目次

2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.2 薬理試験 7
2.4.2.1 まとめ 7
2.4.2.2 効力を裏付ける試験 9
2.4.2.3 副次的薬理試験 10
2.4.2.4 安全性薬理試験 12
2.4.3 薬物動態試験 14
2.4.3.1 まとめ 14
2.4.3.2 分析法 17
2.4.3.3 吸収 17
2.4.3.4 分布 18
2.4.3.5 代謝 18
2.4.3.6 排泄 19
2.4.3.7 薬物動態学的相互作用 19
2.4.3.8 その他の薬物動態試験 20
2.4.4 毒性試験 21
2.4.4.1 まとめ 21
2.4.4.2 単回投与毒性 23
2.4.4.3 反復投与毒性 23
2.4.4.4 遺伝毒性 28
2.4.4.5 がん原性 29
2.4.4.6 生殖発生毒性 29
2.4.4.7 局所刺激性 31
2.4.4.8 その他の毒性試験 31
2.4.5 総括及び結論 32
2.4.6 参考文献一覧 35

略号一覧

略号・用語	定義	
	英語	日本語
^{3}H	tritium	トリチウム
ABC	ATP-binding cassette	ATP 結合カセット
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADME	absorption, distribution, metabolism, and excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
AHP	acute hepatic porphyria	急性肝性ポルフィリン症
AIP	acute intermittent porphyria	急性間欠性ポルフィリン症
ALA	aminolevulinic acid	アミノレブリン酸
ALAS1	5'-aminolevulinate synthase 1	5'-アミノレブリン酸合成酵素 1
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ASGPR	asialoglycoprotein receptor	アシアロ糖たん白質受容体
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t(last)}$	area under the plasma concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration	最終濃度測定可能時点までの血漿中濃度-時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	乳がん耐性たん白質
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸排泄ポンプ
C_{max}	maximum observed concentration occurring at T_{max}	T_{max} における最高血漿中濃度の実測値
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
cERD	circulating extracellular RNA detection	循環細胞外 RNA 検出
DDI	drug-drug interaction	薬物相互作用
Dual-Luc	dual-luciferase	二重ルシフェラーゼ
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
EMSA	electrophoretic mobility shift assay	電気泳動移動度シフトアッセイ
FDA	United States Food and Drug Administration	米国食品医薬品局

略号一覧（続き）

略号・用語	定義	
	英語	日本語
GalNAc	*N*-acetylgalactosamine	*N*-アセチルガラクトサミン
GLP	Good Labolatory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HED	human equivalent dose	ヒト等価用量
Hep3B	human liver carcinoma cell line-3B	ヒト肝癌細胞株 3B
HepG2	human liver carcinoma cell line-G2	ヒト肝癌細胞株 G2
hERG	human ether-à-go-go–related gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
[I]	concentration of inhibitor	阻害剤濃度
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	immunoglobulin M	免疫グロブリン M
ISR	incurred sample reanalysis	実試料再分析
LC/MS-HRAM	liquid chromatography mass spectrometry-high resolution accurate mass	液体クロマトグラフィー高分解能精密質量分析計
LC-MS/MS	liquid chromatography/tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
MATE	multidrug and toxin extrusion proteins	多剤・毒性化合物排泄たん白質
MRHD	maximum recommended human dose	最大推奨臨床用量
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
N/A	not applicable	該当せず
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
OAT	organic anion transporters	組織アニオン輸送トランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptides	組織アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporters	組織カチオントランスポーター
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
PBG	porphobilinogen	ポルフォビリノーゲン

略号一覧（続き）

略号・用語	定義	
	英語	日本語
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
P-gp	P-glycoprotein	P 糖たん白
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
QWBA	quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RNAi	RNA interference	RNA 干渉
RT-qPCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	定量逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応
siRNA	small interfering RNA	低分子干渉 RNA
SLC	solute carrier	-
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
Tg-rasH2	hemizygous rasH2 [CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic Hemizygous]	ヘミ接合型 rasH2 [CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic Hemizygous]

