



## 2.6.1 緒言

ビルトラルセンは、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター（NCNP）と日本新薬株式会社により、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）に対する治療薬として開発されたモルホリノ構造を有するアンチセンス核酸である。

### 2.6.1.1 デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）とジストロフィン

DMD は、ジストロフィン遺伝子の変異により機能的なジストロフィンタンパク質が産生されない X 連鎖性劣性遺伝の筋疾患である<sup>1)</sup>。DMD 患者は、5 歳頃に運動能力のピークをむかえ、その後緩徐に症状が進行し 10 歳頃に歩行不能となる。重篤な運動機能障害、嚥下障害、痰の詰まり、消化管障害が引き起こされ、さらに呼吸筋や心筋の障害も加わり、最終的には呼吸不全や心不全を認めて死に至る。近年、呼吸管理や心不全管理などの医療技術の進歩もあり、平均寿命は 30 歳を越えるようになったが、難治性進行性疾患の代表的な存在である<sup>2,3)</sup>。

ジストロフィン遺伝子は 79 個のエクソンを有する。スプライシングを経た mRNA は約 14 kb のサイズであり、翻訳されたジストロフィンタンパク質は 3685 個のアミノ酸から構成され、その分子量は 427 kDa である（図 2.6.1.1-1）。

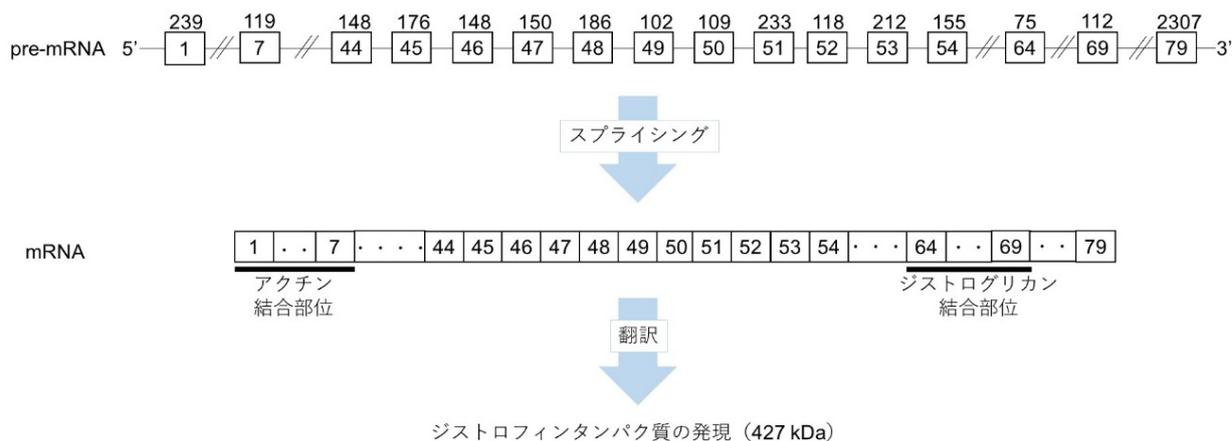


図 2.6.1.1-1 正常ジストロフィン遺伝子及びジストロフィンタンパク質

□ はエクソンを表す。□内の数字はエクソンの番号、□の上の数字は塩基数を示す。エクソン 1～7（アクチン結合部位）及びエクソン 64～69（ジストログリカン結合部位）は、ジストロフィン—ジストロフィン関連糖タンパク質複合体の形成に関わる部位である<sup>4)</sup>。

ジストロフィン は細胞質内アクチンと結合し、細胞膜の糖タンパク質とジストロフィン—ジストロフィン関連糖タンパク質複合体を形成することで、細胞外マトリックスのラミニン  $\alpha 2$  を通じて基底膜と連結している<sup>4,5)</sup>（図 2.6.1.1-2）。ジストロフィンは基底膜と筋細胞の細胞骨格（アクチン）を固定しており、筋細胞の構造を保持する機能を担っている。いわば、天井と柱を支える梁のような役割である。ジストロフィン—ジストロフィン関連糖タンパク質複合体の形成に関わる両端の構造は筋細胞の構造保持機能に必須である。一方で、途中の部分は基本構造の繰り返しであり、両端の構造が保持されていれば途中の部分は少し短くなっていても機能する<sup>6)</sup>。

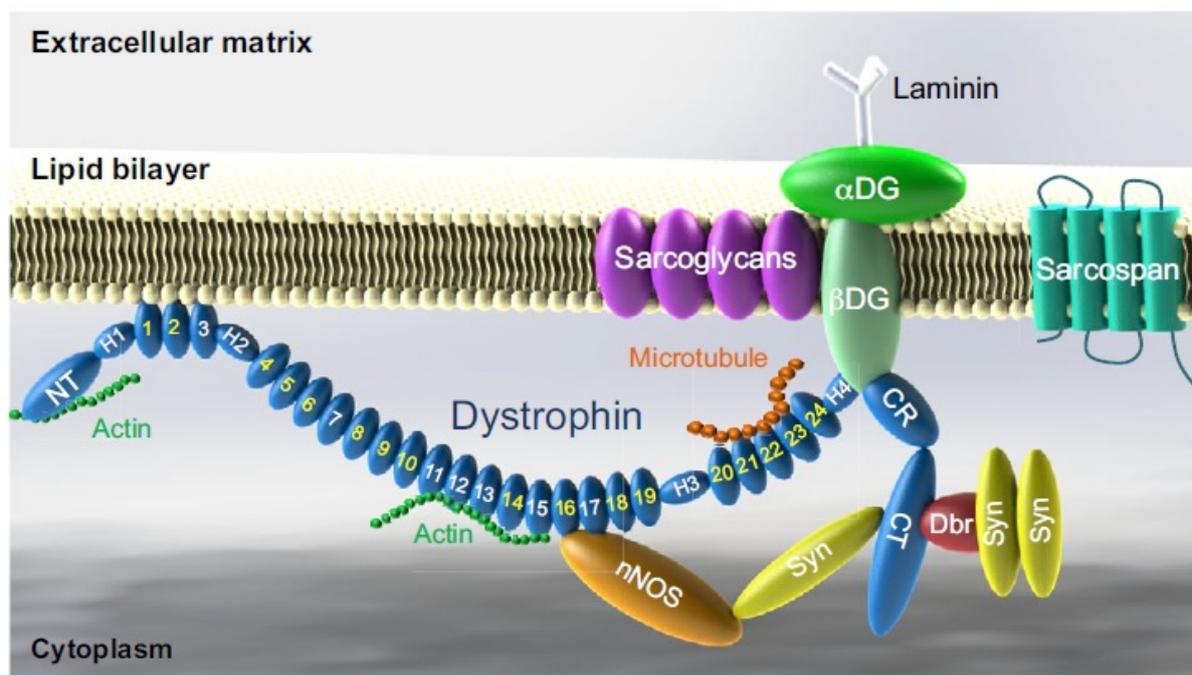


図 2.6.1.1-2 ジストロフィン-ジストロフィン関連糖タンパク質複合体<sup>4)</sup>

ジストロフィンは、N末端 (NT)、rod、システインリッチ (CR) 及びC末端 (CT) の4つの機能ドメインより構成される 427 kDa のタンパク質である。rod ドメインは24の繰り返し構造 (1-24) 及び4つの hinge (H1~H4) より構成される。

ジストロフィンは、細胞膜貫通型タンパク質 [dystroglycan ( $\alpha$ DG 及び  $\beta$ DG)、sarcoglycan、sarcospan] 並びに細胞質内タンパク質 [syntrophin (Syn)、dystrobrevin (Dbr)、神経型 NO 合成酵素 (nNOS)] とジストロフィン-ジストロフィン関連糖タンパク質複合体を形成している。

ジストロフィンが欠損すると筋細胞の構造が壊れ、筋肉は損傷を受ける。線維芽細胞が活性化されて線維化がおこり、組織は癒痕化して、筋細胞が再生されにくくなる<sup>7)</sup>。このような筋の壊死及び再生が繰り返されて脂肪化・繊維化が進むことで症状が重くなる。

DMD では欠失や重複等のジストロフィン遺伝子の変異によって一部のエクソンが欠失している。この欠失エクソンの塩基数が3の倍数でない場合、mRNA がアミノ酸へ翻訳される過程で正常なアミノ酸の読み取り枠にずれ (アウト・オブ・フレーム) が生じる。例えば、エクソン 45-52 が欠失している場合、スプライシングによってエクソン 44 とエクソン 53 が連結した mRNA が生じるが、欠失している塩基数 (1222 塩基) が3の倍数でないため、翻訳過程においてエクソン 53 以降でアミノ酸の読み取り枠のずれが生じ、途中で終止コドンが出現して翻訳が終止する<sup>8)</sup>。このような本来のC末端領域を欠くジストロフィンは、その構造が不安定であることから速やかに分解される (図 2.6.1.1-3、図 2.6.1.2-2)。結果としてジストロフィンタンパク質が欠損することとなり、DMD が発症する。

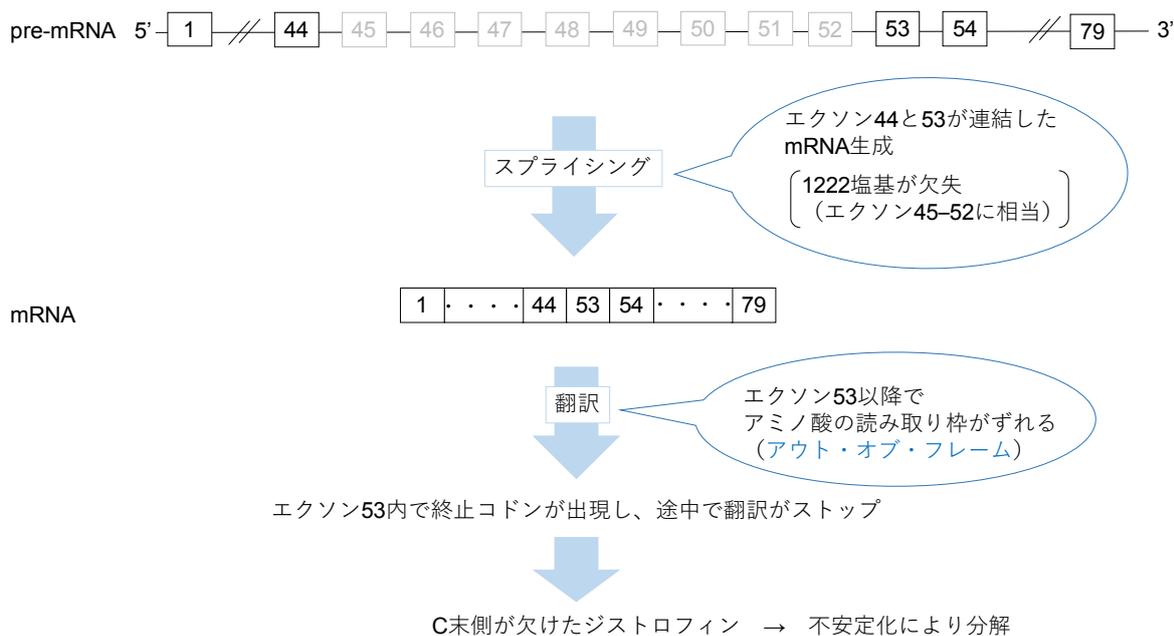


図 2.6.1.1-3 DMD 患者におけるジストロフィン遺伝子とジストロフィンタンパク質 (エクソン 45-52 を欠失した DMD 患者の場合)

□ はエクソンを表す。□ 内の数字はエクソンの番号を示す。  
エクソン 45-52 を欠失した DMD 患者の場合、翻訳の過程でエクソン 53 内に終止コドンが出現し、翻訳が途中で終止する。合成途中のジストロフィンはその構造が不安定であることから分解される。

一方、DMD と同様にジストロフィン遺伝子の変異が原因であるベッカー型筋ジストロフィー (BMD) では、欠失している翻訳領域のエクソンの塩基数が 3 の倍数であり、エクソンが欠失してもアミノ酸の読み取り枠が維持される (イン・フレーム) ため翻訳が最後まで完了する。ジストロフィンの繰り返し構造は短くなるものの、両端の構造が保持されたジストロフィンが産生される。結果的にジストロフィンがある程度機能することが、DMD と比較して症状が軽い理由と考えられている<sup>9)</sup>。

### 2.6.1.2 エクソンスキッピング治療

DMD の根治治療は、欠失や重複などの遺伝子変異を DNA レベルで修復し、機能的な全長型ジストロフィン産生を回復させることである。しかし、ゲノム DNA の変異の修復は現時点では技術的に困難である。

エクソンスキッピング治療は、配列特異的に設計したモルホリノや 2'-O-メチル-ホスホロチオエートなどのアンチセンス人工核酸を用いて、pre-mRNA から mRNA を構成するスプライシングの過程において、スプライシング制御タンパク質・RNA 複合体 (スプライソソーム) による pre-mRNA の特定領域の認識を阻害してスプライシングを制御し、特定のエクソンをスキッピングして読み取り枠を正常化させる。この結果、アウト・オブ・フレームである DMD のジストロフィンの mRNA をイン・フレーム化し、正常よりもやや短い機能がジストロフィンが産生され

る<sup>10, 11)</sup>。エクソン 45–52 欠失例にエクソン 53 スキッピングを行った場合、エクソン 44 とエクソン 54 が連結した mRNA が生じる。エクソン 45 から 53 までの合計 1434 塩基（1222 塩基+212 塩基）の塩基が欠失することになるが、この欠失塩基数は 3 の倍数であるため、翻訳過程においてエクソン 54 以降でアミノ酸の読み取り枠が修正され、ジストロフィンタンパク質の発現が回復する（図 2.6.1.2-1、図 2.6.1.2-2）。同様にエクソン 43–52、47–52、48–52、49–52、50–52、52 の欠失ではエクソン 53 スキッピングにより欠失塩基数の合計はそれぞれ 1755、1110、960、774、672、330 塩基となり、いずれも 3 の倍数となるためアミノ酸の読み取り枠が修正され、ジストロフィンタンパク質の発現が回復する。エクソンスキッピングにより発現回復するジストロフィンタンパク質は、その機能に重要な両端の構造が存在しているため、患者の状態を重症の DMD から比較的軽微な BMD の状態へ移行させることが可能になる。これにより疾患の進行を抑制するとともに疾患状態の改善を期待することができる<sup>12)</sup>。

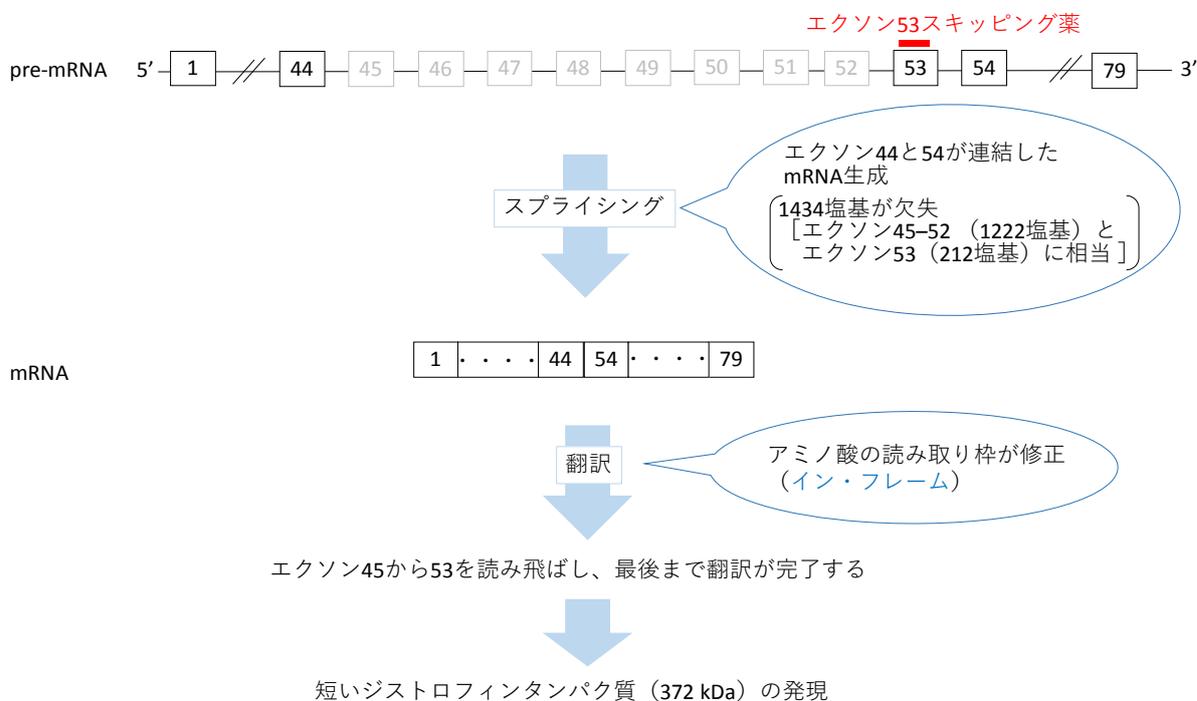
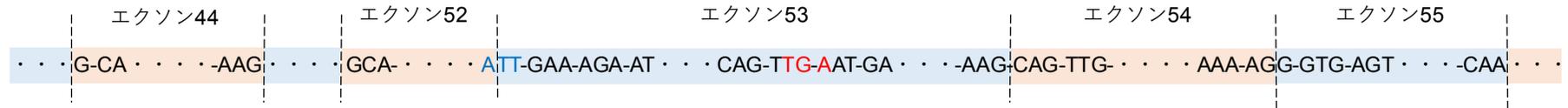


