)	Percent Plasma DLin-MC3-DMA in Milk	Mean PEG₂₀₀₀-C-DMG Rat Milk Conc (µg/mL)	Mean Plasma PEG₂₀₀₀-C-DMG Conc (µg/mL)	Percent Plasma PEG₂₀₀₀-C-DMG in Milk
Patisiran-LNP						
0.15	0.0145	1.160	1.3	NC	0.0958 ^c	NC
0.5	0.0500	1.040	4.8	0.0133	0.566 ^c	2.3
1.5	0.154	3.270	4.7	0.0458	0.691 ^c	6.6

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.8.A Lacteal Secretion Analysis from an Intravenous Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study in Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: Patisiran-LNP (ALN-TTR02) and AF-011-18534: An Intravenous Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study in Rats, Including a Postnatal Behavioral Functional Evaluation					Test Article: Patisiran-LNP	
					Study No. TTR02-GLP16-003	
Dose (mg/kg)	Mean DLin-MC3-DMA Rat Milk Conc (µg/mL)	Mean Plasma DLin-MC3-DMA Conc (µg/mL)	Percent Plasma DLin-MC3-DMA in Milk	Mean PEG ₂₀₀₀ -C-DMG Rat Milk Conc (µg/mL)	Mean Plasma PEG ₂₀₀₀ -C-DMG Conc (µg/mL)	Percent Plasma PEG ₂₀₀₀ -C-DMG in Milk
AF-011-18534						
1.5	0.272	3.290	8.3	0.0313	1.200	2.6

Abbreviations: GD=presumed day of gestation; IV=intravenous; n=number of samples with detectable concentrations of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, PEG₂₀₀₀-C-DMG, or AD-18534; LC/MS-HRAM=liquid chromatography/mass spectrometry – high resolution accurate mass; LD=lactation day; LLOQ=lower limit of quantification; LNP=lipid nanoparticle; NC=not calculated – all individual animal concentration values <LLOQ; RT-qPCR=reverse transcription quantitative polymerase chain reaction.

- a Due to the lack of sensitivity of the LC/MS-HRAM method for ALN-18328 and AD-18534, ALN-18328 concentrations in rat milk samples were also measured using an exploratory, confirmatory RT-qPCR method. This assay confirmed the absence of measurable ALN-18328 from rat milk collected 2 h postdose on LD 12.
- b Comparisons of rat plasma and rat milk ALN-18328 and AD-18534 concentrations were not determined since all individual animal rat milk concentrations of ALN-18328 and AD-18534 were <LLOQ.
- c Value=n of 1 animal.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

9 薬物動態試験－In Vivo における代謝

表 2.6.5.9.A Metabolic Profiling Study of ALN-18328 and PEG₂₀₀₀-C-DMG Following a Single Intravenous Bolus Injection of Patisiran to Male and Female Sprague Dawley Rats

Study Title: Metabolic Profiling Study of ALN-18328 and PEG₂₀₀₀-C-DMG Following a Single Intravenous Bolus Injection of Patisiran to Male and Female Sprague Dawley Rats		Test Article: Patisiran-LNP
		Study No. TTR02-DSM17-002
Test Article	Single IV bolus dose of Patisiran-LNP at 0.3 mg/kg	
Animals/Sex/Group	21 M/F	
Feeding Conditions	Fed	
Matrix	Metabolites Detected	
ALN-18328: Metabolite Profiling and Identification by LC/MS-HRAM:		
<u>Plasma samples</u> were obtained at predose, 0.083, 0.5, 1, 2, 6, 24, 48, 168, 336, and 672 hours postdose		
<u>Liver samples</u> were obtained at predose, 0.083, 0.5, 1, 2, 6, 24, 48, 168, 336, and 672 hours postdose		
<u>Urine samples</u> were obtained at intervals of 0-8, 8-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144, and 144-168 hours postdose.		
Plasma	Full length sense and antisense strands of ALN-18328	
Liver	Full length sense and antisense strands of ALN-18328	
Urine	Sense strand: 代謝物 ^{c*} and 代謝物 ^{d*} <u>Possible metabolites</u> 代謝物 ^{s*} and 代謝物 ^{t*} (with the same exact mass) 代謝物 ^{u*} and 代謝物 ^{v*} (with the same exact mass)	
	Antisense strand: 代謝物 ^{g*} <u>Possible metabolites</u> 代謝物 ^{r*} 代謝物 ^{i*}	

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.9.A Metabolic Profiling Study of ALN-18328 and PEG₂₀₀₀-C-DMG Following a Single Intravenous Bolus Injection of Patisiran to Male and Female Sprague Dawley Rats (続き)

Study Title: Metabolic Profiling Study of ALN-18328 and PEG₂₀₀₀-C-DMG Following a Single Intravenous Bolus Injection of Patisiran to Male and Female Sprague Dawley Rats		Test Article: Patisiran-LNP
		Study No. TTR02-DSM17-002
PEG₂₀₀₀-C-DMG: Metabolite Profiling and Identification by HPLC-HRMS: Urine samples from 0-8, 8-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144, and 144-168 hours postdose.		
Urine	PEG ₂₀₀₀ -C-DMG was not detected in rat urine (concentration estimated to be less than 1 ng/mL). No other metabolites of PEG ₂₀₀₀ -C-DMG were detected in rat urine.	
Proposed Metabolic Pathway of ALN-18328 in urine:		
<p>Parent sequence Sense 5'-GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT-3'</p> <p> Antisense 5'-AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT-3'</p>		

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.9.B Identification, Profiling, and Quantitation of [¹⁴C]-DLin-MC3-DMA and Metabolites in Rat Plasma, Urine, Bile, Feces, and Tissues; and Bioanalysis of ALN-18328 in Rat Plasma, Plasma Ultrafiltrate, and Tissues

Study Title: Identification, Profiling, and Quantitation of [¹⁴C]-DLin-MC3-DMA and Metabolites in Rat Plasma, Urine, Bile, Feces, and Tissues; and Bioanalysis of ALN-18328 in Rat Plasma, Plasma Ultrafiltrate, and Tissues		Test Article: Patisiran-LNP
		Study No. ■■■ 319N-1201 (Samples from ■■■ 319-1103)
Metabolite Profiling and Identification by HPLC/MS/MS: Samples from 24 intact and 4 bile duct cannulated (BDC) male Sprague Dawley rats following an IV bolus dose of 0.3 mg/kg ¹⁴ C-ALN-TTR02 (194.7 μCi/kg).		
Matrix	Parent (¹⁴C-DLin-MC3-DMA)/Metabolites Detected	
Plasma	¹⁴ C-DLin-MC3-DMA major radioactive component; M1, M2, M3/M4, M5, M6	
Urine	M6	
Feces	¹⁴ C-DLin-MC3-DMA present; M6	
Bile	M6	
Liver	¹⁴ C-DLin-MC3-DMA major radioactive component; M3/M4, M6	
Spleen	¹⁴ C-DLin-MC3-DMA major radioactive component; M3/M4, M6	
Kidney	¹⁴ C-DLin-MC3-DMA present; M6	
<p>Metabolite M1: proposed as a double oxidation product of ¹⁴C-DLin-MC3-DMA with the 2 oxygen atoms added to the alkyl chain Metabolite M2: proposed as a double oxidation product of ¹⁴C-DLin-MC3-DMA with the 2 oxygen atoms added to alkyl chain; isomer of M1 Metabolite M3: proposed as a single oxidation product of ¹⁴C-DLin-MC3-DMA with the 1 oxygen atom added to alkyl chain Metabolite M4: proposed as a single oxidation product of ¹⁴C-DLin-MC3-DMA with the 1 oxygen atom added to alkyl chain Metabolite M5: proposed as a single oxidation product of ¹⁴C-DLin-MC3-DMA with the 1 oxygen atom added to the N,N-dimethyl butyric acid portion Metabolite M6: proposed as N,N-dimethyl butyric acid, a hydrolysis product and was confirmed with commercially available reference material</p>		

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.9.B Identification, Profiling, and Quantitation of [¹⁴C]-DLin-MC3-DMA and Metabolites in Rat Plasma, Urine, Bile, Feces, and Tissues; and Bioanalysis of ALN-18328 in Rat Plasma, Plasma Ultrafiltrate, and Tissues (続き)

<p>Study Title: Identification, Profiling, and Quantitation of [¹⁴C]-DLin-MC3-DMA and Metabolites in Rat Plasma, Urine, Bile, Feces, and Tissues; and Bioanalysis of ALN-18328 in Rat Plasma, Plasma Ultrafiltrate, and Tissues</p>	<p>Test Article: Patisiran-LNP Study No. [REDACTED] 319N-1201 (Samples from [REDACTED] 319-1103)</p>
<p>Based on the proposed metabolites formed by the metabolism of ¹⁴C-DLin-MC3-DMA, single oxidation, double oxidation, and hydrolysis metabolism pathways for in DLin-MC3-DMA is proposed as shown below. Proposed Metabolic Pathway:</p> <p>DLin-MC3-DMA (plasma, liver, kidney, spleen, feces)</p> <p>oxidation (+32 Da) M1, M2 (plasma)</p> <p>oxidation (+16 Da) M3 (plasma, liver, spleen)</p> <p>oxidation (+14 Da) M4 (plasma, liver, spleen)</p> <p>N-oxide M5 (plasma)</p> <p>N,N-dimethyl butyric acid M6 (plasma, bile, urine, feces, liver, kidney, spleen)</p>	

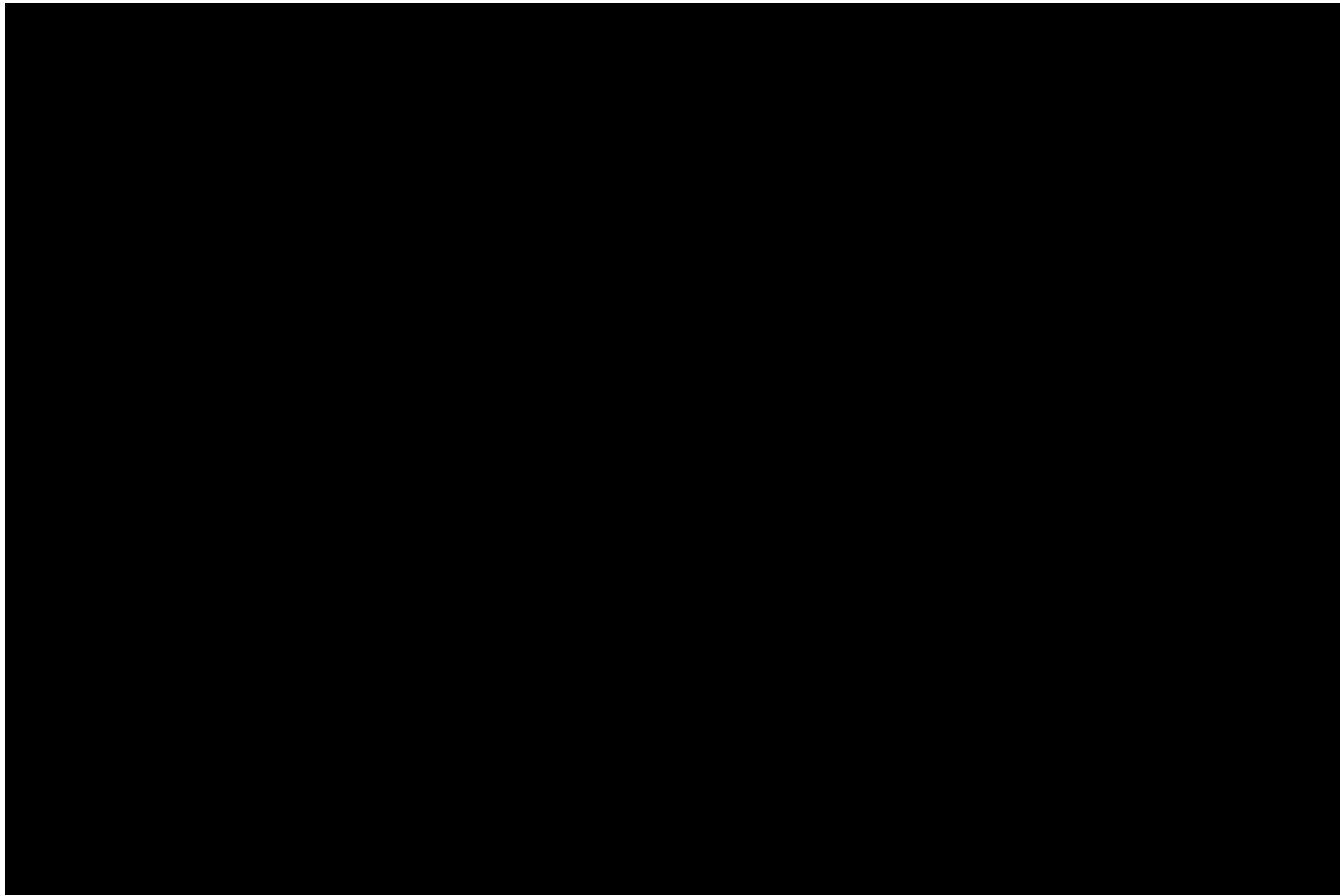
2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.9.C Profiling and Identification of Metabolites of ¹⁴C-ALN-TTR02 in Selected Plasma, Urine, and Feces Samples after a Single Intravenous Administration of ¹⁴C-ALN-TTR02 to Monkeys