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

ギボシランナトリウム（以下、「ギボシラン」と表記する）は、成人及び青年期の患者における急性肝性ポルフィリン症（AHP）の治療を目的として開発中の RNA 干渉（RNAi）治療薬である（2.2 項「緒言」を参照）。ギボシランは、肝臓の 5'-アミノレブリン酸合成酵素 1（*ALAS1*）メッセンジャーRNA（mRNA）の分解を誘導する二本鎖低分子干渉 RNA（siRNA）で構成され、肝臓で誘導される ALAS1 たん白質を減少させる。その結果、AHP の発作やその他の病態の主な原因因子であるアミノレブリン酸（ALA）などの神経毒性ヘム中間体が減少する。申請された最大推奨臨床用量（MRHD）は、月 1 回 2.5 mg/kg の皮下投与である。

一連の非臨床の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で、ギボシラン（非臨床試験報告書では、AD-60519、ALN-60519 又は ALN-AS1 とも表記される）の薬効薬理、安全性薬理、薬物動態（PK）及び毒性を評価した。本項に記載した多くの非臨床試験は、注射用水中にギボシランの遊離酸を 189 mg/mL（ギボシランナトリウムの 200 mg/mL に相当）又は 165 mg/mL（ギボシランナトリウムの 175 mg/mL に相当）含有する製剤を用いて実施した。本概要文の投与量と濃度はすべて、溶液中のギボシランナトリウム塩を示しているが、ナトリウム塩と遊離酸の分子量の差は約 5%であり、本申請資料に記載されているトキシコキネティクス（TK）データの解釈に意味のある影響はない。

ギボシランは、げっ歯類、非ヒト霊長類（カニクイザル、以下「サル」）及びヒトにおいて保存されている *ALAS1* mRNA 領域を標的とするため、これらの動物種において薬理活性を示す。ギボシランは、ウサギでは薬理活性を示さない。非臨床探索的薬理試験では、ヒト肝癌細胞株 3B（Hep3B）細胞及びヒト肝癌細胞株 G2（HepG2）細胞を用いてギボシランの *in vitro* の活性及び特異性を評価し、野生型又は急性間欠性ポルフィリン症（AIP）のげっ歯類モデル及びサルなどの複数の動物種を用いてギボシランの *in vivo* の活性を評価した。薬効薬理評価は適切な生物学的分析法を用いて実施され、野生型動物の肝臓内及び循環血清又は尿中の *ALAS1* mRNA の発現を測定し、さらに、げっ歯類の AIP モデルにおける血清又は尿中に誘導される ALA 及びポルフォビリノーゲン（PBG）量を評価した。

GLP 適合の心血管系及び呼吸器系の安全性薬理試験はサルを用いて実施され、神経学的評価はサルの 13 週間及び 39 週間の GLP 適合反復投与毒性試験で実施した。

ギボシランの非臨床 PK を、ラット及びサルに 0.1～10 mg/kg の範囲で単回（静脈内及び皮下）又は反復皮下投与して評価した。雌雄のラット及びサルを使用することにより、性差について検討した。GLP 適合の毒性試験の一部として、TK 評価を実施した。

マウス、ラット、サル及びヒトの血清を用いて、ギボシランのたん白結合を測定した。マウス、ラット及びサルで、単回及び反復皮下投与後のギボシランの組織内分布を評価した。ラットに放射能標識したギボシランを皮下投与して、マスバランス試験及び定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験を実施した。

In vitro 試験（マウス、ラット、サル及び／又はヒトの血清並びに肝 S9 画分）及び *in vivo* 試験（ラット及びサルの血漿、肝臓及び尿、並びにヒトの血漿及び尿）により、ギボシランの安定性及びプロファイルを評価した。代謝物の同定には、液体クロマトグラフィー高分解能精密質量分析計（LC/MS-HRAM）法を使用した。液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）法で主

要代謝物を定量した。シトクロム P450（CYP）酵素及びトランスポーターを含むギボシランの薬物相互作用を *in vitro* で検討し、ラット及びサルでギボシラン及び代謝物の排泄率及び量を評価した。