図 2.6.1.2-1 DMD 患者におけるエクソンスキッピング  
(エクソン 45–52 を欠失した DMD 患者の場合)

□ はエクソンを表す。□ 内の数字はエクソンの番号を示す。  
 エクソン 45–52 を欠失した DMD 患者におけるエクソン 53 スキッピングの例。  
 欠失領域に隣接するエクソン 53 をスキッピングさせ、イン・フレームに誘導する。

DMD の遺伝子変異はジストロフィン遺伝子の様々な場所で起こりうるため、エクソンスキッピング治療の標的エクソン (スキッピングする特定のエクソン) は患者により異なり、欠失領域に隣接するエクソンが標的となる。ビルトラルセンの標的はエクソン 53 であり、エクソン 43–52、45–52、47–52、48–52、49–52、50–52 又は 52 等を欠失する DMD 患者が対象と考えられる。

## (a) 正常ジストロフィン



## (b) エクソン 45–52 を欠失したジストロフィン



## (c) エクソン 45–52 を欠失したジストロフィンにビルトラルセンを適用 (エクソン 53 スキッピング)

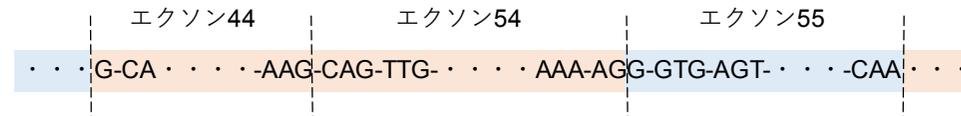


図 2.6.1.2-2 DMD 患者の mRNA におけるアウト・オブ・フレーム変異とエクソン 53 スキッピングによるイン・フレーム化  
(エクソン 45–52 を欠失した DMD 患者におけるジストロフィンの場合)

ハイフン (-) は読み枠、縦のダッシュ線はエクソンの区切りを示す。

- (a) 正常ジストロフィンでは、エクソン 52 の最後の 1 塩基 (A) とエクソン 53 の始まりの 2 塩基 (TT) とが繋がって 1 つのコドン (ATT) を形成している。この読み枠では途中の読み枠は TTG-AAT となり、エクソン 53 に終止コドン (赤字) は成立しない。
- (b) エクソン 45–52 を欠失したジストロフィンでは、スプライシングによりエクソン 44 とエクソン 53 が連結した mRNA が生成する。この場合、エクソン 53 以降の読み枠は 1 塩基分だけ右にずれる。しばらく正常ジストロフィンとは異なるアミノ酸が翻訳された後に終止コドン (TGA) が出現し、翻訳は途中で終了する (アウト・オブ・フレーム)。
- (c) エクソン 45–52 を欠失したジストロフィンにビルトラルセンを適用すると、スプライシングの段階でエクソン 53 がスキッピングされ、エクソン 44 とエクソン 54 が連結した mRNA が生成する。この場合、エクソン 54 以降は正常ジストロフィンと同じコドンの読み枠となり、最後 (エクソン 79) まで翻訳が完了する (イン・フレーム)。

### 2.6.1.3 非臨床試験成績の収集

医薬品製造販売承認申請書添付資料の作成にあたり、NCNP 及び日本新薬株式会社が実施又は委託したビルトラルセンの薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の試験成績を収集した。

#### 2.6.1.3.1 薬理試験

効力を裏付ける試験では、*in vitro* 試験として DMD 患者由来線維芽細胞を用いた検討を、*in vivo* 試験として静脈内投与（週 1 回、39 週間間歇投与）したカニクイザルを用いた検討を行い、ビルトラルセンのエクソン 53 スキッピング活性を評価した。

副次的薬理試験では、ヒト mRNA 及び pre-mRNA を対象とした *in silico* での解析によってオフターゲット候補遺伝子を抽出した後、これらの候補遺伝子の発現変動についてヒト培養細胞を用いて検討し、オフターゲット作用（ジストロフィン以外の遺伝子に対する配列依存的な作用）が生じる可能性について評価した。

安全性薬理については、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する影響を検討する試験を行った。医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用下で実施し、評価資料とした。

薬力学的薬物相互作用に該当する試験は実施しなかった。

#### 2.6.1.3.1.1 エクソン 53 スキッピング活性の評価

##### (1) DMD 患者由来細胞

ビルトラルセンの標的はエクソン 53 であり、隣接するエクソン 52 を欠失している DMD 患者のうち、患者数の多いエクソン 45-52 及びエクソン 48-52 を欠失している DMD 患者由来線維芽細胞を用いた。

これらの DMD 患者由来線維芽細胞ではジストロフィン mRNA は発現しておらず、筋管細胞に分化させることでジストロフィン mRNA が発現する。そのため、ビルトラルセンのジストロフィンエクソン 53 スキッピング活性を検討するには、筋管細胞へ分化させる必要がある。筋管細胞への分化には、筋への分化決定遺伝子である *MyoD* の発現が必須である。DMD 患者由来線維芽細胞では *MyoD* 遺伝子はサイレント遺伝子であるため、レトロウイルスベクターを用いてヒト *MyoD* 遺伝子を強制発現させ、筋管細胞に分化させた後に実験に供した<sup>13)</sup>。

##### (2) RT-PCR 法

エクソン 53 スキッピング活性の測定には、RT-PCR 法を用いた。*in vitro* 試験では、エクソン 53 を挟み込むようにエクソン 44（エクソン 45-52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞の場合）又はエクソン 46（エクソン 48-52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞の場合）に設計したフォワードプライマー及びエクソン 54 と 55 の境界に設計したリバースプライマーを使用し、エクソン 44 又は 46 からエクソン 55 にかけてのジストロフィン mRNA を RT-PCR により増幅させた。これらのプライマーを用いると、エクソン 53 スキッピングした mRNA からはエクソン 53 を含まない PCR 産物（A）が生成し、そのサイズは 212 bp（エクソン 45-52 欠損）又は 367 bp（エクソン 48-52 欠損）となる。同様に、エクソン 53 スキッピングする前の mRNA からはエクソン 53 を含む PCR 産物（B）が生成し、424 bp（エクソン 45-52 欠損）又は 579 bp（エクソン 48-52 欠損）のサイズで検出される（図 2.6.1.3.1.1-1）。

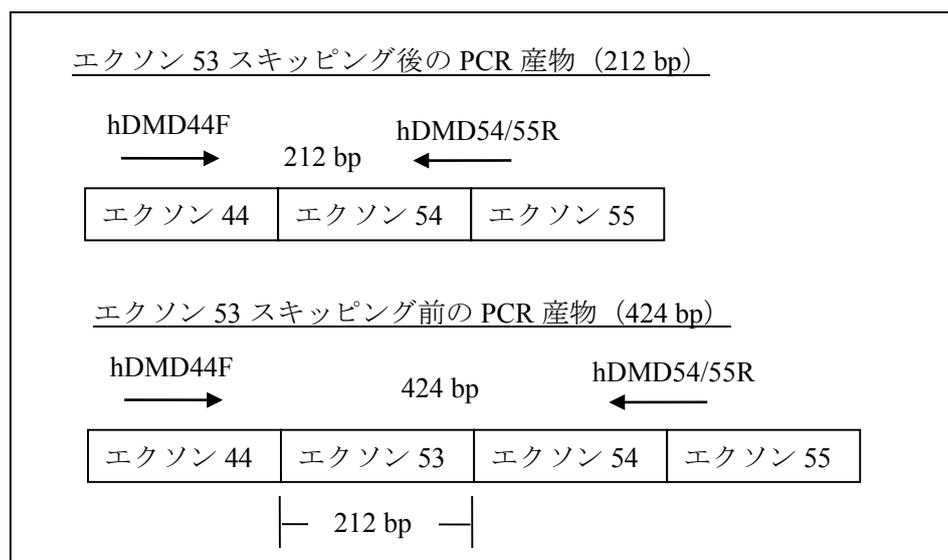


図 2.6.1.3.1.1-1 エクソン 53 スキッピングと PCR プライマー  
(エクソン 45-52 を欠失したジストロフィンの場合)

カニクイザルに反復静脈内投与(週 1 回、39 週間間歇投与)したときの骨格筋及び心筋組織標本におけるエクソン 53 スキッピング活性について検討した *in vivo* 試験では、フォワードプライマーはエクソン 50 に、リバースプライマーはエクソン 54 に設計した。このプライマーセットを用いた RT-PCR により、エクソン 50 から 54 にかけてのジストロフィン mRNA が増幅され、PCR 産物 (A) は 508 bp、PCR 産物 (B) は 720 bp のサイズで検出される。

### (3) ウェスタンブロット法 (イムノブロット)

DMD ではジストロフィタンパク質はほとんど発現していない。ビルトラルセンによりエクソン 53 がスキッピングした場合、エクソン 45-52 が欠失している DMD 患者ではエクソン 45-53 に相当する部分が欠損したジストロフィタンパク質が発現する。同様に、エクソン 48-52 が欠失している DMD 患者ではエクソン 48-53 に相当する部分が欠損したジストロフィタンパク質が発現する。

DMD 患者由来細胞を用いたジストロフィタンパク質発現に対するビルトラルセンの影響を検討した試験では、イムノブロット法を用いてジストロフィタンパク質を検出した。

ビルトラルセンを適用した細胞 (DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞) を回収し、超音波破碎した後に遠心分離して上清 (細胞溶解液) を得た。上清 (タンパク質量として 10 µg) をポリアクリルアミドゲル (3-8%) で電気泳動し、セミドライブロット法によりメンブレンに転写後、一次抗体としてマウス抗ジストロフィン抗体 (NCL-Dys1、Leica Biosystems) を、二次抗体としてヤギ抗マウス IgG (H+L)-horseradish peroxidase 複合体 (Bio-Rad Laboratories) を用い、ECL (enhanced chemiluminescence) により化学発光させて検出した。陽性対照には、ヒト正常線維芽細胞から分化させた筋管細胞より同様に回収した上清を用いた。使用した一次抗体はヒトジストロフィンの 1181~1388 番目のアミノ残基 (ロッドドメイン、エクソン 25~30 に相当する領域) を認識する抗体であるため、正常ジストロフィタンパク質だけでなく、エクソン 45-53 又はエク

ソン 48-53 に相当するアミノ酸が欠損したジストロフィンタンパク質にも反応可能である。この抗体を用いると、正常ジストロフィンタンパク質に由来するバンドは 427 kDa、エクソン 45-53 欠損ジストロフィンタンパク質に由来するバンドは 372 kDa、エクソン 48-53 欠損ジストロフィンタンパク質に由来するバンドは 390 kDa の大きさのバンドで検出される。これらの大きさのバンドの有無を確認し、ビルトラルセンの影響を検討した。

#### 2.6.1.3.2 薬物動態試験

薬物動態試験については、日本新薬株式会社が実施又は委託した試験を評価資料とした。また、安全性薬理試験及び単回/反復投与毒性試験におけるトキシコキネティクス測定の結果を評価資料として記載した。

#### 2.6.1.3.3 毒性試験

毒性試験については、日本新薬株式会社が委託した試験を評価資料（GLP 試験）又は参考資料とした。その他の毒性試験では、製造方法の異なる原薬（XXXXXXXXXX、XXXXXXXXXX、XXXXXXXXXX及びXXXXXXXXXX）を用いて不純物の毒性試験を実施した。

#### 2.6.1.4 参考文献一覧

1. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell. 1987;51:919-28. <資料番号 5.4-1>
2. Ishikawa Y, Miura T, Ishikawa Y, Aoyagi T, Ogata H, Hamada S, et al. Duchenne muscular dystrophy: survival by cardio-respiratory interventions. Neuromuscul Disord. 2011;21:47-51. <資料番号 4.3-10>
3. 一般社団法人 日本神経学会 [homepage on the Internet]. 日本神経学会, 日本小児神経学会, 国立精神・神経医療研究センター監修, 「デュシェンヌ型筋ジストロフィー診療ガイドライン」作成委員会 編集. デュシェンヌ型筋ジストロフィー診療ガイドライン 2014. Available from: <https://www.neurology-jp.org/guidelinem/dmd.html> <資料番号 5.4-15>
4. McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, Duan D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. Dis Model Mech. 2015;8:195-213. <資料番号 4.3-11>
5. Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7:762-73. <資料番号 4.3-12>
6. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. Physiol Rev. 2002;82:291-329. <資料番号 5.4-4>
7. Pasternak C, Wong S, Elson EL. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. J Cell Biol. 1995;128:355-61. <資料番号 4.3-13>

8. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*. 1988;2:90-5. <資料番号 5.4-6>
9. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*. 1989;45:498-506. <資料番号 5.4-24>
10. Järver P, O'Donovan L, Gait MJ. A chemical view of oligonucleotides for exon skipping and related drug applications. *Nucleic Acid Ther*. 2014;24:37-47. <資料番号 4.3-14>
11. Aartsma-Rus A, van Ommen GJ. Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA*. 2007;13:1609-24. <資料番号 5.4-22>
12. Anthony K, Cirak S, Torelli S, Tasca G, Feng L, Arechavala-Gomez V, et al. Dystrophin quantification and clinical correlations in Becker muscular dystrophy: implications for clinical trials. *Brain*. 2011;134:3547-59. <資料番号 5.4-5>
13. Saito T, Nakamura A, Aoki Y, Yokota T, Okada T, Osawa M, et al. Antisense PMO found in dystrophic dog model was effective in cells from exon 7-deleted DMD patient. *PLoS One*. 2010;5:e12239. <資料番号 4.3-15>

## 目次

2.6.2	薬理試験の概要文.....	3
2.6.2.1	まとめ.....	3
2.6.2.2	効力を裏付ける試験.....	5
2.6.2.3	副次的薬理試験.....	13
2.6.2.4	安全性薬理試験.....	18
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	20
2.6.2.6	考察及び結論.....	20
2.6.2.7	図表.....	24
2.6.2.8	参考文献.....	24

## 略語一覧表

語句略語	語句略語内容
AUC	area under the time-plasma concentration curve : 血漿中濃度時間曲線下面積 AUC <sub>0-t</sub> は時間 0 から t (hr) までの AUC を表す。
CHO	chinese hamster ovary : チャイニーズハムスター卵巣
C <sub>max</sub>	maximum plasma concentration : 最高血漿中濃度
DMD	Duchenne muscular dystrophy : デュシェンヌ型筋ジストロフィー
EC <sub>50</sub>	50% effective concentration : 50%有効濃度
FOB	Functional Observation Battery : 機能観察総合評価
GLP	Good Laboratory Practice : 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HEK293 細胞	human embryonic kidney 293 cells : ヒト胎児由来腎臓 293 細胞
hERG	human ether-a-go-go related gene : ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
ITO-II 細胞	human testicular tumor cells : ヒト精巣がん細胞
RD 細胞	human rhabdomyosarcoma cells : ヒト横紋筋肉腫細胞
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction : 逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応
t <sub>max</sub>	time to maximum concentration : 最高血漿中濃度到達時間

## 2.6.2 薬理試験の概要文

### 2.6.2.1 まとめ

#### (1) 効力を裏付ける試験

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞にビルトラルセンを適用し、ジストロフィン pre-mRNA に対するビルトラルセンのエクソン 53 スキッピング活性について、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法で解析した。また、ジストロフィンタンパク質発現に対するビルトラルセンの影響について検討した。さらに、カニクイザルにビルトラルセンを 39 週間反復静脈内投与 (週 1 回の間歇投与) した際の骨格筋及び心筋におけるエクソン 53 スキッピング活性について評価した。

#### 1) エクソン 45–52 欠損 DMD 患者由来細胞を用いた検討

エクソン 45–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞にビルトラルセン (0、0.1、0.3、1、3 及び 10  $\mu\text{mol/L}$ 、終濃度) を 2 日間適用した。適用終了後にエクソン 53 スキッピング活性が認められ、その  $\text{EC}_{50}$  値は 0.63  $\mu\text{mol/L}$  (95%信頼区間 0.53–0.74  $\mu\text{mol/L}$ ) であった。

同筋管細胞にビルトラルセン (0、0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10  $\mu\text{mol/L}$ 、終濃度) を 2 日間適用した。適用開始 7 日後にエクソン 53 スキッピング活性が認められ、その  $\text{EC}_{50}$  値は 0.90  $\mu\text{mol/L}$  (95%信頼区間 0.61–1.32  $\mu\text{mol/L}$ ) と推定された。また、本薬の適用により新たなジストロフィンタンパク質の発現が認められた。