Study Title: Profiling and Identification of Metabolites of ¹⁴C-ALN-TTR02 in Selected Plasma, Urine, and Feces Samples after a Single Intravenous Administration of ¹⁴C-ALN-TTR02 to Monkeys		Test Article: Patisiran-LNP
		Study No. TTR02-DSM16-013
Metabolite Profiling and Identification by LC/MS/MS: Samples from 3 male and 3 female cynomolgus monkeys following a single intravenous administration of 0.3 mg/kg ¹⁴ C-ALN-TTR02 (14C-DLin-MC3-DMA approximately 50 µCi/kg).		
Matrix	Metabolites Detected	
Plasma	M2, DLin-MC3-DMA, M25	
Urine	M25, M27	
Feces	DLin-MC3-DMA, M25	
Metabolite M2: dioxy-DLin-MC3-DMA Metabolite M25: 4-(dimethylamino)butyric acid Metabolite M27: oxy-[4-(dimethylamino)]butyric acid		

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.9.C Profiling and Identification of Metabolites of ¹⁴C-ALN-TTR02 in Selected Plasma, Urine, and Feces Samples after a Single Intravenous Administration of ¹⁴C-ALN-TTR02 to Monkeys (続き)

Study Title: Profiling and Identification of Metabolites of ¹⁴C-ALN-TTR02 in Selected Plasma, Urine, and Feces Samples after a Single Intravenous Administration of ¹⁴C-ALN-TTR02 to Monkeys	Test Article: Patisiran-LNP Study No. TTR02-DSM16-013
<p>¹⁴C-ALN-TTR02 was rapidly metabolized in monkeys via oxidation and hydrolysis, with hydrolysis as a major pathway. Metabolite profiles of males and females were similar, suggesting no sex differences.</p> <p>Proposed Metabolic Pathway:</p>	

10 薬物動態試験－In Vitro における代謝

表 2.6.5.10.A In Vitro Metabolic Stability of Unformulated ALN-18328 in Mouse, Rat, Monkey, and Human Liver Cytosol

Study Title: In Vitro Metabolic Stability of Unformulated ALN-18328 in Mouse, Rat, Monkey, and Human Liver Cytosol						Test Article: ALN-18328		
						Study No. TTR-ST10-008		
Time (h)	Percentage Remaining of ALN-18328							
	Mouse Liver Cytosol		Rat Liver Cytosol		Monkey Liver Cytosol		Human Liver Cytosol	
	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense
0	100	100	100	100	100	100	100	100
0.083	105	100	104	98	101	95	99	100
0.25	106	101	104	106	99	96	95	94
0.5	114	108	104	102	99	91	100	99
1	102	96	101	101	102	90	99	98
2	109	100	104	104	104	98	99	99
4	103	84	103	96	96	89	103	103
6	90	ND	95	91	92	86	98	98

Abbreviations: ND=not determined.

Additional Information: Following 6 hours incubation of unformulated ALN-18328 in mouse, rat, monkey, and human liver cytosols at 37°C, the percent remaining of antisense strand of ALN-18328 was approximately 90, 95, 92, and 98%, respectively, while the percent remaining sense strand of ALN-18328 was approximately 84 (after 4-hour incubation), 91, 86, and 98%, respectively.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.10.B In Vitro Metabolic Stability of ALN-TTR02 as Determined by the Stability of the siRNA Component ALN-18328, in Mouse, Rat, Monkey and Human Serum

Study Title: <i>In vitro</i> Metabolic Stability of ALN-TTR02 as Determined by the Stability of the siRNA Component ALN-18328, in Mouse, Rat, Monkey and Human Serum							Test Article: Patisiran-LNP	
							Study No. TTR-ST10-002	
Time (h)	Percentage Remaining of ALN-18328							
	Mouse Serum		Rat Serum		Monkey Serum		Human Serum	
	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense
0	100	100	100	100	100	100	100	100
0.5	92	93	91	88	82	85	105	104
1	95	97	82	86	65	73	102	101
2	86	88	82	82	54	57	102	100
4	81	84	74	72	46	48	102	101
6	66	66	74	75	46	47	96	96
8	64	66	71	71	45	47	101	102
24	66	62	65	71	42	44	102	102

Abbreviations: LNP=lipid nanoparticle; siRNA= small interfering RNA.

Additional Information: Following 24 hours incubation of patisiran-LNP in mouse, rat, monkey, and human sera at 37°C, the percent remaining of ALN-18328 antisense strand was 66, 65, 42, and 102%, respectively, while the percent remaining of ALN-18328 sense strand was approximately 62, 71, 44, and 102%, respectively.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.10.C In Vitro Metabolic Stability of ALN-TTR02 as Determined by the Stability of the siRNA Component ALN-18328, in Mouse, Rat, Monkey, and Human Liver Cytosol

Study Title: <i>In vitro</i> Metabolic Stability of ALN-TTR02 as Determined by the Stability of the siRNA Component ALN-18328, in Mouse, Rat, Monkey, and Human Liver Cytosol						Test Article: Patisiran-LNP		
						Study No. TTR-ST10-001		
Time (h)	Percentage Remaining of ALN-18328							
	Mouse Liver Cytosol		Rat Liver Cytosol		Monkey Liver Cytosol		Human Liver Cytosol	
	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense
0	100	100	100	100	100	100	100	100
0.083	100	100	101	100	97	101	95	93
0.25	97	97	102	100	94	93	100	94
0.5	110	108	96	95	95	94	101	99
1	94	91	92	90	97	92	91	91
2	92	86	88	84	87	82	97	92
4	85	78	87	81	85	80	94	91
6	85	77	88	82	84	83	102	100

Abbreviations: LNP=lipid nanoparticle.

Additional Information: Following a 6-hour incubation in mouse, rat, monkey, and human liver cytosol at 37°C, the percent remaining of ALN-18328 antisense strand were approximately 85, 88, 84, and 102%, respectively, while the percent remaining sense strand of ALN-18328 were approximately 77, 82, 83, and 100%, respectively.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.10.D In Vitro Metabolic Stability and Metabolic Profiling of ALN-18328 in Mouse, Rat, Monkey, and Human Serum and Liver S9 Fractions

Study Title: In Vitro Metabolic Stability and Metabolic Profiling of ALN-18328 in Mouse, Rat, Monkey, and Human Serum and Liver S9 Fractions						Test Article: ALN-18328		
						Study No. BA16027		
Time (h)	Percent Remaining ALN-18328 in Serum							
	Mouse		Rat		Cynomolgus Monkey		Human	
	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense
0	100	100	100	100	100	100	100	100
0.5	17	16	7	4	46	33	43	31
2	0.07	0.05	0.04	0.03	4	1	4	1
4	0.01	0.04	0.01	0.02	0.21	0.07	0.26	0.10
8	ND	0.02	0.01	0.01	ND	0.01	ND	0.01
24	ND	0.01	ND	0.01	ND	ND	ND	0.01
Time (h)	Percent Remaining ALN-18328 in Liver S9 Fractions							
	Mouse		Rat		Cynomolgus Monkey		Human	
	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense	Antisense	Sense
0	100	100	100	100	100	100	100	100
0.5	75	82	14	14	67	65	83	81
2	43	47	0.09	0.11	4	3	71	74
4	15	19	0.07	0.08	0.10	0.08	55	54
8	2	3	0.04	0.08	0.04	0.05	23	17
24	0.07	0.11	0.07	0.05	0.05	0.06	0.73	0.38

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.10.D In Vitro Metabolic Stability and Metabolic Profiling of ALN-18328 in Mouse, Rat, Monkey, and Human Serum and Liver S9 Fractions (続き)

Study Title: In Vitro Metabolic Stability and Metabolic Profiling of ALN-18328 in Mouse, Rat, Monkey, and Human Serum and Liver S9 Fractions	Test Article: ALN-18328
Study No. BA16027	
<p>Proposed metabolic pathway of ALN-18328:</p> <p>Parent sequence Sense 5'-GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT-3'</p> <p> Antisense 5'-AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT-3'</p> <p>Sense</p> <p>5'-GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT-3'</p> <p>Exonuclease Exonuclease Exonuclease</p> <p>Antisense</p> <p>5'-AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT-3'</p> <p>Exonuclease Exonuclease Exonuclease</p> <p>The diagram illustrates the proposed metabolic pathway for ALN-18328. It shows the parent sense and antisense sequences and their degradation into various metabolites by exonucleases. The sense sequence is 5'-GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT-3' and the antisense sequence is 5'-AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT-3'. The sense sequence is shown being degraded by exonucleases at three different positions, resulting in three different metabolites. The antisense sequence is shown being degraded by exonucleases at three different positions, resulting in three different metabolites. The parent sequences are shown in red, and the metabolites are shown in black boxes.</p>	

Abbreviations: ND=not detected.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.10.E In Vitro Metabolic Stability of DLin-MC3-DMA Using Liver Microsomes and Liver S9 Fractions from CD-1 Mice, Sprague Dawley Rats, Cynomolgus Monkeys, and Humans (as quantified by LC/MS/MS)

Study Title: Metabolic Stability of DLin-MC3-DMA Using Liver Microsomes and Liver S9 Fractions from CD-1 Mice, Sprague Dawley Rats, Cynomolgus Monkeys, and Humans (as quantified by LC/MS/MS)							Test Article: Patisiran-LNP	
							Study No.	319N-1001
Incubation Time (min)	Percentage Remaining of DLin-MC3-DMA							
	Mouse Liver:		Rat Liver:		Monkey Liver:		Human Liver:	
	Microsomes	S9 Fraction	Microsomes	S9 Fraction	Microsomes	S9 Fraction	Microsomes	S9 Fraction
0	100	100	100	100	100	100	100	100
5	109.	93.9	103	91.8	104	90.5	95.7	91.5
10	96.6	93.4	98.7	90.0	95.5	92.1	97.7	89.4
20	99.8	88.5	83.6	84.8	94.9	93.4	96.9	91.9
30	79.7	89.9	80.9	86.8	75.4	96.6	88.6	94.8
60	80.8	89.2	78.3	90.1	73.2	94.3	76.4	95.7

Additional Information: At the 60-minute incubation time point, DLin-MC3-DMA was slightly metabolized in liver microsomes of the 4 tested species; 80.8%, 78.3%, 73.2%, and 76.4% of DLin-MC3-DMA remained in mouse, rat, monkey, and human liver microsomes, respectively. At the 60-minute incubation time point, DLin-MC3-DMA was relatively stable in liver S9 fractions of the 4 tested species; 89.2%, 90.1%, 94.3%, and 95.7% of DLin-MC3-DMA remained in mouse, rat, monkey, and human liver S9 fractions, respectively.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.10.F In Vitro Metabolic Stability of DLin-MC3-DMA Using Liver Microsomes and Liver S9 Fractions from CD-1 Mice, Sprague Dawley Rats, Cynomolgus Monkeys, and Humans (as quantified by LC/MS/MS)