ギボシランの非臨床毒性試験プログラムとして、マウス、ラット及びサルの探索的単回及び反復投与毒性試験、GLP に適合した投与期間がラット及びサルでそれぞれ最長 26 及び 39 週間の反復投与毒性試験、GLP 適合の遺伝毒性試験、並びにラット及びウサギの生殖発生毒性試験を実施した。ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験において、ギボシラン原薬に対する抗薬物抗体（ADA、免疫グロブリン［IgG］／IgM アイソタイプ）を測定した。ギボシランの臨床投与経路と同様に、すべての毒性試験で皮下注射によりギボシランを投与した。毒性試験の投与頻度が週 1 回であるのに対し、ピボタルな臨床試験及び市販後に予定する投与頻度は月 1 回であることに注意が必要である。ヒト全血を用いる *in vitro* 試験並びにマウス及びサルの *in vivo* モデルで、ギボシランのサイトカイン／ケモカイン誘導作用について検討した。ギボシランに関する文献情報及び得られた非臨床データの精査に基づき、ギボシランの作用機序及び毒性プロファイルでは、がん原性の懸念を引き起こす要因は認められない。Tg-rasH2 マウスの 26 週間投与がん原性試験では、最高 1500 mg/kg/month の投与量でがん原性を示すエビデンスは認められなかった。Sprague-Dawley ラットの 2 年間投与がん原性試験が現在実施中であり、終了後に提出する予定である。

ギボシランで実施した GLP 適合の毒性試験は、医薬品規制調和国際会議（ICH）M3(R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス（薬食審査発 0219 第 4 号、平成 22 年 2 月 19 日）」に示された一般的原則に従って実施した。経済協力開発機構（OECD）のデータ相互受入の参加国である欧州連合（欧州医薬品庁［EMA］）、米国（米国食品医薬局［FDA］）、日本（厚生労働省）及びその他諸外国の規制当局で受け入れられるように、すべての GLP 適合試験を OECD 加盟国で、OECD の試験ガイダンス及び GLP の原則に従って実施した。探索的試験及び用量設定試験は、必ずしも厳格に GLP 手順に従って実施されたものではないが、データの完全性を確保するために、適切なプロトコール及び文書管理の下で実施した。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 まとめ

申請されているギボシランの AHP 患者における治療的使用を裏付けるため、ギボシランの非臨床薬理試験の総合的パッケージを *in vitro* 及びマウス、ラット及びサルを用いた *in vivo* 試験で実施した。*In vitro*、*in vivo* 及び安全性薬理試験の一覧を表 2.4.2-1 に示す。ギボシランの非臨床探索的薬理試験では、Hep3B 細胞、HepG2 細胞及び二重ルシフェラーゼ（Dual-Luc）レポーターアッセイを用いて *in vitro* の活性及び特異性を評価し、マウス、ラット及びサルを用いて *in vivo* の活性を評価した。ギボシランは、siRNA の標的配列が保存されているこれらの非臨床試験で用いた動物種で薬理活性を示した。複数の動物種を用いた複数の試験で一貫して、ギボシランは皮下投与により強力かつ投与量依存性の薬理活性を示し、肝臓の *ALAS1* mRNA を最大 80%減少した。

ギボシランで実施した非臨床薬理試験一覧の詳細は[表 2.6.3.1]「薬理試験一覧表」に示し、それぞれの試験について[2.6.2]項「薬理試験の概要文」に要約した。

表 2.4.2-1　　ギボシランで実施した薬理試験

試験番号	試験の種類	投与量（mg/kg）	GLP（適用／非適用）	概要表
効力を裏付ける試験				
[BIO14037]	ALN-60519 の特定（*In vitro*）	N/A	非適用	[表 2.6.3.2]
[BIO14024]	ALN-60519 標的領域の一塩基多型評価	N/A	非適用	[表 2.6.3.2]
[BIO18001]	ギボシランアンチセンス鎖（A-122227）末端切断代謝物の *in vitro* 活性	N/A	非適用	[表 2.6.3.2]
[BIO14050]	マウス AIP モデルでの ALN-AS1 の単回投与のヘミンとの比較評価	20	非適用	[表 2.6.3.2]
[BIO14012]	マウス AIP モデルでの ALN-AS1 の反復皮下投与評価	0.3、1、3 QWx4	非適用	[表 2.6.3.2]
[BIO14008]	野生型ラットでの ALN-AS1 の単回皮下投与評価	1、2.5、5、10	非適用	[表 2.6.3.2]
[BIO14009]	野生型ラットでの ALN-AS1 の反復皮下投与評価	1.25、2.5、5 QWx4	非適用	[表 2.6.3.2]
[BIO18002]	Sprague-Dawley ラットでのギボシランの薬物動態、バイオアベイラビリティ、組織分布及び薬効薬理評価	2.5 QWx8 及び 5 Wk1＋1 QWx7	非適用	[表 2.6.3.2]
[BIO14010]	ラット AIP モデルでの ALN-AS1 の単回皮下投与評価	2.5、5、10	非適用	[表 2.6.3.2]
[BIO14011]	ラット AIP モデルでの ALN-AS1 の反復皮下投与評価	0.3、1、3 QWx4	非適用	[表 2.6.3.2]
[■■■■■]	サルでの単回皮下投与後の肝臓、血清及び尿中の *ALAS1* mRNA に対する ALN-AS1 の効果の評価	1 及び 10（単回）並びに 2.5 QWx8、5 QDx3＋5 QWx7、5 QDx3＋2.5 QWx7 及び 5 BIWx8	非適用	[表 2.6.3.2]
[BIO14003]	カニクイザルの肝臓及び血清における AD-58632、AD-60519、AD-61193 及び AD-60819 の反復皮下投与評価	2.5 又は 5 QDx5 Wk1＋QW Wks 2～4 及び 1.25 又は 2.5 QDx5＋BIW Wks 2～4	非適用	[表 2.6.3.2]
副次的薬理試験				
[BIO14038]	ALN-60519 のオフターゲット解析（*In vitro*）	N/A	非適用	[表 2.6.3.3]
[BIO20002]	ALN-60519 のオフターゲット解析（*In vitro*）	N/A	非適用	[表 2.6.3.3]
安全性薬理試験				
[AS1-NCD14-019]	カニクイザルでのテレメトリー法を用いた心血管系及び呼吸器系の安全性薬理試験	0（滅菌生理食塩液）又は 150	適用	[表 2.6.3.4]