#### 2) エクソン 48–52 欠損 DMD 患者由来細胞を用いた検討

エクソン 48–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞にビルトラルセン (0、0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10  $\mu\text{mol/L}$ 、終濃度) を 2 日間適用した。適用開始 7 日後にエクソン 53 スキッピング活性が認められ、その  $\text{EC}_{50}$  値は 2.30  $\mu\text{mol/L}$  (95%信頼区間 1.84–2.88  $\mu\text{mol/L}$ ) と推定された。また、本薬の適用により新たなジストロフィンタンパク質の発現が認められた。

#### 3) カニクイザルにおけるエクソン 53 スキッピング活性

カニクイザルにビルトラルセン (0、10、60 及び 360 mg/kg) を週 1 回、39 週間反復静脈内投与したとき、投与期間終了時の骨格筋 (60 及び 360 mg/kg) 及び心筋 (360 mg/kg) において、有意なエクソン 53 スキッピング活性が認められた。回復期間 (8 週間) 終了時の骨格筋及び心筋では、いずれも 360 mg/kg の用量においてスキッピング活性が認められた。

#### (2) 副次的薬理試験

##### 1) *In silico* 解析によるオフターゲット候補遺伝子の検出

*In silico* 解析の結果、ビルトラルセンの相補配列に関しては、ヒト mRNA 及び pre-mRNA からは 2 塩基以内相違配列を含む遺伝子は検出されなかった。ビルトラルセンの  $n\pm 1$  mer の相補配列では、完全一致もしくは 1 塩基相違配列を含む遺伝子は検出されなかったが、2 塩基相違配列を含む遺伝子では 30 遺伝子が検出された。このうち 11 遺伝子はカニクイザルと配列が一致しており、19 遺伝子がヒト特異的なオフターゲット候補遺伝子と考えられた。

## 2) エクソンマイクロアレイによる遺伝子変動解析

*In silico* 解析によってオフターゲット候補遺伝子として抽出された 19 遺伝子の発現変動について、エクソンマイクロアレイを用いて検討した。

### a) RD 細胞

ビルトラルセン (30 及び 60  $\mu\text{mol/L}$ ) を 2 日間適用したヒト横紋筋肉腫細胞株 (RD 細胞) において、10 遺伝子はオフターゲット作用を引き起こす可能性は低いと判断した。9 遺伝子 (*RP11-459O1.2*、*RP11-479O16.1*、*APCDD1*、*CNTNAP2*、*FSHR*、*FUT1*、*MYT1*、*SLC22A10* 及び *SLC24A2*) については影響を評価できなかった。

### b) HEK293 細胞

ビルトラルセン (120  $\mu\text{mol/L}$ ) を 2 日間適用したヒト胎児由来腎臓 (HEK) 293 細胞において、4 遺伝子 (*APCDD1*、*CNTNAP2*、*FUT1* 及び *MYT1*) で発現変動が認められた。9 遺伝子はオフターゲット作用を引き起こす可能性は低いと判断した。6 遺伝子 (*RP11-459O1.2*、*RP11-479O16.1*、*FSHR*、*PCDH15*、*SLC22A10* 及び *SLC24A2*) については影響を評価できなかった。

### c) ITO-II 細胞

ビルトラルセン (60  $\mu\text{mol/L}$ ) を 2 日間適用したヒト精巣がん細胞 (ITO-II 細胞) において、1 遺伝子 (*ALDH1A2*) で発現変動が認められた。12 遺伝子はオフターゲット作用を引き起こす可能性は低いと判断した。6 遺伝子 (*RP11-459O1.2*、*RP11-479O16.1*、*CNTNAP2*、*FSHR*、*PCDH15* 及び *SLC22A10*) については影響を評価できなかった。

## 3) RT-PCR 法による遺伝子変動解析

エクソンマイクロアレイによる遺伝子発現変動の結果を検証した。

### a) HEK293 細胞

エクソンマイクロアレイによりビルトラルセンによる発現変動の認められた 4 遺伝子 (*APCDD1*、*CNTNAP2*、*FUT1* 及び *MYT1*) について、RT-PCR 法を用いてエクソンマイクロアレイの結果を検証した。RT-PCR 法を用いて検討した場合も、ビルトラルセン (120  $\mu\text{mol/L}$ ) の適用により、*APCDD1*、*CNTNAP2*、*FUT1* 及び *MYT1* の 4 遺伝子に発現変動が認められた。

### b) ITO-II 細胞

エクソンマイクロアレイによりビルトラルセンによる発現変動の認められた 1 遺伝子 (*ALDH1A2*) 及び RD 細胞、HEK293 細胞及び ITO-II 細胞のいずれの細胞においてもエクソンマイクロアレイで発現を確認できなかった 2 遺伝子 (*FSHR* 及び *SLC22A10*) について、RT-PCR 法を用いてエクソンマイクロアレイの結果を検証した。ビルトラルセン (60  $\mu\text{mol/L}$ ) の適用により、*ALDH1A2*、*FSHR* 及び *SLC22A10* のいずれの遺伝子においても有意な発現変動は認められなかった。

### (3) 安全性薬理試験

安全性薬理試験として、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響について検討した。また、サル 12 週間間歇静脈内及び筋肉内投与による毒性試験の中で、安全性薬理の主要評価項目である中枢神経系、心血管系及び呼吸系についても評価した。中枢神経系について、機能観察総合評価 (FOB) 法を用いてラットにおける一般症状及び行動を観察し中枢神経系に及ぼす影響を検討した結果、ビルトラルセン 500 mg/kg を静脈内投与した 2 時間後に最大となる 0.75°C の体温低下を一過性に示したが、それ以外の中枢作用は認められなかった。また、サル 12 週間間歇静脈内投与毒性試験において、FOB 法を用いて一般症状及び行動を観察し中枢神経系に及ぼす影響を検討した結果、ビルトラルセンは 600 mg/kg (静脈内投与) まで中枢神経系に影響は認められなかった。心血管系について、hERG (human ether-a-go-go related gene) によりコードされたチャネルタンパク質を安定発現させたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いた *in vitro* hERG 試験の結果、ビルトラルセンは 3 mg/mL まで hERG 電流に影響を及ぼさなかった。また、サルを用いて血圧、心拍数並びに心電図に及ぼす影響を検討した結果、ビルトラルセンは 600 mg/kg (静脈内投与) まで、あるいは 100 mg/kg (筋肉内投与) まで、血圧、心拍数並びに心電図パラメータに影響は認められなかった。呼吸系について、サルを用いて呼吸数及び血液ガスパラメータに及ぼす影響を検討した結果、ビルトラルセンは 600 mg/kg (静脈内投与) まで呼吸数及び血液ガスパラメータに影響は認められなかった。

### (4) 薬力学的薬物相互作用

該当試験なし。

## 2.6.2.2 効力を裏付ける試験

### 2.6.2.2.1 エクソン 45–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞を用いた検討

エクソン 45–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞を用いてビルトラルセンのエクソン 53 スキッピング活性を評価した。

#### 2.6.2.2.1.1 ビルトラルセンを 2 日間適用した直後のエクソン 53 スキッピング活性に対する影響 (試験番号 PH-065-001、資料番号 4.2.1.1-1、評価資料)

##### (1) 方法

エクソン 45–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞に、ビルトラルセン (0、0.1、0.3、1、3 及び 10 µmol/L、終濃度) を遺伝子導入試薬である Endo-Porter® (Gene Tools) とともに 2 日間適用し、total RNA を抽出した。ビルトラルセンのエクソン 53 スキッピング活性は、RT-PCR 法で評価した。そのプライマーは、エクソン 53 を挟み込むようにフォワード側をエクソン 44 上に、リバーズ側をエクソン 54/55 上に設計した (2.6.1.3.1.1 (2) 項参照)。ビルトラルセンの各濃度におけるエクソン 53 を含まない PCR 産物 (212 bp、A) 及びエクソン 53 を含む PCR 産物 (424 bp、B) を定量し、「 $A / (A+B) \times 100$ 」の式を用いてスキッピング効率 (%) を算出し、ビルトラルセンのスキッピング活性を評価した。その解析として、2 パラメータロジスティック式を使った非線形回帰分析を行い、EC<sub>50</sub> 値及び 95% 信頼区間を推定した。

## (2) 成績

ビルトラルセンを筋管細胞に2日間適用することでエクソン53スキッピング活性が認められ、そのEC<sub>50</sub>値は0.63 μmol/L (95%信頼区間 0.53~0.74 μmol/L) と推定された (図 2.6.2.2.1.1-1)。

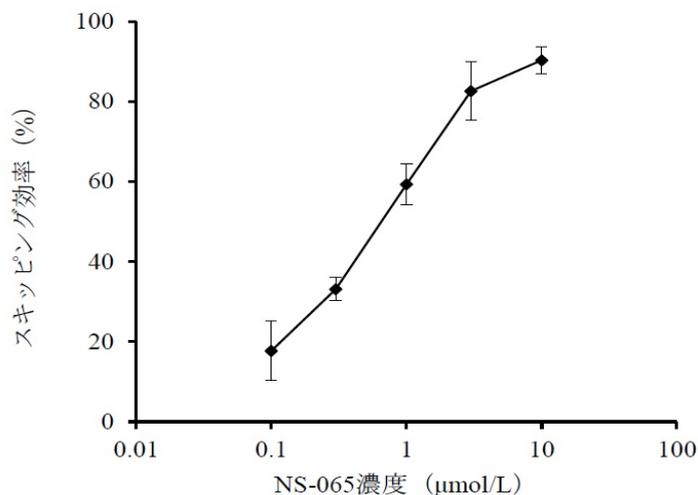


図 2.6.2.2.1.1-1 ビルトラルセンを2日間適用直後のエクソン53スキッピング活性に対するビルトラルセンの影響

NS-065 : ビルトラルセン  
各点は平均値±標準偏差 (n=4) を表す。

[4.2.1.1-1 図 1 を引用]

### 2.6.2.2.1.2 ビルトラルセンを2日間適用したときの適用開始7日後のエクソン53スキッピング活性に対する影響 (試験番号 PH-065-002、資料番号 4.2.1.1-2、評価資料)

#### (1) 方法

エクソン45-52欠損DMD患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞に、遺伝子導入試薬を使わずにビルトラルセン(0、0.03、0.1、0.3、1、3及び10 μmol/L、終濃度)単独で2日間適用した。その後、被験物質を含まない培養液に交換してさらに培養を継続した。適用開始7日後(適用終了5日後)にtotal RNAを抽出し、RT-PCR法でビルトラルセンのエクソン53スキッピング活性を評価した(RT-PCRについては2.6.2.2.1.1(1)項参照)。その解析として、2パラメータロジスティック式を使った非線形回帰分析を行い、EC<sub>50</sub>値及び95%信頼区間を推定した。

#### (2) 成績

ビルトラルセンを2日間適用し、適用開始から7日後の筋管細胞においてエクソン53スキッピング活性が認められ、そのEC<sub>50</sub>値は0.90 μmol/L (95%信頼区間 0.61~1.32 μmol/L) と推定された (図 2.6.2.2.1.2-1)。

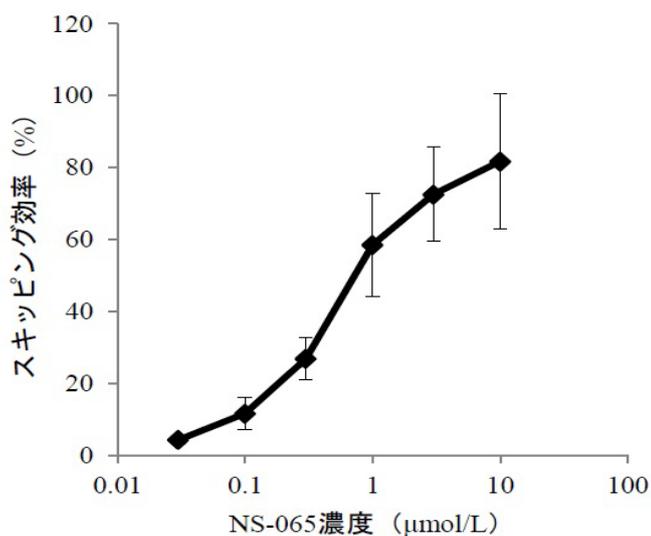


図 2.6.2.2.1.2-1 ビルトラルセンを2日間適用し、適用開始7日後におけるエクソン53スキッピング活性に対する影響

NS-065：ビルトラルセン  
各点は平均値±標準偏差 (n=3) を表す。

[4.2.1.1-2 図2を引用]

### 2.6.2.2.1.3 ビルトラルセンのジストロフィンタンパク質発現に対する影響（試験番号 PH-065-005、資料番号 4.2.1.1-3、評価資料）

#### (1) 方法

エクソン45-52欠損DMD患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞に、遺伝子導入試薬を使わずにビルトラルセン(0、0.03、0.1、0.3、1、3及び10 μmol/L、終濃度)単独で2日間適用した。その後、被験物質を含まない培養液に交換してさらに培養を継続した。適用開始7日後(適用終了5日後)に回収した細胞を用いて、イムノブロットによりジストロフィンタンパク質の発現を検出した。正常ジストロフィンタンパク質(陽性対照、ヒト正常線維芽細胞から分化させた筋管細胞より回収)に由来するバンドは427 kDa、エクソン45-53欠損ジストロフィンタンパク質に由来するバンドは372 kDaの大きさで検出される。これらのバンドの有無を確認することで、ビルトラルセンの影響を検討した(2.6.1.3.1.1 (3)項参照)。

#### (2) 成績

ヒト正常線維芽細胞から分化させた筋管細胞では正常ジストロフィンタンパク質に由来すると考えられる427 kDaの大きさのバンドが検出された。ビルトラルセンを適用した細胞では、1 μmol/L以上の濃度で正常ジストロフィンタンパク質より分子量の小さいバンドが検出され、エクソン45-53に相当する部分が欠損した372 kDaのジストロフィンタンパク質に由来すると考えられた(図2.6.2.2.1.3-1)。

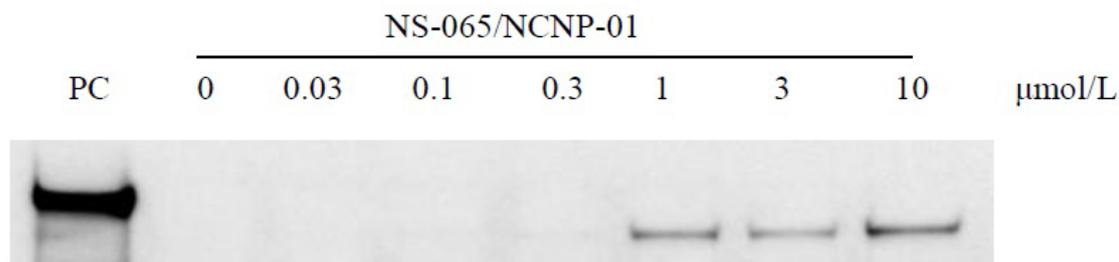


図 2.6.2.2.1.3-1 ビルトラルセンによるジストロフィンタンパク質発現

NS-065/NCNP-01：ビルトラルセン

PC：陽性対照。ヒト正常線維芽細胞から分化させた筋管細胞より回収したジストロフィンタンパク質（427 kDa）。

[4.2.1.1-3 図 1 を引用]

#### 2.6.2.2.2 エクソン 48–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞を用いた検討

エクソン 48–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞を用いて、ビルトラルセンのエクソン 53 スキッピング活性を評価した。

##### 2.6.2.2.2.1 ビルトラルセンのエクソン 53 スキッピング活性に対する影響（試験番号 PH-065-006、資料番号 4.2.1.1-4、評価資料）

###### (1) 方法

エクソン 48–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞に、遺伝子導入試薬を使わずにビルトラルセン（0、0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10 μmol/L、終濃度）単独で 2 日間適用した。その後、被験物質を含まない培養液に交換してさらに培養を継続した。適用開始 7 日後（適用終了 5 日後）に total RNA を抽出し、ビルトラルセンのエクソン 53 スキッピング活性を RT-PCR 法で評価した。そのプライマーは、エクソン 53 を挟み込むようにフォワード側をエクソン 46 上に、リバーズ側をエクソン 54/55 上に設計した（2.6.1.3.1.1 (2) 項参照）。ビルトラルセンの各濃度におけるエクソン 53 を含まない PCR 産物（367 bp、A）及びエクソン 53 を含む PCR 産物（579 bp、B）を定量し、「 $A / (A+B) \times 100$ 」の式を用いてスキッピング効率（%）を算出し、ビルトラルセンのスキッピング活性を評価した。その解析としては、2 パラメータロジスティック式を使った非線形回帰分析を行い、EC<sub>50</sub> 値及び 95%信頼区間を推定した。

## (2) 成績

ビルトラルセンを2日間適用し、適用開始から7日後の筋管細胞においてエクソン53スキッピング活性が認められ、そのEC<sub>50</sub>値は2.30 μmol/L (95%信頼区間 1.84~2.88 μmol/L) と推定された (図 2.6.2.2.2.1-1)。