Study Title: Metabolic Stability of DLin-MC3-DMA Using Liver Microsomes and Liver S9 Fractions from CD-1 Mice, Sprague Dawley Rats, Cynomolgus Monkeys, and Humans (as quantified by LC/MS/MS)	Test Article: Patisiran-LNP
	Study No. ■■■ 319N-1002
<p>The metabolite profile of DLin-MC3-DMA by mouse, rat, monkey, and human liver microsomes incubations showed the formation of single oxidation and double oxidation metabolites. In addition, the glutathione (GSH) adducts of the single oxidation metabolites were observed as the doubly changed ion in the liver microsome incubations for all the tested species. The metabolites profile of DLin-MC3-DMA by mouse, rat, monkey and human liver S9 incubations showed the formation of single oxidation and double oxidation metabolites. Single. The phase II conjugation metabolites, such as sulfation and glucuronidation, were not observed in the S9 fraction incubations. The metabolite profiles were similar in the different species for both liver microsomal and S9 fraction incubations. The ratios of double oxidation metabolites to single oxidation metabolites were higher in the liver S9 fraction incubations.</p> <p>The metabolite profiles of DLin-MC3-DMA were similar in mouse, rat, monkey, and human liver microsomes or S9 incubations. The liver microsomes or S9 incubations showed the formation of single oxidation and double oxidation metabolites.</p>	

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.10.G In Vitro Metabolic Stability and Metabolite Profiling and Identification of PEG₂₀₀₀-C-DMG Using Liver Microsomes and S9 Fractions from CD-1 Mice, Sprague Dawley Rats, Cynomolgus Monkeys, and Humans

Study Title: Metabolic Stability and Metabolite Profiling and Identification of PEG₂₀₀₀-C-DMG Using Liver Microsomes and S9 Fractions from CD-1 Mice, Sprague Dawley Rats, Cynomolgus Monkeys, and Humans						Test Article: Patisiran-LNP		
						Study No. ■■■ 319N-1305		
Method: The metabolic stability and the profiling and identification of PEG ₂₀₀₀ -C-DMG metabolites were evaluated in liver microsomes and S9 fractions from CD-1 mice, Sprague Dawley rats, cynomolgus monkey, and humans incubated at 37°C at a final PEG ₂₀₀₀ -C-DMG concentrations of 2 mM (metabolic stability) and 20 µM (metabolite profiling and identification) at different time points up to 60 minutes in microsomes and S9 fractions. Metabolic stability was analyzed by HPLC-MS/MS methods; metabolic profiling and identification was performed by LC-HRMS and LC-MS/MS versus HPLC-MS/MS.								
Percent (%) of PEG₂₀₀₀-C-DMG Remaining								
Species:	Mouse		Rat		Cynomolgus Monkey		Human	
Time (min)	Microsomes	S9 Fraction	Microsomes	S9 Fraction	Microsomes	S9 Fraction	Microsomes	S9 Fraction
0	100	100	100	100	100	100	100	100
5	98	102	100	98	97	97	103	104
10	98	107	102	99	94	101	101	90
20	97	102	107	96	102	100	105	104
30	101	103	105	102	101	100	98	105
60	101	98	106	105	100	97	101	98

Abbreviations: HPLC=high performance liquid chromatography; HRMS=high resolution mass spectrometry; LC=liquid chromatography; LNP=lipid nanoparticle; MS=mass spectrometry.

Additional Information: The percentage of remaining PEG₂₀₀₀-C-DMG after 60-minute incubation was 97-107% in the incubations of liver microsomes and S9 fractions from mouse, rat, monkey, and human. PEG₂₀₀₀-C-DMG was stable in all incubations.

The metabolite profile of PEG₂₀₀₀-C-DMG in mouse, rat, monkey and human liver microsomal and S9 fraction incubations showed *O*-detetradecylation as the only metabolic pathway with metabolites identified as M1, M2, and M3. The metabolite profiles of PEG₂₀₀₀-C-DMG in monkey and humans were similar, and were similar in liver microsomal and S9 incubations. No metabolites were detected in mice and rats' liver microsomal and S9 fraction incubations.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.10.H Evaluation of Potential Human Cytochrome P450 Isoforms Involved in the Metabolism of ALN-18328 using cDNA Expressed Enzymes

Study Title: Evaluation of Potential Human Cytochrome P450 Isoforms Involved in the Metabolism of ALN-18328 using cDNA Expressed Enzymes						Test Article: ALN-18328		
						Study No. ■■■ 319N-1616		
Metabolite Profiling and Identification by HPLC-HRMS: The metabolism of ALN-18328 by 8 individual human drug metabolizing CYP450 enzymes was evaluated using recombinant human cytochrome P450 (rCYP) enzymes: CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, or CYP3A5. The evaluations were performed at 2 concentrations of ALN-18328: 10 µg/mL (0.745 µmol/L) and 100 µg/mL (7.45 µmol/L).								
Results: ALN-18328 is not a substrate of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, or CYP3A5.								
Percent Remaining of ALN-18328 after Incubation with rCYP Enzymes^a								
Incubation	rCYP1A2	rCYP2B6	rCYP2C8	rCYP2C9	rCYP2C19	rCYP2D6	rCYP3A4	rCYP3A5
10 µg/mL (0.745 µmol/L) ALN-18328								
45 min -NADPH	106 ± 2	98.1 ± 1.0	96.1 ± 2.4	99.9 ± 7.9	99.0 ± 11.1	105 ± 6	103 ± 11	105 ± 9
45 min +NADPH	97.0 ± 7.0	102 ± 9	90.7 ± 6.0	101 ± 7	97.8 ± 6.6	99.1 ± 8.4	102 ± 5	105 ± 12
100 µg/mL (7.45 µmol/L) ALN-18328								
45 min -NADPH	93.5 ± 10.2	98.3 ± 13.5	114 ± 12	90.4 ± 4.1	110 ± 18	101 ± 4	92.0 ± 7.2	99.4 ± 16.7
45 min +NADPH	90.1 ^b	100 ± 13	97.1 ± 2.0	99.9 ± 2.9	104 ± 3	98.7 ± 8.7	89.4 ± 5.5	91.5 ± 11.7
CYP Probe Substrate Controls								
Incubation	rCYP1A2	rCYP2B6	rCYP2C8	rCYP2C9	rCYP2C19	rCYP2D6	rCYP3A4	rCYP3A5
	Phenacetin	Bupropion	Paclitaxel	Diclofenac	S-Mephenytoin	Dextromethorphan	Midazolam	Midazolam
30 min	69.3 ± 5.6	70.0 ± 4.6	67.1 ± 10.4	BLQ	63.7 ± 4.1	BLQ	0.0895 ± 0.0171	0.149 ± 0.020

Abbreviations: BLQ=below the limit of quantification; cDNA=complementary deoxyribonucleic acid; CYP=cytochrome P450; rCYP=recombinant cytochrome P450.

^a Data is presented as mean ± standard deviation (N=3).

^b Average of 2 values.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.10.I Metabolite Profiling and Identification of DLin-MC3-DMA Using Human Supersomes: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4

Study Title: Metabolite Profiling and Identification of DLin-MC3-DMA Using Human Supersomes: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4		Test Article: Patisiran-LNP
		Study No. ■■■ 319D-1304
<p>Metabolite Profiling and Identification by HPLC-HRMS: The metabolite profiling of DLin-MC3-DMA was evaluated in 8 individual human drug metabolizing CYP450 enzymes: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4, by incubating 20 µmol/L (12.842 µg/mL) of DLin-MC3-DMA with human CYP supersomes at protein concentration of 30 pmol/mL. Phenacetin, coumarin, bupropion, amodiaquine, tolbutamide, S-mephenytoin, dextromethorphan, and midazolam were used as positive control probe substrates, respectively.</p>		
<p>Results: DLin-MC3-DMA, a lipid component of patisiran-LNP, was metabolized by CYP3A4, CYP2C8, CYP2A6, CYP2C9, and CYP2C19, but not by CYP1A2, CYP2B6, and CYP2D6. The metabolites observed are formed by single and multiple oxidation, and carboxylation.</p>		
Human CYP450 Isoforms	Parent (DLin-MC3-DMA)/Metabolites Detected	
CYP1A2	DLin-MC3-DMA	
CYP2A6	DLin-MC3-DMA/ M1, M3	
CYP2B6	DLin-MC3-DMA	
CYP2C8	DLin-MC3-DMA/ M1, M13, M14, M16	
CYP2C9	DLin-MC3-DMA/ M4, M5, M6, M7, M11, M12, M13, M15	
CYP2C19	DLin-MC3-DMA/ M12	
CYP2D6	DLin-MC3-DMA	
CYP3A4	DLin-MC3-DMA/ M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16	
<p>Metabolites M1, M3, M5, M8, M13, and M16: proposed as double oxidation product of DLin-MC3-DMA (+32 Da) with the 2 oxygen atoms added to the alkyl chain. Metabolites M2, M4, and M7: proposed as tri-oxidation products of DLin-MC3-DMA (+48 Da) with the 3 oxygen atoms added to the alkyl chain. Metabolites M6, M9, and M10: proposed as carboxylation products of DLin-MC3-DMA (+30 Da) with 1 carboxylic acid added to the alkyl chain. Metabolites M11 and M14: proposed as ketone formation products of DLin-MC3-DMA (+14 Da) with the 1 oxygen atom added to the alkyl chain. Metabolites M12 and M15: proposed as a single oxidation product of DLin-MC3-DMA (+16 Da) with the 1 oxygen atom added to the alkyl chain.</p>		

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.10.I Metabolite Profiling and Identification of DLin-MC3-DMA Using Human Supersomes: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4 (続き)

<p>Study Title: Metabolite Profiling and Identification of DLin-MC3-DMA Using Human Supersomes: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4</p>	<p>Test Article: Patisiran-LNP Study No. [REDACTED] 319D-1304</p>
<p>Based on the proposed metabolites formed by the metabolism of DLin-MC3-DMA, single oxidation, multiple oxidation, and carboxylation metabolism pathways for DLin-MC3-DMA is proposed as shown below. Proposed Metabolic Pathway:</p> <p>DLin-MC3-DMA</p> <p>Carboxylation (+30 Da) M6, M9, M10 (CYP3A4, CYP2C9)</p> <p>Tri-oxidation (+48 Da) M2, M4, M7 (CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9)</p> <p>Di-oxidation (+32 Da) M1, M3, M5, M8, M13, M16 (CYP3A4, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9)</p> <p>Oxidation (+16 Da) M12, M15 (CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19)</p> <p>Oxidation (+14 Da) M11, M14 (CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9)</p>	

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.10.J Evaluation of Potential Human Cytochrome P450 Isoforms Involved in the Metabolism of PEG₂₀₀₀-C-DMG using cDNA Expressed Enzymes