略語：AIP＝急性間欠性ポルフィリン症；*ALAS1*＝5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；BIW 週 2 回；GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；mRNA＝メッセンジャーRNA；N/A＝該当せず；QD＝1 日 1 回；QW＝週 1 回；Wk＝週。

注：ギボシラン（非臨床試験報告書では AD-60519、ALN-60519、又は ALN-AS1 とも記載されている）は溶液で使用した有効成分の名称である。

2.4.2.2　効力を裏付ける試験

ギボシランの *in vitro* 及び *in vivo* の主な薬効薬理特性を表 2.4.2-2 に示す。

表 2.4.2-2　主な薬効薬理特性

測定系	薬効薬理活性
In vitro 試験	
Hep3B 細胞	IC_{50}＝0.026 nmol/L[a]
In vivo 試験	
サル単回皮下投与	ED_{70}＝10 mg/kg[b]
サル反復皮下投与	ED_{80}＝2.5～5 mg/kg[c]

略語：*ALAS1*＝5′-アミノレブリン酸合成酵素 1；ED_{70}／ED_{80}＝ベースラインと比較して、循環 *ALAS1* mRNA をそれぞれ 70%又は 80%減少させたギボシランの投与量；Hep3B＝ヒト肝癌細胞株 3B；IC_{50}＝50%阻害濃度 mRNA＝メッセンジャーRNA；RT-qPCR＝定量逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応。

a　RT-qPCR で測定した *ALAS1* mRNA 濃度（[BIO14037]試験）。

b　ギボシランは、1 又は 10 mg/kg で 3 匹の雄ザル/群に皮下投与した（[redacted]試験）。

c　ギボシランは、2.5 若しくは 5 mg/kg を週 1 回 8 週間、5 mg/kg を週 2 回 8 週間、又は第 1 週は 1 日 1 回 5 mg/kg 投与を 3 回、その後 2.5 若しくは 5 mg/kg を週 1 回 7 週間で、3 匹の雄ザル/群に皮下投与した。ED_{80} である 80%の減少は、投与 5～8 週間後に達成された（[redacted]試験）。

In silico バイオインフォマティクス解析、*in vitro* 及び *in vivo* 解析を組み合わせて、ヒト *ALAS1* を標的とする強力かつ特異的な siRNA を特定した。バイオインフォマティクス基本解析を行い、ヒト *ALAS1* 転写物、並びにサル、マウス及びラットのオルソログ mRNA 配列と相補的なアンチセンス配列を有する siRNA を設計した。ギボシランはオフターゲット活性（*ALAS1* 遺伝子から発現する以外の mRNA が RNAi によって減少することと定義される）を示す可能性を低くするように選択されているが、ギボシランによる意図しないオフターゲット活性を示す可能性が最も高いヒト mRNA 転写物の解析が実施された（2.4.2.3 項を参照）。