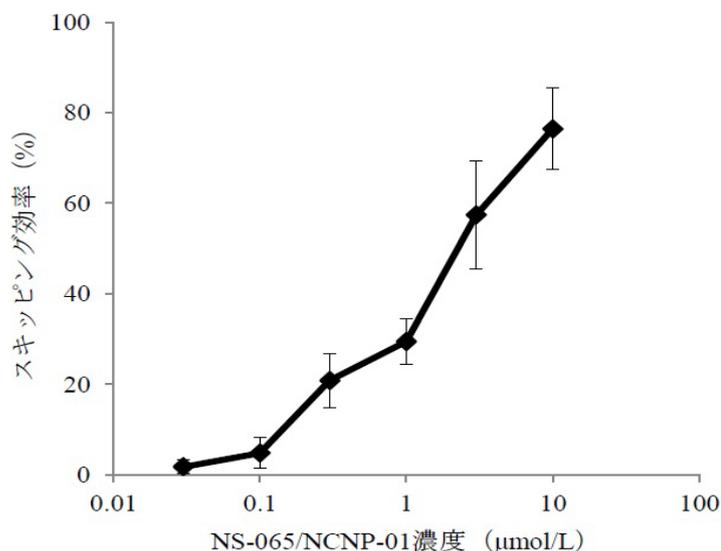


図 2.6.2.2.2.1-1 ビルトラルセンを2日間適用し、適用開始7日後におけるエクソン53スキッピング活性

NS-065/NCNP-01：ビルトラルセン  
各点は平均値±標準偏差 (n=4) を表す。

[4.2.1.1-4 図2を引用]

### 2.6.2.2.2.2 ビルトラルセンのジストロフィンタンパク質発現に対する影響 (試験番号 PH-065-007、資料番号 4.2.1.1-5、評価資料)

#### (1) 方法

エクソン48-52欠損DMD患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞に、遺伝子導入試薬を使わずにビルトラルセン (0、0.03、0.1、0.3、1、3及び10 μmol/L、終濃度) 単独で2日間適用した。その後、被験物質を含まない培養液に交換してさらに培養を継続した。適用開始7日後 (適用終了5日後) に回収した細胞を用い、イムノブロットによりジストロフィンタンパク質の発現を検出した。正常ジストロフィンタンパク質 (陽性対照、ヒト正常線維芽細胞から分化させた筋管細胞より回収) に由来するバンドは427 kDa、エクソン48-53欠損ジストロフィンタンパク質に由来するバンドは390 kDaの大きさに検出される。これらのバンドの有無を確認することで、ビルトラルセンの影響を検討した (2.6.1.3.1.1 (3) 項参照)。

#### (2) 成績

ヒト正常線維芽細胞から分化させた筋管細胞では正常ジストロフィンタンパク質に由来すると考えられる427 kDaの大きさのバンドが検出された。ビルトラルセンを適用した細胞では、

0.1  $\mu\text{mol/L}$  以上の濃度で正常ジストロフィンタンパク質より分子量の小さいバンドが検出され、エクソン 48–53 に相当する部分が欠損した 390 kDa のジストロフィンタンパク質に由来すると考えられた (図 2.6.2.2.2-1)。

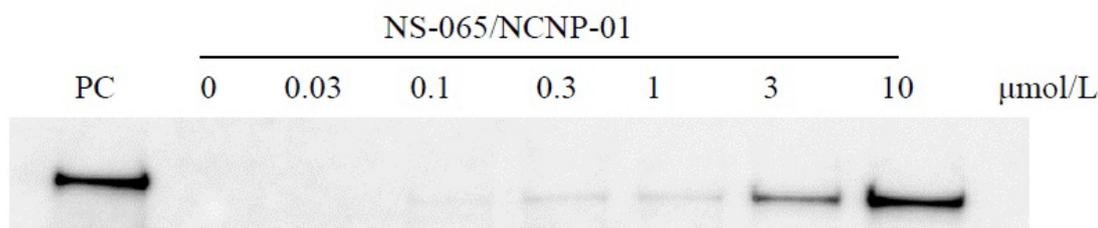


図 2.6.2.2.2-1 ビルトラルセンによるジストロフィンタンパク質発現

NS-065/NCNP-01：ビルトラルセン

PC：陽性対照。ヒト正常線維芽細胞から分化させた筋管細胞より回収したジストロフィンタンパク質 (427 kDa)

[4.2.1.1-5 図 1 を引用]

### 2.6.2.2.3 カニクイザルに対する影響

#### 2.6.2.2.3.1 39 週間間歇静脈内投与したときのエクソン 53 スキッピング活性に対する影響 (試験番号 PH-065-004、資料番号 4.2.1.1-6、評価資料)

ビルトラルセンの標的配列は、カニクイザルとヒトで同じである。カニクイザルにビルトラルセンを反復投与した毒性試験 (39 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 8 週間回復性試験、試験番号 TX10818、資料番号 4.2.3.2-4) において、剖検時に採取した骨格筋及び心筋組織標本を用いて、エクソン 53 スキッピング活性に対する影響を検討した。

##### (1) 方法

ビルトラルセンをカニクイザルに 0 (媒体：生理食塩液)、10、60 及び 360 mg/kg の用量で週 1 回、39 週間静脈内投与し、投与期間終了翌日の剖検時に採取した骨格筋 (右腓腹筋) 及び心筋から total RNA を抽出した (各群 n=5)。また、0 (媒体：生理食塩液)、60 及び 360 mg/kg の用量群においては、8 週間の回復期間を設けた後の骨格筋 (右腓腹筋) 及び心筋からも total RNA を抽出した (各群 n=3)。エクソン 53 スキッピング活性は、エクソン 53 を挟み込むように設計したフォワードプライマー (エクソン 50) 及びリバースプライマー (エクソン 54) を用いて RT-PCR を行った (2.6.1.3.1.1 (2) 項参照)。各投与量におけるエクソン 53 を含まない PCR 産物 (508 bp、A) 及びエクソン 53 を含む PCR 産物 (720 bp、B) を定量し、「 $A / (A+B) \times 100$ 」の式を用いてスキッピング効率 (%) を算出し、ビルトラルセンのスキッピング活性を評価した。

##### (2) 成績

投与期間終了時、ビルトラルセン 0、10、60 及び 360 mg/kg の用量における骨格筋でのエクソン 53 スキッピング効率はそれぞれ  $0.1\% \pm 0.2\%$ 、 $0.5\% \pm 0.3\%$ 、 $2.3\% \pm 1.5\%$  及び  $6.2\% \pm 1.8\%$  であり、60 mg/kg ( $P < 0.025$ ) 及び 360 mg/kg ( $P < 0.0005$ ) の用量で有意であった (Williams 多重比較、

片側、図 2.6.2.2.3.1-1)。心筋でのエクソン 53 スキッピング効率はそれぞれ  $0.1\% \pm 0.1\%$ 、 $0.2\% \pm 0.0\%$ 、 $0.5\% \pm 0.2\%$  及び  $3.9\% \pm 3.2\%$  であり、 $360 \text{ mg/kg}$  ( $P < 0.005$ ) の用量で有意であった (Williams 多重比較、片側、図 2.6.2.2.3.1-2)。

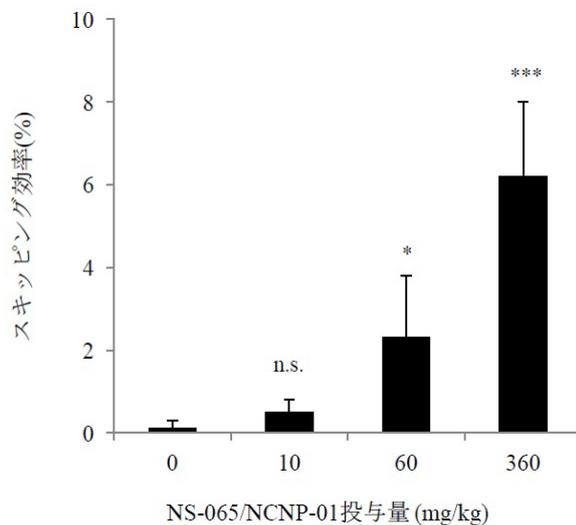


図 2.6.2.2.3.1-1 投与期間終了時のカンクイザル骨格筋におけるエクソン 53 スキッピング活性

NS-065/NCNP-01：ビルトラルセン

各カラムは平均値及び標準偏差 (n=5) を表す。

\*:  $P < 0.025$ 、\*\*\*:  $P < 0.0005$ 、n.s.: 有意差なし (Williams 多重比較検定 (片側)、媒体群との比較)

[4.2.1.1-6 図 2 を引用]

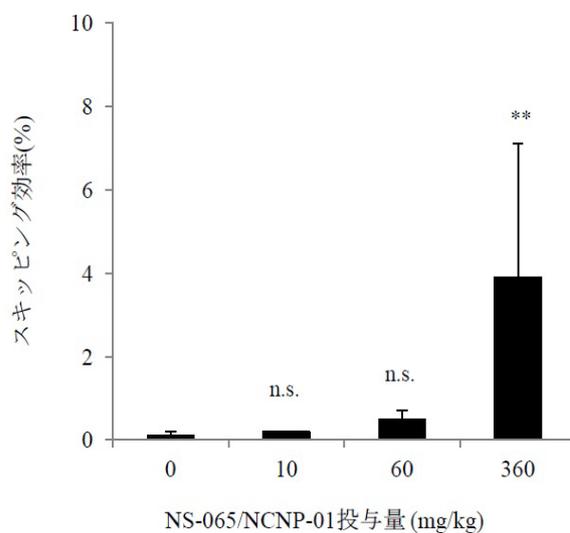


図 2.6.2.2.3.1-2 投与期間終了時のカンクイザル心筋におけるエクソン 53 スキッピング活性

NS-065/NCNP-01：ビルトラルセン

各カラムは平均値及び標準偏差 (n=5) を表す。

\*\* :  $p < 0.005$ 、n.s.: 有意差なし (Williams 多重比較検定 (片側)、媒体群との比較)

[4.2.1.1-6 図 3 を引用]

回復期間終了時、ビルトラルセン 0、60 及び 360 mg/kg の用量におけるエクソン 53 スキッピング効率は、骨格筋（図 2.6.2.2.3.1-3）でそれぞれ 0.0%±0.0%、1.4%±0.7%及び 4.8%±2.7%、心筋（図 2.6.2.2.3.1-4）でそれぞれ 0.0%±0.0%、0.0%±0.1%及び 0.6%±0.3%であり、骨格筋（ $P < 0.025$ ）及び心筋（ $P < 0.005$ ）ともに 360 mg/kg の用量において有意なエクソン 53 スキッピング活性が認められた（Williams 多重比較、片側）。

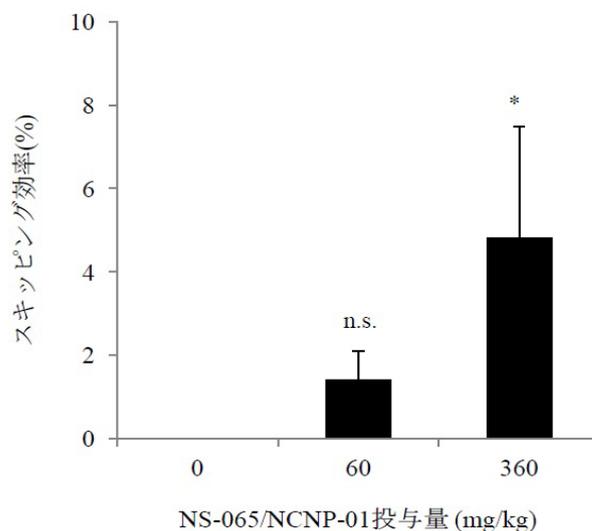


図 2.6.2.2.3.1-3 回復期間終了時のカニクイザル骨格筋におけるエクソン 53 スキッピング活性

NS-065/NCNP-01：ビルトラルセン

各カラムは平均値及び標準偏差（ $n=3$ ）を表す。

\*:  $P < 0.025$ 、n.s.:有意差なし（Williams 多重比較検定（片側）、媒体群との比較）

[4.2.1.1-6 図 4 を引用]

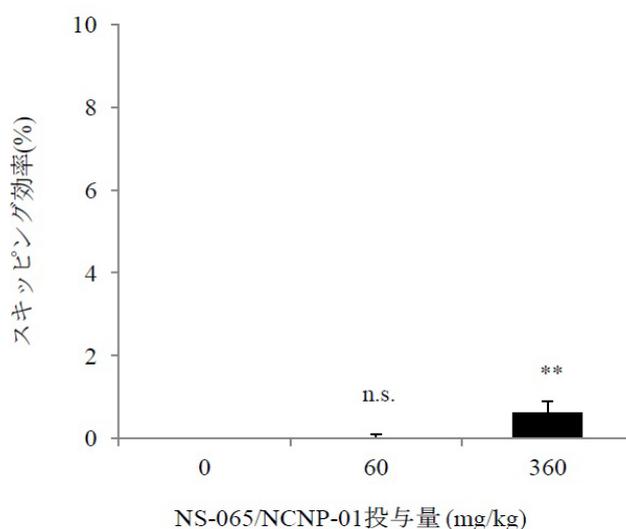


図 2.6.2.2.3.1-4 回復期間終了時のカニクイザル心筋におけるエクソン 53 スキッピング活性

NS-065/NCNP-01：ビルトラルセン

各カラムは平均値及び標準偏差（ $n=3$ ）を表す。

\*\* :  $P < 0.005$ 、n.s.:有意差なし（Williams 多重比較検定（片側）、媒体群との比較）

[4.2.1.1-6 図 5 を引用]

### 2.6.2.3 副次的薬理試験

アンチセンス核酸は、その相補配列と同一あるいは類似した配列を含む標的以外の遺伝子に対して、配列依存的に作用する可能性がある。また、アンチセンス核酸の製造過程において、1塩基が欠失した  $n-1$  mer 又は連続して同じ塩基が挿入した  $n+1$  mer が不純物として含まれる場合があり、これら  $n\pm 1$  mer についても、上記と同様に、配列依存的に作用する可能性がある。このような標的以外の遺伝子に対する配列依存的な作用はオフターゲット作用と呼ばれ、意図しない毒性(副作用)の原因となる。ビルトラルセンのオフターゲット作用(ジストロフィン以外の遺伝子に対する配列依存的な作用)の可能性について検討するために、ヒト mRNA 及び pre-mRNA を対象にしたオフターゲット候補遺伝子を *in silico* で解析した。さらに、その候補遺伝子の発現変動についてヒト培養細胞を用いて評価した。

#### 2.6.2.3.1 *In silico* 解析によるオフターゲット候補遺伝子の検出

##### 2.6.2.3.1.1 ヒト mRNA/pre-mRNA を対象とするビルトラルセン配列及びその $n\pm 1$ mer 配列についての 2 塩基以内相違配列の検索並びに実験動物における 2 塩基以内相違配列の同源性検索(試験番号 TX-1829、資料番号 4.2.1.2-1、評価資料)

###### (1) 方法

ビルトラルセン及びその  $n\pm 1$  mer の相補配列(4.2.1.2-1 表 2 及び表 3 参照)について、ヒトの mRNA 及び pre-mRNA 配列セットに対して、ミスマッチ、インサクション及びデリーションの総数が 2 塩基以内の配列(以下、2 塩基以内相違配列)をスクリプトにより検索し、オフターゲット作用を及ぼす可能性のある遺伝子をリストアップした。

###### (2) 成績

ビルトラルセンの相補配列に関しては、ヒト mRNA、pre-mRNA とともに 2 塩基以内相違配列を含む遺伝子は検出されなかった。ビルトラルセンの  $n\pm 1$  mer の相補配列においても、完全一致もしくは 1 塩基相違配列を含む遺伝子は検出されなかった。しかし 2 塩基相違配列を含む遺伝子では、ヒト mRNA から 3 遺伝子、ヒト pre-mRNA から 30 遺伝子が検出された(表 2.6.2.3.1.1-1)。なお、ヒト mRNA で検出された 3 遺伝子は、ヒト pre-mRNA にも含まれていた。

次に、 $n\pm 1$  mer の相補配列の 2 塩基相違配列を含む遺伝子として検出された遺伝子について、その動物種間の配列保存性を調査した。ヒト mRNA において検出された 3 遺伝子については、マウス及びラットでは一致する配列が検出されなかったが、カニクイザルでは 2 遺伝子で一致する配列が検出された。これら 2 遺伝子の影響については、カニクイザルを用いたビルトラルセンの非臨床試験においてその影響を評価することが可能であることから、以降の遺伝子発現解析の検討からは除外した。また、ヒト pre-mRNA において検出された 30 遺伝子については、マウス及びラットでは一致する配列が検出されなかったが、カニクイザルでは 11 遺伝子で一致する配列が検出された。これら 11 遺伝子についてもヒト mRNA と同様の理由により以降の遺伝子発現解析の検討から除外した。残りの 19 遺伝子のうち 1 遺伝子(ZNF557)については、ヒト mRNA と pre-mRNA の双方に共通して検出された。