Study Title: Evaluation of Potential Human Cytochrome P450 Isoforms Involved in the Metabolism of PEG ₂₀₀₀ -C-DMG using cDNA Expressed Enzymes							Test Article: Patisiran-LNP	
							Study No. ■■■ 319N-1615	
Metabolite Profiling and Identification by HPLC-HRMS: The metabolite profiling of PEG ₂₀₀₀ -C-DMG was evaluated in 8 individual human drug metabolizing CYP450 enzymes: CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, and CYP3A5, using human CYP supersomes at protein concentration of 50 pmol/mL. Phenacetin, bupropion, paclitaxel, diclofenac, (S)-mephenytoin, dextromethorphan, and midazolam were used as the as the positive control probe substrates, respectively.								
Results: PEG ₂₀₀₀ -C-DMG, a component of the lipid nanoparticle formulation, was not metabolized by CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, or CYP3A5.								
Percent Remaining of PEG ₂₀₀₀ -C-DMG after Incubation with rCYP Enzymes ^a								
Incubation	rCYP1A2	rCYP2B6	rCYP2C8	rCYP2C9	rCYP2C19	rCYP2D6	rCYP3A4	rCYP3A5
10 µg/mL (3.60 µmol/L) PEG ₂₀₀₀ -C-DMG								
45 min -NADPH	91.2 ± 6.7	90.6 ± 4.6	92.6 ± 5.0	85.7 ± 4.9	90.9 ± 7.6	87.3 ± 4.2	101 ± 4	96.1 ± 1.2
45 min +NADPH	99.2 ± 1.7	101 ± 9	96.0 ± 6.5	106 ± 4	93.5 ± 4.0	95.7 ± 2.6	86.4 ± 2.8	97.6 ± 6.9
100 µg/mL (36.0 µmol/L) PEG ₂₀₀₀ -C-DMG								
45 min -NADPH	92.0 ± 11.7	89.1 ± 4.1	96.7 ± 3.5	89.8 ± 9.2	97.1 ± 6.3	87.1 ± 2.1	109 ^b	92.2 ± 6.7
45 min +NADPH	97.6 ± 3.9	89.8 ± 4.8	96.2 ^{b,c}	93.8 ± 7.6	104 ± 2	92.0 ± 4.9	92.4 ± 2.4	95.1 ± 5.1

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.10.J Evaluation of Potential Human Cytochrome P450 Isoforms Involved in the Metabolism of PEG₂₀₀₀-C-DMG using cDNA Expressed Enzymes (続き)

Study Title: Evaluation of Potential Human Cytochrome P450 Isoforms Involved in the Metabolism of PEG₂₀₀₀-C-DMG using cDNA Expressed Enzymes						Test Article: Patisiran-LNP		
						Study No. ■■■ 319N-1615		
Percent Remaining of PEG₂₀₀₀-C-DMG after Incubation with rCYP Enzymesa								
CYP Probe Substrate Controls								
Incubation	rCYP1A2	rCYP2B6	rCYP2C8	rCYP2C9	rCYP2C19	rCYP2D6	rCYP3A4	rCYP3A5
	Phenacetin	Bupropion	Paclitaxel	Diclofenac	S-Mephenytoin	Dextromethorphan	Midazolam	Midazolam
30 min	66.7 ± 3.6	59.9 ± 3.9	27.0 ± 4.5	BLQ	57.4 ± 13.3	BLQ	0.0854 ± 0.0365	0.171 ± 0.003

Abbreviations: BLQ=below the limit of quantification; cDNA=complementary deoxyribonucleic acid; CYP=cytochrome P450; LNP=lipid nanoparticle; rCYP=recombinant cytochrome P450.

a Data is presented as mean ± standard deviation (N=3).

b Average of 2 values.

c One of the T0 points was substituted by the mean of the T0 negative control.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

11 薬物動態試験－推定代謝経路

9項参照

12 薬物動態試験－薬物代謝酵素の誘導/阻害

表 2.6.5.12.A Evaluation of the Inhibitory Potential of siRNA ALN-18328 Against Five Principal Human Cytochrome P450 Isozymes Using Human Liver Microsomes

Study Title: Evaluation of the Inhibitory Potential of siRNA ALN-18328 Against Five Principal Human Cytochrome P450 Isozymes Using Human Liver Microsomes					Test Article: ALN-18328	
					Study No. [REDACTED] 319N-1004	
Method: The inhibitory potential of siRNA ALN-18328 on five principal human drug metabolizing enzyme cytochrome P450s, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4/5 activity was evaluated in pooled human liver microsomes at concentrations up to 6.34 µmol/L (85.2 µg/mL) using phenacetin, tolbutamide, S-mephenytoin, dextromethorphan, midazolam, and testosterone as the probe substrates, respectively.						
Results: ALN-18328, the siRNA component of patisiran-LNP, in pooled human liver microsomes did not inhibit CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, or CYP3A4/5 in human hepatic microsomes at concentrations ranging from 0.0000968 to 6.34 µmol/L (0.0013 to 85.2 µg/mL).						
Mean IC₅₀ (µmol/L) for Positive Controls						
CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5 ^a	CYP3A4/5 ^b	
1.20	0.26	20.8	0.12	0.60	0.54	
Mean IC₅₀ (µmol/L) for ALN-18328						
CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5 ^a	CYP3A4/5 ^b	
>6.34	>6.34	>6.34	>6.34	>6.34	>6.34	

Abbreviations: IC₅₀=inhibitor concentration which inhibits maximal activity by 50%.

^a Midazolam was used as substrate.

^b Testosterone was used as substrate.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.12.B Evaluation of the Inhibitory Potential of DLin-MC3-DMA against Eight Principal Human Cytochrome P450 Isozymes Using Human Liver Microsomes

Study Title: Evaluation of the Inhibitory Potential of DLin-MC3-DMA against Eight Principal Human Cytochrome P450 Isozymes Using Human Liver Microsomes							Test Article: Patisiran-LNP	
							Study No. [REDACTED] 319N-1003	
Method: The inhibitory potential of DLin-MC3-DMA on eight principal human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4/5, was evaluated using pooled human liver microsomes at concentrations up to 30 µmol/L using phenacetin, coumarin, bupropion, amodiaquine, tolbutamide, S-mephenytoin, dextromethorphan, midazolam, and testosterone as the probe substrates, respectively.								
Results: DLin-MC3-DMA, a lipid component of patisiran-LNP, in pooled human liver microsomes did not inhibit CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, or CYP3A4/5 in human hepatic microsomes at concentrations ranging from 0.00913 µmol/L to 30 µmol/L (0.00590 to 19.3 µg/mL).								
Mean IC₅₀ (µmol/L) for Positive Controls								
CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5 ^a	CYP3A4/5 ^b
1.4	0.1	3.4	2.7	0.2	18.1	0.1	0.1	0.1
Mean IC₅₀ (µmol/L) for DLin-MC3-DMA								
CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5 ^a	CYP3A4/5 ^b
>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30

Abbreviations: CYP=cytochrome P450; IC₅₀=inhibitor concentration which inhibits maximal activity by 50%; LNP=lipid nanoparticle.

^a Midazolam was used as substrate.

^b Testosterone was used as substrate.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.12.C Evaluation of the Inhibitory Potential of PEG₂₀₀₀-C-DMG Against Eight Principal Human Cytochrome P450 Isozymes Using Human Liver Microsomes

Study Title: Evaluation of the Inhibitory Potential of PEG₂₀₀₀-C-DMG Against Eight Principal Human Cytochrome P450 Isozymes Using Human Liver Microsomes						Test Article: Patisiran-LNP		
						Study No. ■■■ 319N-1303		
Method: The inhibitory potential of PEG ₂₀₀₀ -C-DMG on 8 principal human drug metabolizing CYP450 enzymes. CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4/5 (using midazolam and testosterone as substrates) activity was evaluated using pooled human liver microsomes at PEG ₂₀₀₀ -C-DMG concentrations up to 150 µmol/L or 420 µg/mL and using phenacetin, coumarin, bupropion, amodiaquine, tolbutamide, S-mephenytoin, dextromethorphan, midazolam, and testosterone as probe substrates, respectively.								
Results: PEG ₂₀₀₀ -C-DMG, a lipid component of patisiran-LNP, in pooled human liver microsomes did not inhibit CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4/5 in human liver microsomes at concentrations up to 150 µmol/L or 420 µg/mL. However, minor increase of enzyme activity, as measured by probe substrate metabolite(s) formation, was observed for CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, and CYP2C19, suggesting CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, and CYP2C19 enzyme activities may be influenced by higher PEG ₂₀₀₀ -C-DMG concentration.								
Mean IC₅₀ (µmol/L) for Positive Controls								
CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5 ^a	CYP3A4/5 ^b
1.00	0.07	5.00	2.06	0.14	9.73	0.07	0.30	0.32
Mean IC₅₀ (µmol/L) for PEG₂₀₀₀-C-DMG								
CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5 ^a	CYP3A4/5 ^b
>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150

Abbreviations: CYP=cytochrome P450; IC₅₀=inhibitor concentration which inhibits maximal activity by 50%; LNP=lipid nanoparticle.

^a Midazolam was used as substrate.

^b Testosterone was used as substrate.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.12.D Evaluation of the Potential of ALN-18328 to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes

Study Title: Evaluation of the Potential of ALN-18328 to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes		Test Article: ALN-18328	
		Study No. ■■■ 319N-1306	
Method: The induction potential of ALN-18328 on 3 principal human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4, was determined by evaluating mRNA expression and enzyme activities in primary cultures of human hepatocytes, at 3 concentrations: 0.55, 5.5, and 275 µg/mL (41 nmol/L, 410 nmol/L, and 20.5 µmol/L, respectively). Enzyme activity levels of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 were measured in situ with a cocktail of phenacetin, bupropion, and midazolam using qualified LC-MS/MS methods. Measurement of mRNA levels was evaluated using RT-PCR.			
Results: ALN-18328 did not cause significant induction of CYP1A2, CYP2B6, or CYP3A4 up to the highest concentration tested, 275 µg/mL (20.5 µmol/L), in the 3 human hepatocyte batches tested.			
Fold mRNA Changes in Hepatocytes Treated with ALN-18328^a			
Donor No.	0.55 µg/mL (41 nmol/L)	5.5 µg/mL (410 nmol/L)	275 µg/mL (20.5 µmol/L)
CYP1A2			
1	1.18±0.10	0.98±0.05	1.12±0.09
2	0.83±0.05	0.68±0.22	1.14±1.16
3	0.77±0.15	0.79±0.18	1.04±0.44
CYP2B6			
1	1.09±0.09	0.87±0.09	0.87±0.13
2	0.56±0.04	0.45±0.21	0.46±0.48
3	0.66±0.15	0.68±0.02	1.00±0.44
CYP3A4			
1	1.31±0.17	0.97±0.12	1.14±0.03
2	0.84±0.04	0.70±0.18	0.90±0.94
3	0.94±0.10	0.92±0.04	1.22±0.33

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.12.D Evaluation of the Potential of ALN-18328 to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes (続き)

Study Title: Evaluation of the Potential of ALN-18328 to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes		Test Article: ALN-18328	
		Study No. ■■■ 319N-1306	
% Change in Enzyme Activity in Hepatocytes Treated with ALN-18328 ^b			
Donor No.	0.55 µg/mL (41 nmol/L)	5.5 µg/mL (410 nmol/L)	275 µg/mL (20.5 µmol/L)
CYP1A2			
1	0.17	-2.21	-0.69
2	-0.31	-1.67	-0.45
3	-0.35	-0.12	0.34
CYP2B6			
1	11.4	13.6	1.50
2	-1.78	-2.42	-1.82
3	-0.47	0.09	0.68
CYP3A4			
1	-1.35	-3.45	-2.89
2	-5.33	-7.60	-5.04
3	0.53	2.20	6.55

Abbreviations: CYP=cytochrome P450; LC=liquid chromatography; mRNA=messenger RNA; MS=mass spectrometry; RT-PCR= Reverse transcription polymerase chain reaction.

a Data is mean ± standard deviation. The fold change over control is calculated by dividing the normalized mRNA values for each sample by the average of the normalized mRNA value for the vehicle control.

b Percent of positive control is calculated by subtracting the vehicle control activity from the treatment condition activity and dividing by the vehicle control corrected positive control activity and multiplying by 100.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.12.E Evaluation of the Potential of DLin-MC3-DMA to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes

Study Title: Evaluation of the Potential of DLin-MC3-DMA to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes		Test Article: Patisiran-LNP	
		Study No. ■■■ 319N-1307	
Method: The induction potential of DLin-MC3-DMA on 3 principal human drug metabolizing enzyme cytochrome P450s, CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 mRNA expression and enzyme activities was evaluated in primary cultures of human hepatocytes at 3 concentrations: 0.642, 6.42, and 19.3 µg/mL (1, 10, and 30 µmol/L, respectively). Activity levels of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 were measured in situ with a cocktail of phenacetin, bupropion, and midazolam using qualified LC-MS/MS methods.			
Results: DLin-MC3-DMA did not cause significant induction of CYP1A2, CYP2B6, or CYP3A4 up to the highest concentration tested, 19.3 µg/mL (30 µmol/L).			
mRNA Changes in Hepatocytes Treated with DLin-MC3-DMA ^a			
Donor No.	0.642 µg/mL (1 µmol/L)	6.42 µg/mL (10 µmol/L)	19.3 µg/mL (30 µmol/L)
CYP1A2			
1	0.97±0.01	1.37±0.33	1.18±0.14
2	1.29±0.12	1.31±0.48	0.86±0.12
3	1.12±0.48	0.61±0.28	0.68±0.06
CYP2B6			
1	0.88±0.04	0.98±0.06	0.97±0.09
2	0.67±0.05	0.68±0.24	0.58±0.14
3	0.49±0.23	0.50±0.16	0.68±0.09
CYP3A4			
1	1.09±0.38	0.85±0.06	1.09±0.14
2	0.86±0.08	0.90±0.15	0.67±0.12
3	0.57±0.33	0.60±0.31	0.66±0.13

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.12.E Evaluation of the Potential of DLin-MC3-DMA to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes (続き)

Study Title: Evaluation of the Potential of DLin-MC3-DMA to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes		Test Article: Patisiran-LNP	
		Study No. ■■■ 319N-1307	
Relative Activity (%) in Hepatocytes Treated with DLin-MC3-DMA ^b			
Donor No.	0.642 µg/mL (1 µmol/L)	6.42 µg/mL (10 µmol/L)	19.3 µg/mL (30 µmol/L)
CYP1A2			
1	-0.56	1.39	1.26
2	0.11	-0.79	-0.48
3	-0.53	-0.34	-0.72
CYP2B6			
1	3.95	6.14	0.24
2	-0.69	-1.37	-0.92
3	-1.30	-1.24	-1.52
CYP3A4			
1	-0.46	7.31	6.21
2	0.07	-1.86	1.79
3	-4.38	-1.52	-0.82

Abbreviations: CYP= cytochrome P450; LC=liquid chromatography; mRNA=messenger ribonucleic acid; MS=mass spectrometry.

a Data is mean ± standard deviation. The fold change over control is calculated by dividing the normalized mRNA values for each sample by the average of the normalized mRNA value for the vehicle control.

b Percent of positive control is calculated by subtracting the vehicle control activity from the treatment condition activity and dividing by the vehicle control corrected positive control activity and multiplying by 100.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.12.F Evaluation of the Potential of PEG₂₀₀₀-C-DMG to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes

Study Title: Evaluation of the Potential of PEG ₂₀₀₀ -C-DMG to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes		Test Article: Patisiran-LNP	
		Study No. ■■■ 319N-1308	
Method: The induction potential of PEG ₂₀₀₀ -C-DMG on 3 principal human drug metabolizing enzyme cytochrome P450s, CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 mRNA expression and enzyme activities was evaluated in primary cultures of human hepatocytes at 3 concentrations: 0.42, 4.2 and 210 µg/mL (0.151, 1.51, and 75 µmol/L, respectively). Activity levels of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 were measured in situ with a cocktail of omeprazole, flumazenil, or PEG ₂₀₀₀ -C-DMG using qualified LC-MS/MS methods.			
Results: PEG ₂₀₀₀ -C-DMG did not cause significant induction of CYP1A2, CYP2B6, or CYP3A4 up to the highest concentration tested, 210 µg/mL (75µmol/L).			
mRNA Changes in Hepatocytes Treated with PEG₂₀₀₀-C-DMG^a			
Donor No.	0.42 µg/mL (0.151 µmol/L)	4.2 µg/mL (1.51 µmol/L)	210 µg/mL (75 µmol/L)
CYP1A2			
1	0.66± 0.05	0.69±0.05	1.29±0.11
2	0.65±0.11	1.38±0.08	2.08±0.26
3	0.59±0.05	1.06±0.04	1.78±0.09
CYP2B6			
1	0.92±0.16	1.07±0.15	0.80±0.09
2	0.50±0.15	0.92±0.18	1.15±0.13
3	0.62±0.05	0.91±0.10	1.04±0.06
CYP3A4			
1	1.42±0.10	0.80±0.11	1.34±0.14
2	0.35±0.06	0.85±0.07	1.06±0.08
3	0.81±0.05	1.08±0.12	1.20±0.23

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.12.F Evaluation of the Potential of PEG₂₀₀₀-C-DMG to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes (続き)

Study Title: Evaluation of the Potential of PEG ₂₀₀₀ -C-DMG to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes			Test Article: Patisiran-LNP
Relative Activity (%) in Hepatocytes Treated with PEG ₂₀₀₀ -C-DMG ^b			
Donor No.	0.42 µg/mL (0.151 µmol/L)	4.2 µg/mL (1.51 µmol/L)	210 µg/mL (75 µmol/L)
CYP1A2			
1	0.32	-0.23	1.12
2	-0.33	-0.17	-0.07
3	0.06	0.20	0.19
CYP2B6			
1	2.08	1.42	-1.91
2	-1.25	-2.44	-2.55
3	0.78	1.12	1.98
CYP3A4			
1	-0.09	4.99	10.23
2	-3.12	0.73	5.31
3	2.55	2.25	5.38

Abbreviations: CYP= cytochrome P450; LC=liquid chromatography; LNP=lipid nanoparticle; mRNA=messenger ribonucleic acid; MS=mass spectrometry.

a Data is mean ± standard deviation. The fold change over control is calculated by dividing the normalized mRNA values for each sample by the average of the normalized mRNA value for the vehicle control.

b Percent of positive control is calculated by subtracting the vehicle control activity from the treatment condition activity and dividing by the vehicle control corrected positive control activity and multiplying by 100.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.12.G Evaluation of ALN-TTR02 Effects on Cytochrome P450 and UGT Enzyme Activities in Liver Microsomes from Cynomolgus Monkeys Treated with ALN-TTR02

Study Title: Evaluation of ALN-TTR02 Effects on Cytochrome P450 and UGT Enzyme Activities in Liver Microsomes from Cynomolgus Monkeys Treated with ALN-TTR02						Test Article: Patisiran-LNP		
						Study No. [REDACTED] 319N-1105		
Method: The inhibitory effect of ALN TTR02 on cytochrome P450 CYP enzymes (CYP1A1/2, CYP2C76, CYP2C43, CYP2D6, and CYP3A4) and on UGT (Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase) was evaluated in monkeys that received 4 doses of patisiran-LNP by 1-hour IV infusion bi-weekly at 1 mg/kg/day liver microsomes using phenacetin, tolbutamide, S-mephenytoin, dextromethorphan, midazolam and testosterone as probe substrates respectively.								
Results: There was no significant change in the activity of CYP1A1/2, CYP2C76, CYP2C43, CYP2D6, CYP3A (both Midazolam and Testosterone as substrate) and UGT1A1 in male and female cynomolgus monkeys receiving 4 doses of patisiran-LNP by 1-hour IV infusion bi-weekly at 1 mg/kg/day as compared to animals treated with the vehicle control.								
Mean Enzyme Activity (pmol/min/mg) for Controls (PBS) and Patisiran-LNP treated groups (1 mg/kg)								
		CYP1A1/2	CYP2C76	CYP2C43	CYP2D6	CYP3A4 ^a	CYP3A4 ^b	UGT1A1
Males	PBS	2686.233	500.829	191.757	824.850	13949.576	25104.412	1119.358
	1 mg/kg patisiran-LNP	2526.972	571.013	200.077	975.839	12035.643	18998.420	872.955
Females	PBS	3144.414	544.973	190.600	764.375	12670.194	22743.167	957.162
	1 mg/kg patisiran-LNP	2762.541	558.011	176.229	861.363	13229.440	20061.291	893.316

Abbreviations: CYP= cytochrome P450; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; PBS=phosphate buffered saline.

^a Midazolam was used as substrate.

^b Testosterone was used as substrate.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.12.H ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG: In Vitro Inhibitory Potential Towards Multiple Human Cytochrome P450 Isoforms

Study Title: ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG: In Vitro Inhibitory Potential Towards Multiple Human Cytochrome P450 Isoforms						Test Article: ALN-18328, DLin-MC3-DMA, PEG₂₀₀₀-C-DMG	
						Study No. ■■■ 319N-1807	
Method: The direct inhibitory potential of ALN-18328 on CYP2B6 and CYP2C8 at ALN-18328 concentrations up to 74.5 µM as well as the time-dependent inhibition of ALN-18328, DLin-MC3-DMA and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG on human drug metabolizing CYP enzymes, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4/5 (using midazolam and testosterone as substrates) was evaluated using pooled human liver microsomes. Time-dependent inhibition potential was assessed by two sets of simultaneous incubations where in one set, HLM (1 mg/mL) was pre-incubated at concentrations of ALN-18328 (0, 0.00745, 0.0224, 0.224, 2.24, 7.45, 22.4 and 74.5 µmol/L), DLin-MC3-DMA (0, 0.0823, 0.247, 0.741, 2.22, 6.67, 20 and 30 µM), or PEG ₂₀₀₀ -C-DMG (0, 0.75, 1.5, 7.5, 15, 37.5, 75 and 150 µmol/L) in the presence of NADPH and in the other set, HLM was pre-incubated with the same concentrations of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, or PEG ₂₀₀₀ -C-DMG in the absence of NADPH. The residual CYP isoform activity was evaluated by incubating an aliquot of each pre-incubation mixture with the respective probe substrate reaction mixture (a 1:10 dilution). Pre-incubations with a single concentration of selective chemical inhibitor of the CYP isoform, as positive controls, were conducted concurrently in triplicate for confirmation of enzymatic activity and comparison of inhibition potential.							
Results: ALN-18328 weakly reduced CYP2C8 activity by 23%, however, the IC ₅₀ value was greater than 74.5 µmol/L. ALN-18328 caused direct inhibition of CYP2B6 with an IC ₅₀ value of 45.3 µmol/L. ALN-18328 caused time-dependent inhibition of CYP2B6 but not CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, or CYP3A4/5. Neither DLin-MC3-DMA nor PEG ₂₀₀₀ -C-DMG caused time-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, or CYP3A4/5.							
Mean IC ₅₀ (µmol/L) for Direct Inhibition-ALN-18328							
CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5^a	CYP3A4/5^b
ND	45.3	>74.5	ND	ND	ND	ND	ND
Mean IC ₅₀ (µmol/L) for Time-Dependent Inhibition (pre-incubation without NADPH)-ALN-18328							
CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5^a	CYP3A4/5^b
>74.5	14.0	>74.5	>74.5	21.6	>74.5	>74.5	>74.5
Mean IC ₅₀ (µmol/L) for Time-Dependent Inhibition (pre-incubation with NADPH)-ALN-18328							
CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5^a	CYP3A4/5^b
>74.5	4.85	>74.5	60.3	27.1	>74.5	>74.5	>74.5
Mean IC ₅₀ (µmol/L) for Time-Dependent Inhibition (pre-incubation without NADPH)-DLin-MC3-DMA							
CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5^a	CYP3A4/5^b
>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
Mean IC ₅₀ (µmol/L) for Time-Dependent Inhibition (pre-incubation with NADPH)- DLin-MC3-DMA							
CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5^a	CYP3A4/5^b
>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.12.H ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG₂₀₀₀-C-DMG: In Vitro Inhibitory Potential Towards Multiple Human Cytochrome P450 Isoforms (続き)

Study Title: ALN-18328, DLin-MC3-DMA, and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG: In Vitro Inhibitory Potential Towards Multiple Human Cytochrome P450 Isoforms							Test Article: ALN-18328, DLin-MC3-DMA, PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	
							Study No. ■■■ 319N-1807	
Mean IC ₅₀ (μmol/L) for Time-Dependent Inhibition (pre-incubation without NADPH)-PEG ₂₀₀₀ -C-DMG								
CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5 ^a	CYP3A4/5 ^b	
31.8	69.0	18.2	56.6	40.9	31.4	24.8	19.5	
Mean IC ₅₀ (μmol/L) for Time-Dependent Inhibition (pre-incubation with NADPH)- PEG ₂₀₀₀ -C-DMG								
CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5 ^a	CYP3A4/5 ^b	
27.0	56.9	23.8	53.9	35.2	21.4	29.8	17.7	

Abbreviations: CYP=cytochrome P450; HLM=human liver microsomes; IC₅₀=inhibitor concentration which inhibits maximal activity by 50%; LNP=lipid nanoparticle, NADPH=B-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, tetra-sodium salt; ND=not determined.