ギボシランの *in vitro* の活性は、漸増濃度のギボシラン（[BIO14037]試験）のトランスフェクションによって Hep3B 細胞で評価した。細胞は 24 時間後に採取され、定量逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）によって *ALAS1* mRNA 濃度を測定した。Hep3B 細胞を用いたトランスフェクションアッセイにおいて内因性 *ALAS1* mRNA 量はギボシランの濃度に依存して抑制され、50%阻害濃度（IC_{50}）は約 26 pmol/L であった。

マウス、ラット及びサルを用いた複数の試験で一貫して、ギボシランは皮下投与時に強力かつ投与量依存性の薬理活性を示し、肝臓の *ALAS1* mRNA を最大 80%減少した。ギボシランは、標的 mRNA 配列が保存されていないウサギで薬理活性はないと予測されており、これはウサギで実施された生殖毒性試験で確認された（[2.6.6]項「毒性試験の概要文」；[AS1-DSM16-012]試験及び[AS1-GLP16-018]試験を参照）。ALAS1 はヘム生合成経路の律速段階でもある最初のステップを仲介し、グリシンとスクシニル補酵素 A（スクシニル CoA）を ALA に変換する。野生型動物では尿又は血液中に ALA 及び PBG が認められないため、薬効薬理作用の評価を目的とした *ALAS1* mRNA の減少の測定が必要になる。ALAS1 は血清中に分泌されるたん白質ではないため ALAS1 減少を直接測定することは難しく、肝臓内 *ALAS1* mRNA の減少と回復といったギボシランの薬効薬理作用を評価するには肝生検を繰り返す必要がある。エキソソーム中に高濃度の mRNA がさまざまな組織由来の細胞から分泌されることが可能であることを示すこれまでに公開されている結果[1,2]に基づいて、低侵襲アプローチに

より *ALAS1* mRNA 量を評価する循環細胞外 RNA 検出（cERD）アッセイを開発した。この循環 mRNA は血清又は尿から収集されて精製され、肝臓での mRNA 発現濃度を反映する[3]。エキソソームは細胞間情報伝達に重要であることが示されており、がん診断及びバイオマーカーの分野で広く使用されている[4,5,6]。ギボシラン投与後の血清又は尿中の *ALAS1* mRNA 濃度は肝臓の *ALAS1* mRNA 濃度と相関することが示され、サルにおいてギボシラン投与後の同一時点で血清及び尿中 cERD *ALAS1* mRNA 濃度と肝細胞内量との間に良好な相関と一貫性が示された（[■■■■■]試験）。したがって、サルの単回及び反復投与試験で cERD アッセイを使用して、*ALAS1* mRNA の減少に対するギボシランの薬理効果を評価した。サルへの単回投与後、肝臓での *ALAS1* mRNA の最大 70%の減少は投与量に応じて持続的（1～4 週間）で、血清又は尿中で認められた *ALAS1* mRNA の減少の程度と相関が認められた。投与量依存性の定常状態における *ALAS1* の最大 80%の削減も、さまざまな反復投与レジメンによって実証された。さらに、リポジトリから入手したドナーが適合するヒト尿及び血清に対する cERD 分析では、*ALAS1* 濃度の尿と血清間の明らかな一致と連続的な検体採取における患者間の低変動性が示され、*ALAS1* の経時変化の評価に対するこのアッセイの有用性が明らかにされた[7]。

野生型げっ歯類とは異なり、AIP げっ歯類モデル（[BIO14050]試験、[BIO14012]試験、[BIO14010]試験及び[BIO14011]試験）では、血清及び尿中に ALA 及び PBG ヘム中間体濃度が増加した（[2.6.2.2.2]項「*In vivo* 薬理試験」を参照）。これらの中間体は、AHP 患者で毒性濃度まで増加し、発作症状と神経損傷を引き起こす[8]。AIP のマウスモデル及びラットモデルにおいて、ギボシランの最大 10 mg/kg の単回投与による短期治療的投与及び最大 3 mg/kg の週 1 回の予防投与は、*Alas1* mRNA 並びに血清又は尿中の ALA 及び PBG の誘導の増加の両方を投与量依存性に妨げた。ALA 及び PBG 産生の完全抑制は、最高投与量の単回投与後又は最終投与後 72～96 時間に認められた。さらに、ギボシランとヘミン（Panhematin®：米国では AHP 患者に対する現在の標準治療）の比較試験では、20 mg/kg のギボシランの単回皮下投与は、4 mg/kg のヘミンの 1 日 2 回静脈内投与と比較して、ALA 及び PBG のより急速な低下が示された。