以上の結果から、ヒト特異的なオフターゲット候補遺伝子として 19 遺伝子が抽出された。

表 2.6.2.3.1.1-1 ビルトラルセンの n±1 mer の 2 塩基以内相違配列を含むヒト遺伝子

	ヒト mRNA	ヒト pre-mRNA
ヒト特異的な遺伝子	<i>ZNF557</i>	<i>ALDH1A2</i> , <i>APCDD1</i> , <i>CAMKK2</i> , <i>CNTNAP2</i> , <i>FSHR</i> , <i>FUT1</i> , <i>LMTK2</i> , <i>LRIG1</i> , <i>MYT1</i> , <i>PCDH15</i> , <i>PRKCH</i> , <i>RP11-459O1.2</i> , <i>RP11-479O16.1</i> , <i>SLC22A10</i> , <i>SLC24A2</i> , <i>TIAM1</i> , <i>WDR20</i> , <i>WRN</i> , <i>ZNF557</i>
カニクイザルの配列と一致している遺伝子	<i>RP11-649E7.5</i> , <i>SYCP2L</i>	<i>AC008697.1</i> , <i>COL18A1</i> , <i>EEF2K</i> , <i>GRIA1</i> , <i>GRIN2A</i> , <i>RP11-145G20.1</i> , <i>RP11-649E7.5</i> , <i>SLC25A18</i> , <i>SLIT3</i> , <i>SYCP2L</i> , <i>ZMIZ1-AS1</i>

### 2.6.2.3.2 遺伝子発現解析

*In silico* 解析 (2.6.2.3.1.1 項参照) によって抽出されたヒトに特異的な 19 個のオフターゲット候補遺伝子の発現変動について、エクソンマイクロアレイを用いて検討した。また、RT-PCR 法によりエクソンマイクロアレイの結果を検証した。

#### 2.6.2.3.2.1 エクソンマイクロアレイを用いた RD 細胞における遺伝子発現解析 (試験番号 TX10902、資料番号 4.2.1.2-2、評価資料)

##### (1) 方法

RD 細胞にビルトラルセンを 0 (対照)、30 及び 60  $\mu\text{mol/L}$  (細胞毒性を示さない最高濃度) の濃度で遺伝子導入試薬である Endo-Porter<sup>®</sup> とともに 2 日間適用した。適用終了後に抽出した total RNA を用いてオフターゲット候補遺伝子 (19 遺伝子) の蛍光標識プローブを作成し、マイクロアレイとハイブリダイゼーション (65°C、17 時間) させた。ハイブリダイゼーション後の蛍光シグナル値について、対照群とビルトラルセン群を比較するためにアレイ間補正を行った。対照群とビルトラルセン群のシグナル値 (補正後) について Welch の t 検定を実施するとともに、対照群に対するビルトラルセン群の発現比を算出した。「Welch の t 検定で有意」かつ「発現比が 1.5 超又は 0.67 未満」を示した場合に、発現変動があると判定した。さらに、網羅的な遺伝子発現変動に基づいてパスウェイ解析を実施した。

##### (2) 成績

19 個のオフターゲット候補遺伝子のうち、*RP11-459O1.2* 及び *RP11-479O16.1* はプローブを作成できず、また *APCDD1*、*CNTNAP2*、*FSHR*、*FUT1*、*MYT1*、*SLC22A10* 及び *SLC24A2* は発現が確認できなかったため、これら 9 遺伝子についてはビルトラルセンの影響は評価できなかった。残る 10 遺伝子の発現に変動は認められなかった。

パスウェイ解析では、30 及び 60  $\mu\text{mol/L}$  群でそれぞれ 29 及び 19 パスウェイが有意 ( $P < 0.05$ ) に検出された (4.2.1.2-2 Table 4-1, Table 4-2) が、これらのパスウェイに発現変動を示すオフターゲット候補遺伝子は含まれておらず、オフターゲット作用と関連性のない変化と考えられた。

以上、エクソンマイクロアレイを用いた RD 細胞における遺伝子発現変動解析の結果、19 個のオフターゲット候補遺伝子のうち、10 遺伝子はオフターゲット作用を引き起こす可能性は低いと判断した。9 遺伝子 (*RP11-459O1.2*、*RP11-479O16.1*、*APCDD1*、*CNTNAP2*、*FSHR*、*FUT1*、*MYT1*、*SLC22A10* 及び *SLC24A2*) については影響を評価できなかった。

### 2.6.2.3.2.2 エクソンマイクロアレイを用いた HEK293 細胞における遺伝子発現解析（試験番号 TX10903、資料番号 4.2.1.2-3、評価資料）

#### (1) 方法

HEK293 細胞にビルトラルセンを 0（対照）及び 120  $\mu\text{mol/L}$ （細胞毒性を示さない濃度）の濃度で遺伝子導入試薬である Endo-Porter<sup>®</sup>とともに 2 日間適用した。適用終了後に抽出した total RNA を用いてオフターゲット候補遺伝子（19 遺伝子）の蛍光標識プローブを作成し、マイクロアレイとハイブリダイゼーション（65°C、17 時間）させた。ハイブリダイゼーション後の蛍光シグナル値について、対照群とビルトラルセン群を比較するためにアレイ間補正を行った。対照群とビルトラルセン群のシグナル値（補正後）について Welch の t 検定を実施するとともに、対照群に対するビルトラルセン群の発現比を算出した。「Welch の t 検定で有意」かつ「発現比が 1.5 超又は 0.67 未満」を示した場合に、発現変動があると判定した。さらに、網羅的な遺伝子発現変動に基づいてパスウェイ解析を実施した。

#### (2) 成績

19 個のオフターゲット候補遺伝子のうち、*RP11-45901.2* 及び *RP11-479016.1* はプローブを作成できず、また *FSHR*、*PCDH15*、*SLC22A10* 及び *SLC24A2* は発現が確認できなかったため、これら 6 遺伝子についてはビルトラルセンの影響は評価できなかった。*APCDD1*（プローブ名：A\_23\_P337262）、*CNTNAP2*（プローブ名：A\_33\_P3367196、A\_37\_P156408、A\_37\_P156409）及び *MYT1*（プローブ名：A\_37\_P413045）については発現低下が認められ、*FUT1*（プローブ名：A\_23\_P107963）については発現上昇が認められた。残る 9 遺伝子の発現に変動は認められなかった。

パスウェイ解析では、41 パスウェイが有意に検出されたが、これらのパスウェイに発現変動を示すオフターゲット候補遺伝子は含まれておらず、オフターゲット作用と関連性のない変化と考えられた。

以上、エクソンマイクロアレイを用いて HEK293 細胞における遺伝子発現変動を解析した結果、19 個のオフターゲット候補遺伝子のうち、4 遺伝子（*APCDD1*、*CNTNAP2*、*FUT1* 及び *MYT1*）で発現変動が認められた。9 遺伝子はオフターゲット作用を引き起こす可能性は低いと判断した。6 遺伝子（*RP11-45901.2*、*RP11-479016.1*、*FSHR*、*PCDH15*、*SLC22A10* 及び *SLC24A2*）については影響を評価できなかった。

### 2.6.2.3.2.3 エクソンマイクロアレイを用いた ITO-II 細胞における遺伝子発現解析（試験番号 TX10904、資料番号 4.2.1.2-4、評価資料）

#### (1) 方法

ITO-II 細胞にビルトラルセンを 0（対照）及び 60  $\mu\text{mol/L}$ （細胞毒性を示さない濃度）の濃度で遺伝子導入試薬である Endo-Porter<sup>®</sup>とともに 2 日間適用した。適用終了後に抽出した total RNA を用いてオフターゲット候補遺伝子（19 遺伝子）の蛍光標識プローブを作成し、マイクロアレイとハイブリダイゼーション（65°C、17 時間）させた。ハイブリダイゼーション後の蛍光シグナル値について、対照群とビルトラルセン群を比較するためにアレイ間補正を行った。対照群とビルトラルセン群のシグナル値（補正後）について Welch の t 検定を実施するとともに、対照群に対す

るビルトラルセン群の発現比を算出した。「Welch の t 検定で有意」かつ「発現比が 1.5 超又は 0.67 未満」を示した場合に、発現変動があると判定した。さらに、網羅的な遺伝子発現変動に基づいてパスウェイ解析を実施した。

## (2) 成績

19 個のオフターゲット候補遺伝子のうち、*RP11-45901.2* 及び *RP11-479016.1* はプローブを作成できず、また *CNTNAP2*、*FSHR*、*PCDH15* 及び *SLC22A10* は発現が確認できなかったため、これら 6 遺伝子についてはビルトラルセンの影響は評価できなかった。*ALDH1A2* (プローブ名: A\_37\_P398120) については発現上昇が認められた。残る 12 遺伝子の発現に変動は認められなかった。

パスウェイ解析では、有意なパスウェイは検出されなかった。

以上、エクソンマイクロアレイを用いて ITO-II 細胞における遺伝子発現変動を解析した結果、19 個のオフターゲット候補遺伝子のうち、1 遺伝子 (*ALDH1A2*) で発現変動が認められた。12 遺伝子はオフターゲット作用を引き起こす可能性は低いと判断した。6 遺伝子 (*RP11-45901.2*、*RP11-479016.1*、*CNTNAP2*、*FSHR*、*PCDH15* 及び *SLC22A10*) については影響を評価できなかった。

### 2.6.2.3.2.4 RT-PCR 法を用いた HEK293 細胞における遺伝子発現解析 (試験番号 TX10968、資料番号 4.2.1.2-5、評価資料)

## (1) 方法

エクソンマイクロアレイで発現変動の認められた *APCDD1* (プローブ名: A\_23\_P337262)、*CNTNAP2* (プローブ名: A\_33\_P3367196、A\_37\_P156408、A\_37\_P156409)、*FUT1* (プローブ名: A\_23\_P107963) 及び *MYT1* (プローブ名: A\_37\_P413045) の 4 遺伝子 (2.6.2.3.2.2 項参照) の発現変動について、ビルトラルセン (0 及び 120  $\mu\text{mol/L}$ ) を適用した HEK293 細胞より抽出した total RNA (2.6.2.3.2.2 (1) 項参照) を用い、RT-PCR 法で定量的に解析した。プライマーは、プローブ配列の一部もしくは全配列が包含されるように設計した (*CNTNAP2* では 3 種類を設計)。結果は、ビルトラルセン 0 (対照群) 及び 120  $\mu\text{mol/L}$  適用群の間で有意差検定 (Welch の t 検定) を行うとともに、両者の発現比を算出した。

## (2) 成績

ビルトラルセン (120  $\mu\text{mol/L}$ ) の適用により、*APCDD1* (プローブ名: A\_23\_P337262)、*CNTNAP2* (プローブ名: A\_33\_P3367196、A\_37\_P156409) 及び *MYT1* (プローブ名: A\_37\_P413045) の発現は有意に低下し、*FUT1* (プローブ名: A\_23\_P107963) の発現は有意に増加した。*CNTNAP2* (プローブ名: A\_37\_P156408) については、有意な変動は認められなかった (表 2.6.2.3.2.4-1)。

以上、RT-PCR 法により HEK293 細胞における遺伝子発現変動を解析した結果、*APCDD1*、*CNTNAP2*、*MYT1* 及び *FUT1* の 4 遺伝子に発現変動が認められた。

表 2.6.2.3.2.4-1 RT-PCR を用いた HEK293 細胞におけるオフターゲット候補遺伝子の発現変動

遺伝子名	PCR 領域 <sup>a</sup>	発現比	
		対数 (log <sub>2</sub> ratio)	真数 <sup>b</sup>
<i>APCDD1</i>	A_23_P337262	-0.99*	0.50
<i>CNTNAP2</i>	A_33_P3367196	-3.25*	0.11
	A_37_P156408	0.16	1.12
	A_37_P156409	-3.88*	0.07
<i>FUT1</i>	A_23_P107963	0.61*	1.53
<i>MYT1</i>	A_37_P413045	-2.44*	0.18

\* : P<0.05 vs 対照群 (Welch の t 検定)

a : プローブ名で示す。PCR プライマーは、ジストロフィンの当該プローブを含む領域で設定した。

b : 対数值 (log<sub>2</sub> ratio) を真数に変換した。

#### 2.6.2.3.2.5 RT-PCR 法を用いた ITO-II 細胞における遺伝子発現解析 (試験番号 TX10967、資料番号 4.2.1.2-6、評価資料)

##### (1) 方法

ビルトラルセン (0 及び 60 µmol/L) を適用した ITO-II 細胞より抽出した total RNA (2.6.2.3.2.3 (1) 項参照) を用い、*ALDH1A2* (プローブ名 : A\_37\_P398120)、*FSHR* (プローブ名 : A\_37\_P041819、A\_37\_P041818) 及び *SLC22A10* (プローブ名 : A\_37\_P434573) の 3 遺伝子の発現変動を RT-PCR 法で定量的に解析した。*ALDH1A2* は ITO-II 細胞においてエクソンマイクロアレイで発現変動が認められた遺伝子、*FSHR* 及び *SLC22A10* については、RD 細胞、HEK293 細胞及び ITO-II 細胞のいずれの細胞においてもエクソンマイクロアレイで発現を確認できなかった遺伝子として選択した。プライマーは、プローブ配列の一部もしくは全配列が包含されるように設計した (*FSHR* では 2 種類を設計)。結果は、ビルトラルセン 0 (対照群) 及び 60 µmol/L 適用群の間で有意差検定 (Welch の t 検定) を行うとともに、両者の発現比を算出した。

##### (2) 成績

ビルトラルセン (60 µmol/L) の適用により、*ALDH1A2*、*FSHR* 及び *SLC22A10* のいずれの遺伝子においても有意な発現変動は認められなかった (表 2.6.2.3.2.5-1)。

表 2.6.2.3.2.5-1 RT-PCR を用いた ITO-II 細胞におけるオフターゲット候補遺伝子の発現変動

遺伝子名	PCR 領域 <sup>a</sup>	発現比	
		対数 (log <sub>2</sub> ratio)	真数 <sup>b</sup>
<i>ALDH1A2</i>	A_37_P398120	0.10	1.07
<i>FSHR</i>	A_37_P041819	-0.15	0.90
	A_37_P041818	-0.03	0.98
<i>SLC22A10</i>	A_37_P434573	-0.37	0.77

a : プローブ名で示す。PCR プライマーは、ジストロフィンの当該プローブを含む領域で設定した。

b : 対数值 (log<sub>2</sub> ratio) を真数に変換した。

## 2.6.2.4 安全性薬理試験

ビルトラルセンの安全性薬理試験として、ラット及びサルを用いて中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した。心血管系においては、hERG 安定発現 CHO 細胞を用いて *in vitro* での検討を行った。また、サル 12 週間間歇静脈内及び筋肉内投与による毒性試験の中で、安全性薬理の主要評価項目である中枢神経系、心血管系及び呼吸系についても評価した。

### 2.6.2.4.1 中枢神経系

#### 2.6.2.4.1.1 ラットを用いた一般症状及び神経行動学的機能に及ぼす影響（試験番号 TX10764, 資料番号 4.2.1.3-1、評価資料）

CrI:CD(SD)系雄性ラット（8 週齢、各群 n=6）にビルトラルセンを 0（媒体：生理食塩液）、125、250 及び 500 mg/kg の用量で単回静脈内投与し、FOB 法を用いて一般症状及び神経行動学的機能観察を行い中枢神経系に及ぼす影響を評価した。また、そのときの全身的曝露についても評価した。ビルトラルセンは 500 mg/kg の用量で投与後 1 及び 2 時間において体温を有意に低下させ、その程度（平均値の差）は媒体群と比較してそれぞれ 0.58°C（投与後 1 時間）及び 0.75°C（投与後 2 時間）であった。なお、体温低下は投与後 24 時間までに回復した。その他の中枢神経系に対する影響は認められなかった。

ビルトラルセンを 125、250 及び 500 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときのビルトラルセンの最高血漿中濃度（平均値±標準偏差）はそれぞれ 641.8±113.5、1077±400 及び 1862±214 µg/mL、投与開始から 24 時間後までの血漿中濃度時間曲線下面積（AUC<sub>0-24hr</sub>、平均値）はそれぞれ 273.1、604.8 及び 2361 µg·hr/mL であった。

#### 2.6.2.4.1.2 カニクイザルを用いた 12 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験の中 中枢神経系に及ぼす影響（試験番号 TX10746, 資料番号 4.2.3.2-3、評価資料）

雄性カニクイザルを用いた 12 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験において、ビルトラルセンを 0（媒体：生理食塩液）、60、200 及び 600 mg/kg の用量で週 1 回、12 週間間歇静脈内投与し、FOB 法を用いて一般症状及び神経行動学的機能観察を行い、中枢神経系に及ぼす影響を検討した。観察は 3 並びに 10 回目投与日の投与終了後約 2 及び 6 時間に行った。ビルトラルセンはいずれの投与用量においても中枢神経系に影響を及ぼさなかった。