^a Midazolam was used as substrate.

^b Testosterone was used as substrate.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.12.I Evaluation of the Potential of Patisiran-LNP to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes

Study Title: Evaluation of the Potential of Patisiran-LNP to Induce the Expression of Human Hepatic CYP Isoforms (CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4) in Primary Human Hepatocyte Cultures					Test Article: Patisiran-LNP
					Study No. 319N-1808
Method: Evaluation of CYP induction was performed via measurement of mRNA levels in cryopreserved human hepatocytes from three separate adult donors cultured on collagen-coated plates and incubated with vehicle alone (negative control), positive control inducers, or test article for 48 hours. Patisiran-LNP was evaluated at 4 concentrations: 0.5, 2, 6 and 18% (v/v), containing 10, 40, 120, 360 µg/mL ALN-18328, respectively). The criteria for positive CYP induction are: increases in mRNA levels ≥ 2 -fold above vehicle control and a response $\geq 20\%$ of the positive control response were obtained. To ensure cell viability, an endpoint cytotoxicity assay (LDH leakage) was employed during the induction evaluation. In addition, the concentrations of patisiran-LNP were determined over the last dosing interval (24-48 h), by monitoring levels of ALN-18328, PEG ₂₀₀₀ -C-DMG and Dlin-MC3-DMA.					
Results: There was minimal loss of patisiran-LNP observed over the dosing period (<50%), no increase in LDH leakage observed with all the tested concentrations of patisiran-LNP and in all the three donors used in this study, marked induction observed with prototypical inducers indicating that the experimental conditions were appropriate for determining the induction potential of patisiran-LNP. No concentration dependent increases in either CYP1A2 or CYP3A4 mRNA levels above 2-fold were observed in any of the 3 donors evaluated. Patisiran-LNP treatment resulted in concentration dependent increases of CYP2B6 mRNA in 2 donors. However, only 1 donor saw concentration dependent increases in CYP2B6 mRNA ≥ 2 -fold and $\geq 20\%$ of the positive control.					
Mean \pm SD mRNA Changes (Fold over Control) in Hepatocytes Treated with Patisiran-LNP ^a					
Donor No.	Positive Control	Patisiran LNP 0.5% (v/v)	Patisiran LNP 2% (v/v)	Patisiran LNP 6% (v/v)	Patisiran LNP 18% (v/v)
CYP1A2					
1	79.7 \pm 3.31	1.13 \pm 0.09	0.91 \pm 0.15	1.26 \pm 0.16	1.08 \pm 0.02
2	44.0 \pm 0.80	1.24 \pm 0.03	1.08 \pm 0.06	1.33 \pm 0.09	1.13 \pm 0.08
3	111 \pm 16.3	1.28 \pm 0.24	1.11 \pm 0.21	1.53 \pm 0.21	1.84 \pm 0.01
CYP2B6					
1	8.08 \pm 0.41	1.17 \pm 0.11	1.32 \pm 0.25	2.34 \pm 0.30	1.65 \pm 0.11
2	17.0 \pm 1.03	1.07 \pm 0.16	1.27 \pm 0.05	2.67 \pm 0.33	3.24 \pm 0.34
3	12.1 \pm 0.39	1.28 \pm 0.09	1.68 \pm 0.05	2.89 \pm 0.28	4.10 \pm 0.09
CYP3A4					
1	5.66 \pm 1.29	1.00 \pm 0.09	0.94 \pm 0.12	1.24 \pm 0.16	1.08 \pm 0.11
2	7.45 \pm 0.30	0.97 \pm 0.38	0.79 \pm 0.08	1.31 \pm 0.06	1.46 \pm 0.16
3	7.83 \pm 1.40	0.97 \pm 0.24	0.86 \pm 0.04	1.43 \pm 0.10	1.85 \pm 0.11

Abbreviations: CYP=cytochrome P₄₅₀; LDH=lactate dehydrogenase; LNP=lipid nanoparticle; mRNA=messenger RNA; SD=standard deviation.

^a Fold induction is calculated by dividing the specific activity of the treatment condition by the specific activity of the vehicle control.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

13 薬物動態試験－累積排泄

表 2.6.5.13.A Excretion Mass Balance and Tissue Distribution *via* Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague Dawley and Long-Evans Rats Following a Single Intravenous Bolus Administration of ¹⁴C-ALN-TTR02

Study Title: Excretion Mass Balance and Tissue Distribution <i>via</i> Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague Dawley and Long-Evans Rats Following a Single Intravenous Bolus Administration of ¹⁴C-ALN-TTR02			Test Article: Patisiran-LNP	
			Study No. ■■■ 319-1103	
Species: Sprague Dawley Rats				
Sex (M/F)/Number of Animals: 4 Intact Males				
Method of Administration: Single IV Bolus Dose				
Dose (mg/kg): 0.3 mg/kg ¹⁴C-patisiran-LNP (194.7 μCi/kg; 2.1 mg ¹⁴C-DLin-MC3-DMA/kg)				
	Percent of Dose Recovered			
Excretion Route:	Feces	Urine	Cage Rinse	Cage Residue
Time (h)				
0-8	NA	1.23	NA	NA
8-24	NA	7.23	NA	NA
0-24	3.03	NA	0.42	NA
24-48	3.50	9.46	0.33	NA
48-72	2.11	5.52	0.74	NA
72-96	1.82	4.59	0.47	NA
96-120	1.35	2.77	0.34	NA
120-144	1.28	1.99	0.47	NA
144-168	1.05	1.71	0.36	NA

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.13.A Excretion Mass Balance and Tissue Distribution *via* Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague Dawley and Long-Evans Rats Following a Single Intravenous Bolus Administration of ¹⁴C-ALN-TTR02 (続き)

Study Title: Excretion Mass Balance and Tissue Distribution <i>via</i> Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague Dawley and Long-Evans Rats Following a Single Intravenous Bolus Administration of ¹⁴ C-ALN-TTR02					Test Article: Patisiran-LNP
					Study No. ■■■ 319-1103
	Percent of Dose Recovered				
Excretion Route:	Feces	Urine	Cage Rinse	Cage Residue	Total
Time (h)					
Subtotal 0-168	14.1	34.5	3.13	NA	51.8
Subtotal 168-336	4.86	6.54	1.21	1.79	13.2
Subtotal 336-504	1.94	3.09	0.24	NA	5.3
Subtotal 504-672	1.01	1.56	0.20	0.33	2.9
Subtotal 672-1008	1.09	2.01	0.22	0.29	3.4
Subtotal 1008-1344	0.653	1.31	0.16	0.21	7.4a
Total 0-1344 ^b	23.7	49.0	6.0 ^c		
Carcass 1344					6.93
Total Recovery 0-1344					83.9^d

Abbreviations: F=female; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M=male; NA=not applicable; QWBA=quantitative whole-body autoradiography.

Additional Information: Following a single IV administration of ¹⁴C-ALN-TTR02 to uncannulated rats, the mean total amount of radioactivity recovered was 83.9%, with 49.0% in urine, 23.7% in feces, 6.9% in carcass, and 6.0% in combined samples of cage wash, cage wipe, and cage debris. Elimination of ¹⁴C-ALN-TTR02 radioactivity was relatively slow with approximately 34.5% of the total radioactivity excreted in the urine within the first 168 hours postdose, and approximately 14.5% of the total radioactivity still detected in urine samples collected at 168 to 1344 hours postdose. The data suggest that the radioactivity of ¹⁴C-ALN-TTR02 is eliminated by renal and fecal excretion with renal elimination being the major route of elimination.

a Includes carcass

b Includes Rat 4 in mean total, which did not have carcass digest analyzed, as it was used for QWBA.

c Includes cage residue.

d Group 1 Total without Rat 4 (0-1344 h)=88.9±2.7

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.13.B Urine and Feces Accumulation Analysis from “Absorption, Metabolism, and Excretion of ¹⁴C-ALN-TTR02 Following Intravenous Administration to Monkeys”

Study Title: Urine and Feces Accumulation Analysis from “Absorption, Metabolism, and Excretion of ¹⁴ C-ALN-TTR02 Following Intravenous Administration to Monkeys						Test Article: Patisiran-LNP		
						Study No. TTR02-DSM16-013		
Species:	Cynomolgus Monkeys							
Sex (M/F)/Number of Animals:	3 Males / 3 Females							
Method of Administration:	Single IV Infusion							
Dose (mg/kg):	0.3 mg/kg (approximately 50 µCi/kg)							
Analyte:	ALN-18328		DLin-MC3-DMA		4-(DMA)-butyric acid		PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	
	Percent of Dose Recovered							
Excretion Route:	Urine	Feces	Urine	Feces	Urine	Feces	Urine	Feces
Time (h)								
0-6	ND	ND	<0.001	<0.0001	0.18	NA	ND	0.06
6-12	0.047 ^a	ND	<0.001	0.003	0.26	NA	ND	0.37
12-24	ND	ND	0.001	0.008	1.86	NA	ND	5.30
24-48	ND	ND	0.001	0.022	2.88	NA	ND	15.2
48-72	ND	ND	0.001	0.031	2.73	NA	ND	13.8
72-96	ND	ND	0.001	0.035	2.43	NA	ND	5.95
96-120	ND	ND	0.001	0.029	2.13	NA	ND	1.72
120-144	ND	ND	0.001	0.025	2.45	NA	ND	0.87
144-168	ND	ND	0.001	0.027	1.95	NA	ND	0.78
168-192	ND	ND	0.001	0.015	1.99	NA	ND	0.37
192-216	ND	ND	0.001	0.014	1.88	NA	ND	0.25
216-240	ND	ND	0.001	0.016	2.06	NA	ND	0.27

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.13.B Urine and Feces Accumulation Analysis from “Absorption, Metabolism, and Excretion of ¹⁴C-ALN-TTR02 Following Intravenous Administration to Monkeys” (続き)

Study Title: Urine and Feces Accumulation Analysis from “Absorption, Metabolism, and Excretion of ¹⁴ C-ALN-TTR02 Following Intravenous Administration to Monkeys						Test Article: Patisiran-LNP		
Analyte:	ALN-18328		DLin-MC3-DMA		4-(DMA)-butyric acid		PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	
	Percent of Dose Recovered							
Excretion Route:	Urine	Feces	Urine	Feces	Urine	Feces	Urine	Feces
Time (h)								
240-264	ND	ND	0.001	0.015	1.96	NA	ND	0.27
264-288	ND	ND	0.001	0.012	1.90	NA	ND	0.21
288-312	0.270 ^a	ND	0.001	0.009	1.89	NA	ND	0.18
312-336	ND	ND	0.001	0.008	1.77	NA	ND	0.18

Abbreviations: IV=intravenous; F=female; M=male; LNP=lipid nanoparticle; NA=not applicable; ND=not detected.