2.4.2.3 副次的薬理試験

2.4.2.2 項に記載したように、ギボシランの選択プロセスの一環としてバイオインフォマティクス解析を実施し、配列相同性に基づきギボシランのアンチセンス鎖 A-122227 によって抑制される可能性のある転写物を特定した（[BIO14038]試験）。広範囲の 2'-O-メチル及び 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾とセンス鎖の 3'末端へ 3 分岐型 N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）リガンドとリンカーを付加することで、ギボシランのセンス鎖がオフターゲット転写減少を引き起こす可能性は著しく低下する[8]。そこで、ギボシランによる mRNA 減少の *in vitro* 解析は、アンチセンス鎖のみを対象とした *in silico* 解析で予測された潜在的オフターゲット転写物について行った。

潜在的オフターゲット活性は、合計したスコア（表 2.4.2-3；方法論の詳細については、[2.6.2.3.1]項「ギボシランのオフターゲット活性の解析」を参照）に従って、特異性のカテゴリーを割り当てた。合計したオフターゲットスコアが高いほど、その潜在的オフターゲット活性による発現抑制の可能性は低くなる。バイオインフォマティクス解析の結果、■～■■ の特異性スコアを有する 6 種類の潜在的オフターゲット転写物を特定した。ギボシランの推定オフターゲット転写物はいずれもスコアが■

以上で、このスコアは潜在的オフターゲット活性による発現抑制が認められる可能性が低いことを示している。

表 2.4.2-3 BIO14038 試験で特定された潜在的オフターゲット配列と関連する標的遺伝子

オフターゲット ID	オフターゲットスコア	ミスマッチの位置[a]	アクセッション番号[b]	標的遺伝子[c]
ALN-60519 (Off-1)	[redacted]	16、17、19	NM_012365.1	*OR2A5*
ALN-60519 (Off-2)	[redacted]	13、16、19	NM_005513.2	*GTF2E1*
ALN-60519 (Off-3)	[redacted]	11、12、19	NR_045861.1	*ARMCX4*
ALN-60519 (Off-4)	[redacted]	11、14、15	NM_152381.5	*XIRP2*
ALN-60519 (Off-5)	[redacted]	10、11、15	NM_014892.3	*SCAF8*
ALN-60519 (Off-6)	[redacted]	9、17	NR_045128.1	*TXLNG2P*
ALAS1	[redacted]	N/A	NM_000688.4	*ALAS1*

略語：*ALAS1*=5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；ID＝識別番号；N/A＝該当せず。
a ミスマッチの位置は、アンチセンス鎖の 5'-3 '方向番号付けした。すなわち、「1」位は、ギボシラン（ALN-60519）のアンチセンス鎖の 5'側のヌクレオチドに相補的な塩基に対応する。
b 複数の RefSeq ID が同じ標的遺伝子とオフターゲットプロファイルに付けられている場合、表には代表番号を一つ、記載した。
c 表には代表遺伝子名を記載した。
出典：[BIO14038]試験。

ギボシラン投与による潜在的オフターゲット抑制の程度は、HepG2 細胞で内因的に発現する転写物から上記 6 種類の潜在的オフターゲット遺伝子の発現について RT-qPCR によって評価した。4 パラメーターフィットモデル（XLfit）を用いて用量反応データを曲線にあてはめた。ギボシランのトランスフェクションにより、潜在的オフターゲットはいずれも濃度依存性の明らかな減少を示さず、潜在的オフターゲット遺伝子のいずれでも IC_{50} 値を得ることができなかった。潜在的オフターゲット *ARMCX4*（Off-3）は、HepG2 細胞では発現していなかった。別の潜在的オフターゲット *XIRP2*（Off-4）は、RT-qPCR の定量下限付近の濃度で発現が認められ、ギボシラン添加濃度（1 濃度）ではデータを得ることができなかった。これらの試験結果は、UniGene データベースにおいて *ARMCX4*（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.729062）及び *XIRP2*（http：//www .ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi？uglist=Hs.73680）の肝臓での両発現量が低いことが示されていることと一致している。

以上、HepG2 細胞に最大 10 nmol/L の濃度のギボシランのトランスフェクションにおいて、これら標的の抑制は認められず、ギボシランによるオンターゲットの *ALAS1* の減少と、6 種類のいずれかの推定オフターゲット転写物の減少との間には 100 倍超の差があることが示された。これらのデータから、ギボシランの *ALAS1* に対する特異性を確認できたと解釈される。HepG2 細胞でのギボシランの *ALAS1* に対する IC_{50} 値（88 pmol/L）といずれかの推定オフターゲット転写物によるオフターゲット減少の間には 113 倍超の差がある。