### 2.6.2.4.2 心血管系

#### 2.6.2.4.2.1 hERG 電流に及ぼす影響（試験番号 TX10836、資料番号 4.2.1.3-2、評価資料）

hERG 安定発現 CHO 細胞にビルトラルセンを 0（媒体：Tyrode 溶液）、0.3、1 及び 3 mg/mL の濃度で適用し、ホールセルパッチクランプ法を用いて hERG 電流に及ぼす影響を検討した。ビルトラルセンはいずれの適用濃度においても hERG 電流に影響は認められなかった。

陽性対照物質である E-4031 は 0.1 µmol/L で hERG 電流を顕著に抑制した。

#### 2.6.2.4.2.2 覚醒サルの心血管系に及ぼす影響（試験番号 TX10834、資料番号 4.2.1.3-3、評価資料）

雄性カニクイザルにビルトラルセンを 0（媒体：生理食塩液）、60、200 及び 600 mg/kg の用量で週 1 回、4 週間漸増静脈内投与し、テレメトリー法を用いて心電図パラメータ（心拍数、PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び QTc [Bazett の補正式]）並びに血圧（拡張期血圧、収縮期血圧及び平均血圧）に及ぼす影響を検討した。ビルトラルセンはいずれの投与用量においても心電図パラメータ及び血圧に影響は認められなかった。

#### 2.6.2.4.2.3 カニクイザルを用いた 12 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験の心血管系に及ぼす影響（試験番号 TX10746、資料番号 4.2.3.2-3、評価資料）

雄性カニクイザルを用いた 12 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験において、ビルトラルセンを 0（媒体：生理食塩液）、60、200 及び 600 mg/kg の用量で週 1 回、12 週間間歇静脈内投与し、心電図パラメータ（心拍数、PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び QTc [Bazett の補正式]）並びに血圧（拡張期血圧及び収縮期血圧）に及ぼす影響を検討した。心電図検査及び血圧測定は 2 及び 11 回目投与日の投与終了後 1～3 時間に、それぞれホルター心電計と全自動血圧測定装置を用いて無麻酔下で測定した。ビルトラルセンはいずれの投与用量においても心電図パラメータ及び血圧に影響は認められなかった。

#### 2.6.2.4.2.4 カニクイザルを用いた 12 週間間歇筋肉内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験の心血管系に及ぼす影響（試験番号 TX10747、資料番号 4.2.3.2-5、評価資料）

雄性カニクイザルを用いた 12 週間間歇筋肉内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験において、ビルトラルセンを 0（媒体：生理食塩液）、100 mg/kg の用量で週 1 回、12 週間間歇筋肉内投与し、心電図パラメータ（心拍数、PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び QTc [Bazett の補正式]）に及ぼす影響を検討した。心電図検査は 2 及び 11 回目投与日の投与終了後 1～3 時間に、ホルター心電計を用いて無麻酔下で測定した。ビルトラルセンは心電図パラメータに影響は認められなかった。

### 2.6.2.4.3 呼吸系

#### 2.6.2.4.3.1 カニクイザルの呼吸系に及ぼす影響（試験番号 TX10765、資料番号 4.2.1.3-4、評価資料）

雄性カニクイザル（1 歳）にビルトラルセンを 0（媒体：生理食塩液）、60、200 及び 600 mg/kg の用量で週 1 回、4 週間漸増静脈内投与し、呼吸数及び血液ガスパラメータ（pH、酸素分圧、二酸化炭素分圧及びヘモグロビン酸素飽和度）に及ぼす影響を検討した。ビルトラルセンはいずれの投与用量においても呼吸数及び血液ガスパラメータに影響は認められなかった。

#### 2.6.2.4.3.2 カニクイザルを用いた 12 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験の呼吸系に及ぼす影響（試験番号 TX10746、資料番号 4.2.3.2-3、評価資料）

雄性カニクイザルを用いた 12 週間間歇静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験において、ビルトラルセンを 0（媒体：生理食塩液）、60、200 及び 600 mg/kg の用量で週 1 回、12 週間間歇静脈内投与し、呼吸数に及ぼす影響を検討した。呼吸数測定は 2 及び 11 回目投与日の投与終了後 1～3 時間に、無麻酔下で 15 秒間の呼吸数を測定した。ビルトラルセンはいずれの投与用量においても呼吸数に影響は認められなかった。

#### 2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

#### 2.6.2.6 考察及び結論

ビルトラルセンは、DMD の原因遺伝子であるジストロフィン pre-mRNA のエクソン 53 内の相補配列に結合することでスプライシングを制御し、エクソン 53 をスキッピングするアンチセンス核酸である。

エクソン 45-52 を欠損した DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞を用いてビルトラルセンのエクソン 53 スキッピング活性について検討した。ビルトラルセンを 2 日間適用したとき、適用終了直後及び適用開始 7 日後（適用終了 5 日後）におけるエクソン 53 スキッピング活性は非線形回帰分析から濃度依存的に増加すると考えられ、その EC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 0.63 µmol/L 及び 0.90 µmol/L と推定された。エクソン 48-52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞を用いた場合にも、適用開始 7 日後（適用終了 5 日後）にエクソン 53 スキッピング活性が認められており、EC<sub>50</sub> 値は 2.30 µmol/L と推定された。いずれの細胞においても、正常よりも短い新たなジストロフィンタンパク質の発現が確認され、それぞれエクソン 45-53、エクソン 48-53 に相当するアミノ酸が欠けたジストロフィンタンパク質と考えられた。

薬物動態試験において、筋ジストロフィーモデルマウスである *mdx* マウスに 20 mg/kg の用量で <sup>14</sup>C-ビルトラルセンを静脈内投与したとき、骨格筋における放射能濃度は最高（前肢下部の筋肉）で 47.3 µg eq./g であり（2.6.5.5.2 項参照）、この値はビルトラルセンの分子量（6924.82）から 6.8 µmol/L に相当する。上述したように、培養細胞を用いた検討において、概ね 1 µmol/L 前後の濃度域で活性が確認されており、本薬投与時この濃度域で薬効発現すると考えられた。

カニクイザルにビルトラルセンを 10、60 及び 360 mg/kg の用量で週 1 回、39 週間反復静脈内投与したとき、投与期間終了時の骨格筋におけるエクソン 53 スキッピング効率はそれぞれ 0.5%、2.3%及び 6.2%であり、Williams 多重比較検定の結果から用量依存的に増加したと考えられた。<sup>14</sup>C-ビルトラルセンを用いた組織分布試験（2.6.4.4.2 項参照）において、*mdx* マウスでは野生型マウスと比較して筋肉組織中で高い放射能濃度を示した。これは、ビルトラルセンの基本骨格であるモルホリノ核酸は再生初期の筋線維に効率よく取り込まれ、筋再生が活発な DMD 患者の筋線維に取り込まれやすいという報告<sup>1)</sup>と一致しており、DMD 患者ではより高いスキッピング活性が得られると推察された。

*mdx52* マウス (エクソン 52 欠損マウス) にエクソン 51 スキッピング薬 (320 mg/kg) を週 1 回、7 週間反復投与したとき筋機能が回復したことが報告<sup>2)</sup>されており、エクソン 53 スキッピングすることでも、機能的なジストロフィンタンパク質が発現し筋機能の回復が期待できると考えられた。国内 P1/2 試験 (2.7.6.2 項参照) において、ヒトに本薬 80 mg/kg を 1 時間かけて静脈内投与 (週 1 回、24 週間) したときの最終投与時の  $C_{max}$  は 47.5  $\mu\text{mol/L}$  (329  $\mu\text{g/mL}$ )、 $AUC_{0-\infty}$  は 73.4  $\mu\text{mol/L}$  (508  $\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ ) である。DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞を用いた検討において、本薬のエクソン 53 スキッピング活性の  $EC_{50}$  値は 1  $\mu\text{mol/L}$  前後と推定されていることから、ヒトに投与した際にもエクソン 53 をスキッピングすることで、正常よりも短いもののジストロフィンタンパク質を発現させると考えられた。

ビルトラルセンのオフターゲット作用を検討するために、ビルトラルセン及びその  $n\pm 1$  mer について、ヒト mRNA 及び pre-mRNA の全ての遺伝子配列に対して *in silico* で解析した。その結果、30 種類のオフターゲット候補遺伝子を見出した。このうち、11 遺伝子はカニクイザルでも認められ、ヒト特異的なオフターゲット候補遺伝子は 19 遺伝子であった。これらの 19 候補遺伝子について、ヒト由来の RD 細胞、HEK293 細胞及び ITO-II 細胞を用いてビルトラルセンの遺伝子発現に及ぼす影響をエクソンマイクロアレイ法及び RT-PCR 法により評価した (表 2.6.2.6-1)。エクソンマイクロアレイ法による検討では、薬効標的臓器である筋細胞 (RD 細胞) では、10 遺伝子について発現変動が認められず、9 遺伝子についてはビルトラルセンの影響を評価できなかった。ビルトラルセンの毒性標的臓器である腎臓細胞 (HEK293 細胞) では、4 遺伝子 (*APCDD1*、*CNTNAP2*、*FUT1* 及び *MYT1*) で、ITO-II 細胞では 1 遺伝子 (*ALDH1A2*) で発現変動が認められた。*SLC24A2* は ITO-II 細胞での発現変動が認められず、遺伝子発現に影響しないと考えられた。*FSHR* 及び *SLC22A10* は、RD 細胞、HEK293 細胞並びに ITO-II 細胞のいずれにおいても発現が認められず、エクソンマイクロアレイにより評価できなかった。エクソンマイクロアレイにより発現変動の認められた 5 遺伝子 (*APCDD1*、*CNTNAP2*、*FUT1*、*MYT1* 及び *ALDH1A2*) 及び影響を評価できなかった 2 遺伝子 (*FSHR* 及び *SLC22A10*) について、RT-PCR 法を用いて遺伝子発現を評価した。その結果、*APCDD1*、*CNTNAP2*、*FUT1* 及び *MYT1* については発現変動が認められ、遺伝子発現に影響すると考えられた。*ALDH1A2*、*FSHR* 及び *SLC22A10* については発現変動が認められなかったことから、遺伝子発現に影響しないと考えられた。なお、*RP11-459O1.2* 及び *RP11-479O16.1* はいずれの細胞においてもエクソンマイクロアレイの際にプローブを作成できずビルトラルセンの遺伝子発現への影響を評価ができなかったが、これらの遺伝子は生体における機能が知られておらず、遺伝子発現変動が生体の機能に与える影響を評価できないため、RT-PCR 法による検討は実施しなかった。

表 2.6.2.6-1 ビルトラルセンによるオフターゲット候補遺伝子の発現変動

遺伝子名	実験系	発現変動			最終判定
		RD 細胞	HEK293 細胞	ITO-II 細胞	
ALDH1A2	エクソンマイクロアレイ	—	—	↑	影響なし
	RT-PCR	/	/	—	
APCDD1	エクソンマイクロアレイ	発現なし	↓	—	↓
	RT-PCR	/	↓	/	
CAMKK2	エクソンマイクロアレイ	—	—	—	影響なし
	RT-PCR	/	/	/	
CNTNAP2	エクソンマイクロアレイ	発現なし	↓	発現なし	↓
	RT-PCR	/	↓	/	
FSHR	エクソンマイクロアレイ	発現なし	発現なし	発現なし	影響なし
	RT-PCR	/	/	—	
FUT1	エクソンマイクロアレイ	発現なし	↑	—	↑
	RT-PCR	/	↑	/	
LMTK2	エクソンマイクロアレイ	—	—	—	影響なし
	RT-PCR	/	/	/	
LRIG1	エクソンマイクロアレイ	—	—	—	影響なし
	RT-PCR	/	/	/	
MYT1	エクソンマイクロアレイ	発現なし	↓	—	↓
	RT-PCR	/	↓	/	
PCDH15	エクソンマイクロアレイ	—	発現なし	発現なし	影響なし
	RT-PCR	/	/	/	
PRKCH	エクソンマイクロアレイ	—	—	—	影響なし
	RT-PCR	/	/	/	
RP11-459O1.2	エクソンマイクロアレイ	/	/	/	未検討
	RT-PCR	/	/	/	
RP11-479O16.1	エクソンマイクロアレイ	/	/	/	未検討
	RT-PCR	/	/	/	
SLC22A10	エクソンマイクロアレイ	発現なし	発現なし	発現なし	影響なし
	RT-PCR	/	/	—	
SLC24A2	エクソンマイクロアレイ	発現なし	発現なし	—	影響なし
	RT-PCR	/	/	/	
TIAM1	エクソンマイクロアレイ	—	—	—	影響なし
	RT-PCR	/	/	/	
WDR20	エクソンマイクロアレイ	—	—	—	影響なし
	RT-PCR	/	/	/	
WRN	エクソンマイクロアレイ	—	—	—	影響なし
	RT-PCR	/	/	/	
ZNF557	エクソンマイクロアレイ	—	—	—	影響なし
	RT-PCR	/	/	/	

RD 細胞はエクソンマイクロアレイのみ実施。斜線のカラムは未検討を示す。

—：変化なし、↑：発現増加、↓：発現低下

*CNTNAP2* は神経系に発現するニューレキシンファミリーに属するタンパク質をコードしており、自閉症、統合失調症を含む神経発達障害に関与している<sup>3,4)</sup>。また、*MYT1* は神経に特異的な Zn フィンガーを含有する DNA 結合性タンパク質をコードしており、発育時の神経細胞の分化に関与している<sup>5)</sup>。実験動物を用いた組織分布試験の結果（2.6.4.4.2 項及び 2.6.4.4.3 項参照）より、ビルトラルセンはヒトにおいて神経系への分布は少ないと考えられることから、*CNTNAP2* 及び *MYT1* の遺伝子発現に影響を与える可能性は低いと考えられた。*FUT1* は赤血球の H 抗原の前駆体

の生成に関与するフコシルトランスフェラーゼをコードし、遺伝子の突然変異は血液型のボンベイ型の原因となる<sup>6)</sup>。また、*FUT1* はがん細胞の分化<sup>7)</sup>、転移<sup>8)</sup>、薬剤耐性<sup>9)</sup>に関連するとの報告もあるが、正常細胞を用いた検討は報告されていない。エクソンマイクロアレイ試験では、遺伝子導入試薬である Endo-Porter<sup>®</sup>を用いたうえで、ビルトラルセンを最高 120 µmol/L (831 µg/mL) で適用している。これは、臨床試験 (2.7.6.2 項参照) において 80 mg/kg を静脈内投与した時の C<sub>max</sub> 値 (329 µg/mL) より 2.5 倍高い条件であるが、このときの *FUT1* mRNA の増加は 1.53 倍と僅かであった。したがって、ビルトラルセンはヒトにおいて *FUT1* の遺伝子発現に影響を与える可能性は否定できないものの、ヒトの生理機能に影響を与える可能性は低いと考えられた。*APCDD1* は Wnt シグナル経路の抑制因子をコードしている。この遺伝子の変異は先天性貧毛症と関連性があるとされ、しばしば毛幹の脱色又は低色素化を伴うことが報告されている<sup>10, 11)</sup>。なお、この遺伝子の発現増加は大腸がんとの関連性が疑われている。ヒトにおいて、*APCDD1* の発現低下により毛髪伸長の過程に影響を及ぼす可能性も考えられたものの、臨床試験において貧毛は認められなかった。国内 P1/2 試験において、16 例中 1 例の患者において毛髪変色が認められたが (2.7.4.2.1.5 (3) 項参照)、貧毛を伴うものではなく、オフターゲット作用との関連性は明らかでなかった。

ヒトとカニクイザルで共通して発現するオフターゲット候補遺伝子 (11 遺伝子) の評価は、カニクイザルを用いた非臨床試験の中で実施した。カニクイザルにビルトラルセンを反復静脈内投与した毒性試験で認められた所見は尿細管の好塩基性顆粒などの腎臓への影響に限定されたものであった (2.6.6.9.1.2 項参照)。これらはアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与した際に一般的に認められるものであり<sup>12, 13)</sup>、ハイブリダイゼーション非依存的な変化と推察された。また、同 11 遺伝子について、ヒト細胞を用いたエクソンマイクロアレイから得られたデータを再解析した。5 遺伝子 (*COL18A1*、*EEF2K*、*SLC25A18*、*SLIT3*、*SYCP2L*) については、遺伝子発現変動は認められなかった。残りの 6 遺伝子はいずれのヒト細胞においても遺伝子発現がない、あるいはエクソンマイクロアレイにプローブが搭載されていなかったが、4 遺伝子 (*ZMIZ1-AS1*、*AC008697.1*、*RP11-145G20.1* 及び *RP11-649E7.5*) については生物学的特性が不明であり、ヒトにおけるリスク評価は不能と考えられた。2 遺伝子 (*GRI1A1* 及び *GRIN2A*) については主に脳に発現する遺伝子であり、ビルトラルセンは神経系への分布は少ないと考えられること (2.6.4.4.2 項及び 2.6.4.4.3 項参照) から、本薬がこれらの遺伝子発現に影響を与える可能性は低いと考えられた。上記のとおり、カニクイザルを用いた非臨床試験において認められた毒性所見は核酸薬を投与した際に一般的に認められる腎障害に起因した変化に限定されており、中枢神経症状を含めこれら 6 遺伝子の変動を疑う変化は認められなかった。したがって、ヒトに対してビルトラルセンの標的以外の配列へのハイブリダイゼーションに基づくオフターゲット作用が生じるリスクは低いと考えられた。