^a Value represents an n=1

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

14 薬物動態試験－胆汁中排泄

表 2.6.5.14.A Excretion Mass Balance and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague Dawley and Long Evans Rats Following a Single Intravenous Bolus Administration of ¹⁴C-ALN-TTR02

Study Title: Excretion Mass Balance and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague Dawley and Long-Evans Rats Following a Single Intravenous Bolus Administration of ¹⁴C-ALN-TTR02						Test Article: Patisiran-LNP
						Study No. [REDACTED] 319-1103
Species: Sprague Dawley Rats						
Sex (M/F)/Number of Animals: 4 BDC Males						
Method of Administration: Single IV Bolus Dose						
Dose (mg/kg): 0.3 mg/kg ¹⁴C-patisiran-LNP (194.7 µCi/kg; 2.1 mg ¹⁴C-DLin-MC3-DMA/kg)						
	Percent of Dose Recovered					
Excretion Route:	Bile	Feces	Urine	Cage Rinse	Cage Residue	Total
Time (h)						
0-8	1.44	NA	1.51	NA	NA	
8-24	11.69	NA	2.87	NA	NA	
0-24	NA	0.080	NA	0.30	NA	
24-48	10.6	0.119	2.33	0.13	NA	
48-72	6.18	0.272	1.74	0.09	NA	
72-96	6.42	0.226	1.42	0.08	NA	
96-120	4.46	0.206	1.23	0.13	NA	
120-144	3.79	0.156	0.87	NA	NA	

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.14.A Excretion Mass Balance and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague Dawley and Long Evans Rats Following a Single Intravenous Bolus Administration of ¹⁴C-ALN-TTR02 (続き)

Study Title: Excretion Mass Balance and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague Dawley and Long-Evans Rats Following a Single Intravenous Bolus Administration of ¹⁴ C-ALN-TTR02						Test Article: Patisiran-LNP
Subtotal 0-144	43.6	1.06	12.0	0.73	1.06	
Carcass 144						40.1
Total Recovery 0-144						97.8

Abbreviations: BDC=bile duct cannulated; IV=intravenous; F=female; FVC= femoral vein cannulated; LNP=lipid nanoparticle; M=male; NA=not applicable.

Additional Information: Following a single IV administration of ¹⁴C-patisiran-LNP to BDC/FVC rats, the mean total radioactivity recovered 144 hours postdose was 97.8% with 43.6% in bile, 40.1% in carcass, 12% in urine, 1.1% in feces, 1.8% in combined samples of cage wash, cage wipe, and cage debris. The relatively high total radioactivity recovered in bile compared to the relatively low amount of total radioactivity recovered in feces suggests reabsorption following bile excretion. These data suggest that biliary excretion of radioactive ¹⁴C-patisiran-LNP occurs, followed by reabsorption and renal elimination.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

15 薬物動態試験－薬物相互作用

表 2.6.5.15.A In vitro Transporter Assay

Study Title: In vitro Interaction Studies of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, PEG₂₀₀₀-C-DMG, and 4-Dimethylaminobutyric Acid with the human MDR1, BCRP and BSEP ABC (efflux) Transporters, and with human OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, MATE1 and MATE2-K Uptake Transporters			Test Article: Patisiran-LNP
			Study No. Alnylam-01- [REDACTED]
Type of Study: In vitro interaction study on multiple human transporter proteins			
Transporter	Test Article	IC₅₀ (μmol/L)	Substrate (Yes/No)
Vesicular Transporters			
MDR1	a=ALN-18328, b=DLin-MC3-DMA, c=PEG ₂₀₀₀ -C-DMG, and d=4-Dimethylaminobutyric acid	NC	No (a,c,d)
BCRP		NC	No (a, c)
BSEP		NC	No (a,c)
Uptake transporters			
OATP1B1	a=ALN-18328, b=DLin-MC3-DMA, c=PEG ₂₀₀₀ -C-DMG, and d=4-Dimethylaminobutyric acid	NC	No (a,b,c)
OATP1B3		NC	No (a,b,c)
OAT1		NC	No (a,b,c,d)
OAT3		NC	No (a,b,c,d)
OCT1		NC	No (a,b,c)
OCT2		NC	No (a,b,c,d)
MATE1		NC	No (a,b,c,d)
MATE2-K		NC	No (a,b,d)

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.15.A In vitro Transporter Assay (続き)

<p>Study Title: In vitro Interaction Studies of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, PEG₂₀₀₀-C-DMG, and 4-Dimethylaminobutyric Acid with the human MDR1, BCRP and BSEP ABC (efflux) Transporters, and with human OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, MATE1 and MATE2-K Uptake Transporters</p>	<p>Test Article: Patisiran-LNP Study No. Alnylam-01- [REDACTED]</p>
<p>Additional Information: Methods: Vesicular transport and inhibition assays: Vesicular transport assays were performed with inside-out membrane vesicles prepared from cells overexpressing human ABC transporters. Low permeability probe substrates are transported into the vesicles by the expressed ABC transporter. At the end of the incubation period, the vesicles can be separated by filtration and the amount of probe substrate trapped in the vesicles quantified. The BSEP has been expressed by [REDACTED] in insect (<i>Spodoptera frugiperda</i> [Sf9] ovarian cells); and MDR1 and BCRP in mammalian (K and M) cells. Sf9 cells were infected with recombinant baculovirus as a means of achieving the over expression of the selected transporter. The mammalian cells were chemically selected for, the ABC transporter of interest. The membrane vesicles were prepared and supplied by [REDACTED].</p> <p><u>Experimental method for vesicular transport inhibition assay</u> The TA was incubated with membrane vesicle preparations (total protein: 50 µg/well in case of MDR1 and BSEP or 25 µg/well in case of BCRP) and the probe substrate. Incubations were carried out in the presence of 4 mmol/L ATP or AMP to distinguish between transporter-mediated uptake (ATP) and passive diffusion (AMP) into the vesicles. The TA was added to the reaction mixture in 0.75 µl of solvent (1% of the final incubation volume). Reaction mixtures were preincubated for 10 minutes at 37±1°C in case of MDR1 and BSEP or at 32°C in case of BCRP. Reactions were started by the addition of 25 µl of 12 mmol/L MgATP (or assay buffer with AMP for background controls), preincubated separately. Reactions were quenched by the addition of 200 µl of ice-cold washing buffer and immediate filtration via glass fiber filters mounted to a 96-well plate (filter plate). The filters were washed, dried and the amount of substrate inside the filtered vesicles determined by liquid scintillation counting.</p> <p><u>Experimental method for vesicular transport substrate assay</u> The uptake of test articles into vesicles was determined using inside-out membrane vesicles (total protein: 50 µg/well for all transporters) prepared from cells overexpressing human ABC transporters. Two incubation time points (2 and 20 min) and 2 concentrations (1 and 10 µmol/L for ALN-18328, PEG₂₀₀₀-C-DMG, and 4-Dimethylaminobutyric acid) of test articles were applied. The goal of the pilot study was to determine whether or not the test articles were actively taken up into the vesicles. The amount of accumulated PEG₂₀₀₀-C-DMG and 4-Dimethylaminobutyric acid retained inside the vesicles after the incubations and filtration was determined by LC-MS detection at [REDACTED]. ALN-18328 was analyzed by Alnylam, using an ATTO-probe HPLC hybridization assay. The method was validated by Alnylam for use with biomatrix (cell lysate), provided by [REDACTED]. Biomatrix contained lysate of the transporter expressing cells.</p>	

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.15.A In vitro Transporter Assay (続き)

<p>Study Title: In vitro Interaction Studies of ALN-18328, DLin-MC3-DMA, PEG₂₀₀₀-C-DMG, and 4-Dimethylaminobutyric Acid with the human MDR1, BCRP and BSEP ABC (efflux) Transporters, and with human OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, MATE1 and MATE2-K Uptake Transporters</p>	<p>Test Article: Patisiran-LNP Study No. Alnylam-01- [REDACTED]</p>
<p>Additional Information: Methods: Uptake transporter inhibition and substrate assays: Uptake experiments were performed using CHO, MDCKII, or HEK293 cells stably expressing the respective uptake transporters. For human OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, MATE1, and MATE2-K, the parental cell lines or mock transfected parental cells were used as negative control. <u>Experimental method for uptake transporter inhibition experiments</u> Cells were cultured at 37±1°C in an atmosphere of 95:5 air:CO₂ and were plated onto standard 96-well tissue culture plates. Before the experiment, the medium was removed and the cells were washed twice with 100 µl of Henseleit-Krebs buffer at pH 7.4 or 8.0 (prepared from Sigma chemicals, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Uptake experiments were carried out at 37±1°C in 50 µl of Henseleit-Krebs buffer (pH 7.4, pH 8.0 for MATE1 and MATE2-K) containing the probe, substrate, and the TA or solvent. The organic solvent concentration was equal in all wells, and did not exceed 1% (V/V). After the experiment, cells were washed twice with 100 µl of Henseleit-Krebs buffer and lysed with 50 µl of 0.1 mol/L NaOH (1 mM CaCl₂ in 5% SDS in case of OATP1B3). Fluo-3 transport (OATP1B3) was determined by measuring fluorescence using 485 nm and 520 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. Radiolabelled probe substrate transport was determined by measuring an aliquot (35 µl) from each well for liquid scintillation counting. <u>Experimental method for uptake transporter substrate experiments</u> Cells were cultured at 37±1°C in an atmosphere of 95:5 air:CO₂ and were plated onto standard 24-well tissue culture plates in a density of 2x10⁵ cells. The uptake of the TA was determined using cells overexpressing the respective uptake transporter and using control cells at 2 incubation time points (2 and 20 min) and at 2 concentrations (1 and 10 µmol/L for ALN-18328, PEG₂₀₀₀-C-DMG, 4-Dimethylaminobutyric acid; 3 and 0.5 µmol/L for DLin-MC3-DMA) of the test drug. The goal of the feasibility experiment was to determine whether or not the TA was actively taken up into the cells. The apparent OAT1 mediated uptake of ALN-18328 was examined in a follow-up experiment in the presence of a known inhibitor. Before the experiment, the medium was removed and the cells were washed twice with 300 µl of Henseleit-Krebs buffer (pH 7.4 for OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2 and pH 8.0 for MATE1 and MATE2) (prepared from Sigma chemicals). Cellular uptake of TA into the cells was measured by adding 200 µl of Henseleit-Krebs buffer containing TA and incubating them at 37±1°C. Reactions were quenched by removing the Henseleit-Krebs buffer containing the TA and the cells were washed twice with 200 µl of Henseleit-Krebs buffer. Cells were lysed by adding 300 µl of either MeOH:H₂O (3:1) in case of PEG₂₀₀₀-C-DMG, 4-Dimethylaminobutyric acid and DLin-MC3-DMA, or lysing agent (Epicentre tissue and cell lysis buffer, Cat# MTC096H) in case of ALN-18328, and incubated for 10 minutes at 37±1°C. The amount of TA in the cell lysates was determined by LC-MS/MS. ALN-18328 was analyzed by Alnylam, using an ATTO-probe HPLC hybridization assay. The method was validated by Alnylam for use with biomatrix (cell lysate), provided by [REDACTED]. Biomatrix contained lysate of the transporter expressing cells. The amount of protein in each well was quantified using BCA kit for protein determination (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).</p>	

Abbreviations: ABC=ATP binding cassette; ACT=active accumulation; AMP=passive accumulation; ATP= anion-transporting polypeptide; BCRP=breast cancer resistance protein; BSEP=bile salt export pump; HPLC=high-performance liquid chromatography; LC=liquid chromatography; LNP=lipid nanoparticle; MATE=multidrug and toxin extrusion transporter; MDR1=multidrug resistance protein 1; MS=mass spectrometry; NC=not calculable; OAT=organic anion transporter ; OATP=organic anion-transporting polypeptide; OCT=organic cation transporter; TA=test article.

Note: A result of NC indicated that an IC₅₀ could not be determined as inhibition >50% was not observed for more than 2 concentration points within the concentration ranges tested.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

16 薬物動態試験—その他

表 2.6.5.16.A ALN-TTR02: A Single Dose Intravenous Infusion Bridging Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Safety Study in Cynomolgus Monkeys

Study Title: Pharmacokinetic Aspects of “ALN-TTR02: A Single Dose Intravenous Infusion Bridging Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Safety Study in Cynomolgus Monkeys”		Test Article: Patisiran-LNP	
		Study No. TTR02-NCD13-001	
Objective: The objective of this study was to compare the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of patisiran-LNP from 2 different manufacturers when administered as a single dose by intravenous infusion over 1 hour to cynomolgus monkeys.			
Species	Cynomolgus Monkeys		
Method of Administration:	IV Infusion over 1 hour on Day 1		
Sample:	Plasma		
Analyte:	ALN-18328		
Patisiran-LNP Dose (mg/kg):	1.0	1.0	
Sexes combined (M+F)/ # animals:	3 M + 3 F	3 M + 3 F	
Source of Patisiran-LNP:	■	Alnylam	Alnylam/■ ratio
C_{max} (µg/mL)	0.0163	0.0186	1.14
AUC_{0-t} (µg•h/mL)	0.0549	0.0518	0.94
$AUC_{0-\infty}$ (µg•h/mL)	0.0601	0.0552	0.92

Abbreviations: $AUC_{0-\infty}$ =area under the concentration-time curve from time zero to infinity; AUC_{0-t} =area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} =maximum (peak) concentration; F=female; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M=male; ■

Additional Information: The ratios for C_{max} , AUC_{0-t} , and $AUC_{0-\infty}$ (Alnylam/■) were 1.14, 0.94, and 0.92, respectively, indicating that the pharmacokinetics of ALN-18328 after administration of the 2 formulations were comparable.