安全性薬理試験として、ラット中枢神経系、*in vitro* hERG 試験ならびにサル心血管系及びサル呼吸系に及ぼす影響について検討した。また、サル 12 週間間歇静脈内及び筋肉内投与による毒性試験の中で、安全性薬理の主要評価項目である中枢神経系、心血管系及び呼吸系についても評価した。ラット中枢神経系において、500 mg/kg を静脈内投与した 1 及び 2 時間後にのみ、最大で 0.75°C の軽度な体温低下が一過性に認められた。この時の血漿中濃度はそれぞれ 278.8 及び 120.9 µg/mL であった (4.2.1.3-1 参照)。これらの血漿中濃度を超えるその他の測定時点ではいず

れも体温は低下しておらず、血漿中濃度推移との関連性が認められないことから、この一過性の体温低下は偶発的な変化であると考えられた。また、サルを用いた中枢神経系評価では、最大用量である 600 mg/kg を急速静脈内投与しても体温への影響は認められず、この時の  $C_{max}$  は 7835  $\mu\text{g/mL}$  であった（初回投与日の  $C_{max}$ 、2.6.7.7.3 項参照）。以上より、ラットで認められた体温低下は統計学的には有意であるものの生物学的な意義はなく、ヒトへ影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。その他、中枢神経系、心血管系および呼吸系に影響は認められなかった。以上の安全性薬理試験より、臨床使用にあたり特別に注意を要する作用は認められなかった。

以上より、本薬はジストロフィン pre-mRNA のエクソン 53 に結合してエクソン 53 をスキッピングさせ、機能的なジストロフィンタンパク質を発現させることにより DMD の治療に貢献すると考えられた。

### 2.6.2.7 図表

図表は、本文中の適切な場所に記載した。

### 2.6.2.8 参考文献

1. Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Nakamura A, Wood MJ, Partridge T, et al. Highly efficient *in vivo* delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- $\alpha$ 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. *Hum Mol Genet.* 2013;22:4914-28. <資料番号 4.3-1>
2. Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, Saito T, Okazawa H, Nagata T, et al. In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient *mdx* mouse. *Mol Ther.* 2010;18:1995-2005. <資料番号 4.3-2>
3. Clemm von Hohenberg C, Wigand MC, Kubicki M, Leicht G, Giegling I, Karch S, et al. *CNTNAP2* polymorphisms and structural brain connectivity: a diffusion-tensor imaging study. *J Psychiatr Res.* 2013;47:1349-56. <資料番号 4.3-3>
4. Scott-Van Zeeland AA, Abrahams BS, Alvarez-Retuerto AI, Sonnenblick LI, Rudie JD, Ghahremani D, et al. Altered functional connectivity in frontal lobe circuits is associated with variation in the autism risk gene *CNTNAP2*. *Sci Transl Med.* 2010;2:56-80. <資料番号 4.3-4>
5. Vasconcelos FF, Castro DS. Coordinating neuronal differentiation with repression of the progenitor program: Role of the transcription factor MyT1. *Neurogenesis.* 2017;4:e1329683. <資料番号 4.3-5>
6. Kelly RJ, Ernst LK, Larsen RD, Bryant JG, Robinson JS, Lowe JB. Molecular basis for H blood group deficiency in Bombay ( $O_h$ ) and para-Bombay individuals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:5843-7. <資料番号 4.3-6>
7. Gao N, Liu J, Liu D, Hao Y, Yan L, Ma Y, et al. c-Jun transcriptionally regulates alpha 1, 2-fucosyltransferase 1 (FUT1) in ovarian cancer. *Biochimie.* 2014;107:286-92. <資料番号 4.3-16>

8. Mejías-Luque R, López-Ferrer A, Garrido M, Fabra A, de Bolós C. Changes in the invasive and metastatic capacities of HT-29/M3 cells induced by the expression of fucosyltransferase 1. *Cancer Sci.* 2007;98:1000-5. <資料番号 4.3-17>
9. Che Y, Ren X, Xu L, Ding X, Zhang X, Sun X. Critical involvement of the  $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase in multidrug resistance of human chronic myeloid leukemia. *Oncol Rep.* 2016;35:3025-33.  
<資料番号 4.3-18>
10. Rabbani P, Takeo M, Chou W, Myung P, Bosenberg M, Chin L, et al. Coordinated activation of Wnt in epithelial and melanocyte stem cells initiates pigmented hair regeneration. *Cell.* 2011;145:941-55.  
<資料番号 5.4-52>
11. Shimomura Y, Agalliu D, Vonica A, Luria V, Wajid M, Baumer A, et al. APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. *Nature.* 2010;464:1043-7.  
<資料番号 5.4-53>
12. Sazani P, Ness KP, Weller DL, Poage DW, Palyada K, Shrewsbury SB. Repeat-dose toxicology evaluation in cynomolgus monkeys of AVI-4658, a phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO) drug for the treatment of duchenne muscular dystrophy. *Int J Toxicol.* 2011;30:313-21.  
<資料番号 4.3-7>
13. Engelhardt JA. Comparative renal toxicopathology of antisense oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2016;26:199-209. <資料番号 4.3-8>

## 目次

2.6.3	薬理試験概要表.....	2
2.6.3.1	薬理試験：一覧表.....	2
2.6.3.2	効力を裏付ける試験.....	4
2.6.3.3	副次的薬理試験.....	8
2.6.3.4	安全性薬理試験.....	14
2.6.3.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	16
2.6.3.6	参考文献.....	16

## 2.6.3 薬理試験概要表

## 2.6.3.1 薬理試験：一覧表

## 一覧表（1/2）

被験物質：Viltolarsen

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
効力を裏付ける試験					
エクソン 53 スキッピング後のジストロフィン mRNA 発現（エクソンスキッピング活性）	エクソン 45-52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞（筋管細胞）	<i>in vitro</i>	日本新薬東部創薬研究所/国立精神・神経医療研究センター	PH-065-001	4.2.1.1-1 (評価資料)
	エクソン 45-52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞（筋管細胞）	<i>in vitro</i>	日本新薬東部創薬研究所/国立精神・神経医療研究センター	PH-065-002	4.2.1.1-2 (評価資料)
エクソン 53 スキッピング後のジストロフィンタンパク質発現	エクソン 45-52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞（筋管細胞）	<i>in vitro</i>	日本新薬東部創薬研究所/国立精神・神経医療研究センター	PH-065-005	4.2.1.1-3 (評価資料)
エクソン 53 スキッピング後のジストロフィン mRNA 発現（エクソンスキッピング活性）	エクソン 48-52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞（筋管細胞）	<i>in vitro</i>	日本新薬東部創薬研究所/国立精神・神経医療研究センター	PH-065-006	4.2.1.1-4 (評価資料)
エクソン 53 スキッピング後のジストロフィンタンパク質発現	エクソン 48-52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞（筋管細胞）	<i>in vitro</i>	日本新薬東部創薬研究所/国立精神・神経医療研究センター	PH-065-007	4.2.1.1-5 (評価資料)
カニクイザルにおけるエクソン 53 スキッピング活性	カニクイザル	静脈内	日本新薬東部創薬研究所	PH-065-004	4.2.1.1-6 (評価資料)

DMD：デュシェンヌ型筋ジストロフィー

一覧表 (2/2)

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
副次的薬理試験					
ヒトでの2塩基以内相違配列の検索並びに実験動物における2塩基以内相違配列の同源性検索	ヒト mRNA 及び pre-mRNA	<i>in silico</i>	日本新薬東部創薬研究所	TX-1829	4.2.1.2-1 (評価資料)
遺伝発現変動解析 (エクソンマイクロアレイ)	RD 細胞	<i>in vitro</i>	██████████	TX10902	4.2.1.2-2 (評価資料)
	HEK293 細胞	<i>in vitro</i>	██████████	TX10903	4.2.1.2-3 (評価資料)
	ITO-II 細胞	<i>in vitro</i>	██████████	TX10904	4.2.1.2-4 (評価資料)
遺伝発現変動解析 (RT-PCR 法)	HEK293 細胞	<i>in vitro</i>	██████████	TX10968	4.2.1.2-5 (評価資料)
	ITO-II 細胞	<i>in vitro</i>	██████████	TX10967	4.2.1.2-6 (評価資料)
安全性薬理試験					
中枢神経系に及ぼす影響	ラット	静脈内	██████████	TX10764	4.2.1.3-1 (評価資料)
中枢神経系に及ぼす影響	カニクイザル	静脈内	██████████	TX10746	4.2.3.2-3 (評価資料)
hERG 電流に及ぼす影響	hERG 安定発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i>	██████████	TX10836	4.2.1.3-2 (評価資料)
心血管系に及ぼす影響	カニクイザル	静脈内	██████████	TX10834	4.2.1.3-3 (評価資料)
心血管系に及ぼす影響	カニクイザル	静脈内	██████████	TX10746	4.2.3.2-3 (評価資料)
心血管系に及ぼす影響	カニクイザル	筋肉内	██████████	TX10747	4.2.3.2-5 (評価資料)
呼吸系に及ぼす影響	カニクイザル	静脈内	██████████	TX10765	4.2.1.3-4 (評価資料)
呼吸系に及ぼす影響	カニクイザル	静脈内	██████████	TX10746	4.2.3.2-3 (評価資料)
薬力学的薬物相互作用試験：該当試験なし					

RD 細胞：ヒト横紋筋肉腫細胞、HEK293 細胞：ヒト胎児由来腎臓細胞、ITO-II 細胞：ヒト精巣がん細胞、hERG：human ether-a-go-go related gene

## 2.6.3.2 効力を裏付ける試験

## 2.6.3.2.1 エクソン 45–52 欠損 DMD 患者由来細胞を用いた検討

## 2.6.3.2.1.1 エクソン 53 スキッピング活性に対する影響 (1)

被験物質：Viltolarsen

試験項目	試験系	試験成績			試験番号 (CTD 記載箇所)
		適用濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	スキッピング効率 <sup>b</sup> (%)	EC <sub>50</sub> 値 (95%信頼区間) ( $\mu\text{mol/L}$ )	
ジストロフィン mRNA の RT-PCR <sup>a</sup>	エクソン 45–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞	0	0.7 ± 0.8	0.63 (0.53~0.74)	PH-065-001 (4.2.1.1-1、 評価資料)
		0.1	17.7 ± 7.4		
		0.3	33.1 ± 2.9		
		1	59.3 ± 5.2		
		3	82.6 ± 7.4		
		10	90.3 ± 3.3		

a：ビルトラルセンを2日間適用した直後に回収した細胞から total RNA を抽出し、ジストロフィン mRNA の RT-PCR 産物を検出した。

b：平均値±標準偏差 (n=4)

## 2.6.3.2.1.2 エクソン 53 スキッピング活性に対する影響 (2)

被験物質：Viltolarsen

試験項目	試験系	試験成績			試験番号 (CTD 記載箇所)
		適用濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	スキッピング効率 <sup>b</sup> (%)	EC <sub>50</sub> 値 (95%信頼区間) ( $\mu\text{mol/L}$ )	
ジストロフィン mRNA の RT-PCR <sup>a</sup>	エクソン 45–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞	0	3.3 ± 1.5	0.90 (0.61~1.32)	PH-065-002 (4.2.1.1-2、 評価資料)
		0.03	4.3 ± 1.0		
		0.1	11.6 ± 4.4		
		0.3	26.8 ± 5.8		
		1	58.5 ± 14.4		
		3	72.5 ± 13.1		
		10	81.7 ± 18.8		

a：ビルトラルセンを2日間適用し、適用開始7日後（適用終了5日後）に回収した細胞から total RNA を抽出し、ジストロフィン mRNA の RT-PCR 産物を検出した。

b：平均値±標準偏差 (n=3)

2.6.3.2.1.3 ジストロフィンタンパク質発現に対する影響

被験物質：Viltolarsen

試験項目	試験系	試験成績		試験番号 (CTD 記載箇所)
		適用濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	タンパク質発現	
ジストロフィンタンパク質のイムノブロット <sup>a</sup>	エクソン 45-52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞	0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10	1 $\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度で、ジストロフィンタンパク質の発現が確認された (☑ 2.6.2.2.1.3-1 参照)。	PH-065-005 (4.2.1.1-3、 評価資料)

a：ビルトラルセンは2日間適用し、適用開始7日後（適用終了5日後）に回収した細胞を用いてジストロフィンタンパク質を検出した。ヒト正常線維芽細胞を分化させた筋管細胞より回収したジストロフィンタンパク質を陽性対照として用いた。

## 2.6.3.2.2 エクソン 48–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞を用いた検討

## 2.6.3.2.2.1 エクソン 53 スキッピング活性に対する影響

被験物質：Viltolarsen

試験項目	試験系	試験成績			試験番号 (CTD 記載箇所)
		適用濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	スキッピング効率 <sup>b</sup> (%)	EC <sub>50</sub> 値 (95%信頼区間) ( $\mu\text{mol/L}$ )	
ジストロフィン mRNA の RT-PCR <sup>a</sup>	エクソン 48–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞	0	0.7 ± 0.5	2.30 (1.84~2.88)	PH-065-006 (4.2.1.1-4、 評価資料)
		0.03	1.8 ± 1.5		
		0.1	4.9 ± 3.3		
		0.3	20.9 ± 5.9		
		1	29.5 ± 5.0		
		3	57.4 ± 11.9		
		10	76.4 ± 9.0		

a：ビルトラルセンを2日間適用し、適用開始7日後（適用終了5日後）に回収した細胞から total RNA を抽出し、ジストロフィン mRNA の RT-PCR 産物を検出した。

b：平均値±標準偏差（n=4）

## 2.6.3.2.2.2 ジストロフィンタンパク質発現に対する影響

被験物質：Viltolarsen

試験項目	試験系	試験成績		試験番号 (CTD 記載箇所)
		適用濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	タンパク質発現	
ジストロフィンタンパク質のイムノブロット <sup>a</sup>	エクソン 48–52 欠損 DMD 患者由来線維芽細胞から分化させた筋管細胞	0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10	0.1 $\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度でジストロフィンタンパク質の発現が確認された（ <input checked="" type="checkbox"/> 2.6.2.2.2.2-1 参照）。	PH-065-007 (4.2.1.1-5、 評価資料)

a：ビルトラルセンを2日間適用し、適用開始7日後（適用終了5日後）に回収した細胞を用いてジストロフィンタンパク質を検出した。ヒト正常線維芽細胞を分化させた筋管細胞より回収したジストロフィンタンパク質を陽性対照として用いた。

2.6.3.2.3 カニクイザルに対する影響

2.6.3.2.3.1 39 週間間歇静脈内投与したときのエクソン 53 スキッピング活性に対する影響

被験物質：Viltolarsen

試験項目	試験系	試験成績				試験番号 (CTD 記載箇所)
		標本採取時期	組織	投与量 (mg/kg)	スキッピング効率 <sup>a</sup> (%)	
ジストロフィン mRNA の RT-PCR	カニクイザル 39 週間 静脈内投与試験 (週 1 回間歇)	39 週間の投与期間 終了時	骨格筋	0 (媒体)	0.1 ± 0.2	PH-065-004 (4.2.1.1-6、 評価資料)
				10	0.5 ± 0.3	
				60	2.3 ± 1.5 <sup>b</sup>	
			360	6.2 ± 1.8 <sup>c</sup>		
			心筋	0 (媒体)	0.1 ± 0.1	
				10	0.2 ± 0.0	
		60		0.5 ± 0.2		
		39 週間の投与期間終了 後の 8 週間の回復期間 終了時	骨格筋	0 (媒体)	0.0 ± 0.0	
				60	1.4 ± 0.7	
				360	4.8 ± 2.7 <sup>b</sup>	
			心筋	0 (媒体)	0.0 ± 0.0	
				60	0.0 ± 0.1	
360	0.6 ± 0.3 <sup>d</sup>					

媒体：生理食塩液

a：平均値±標準偏差（投与期間終了時は n=5、回復期間終了時は n=3）

b：P<0.025（Williams 多重比較検定（片側）、媒体群との比較）

c：P<0.0005（Williams 多重比較検定（片側）、媒体群との比較）

d：P<0.005（Williams 多重比較検定（片側）、媒体群との比較）

## 2.6.3.3 副次的薬理試験

2.6.3.3.1 *in silico* 解析によるオフターゲット候補遺伝子の検出2.6.3.3.1.1 ヒト mRNA/pre-mRNA を対象とするビルトラルセン配列及びその  $n \pm 1$  mer 配列についての 2 塩基以内相違配列の検索並びに実験動物における 2 塩基以内相違配列の相同性検索

(1/2)