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.16.B Toxicokinetics of Patisiran (ALN-TTR02): A 10-Week Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Pharmacodynamic Study in Cynomolgus Monkeys with Different Batch Processes

Study Title: Toxicokinetics of Patisiran (ALN-TTR02): A 10-Week Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Pharmacodynamic Study in Cynomolgus Monkeys with Different Batch Processes							Test Article: Patisiran-LNP						
							Study No. TTR02-GLP17-007						
Objective: The purpose of this phase of the study was to characterize the TK of ALN 18328, DLin-MC3-DMA and PEG2000-C-DMG after 1-hour IV infusion doses of patisiran-LNP from two different batch processes in male and female monkeys once every three weeks for a total of 4 doses, as part of the 10-week TK/PD/toxicity study.													
Species		Cynomolgus Monkeys											
Method of Administration:		IV Infusion over 1 hour on Day 1, 22, 43, and 64											
Sample:		Plasma											
Analyte:		ALN-18328, DLin-MC3-DMA and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG											
ALN-18328													
		Lot No.: [REDACTED]; [REDACTED] kg Batch Process					Lot No.: [REDACTED]; [REDACTED] kg Batch Process						
		4 Males		4 Females		8 Combined		4 Males		4 Females		8 Combined	
siRNA (mg/kg)		0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0
Day 1													
C_{max} (µg/mL)	6.05	40.5	5.47	41.2	5.76	40.8	4.27	32.8	3.29	35.5	3.78	34.1	
t_{max} (h)	1.167	1.25	1.083	1.083	1.083	1.167	1.167	1.083	1.167	1.083	1.167	1.083	
t_{last} (h)	37	49	17	97	25	73	37	49	9	73	17	49	
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	17.2	152	16.4	149	16.8	150	13.0	123	5.34	86.0	9.19	105	
$C_{max}/Dose$	20.2	20.3	18.2	20.6	19.2	20.4	14.2	16.4	11.0	17.7	12.6	17.1	
$AUC_{0-t}/Dose$	57.2	76.1	54.7	74.3	56.0	75.2	43.5	61.6	17.8	43.0	30.6	52.3	
Day 43													
C_{max} (µg/mL)	5.68	45.2	5.48	37.8	5.58	41.5	4.64	33.4	3.22	40.7	3.93	37.1	
t_{max} (h) ^a	1.25	1.083	1.083	1.083	1.167	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	
t_{last} (h) ^a	37	97	25	97	25	97	25	73	17	49	25	49	
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	17.4	196	20.9	174	19.2	185	11.5	128	5.98	108	8.73	118	
$C_{max}/Dose$	18.9	22.6	18.3	18.9	18.6	20.7	15.5	16.7	10.7	20.3	13.1	18.5	

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.16.B Toxicokinetics of Patisiran (ALN-TTR02): A 10-Week Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Pharmacodynamic Study in Cynomolgus Monkeys with Different Batch Processes (続き)

Study Title: Toxicokinetics of Patisiran (ALN-TTR02): A 10-Week Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Pharmacodynamic Study in Cynomolgus Monkeys with Different Batch Processes								Test Article: Patisiran-LNP				
								Study No. TTR02-GLP17-007				
AUC _{0-t} /Dose	57.9	98.1	69.8	87.0	63.9	92.5	38.3	64.0	19.9	54.0	29.1	59.0
Accumulation (Day 43/Day 1)												
C _{max}	0.939	1.12	1.00	0.917	0.969	1.02	1.09	1.02	0.979	1.15	1.04	1.09
AUC _{0-t}	1.01	1.29	1.27	1.17	1.14	1.23	0.885	1.04	1.12	1.26	0.950	1.12
DLin-MC3-DMA												
	Lot No.: ██████; ██████ kg Batch Process						Lot No.: ██████; ██████ kg Batch Process					
	4 Males		4 Females		8 Combined		4 Males		4 Females		8 Combined	
siRNA (mg/kg)	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0
Lipid Dose (mg/kg)	2.01	13.4	2.01	13.4	2.01	13.4	1.85	12.3	1.85	12.3	1.85	12.3
Day 1												
C _{max} (µg/mL)	31.9	218	28.6	191	30.2	205	24.0	148	17.3	142	20.6	145
t _{max} (h) ^{a, b}	1.083	1.083	1.083	1.25	1.083	1.25	1.083	1.167	1.083	1.25	1.083	1.25
t _{last} (h) ^a	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121
AUC _{0-t} (µg·h/mL) ^a	215	1590	225	1200	220	1400	214	1220	167	1260	191	1240
C _{max} /Dose	15.9	16.3	14.2	14.3	15.0	15.3	13.0	12.0	9.33	11.5	11.2	11.8
AUC _{0-t} /Dose ^a	107	119	112	89.7	110	104	116	99.2	90.4	103	103	101
Day 43												
C _{max} (µg/mL)	29.5	233	28.1	195	28.8	214	23.2	168	16.2	190	19.7	179
t _{max} (h) ^{a, b}	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083	1.083
t _{last} (h) ^a	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121
AUC _{0-t} (µg·h/mL) ^a	225	1690	258	1400	242	1550	253	1570	196	1550	224	1560
C _{max} /Dose	14.7	17.4	13.9	14.5	14.3	15.9	12.5	13.7	8.76	15.4	10.6	14.5
AUC _{0-t} /Dose ^a	112	126	128	104	120	115	136	127	106	126	121	127
Accumulation (Day 43/Day 1)												
C _{max}	0.925	1.07	0.983	1.02	0.954	1.04	0.967	1.14	0.936	1.34	0.956	1.23
AUC _{0-t} ^a	1.05	1.06	1.15	1.17	1.10	1.11	1.18	1.29	1.17	1.23	1.17	1.26

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.16.B Toxicokinetics of Patisiran (ALN-TTR02): A 10-Week Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Pharmacodynamic Study in Cynomolgus Monkeys with Different Batch Processes (続き)

Study Title: Toxicokinetics of Patisiran (ALN-TTR02): A 10-Week Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Pharmacodynamic Study in Cynomolgus Monkeys with Different Batch Processes							Test Article: Patisiran-LNP					
							Study No. TTR02-GLP17-007					
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG												
	Lot No.: [REDACTED]; [REDACTED] kg Batch Process						Lot No.: [REDACTED]; [REDACTED] kg Batch Process					
	4 Males		4 Females		8 Combined		4 Males		4 Females		8 Combined	
siRNA (mg/kg)	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0	0.3	2.0
Lipid Dose (mg/kg)	0.24	1.6	0.24	1.6	0.24	1.6	0.23	1.5	0.23	1.5	0.23	1.5
Day 1												
C _{max} (µg/mL)	3.98	27.9	3.82	31.3	3.90	29.6	3.27	23.3	2.97	24.2	3.12	23.7
t _{max} (h) ^{a, b}	1.083	1.75	1.083	1.083	1.083	1.375	1.167	1.083	1.167	1.083	1.167	1.083
t _{last} (h) ^a	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121
AUC _{0-t} (µg·h/mL) ^a	46.1	385	42.7	282	44.4	334	43.0	329	39.7	295	41.4	312
C _{max} /Dose	16.6	17.5	15.9	19.6	16.2	18.5	14.2	15.5	12.9	16.1	13.6	15.8
AUC _{0-t} /Dose ^a	192	241	178	176	185	209	187	220	173	197	180	208
Day 43												
C _{max} (µg/mL)	3.89	32.7	3.83	27.1	3.86	29.9	3.42	27.9	3.15	30.7	3.29	29.3
t _{max} (h) ^{a, b}	1.083	1.292	1.25	1.083	1.167	1.083	1.083	2.125	1.625	1.167	1.167	1.25
t _{last} (h) ^a	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121	121
AUC _{0-t} (µg·h/mL) ^a	41.5	390	40.8	299	41.1	344	43.1	368	38.0	314	40.5	341
C _{max} /Dose	16.2	204	16.0	17.0	16.1	18.7	14.9	18.6	13.7	20.4	14.3	19.5
AUC _{0-t} /Dose ^a	173	244	170	187	171	215	187	245	165	209	176	227
Accumulation (Day 43/Day 1)												
C _{max} (µg/mL)	0.977	1.17	1.00	0.866	0.990	1.01	1.05	1.20	1.06	1.27	1.05	1.24
AUC _{0-t} ^a	0.900	1.01	0.956	1.06	0.926	1.03	1.00	1.12	0.957	1.06	0.978	1.09

2.6.5 薬物動態試験概要表
パチシランナトリウム

表 2.6.5.16.B Toxicokinetics of Patisiran (ALN-TTR02): A 10-Week Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Pharmacodynamic Study in Cynomolgus Monkeys with Different Batch Processes (続き)

Study Title: Toxicokinetics of Patisiran (ALN-TTR02): A 10-Week Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Pharmacodynamic Study in Cynomolgus Monkeys with Different Batch Processes						Test Article: Patisiran-LNP		
						Study No. TTR02-GLP17-007		
Statistical Comparisons of AUC _{0-t} for ALN-18328, DLin-MC3-DMA and PEG ₂₀₀₀ -C-DMG								
Analyte	ALN-TTR02 Dose (mg/kg)	Day	AUC _{0-t} [†] , h·µg/mL					P-Value
			ALN-TTR02 (Lot No. ██████; █ kg process batch)		ALN-TTR02 (Lot No. ██████; █ kg process batch)		Lot No. ██████ / Lot No. ██████	
			N	GM	N	GM	GMR (95% CI)	
ALN-18328	0.3	1	8	15.1	8	7.89	0.52 (0.29, 0.94)	0.0325
		43	8	16.5	8	7.93	0.48 (0.27, 0.86)	0.0169
	2.0	1	8	143	8	95.5	0.67 (0.44, 1.01)	0.0541
		43	8	175	8	106	0.61 (0.38, 0.98)	0.0438
DLin-MC3-DMA	0.3	1	8	218	8	184	0.85 (0.66, 1.09)	0.1726
		43	8	236	8	215	0.91 (0.68, 1.22)	0.5093
	2.0	1	8	1360	8	1230	0.90 (0.72, 1.13)	0.3439
		43	8	1520	8	1540	1.02 (0.84, 1.23)	0.8651
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	0.3	1	8	43.5	8	40.4	0.93 (0.73, 1.19)	0.5295
		43	8	40.4	8	39.7	0.98 (0.78, 1.23)	0.8616
	2.0	1	8	324	8	311	0.96 (0.78, 1.18)	0.6871
		43	8	335	8	338	1.01 (0.82, 1.24)	0.9315

Abbreviations: ANOVA=analysis of variance; AUC_{0-t}=area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration; CI=Confidence interval.; C_{max}=maximum (peak) concentration; F=female; GM=Geometric least-squares mean; GMR=Geometric least-squares mean ratio; IV=intravenous; LNP=lipid nanoparticle; M=male; PD=pharmacodynamics; siRNA=small interfering RNA; TK=toxicokinetic; t_{last}=time of dosing to last sampling time point; t_{max}=time to reach maximum concentration.

^a Parameters were calculated using sampling times post start of infusion (SOI).

^b t_{max} is shown as median.

[†] Back-transformed least squares mean and confidence interval from ANOVA model performed on log-transformed AUC_{0-t} values.