被験物質：Viltolarsen

遺伝子名	Description	ヒト mRNA		ヒト pre-mRNA		試験番号 (CTD 記載箇所)
		n-1	n+1	n-1	n+1	
<i>AC008697.1</i>	—			✓		TX-1829 (4.2.1.2-1、評価資料)
<i>ALDH1A2</i>	aldehyde dehydrogenase 1 family member A2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15472]			✓		
<i>APCDD1</i>	APC down-regulated 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15718]			✓		
<i>CAMKK2</i>	calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1470]			✓		
<i>CNTNAP2</i>	contactin associated protein-like 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13830]			✓		
<i>COL18A1</i>	collagen type XVIII alpha 1 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2195]			✓		
<i>EEF2K</i>	eukaryotic elongation factor 2 kinase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24615]			✓		
<i>FSHR</i>	follicle stimulating hormone receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3969]			✓		
<i>FUT1</i>	fucosyltransferase 1 (H blood group) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4012]			✓		
<i>GRIA1</i>	glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4571]			✓		
<i>GRIN2A</i>	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4585]			✓		
<i>LMTK2</i>	lemur tyrosine kinase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17880]			✓		
<i>LRIG1</i>	leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17360]			✓		
<i>MYT1</i>	myelin transcription factor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7622]			✓		

✓：検出された遺伝子

(2/2)

遺伝子名	Description	ヒト mRNA		ヒト pre-mRNA		試験番号 (CTD 記載箇所)
		n-1	n+1	n-1	n+1	
<i>PCDH15</i>	protocadherin related 15 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14674]			✓		TX-1829 (4.2.1.2-1、評価 資料)
<i>PRKCH</i>	protein kinase C eta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9403]			✓		
<i>RP11-145G20.1</i>	—			✓		
<i>RP11-459O1.2</i>	—				✓	
<i>RP11-479O16.1</i>	—			✓		
<i>RP11-649E7.5</i>	—	✓		✓		
<i>SLC22A10</i>	solute carrier family 22 member 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18057]			✓	✓	
<i>SLC24A2</i>	solute carrier family 24 member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10976]			✓		
<i>SLC25A18</i>	solute carrier family 25 member 18 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10988]			✓		
<i>SLIT3</i>	slit guidance ligand 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11087]			✓		
<i>SYCP2L</i>	synaptonemal complex protein 2 like [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21537]	✓		✓		
<i>TIAM1</i>	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11805]			✓		
<i>WDR20</i>	WD repeat domain 20 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19667]			✓		
<i>WRN</i>	Werner syndrome RecQ like helicase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12791]			✓		
<i>ZMIZ1-AS1</i>	ZMIZ1 antisense RNA 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:27433]			✓		
<i>ZNF557</i>	zinc finger protein 557 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28632]	✓		✓		
ビルトラルセンの相補配列：ヒト mRNA、pre-mRNA とともに 2 塩基以内相違配列を含む遺伝子は検出されなかった。 ビルトラルセンの n±1 mer の相補配列：ヒト mRNA、pre-mRNA とともに完全一致もしくは 1 塩基相違で一致する配列は含まれていなかった。 ✓：検出された遺伝子						

## 2.6.3.3.2 遺伝子の発現変動解析

## 2.6.3.3.2.1 エクソンマイクロアレイを用いた遺伝子変動解析：RD 細胞

試験番号 TX10902 (資料番号 4.2.1.2-2) 参照。

## 2.6.3.3.2.2 エクソンマイクロアレイを用いた遺伝子変動解析：HEK293 細胞

(1/2)

被験物質：Viltolarsen

遺伝子名	プローブ名	発現比	判定 <sup>a</sup>	プローブ名	発現比	判定 <sup>a</sup>	試験番号 (CTD 記載箇所)
<i>APCDD1</i>	A_23_P337262	0.54*	↓	A_37_P099263	0.67*	—	TX10903 (4.2.1.2-3、評価資料)
	A_37_P099261	0.95	—	A_37_P099264	0.71*	—	
	A_37_P099262	0.75*	—				
<i>CNTNAP2</i>	A_33_P3367196	0.09*	↓	A_37_P156401	0.82	—	
	A_37_P156386	0.93	—	A_37_P156403	0.89	—	
	A_37_P156387	0.99	—	A_37_P156404	0.99	—	
	A_37_P156389	0.86	—	A_37_P156405	0.87	—	
	A_37_P156390	1.43	—	A_37_P156408	0.19*	↓	
	A_37_P156391	1.12	—	A_37_P156409	0.13*	↓	
	A_37_P156392	0.87	—	A_37_P380098	0.90	—	
	A_37_P156394	1.09	—	A_37_P380103	0.95	—	
	A_37_P156395	0.77	—	A_37_P380108	1.05	—	
	A_37_P156396	0.79	—	A_37_P380112	1.09	—	
	A_37_P156397	1.03	—	A_37_P380116	0.95	—	
	A_37_P156399	0.87	—	A_37_P380117	0.92	—	
	A_37_P156400	0.98	—				

\* : P<0.05 vs 対照群 (Welch の t 検定)

↓ : 発現低下、— : 変動なし、

a : 「Welch の t 検定で有意」かつ「発現比が 1.5 倍超又は 0.67 倍未満」を示した場合に発現変動ありと判定

(2/2)

遺伝子名	プローブ名	発現比	判定 <sup>a</sup>	プローブ名	発現比	判定 <sup>a</sup>	試験番号 (CTD 記載箇所)
<i>FUT1</i>	A_23_P107963	1.53*	↑	A_37_P143217	1.11	—	TX10903 (4.2.1.2-3、評価資料)
	A_37_P143216	0.90	—	A_37_P143218	1.00	—	
<i>MYT1</i>	A_23_P210835	0.99	—	A_37_P189349	0.85	—	
	A_37_P189336	0.99	—	A_37_P189350	0.99	—	
	A_37_P189337	1.18	—	A_37_P189351	1.04	—	
	A_37_P189338	0.92	—	A_37_P189352	0.74	—	
	A_37_P189339	1.14	—	A_37_P413044	0.76	—	
	A_37_P189341	0.89	—	A_37_P413045	0.30*	↓	
	A_37_P189342	0.87	—	A_37_P413050	0.88	—	
	A_37_P189343	1.08	—	A_37_P413054	1.02	—	
	A_37_P189345	0.74	—	A_37_P413058	0.95	—	
	A_37_P189346	0.97	—	A_37_P413063	0.94	—	
	A_37_P189347	0.96	—	A_37_P462811	0.79	—	
<p>評価不能遺伝子</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・発現が認められなかった遺伝子：<i>FSHR</i>、<i>PCDH15</i>、<i>SLC22A10</i>、<i>SLC24A2</i></li> <li>・プローブ作成ができなかった遺伝子：<i>RP11-459O1.2</i>、<i>RP11-479O16.1</i></li> </ul> <p>発現変動が認められなかった遺伝子：<i>ALDH1A2</i>、<i>CAMKK2</i>、<i>LMTK2</i>、<i>LRIG1</i>、<i>PRKCH</i>、<i>TIAM1</i>、<i>WDR20</i>、<i>WRN</i>、<i>ZNF557</i></p> <p>有意なパスウェイ：41（オフターゲット候補遺伝子は含まれず）</p>							

\*：P&lt;0.05 vs 対照群（Welch の t 検定）

↑：発現上昇、↓：発現低下、—：変動なし、

a：「Welch の t 検定で有意」かつ「発現比が 1.5 倍超又は 0.67 倍未満」を示した場合に発現変動ありと判定

2.6.3.3.2.3 エクソンマイクロアレイを用いた遺伝子変動解析：ITO-II 細胞

被験物質：Viltolarsen

遺伝子名	プローブ名	発現比	判定 <sup>a</sup>	プローブ名	発現比	判定 <sup>a</sup>	試験番号 (CTD 記載箇所)
<i>ALDH1A2</i>	A_24_P73577	1.10	—	A_37_P174417	0.78	—	TX10904 (4.2.1.2-4、評価資料)
	A_37_P174407	1.01	—	A_37_P174418	0.99	—	
	A_37_P174408	0.94	—	A_37_P398120	1.54*	↑	
	A_37_P174409	1.15	—	A_37_P398124	1.31*	—	
	A_37_P174411	1.14	—	A_37_P398125	1.04	—	
	A_37_P174412	1.22	—	A_37_P398129	1.08	—	
	A_37_P174413	1.20	—	A_37_P461571	1.00	—	
	A_37_P174416	0.86	—				
<p>評価不能遺伝子</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・発現が認められなかった遺伝子：<i>CNTNAP2</i>、<i>FSHR</i>、<i>PCDH15</i>、<i>SLC22A10</i></li> <li>・プローブ作成ができなかった遺伝子：<i>RP11-459O1.2</i>、<i>RP11-479O16.1</i></li> </ul> <p>発現変動が認められなかった遺伝子：<i>APCDD1</i>、<i>CAMKK2</i>、<i>FUT1</i>、<i>LMTK2</i>、<i>LRIG1</i>、<i>MYT1</i>、<i>PRKCH</i>、<i>SLC24A2</i>、<i>TIAM1</i>、<i>WDR20</i>、<i>WRN</i>、<i>ZNF557</i></p> <p>有意なパスウェイ：なし</p>							

\*：P<0.05 vs 対照群（Welch の t 検定）

↑：発現上昇、—：変動なし

a：「Welch の t 検定で有意」かつ「発現比が 1.5 超又は 0.67 未満」を示した場合に発現変動ありと判定

## 2.6.3.3.2.4 RT-PCR 法を用いた遺伝子変動解析：HEK293 細胞

被験物質：Viltolarsen

遺伝子名	プローブ名	プローブ配列 <sup>a</sup>	発現比 (log <sub>2</sub> ratio)	試験番号 (CTD 記載箇所)
<i>APCDD1</i>	A_23_P337262	5'-GTTTTATATGCTGGAATCCAATGCAGAGTTGGTTTGGGACTGTGATCAAGACACCTTTTA-3'	-0.99*	TX10968 (4.2.1.2-5、評価資料)
<i>CNTNAP2</i>	A_33_P3367196	5'-CTCTCTAAAAGCAACAGCATGTAAACTAGAATGAAAGAAGGAAATTATGTACGTATGCCT-3'	-3.25*	
	A_37_P156408	5'-AATTGACCAAGAGATTCACAAATACAACACCCAGGATTCAGTGGTTGCCTCTCCAGAGT-3'	0.16	
	A_37_P156409	5'-ATCCAGGACAAGGCCAAGCTATAAGAAATGGAGTCAACAGAACTCGGCTATCATTGGAG-3'	-3.88*	
<i>FUT1</i>	A_23_P107963	5'-AACTCAGCTGCCACGGGTGAGAGAGCAGGAGGTATGAATTAAAAGTCTACAGCACTAAAA-3'	0.61*	
<i>MYT1</i>	A_37_P413045	5'-ATGAGTTCCGAGGTGAGCTGTTAAATCAGAGGTGGACACACGGAGGCAAGGCCAGCAGCT-3'	-2.44*	

\* : P&lt;0.05 vs 対照群 (Welch の t 検定)

a : PCR プライマーは、当該プローブの一部もしくは全配列が包含されるように設計

## 2.6.3.3.2.5 RT-PCR 法を用いた遺伝子変動解析：ITO-II 細胞

被験物質：Viltolarsen

遺伝子名	プローブ名	プローブ配列 <sup>a</sup>	発現比 (log <sub>2</sub> ratio)	試験番号 (CTD 記載箇所)
<i>ALDH1A2</i>	A_37_P398120	5'-AGGGGACGTCTGTTGGATAAGCTTGCAGACTTGGTGGAACGGGACAGGGCAGTTCTTGCA-3'	0.10	TX10967 (4.2.1.2-6、評価資料)
<i>FSHR</i>	A_37_P041819	5'-AGGTGCGACTTACAACCTTAAAAAGCTGCCTACTCTGGAAAAGCTTGTGCGCCCTCATGGAA-3'	-0.15	
	A_37_P041818	5'-TAATAATTTAGAAGAATTGCCTAATGATGTTTTCCACGGAGCCTCTGGACCAGTCATTCT-3'	-0.03	
<i>SLC22A10</i>	A_37_P434573	5'-AAATATTTTCTCCCTTTGAACTTATCTCCGTAAAGCCATTGTGCTCCTCTTGGGGGTCA-3'	-0.37	

a : PCR プライマーは、当該プローブの一部もしくは全配列が包含されるように設計

2.6.3.4 安全性薬理試験

2.6.3.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

被験物質：viltolarsen

試験項目	動物種/ 系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号 (CTD 記載箇所)												
一般症状及び行動 (FOB 法)  トキシコキネテ イクス測定	ラット /CrI:CD(SD)	静脈内	0, 125, 250, 500	雄 6	体温 (500 mg/kg) : 0.58°C 低下 (投与後 1 時間) 0.75°C 低下 (投与後 2 時間) (その他、一般症状及び行動についてはなし)  血漿中ビルトラルセンの薬物動態パラメータ <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Dose (mg/kg)</th> <th>C<sub>max</sub><sup>a</sup> (µg/mL)</th> <th>AUC<sub>0-24hr</sub><sup>b</sup> (µg·hr/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>125</td> <td>641.8 ± 113.5</td> <td>273.1</td> </tr> <tr> <td>250</td> <td>1077 ± 400</td> <td>604.8</td> </tr> <tr> <td>500</td> <td>1862 ± 214</td> <td>2361</td> </tr> </tbody> </table>	Dose (mg/kg)	C <sub>max</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)	AUC <sub>0-24hr</sub> <sup>b</sup> (µg·hr/mL)	125	641.8 ± 113.5	273.1	250	1077 ± 400	604.8	500	1862 ± 214	2361	適	TX10764 (4.2.1.3-1、評価資料)
Dose (mg/kg)	C <sub>max</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)	AUC <sub>0-24hr</sub> <sup>b</sup> (µg·hr/mL)																	
125	641.8 ± 113.5	273.1																	
250	1077 ± 400	604.8																	
500	1862 ± 214	2361																	
一般症状及び行動 (FOB 法)	サル /Cynomolgus	静脈内 (週 1 回、12 週間)	0, 60, 200, 600	雄 5	一般症状及び行動 <sup>c</sup> : なし	適	TX10746 (4.2.3.2-3、評価資料)												

a : 平均値 ± 標準偏差

b : 平均値

c : 3 並びに 10 回目投与日の投与終了後約 2 及び 6 時間に観察

2.6.3.4.2 心血管系に及ぼす影響

被験物質：viltolarsen

試験項目	動物種/系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号 (CTD 記載箇所)
hERG 電流 (tail peak current)	hERG 安定発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i>	0, 0.3, 1, 3 mg/mL	6 例	hERG 電流：なし	適	TX10836 (4.2.1.3-2、評価資料)
血圧 心拍数 心電図 (PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔、QTc) (無麻酔、テレメトリー法)	サル /Cynomolgus	静脈内 (漸増投与)	0, 60, 200, 600	雄 4	血圧：なし 心拍数：なし 心電図 PR 間隔：なし QRS 時間：なし QT 間隔：なし QTc：なし	適	TX10834 (4.2.1.3-3、評価資料)
血圧 心拍数 心電図 (PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔、QTc) (無麻酔、ホルター法)	サル /Cynomolgus	静脈内 (週 1 回、12 週間)	0, 60, 200, 600	雄 5	血圧 <sup>a</sup> ：なし 心拍数 <sup>a</sup> ：なし 心電図 <sup>a</sup> PR 間隔：なし QRS 時間：なし QT 間隔：なし QTc：なし	適	TX10746 (4.2.3.2-3、評価資料)
心拍数 心電図 (PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔、QTc) (無麻酔、ホルター法)	サル /Cynomolgus	筋肉内 (週 1 回、12 週間)	0, 100	雄 5	心拍数 <sup>a</sup> ：なし 心電図 <sup>a</sup> PR 間隔：なし QRS 時間：なし QT 間隔：なし QTc：なし	適	TX10747 (4.2.3.2-5、評価資料)

a：2 及び 11 回目投与日の投与終了後 1~3 時間に測定

## 2.6.3.4.3 呼吸系に及ぼす影響

被験物質：viltolarsen

試験項目	動物種/ 系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号 (CTD 記載箇所)
呼吸数 血液ガス (pH、酸素分 圧、二酸化炭素分圧、 ヘモグロビン酸素飽和 度)	サル /Cynomolgus	静脈内 (漸増投与)	0, 60, 200, 600	雄 4	呼吸数：なし 血液ガス pH：なし 酸素分圧：なし 二酸化炭素分圧：なし ヘモグロビン酸素飽和度：なし	適	TX10765 (4.2.1.3-4、評価 資料)
呼吸数	サル /Cynomolgus	静脈内 (週1回、12週 間)	0, 60, 200, 600	雄 5	呼吸数 <sup>a</sup> ：なし	適	TX10746 (4.2.3.2-3、評価 資料)

a：2及び11回目投与日の投与終了後1～3時間に測定

## 2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。

## 2.6.3.6 参考文献

なし。