さらに、Alnylam 社で開発したオフターゲット検索アルゴリズム並びに国内で公的に利用可能なオンラインツール siDirect v.2.0 を用いて配列相同性に基づき第 2 のバイオインフォマティクス解析を行い、ギボシランのセンス鎖又はアンチセンス鎖によってオフターゲット作用を示す可能性のある 19 種類の転写物を特定した。推定されたオフターゲット遺伝子すべては、ギボシランのセンス又はアン

チセンス鎖とは複数のミスマッチを有しており、オフターゲット発現抑制の可能性を低減している。*In silico* 解析で予測された潜在的オフターゲット転写物について、ギボシランによる mRNA 減少の *in vitro* 解析を行った（[BIO20002]試験）。

検討した 19 種類のオフターゲット転写物のうち 13 種類は Hep3B 細胞又は HepG2 細胞のいずれかに内因性の発現が認められた。これらのオフターゲット mRNA 発現のギボシランによる抑制を RT-qPCR によって評価した。ギボシランのトランスフェクションによる Hep3B 細胞及び HepG2 細胞の *ALAS1* mRNA 発現のオンターゲット減少の IC_{50} はそれぞれ 0.019 nmol/L 及び 0.018 nmol/L であった。これに対し、13 種類のオフターゲット転写物のうち 12 種類は 10 nmol/L の最高濃度においても明らかな mRNA 減少を示さなかった。1 種類の潜在的オフターゲット遺伝子（*RNF216*）は、測定濃度の最高濃度から 2 濃度において軽度の抑制を示した。4 パラメータフィットモデル（XLfit）を用いて濃度反応データを曲線にあてはめると、ギボシランによる *RNF216* の発現抑制作用に対して HepG2 細胞では 9.537 nmol/L の IC_{50} 値が得られたが、Hep3B 細胞では IC_{50} 値を得ることができなかった。

19 種類のオフターゲット転写物すべてについて Dual-Luc アッセイによる評価も行った。推定されたオフターゲット配列部位及びルシフェラーゼレポーター遺伝子を含む個々のベクターをそれぞれ作製し、ギボシラン（1×10^{-8}～10 nmol/L）のトランスフェクションによるレポーター発現抑制を評価した。評価した 19 種類の遺伝子のうち 16 種類は、濃度依存性の抑制がみられず IC_{50} 値を得ることができなかった。残りの 3 種類の遺伝子（*BZW1*、*ABCC5* 及び *RNF216*）は高濃度のギボシランによって部分的に抑制され、最大減少率は約 60%であった。これら 3 種類の遺伝子について、同じ実験系で *ALAS1* のオンターゲットの発現抑制の IC_{50} 値よりもオフターゲットの発現抑制の IC_{50} 値の方が大幅に高かった（*BZW1* は 73.8 倍、*ABCC5* は 25.5 倍及び *RNF216* は 12.3 倍）。

以上、*in vitro* 及び *in silico* 評価の結果から、ミスマッチの数及び位置に基づき、また推定されたオフターゲット遺伝子が軽度の発現抑制を引き起こすにも高濃度のギボシランが必要であることから、ギボシランによるオフターゲットの発現抑制の可能性は低いことが示唆された。

ギボシランは肝臓特異的な ASGPR によって細胞内に取り込まれるため、肝臓以外の曝露は非常に低い[19,20]。したがって、肝臓以外で *RNF216*、*BZW1* 及び *ABCC5* の発現が抑制される可能性は非常に低い。*RNF216* 及び *ABCC5* の肝臓での発現量は低く、オフターゲットノックダウンは、肝臓の機能又は *RNF216* や *ABCC5* を介して肝臓が制御するプロセスにほとんど影響しないと考えられる。*BZW1* の肝臓での発現量は高めだが、*Bzw1* ノックアウトマウスでの肝臓に関連する表現型は文献で報告されておらず、肝臓での *BZW1* の減少が肝臓の機能又は肝臓が制御するプロセスに影響する可能性は低い。以上、データ全体から、ギボシランの投与によって *RNF216*、*BZW1* 又は *ABCC5* がオフターゲットの発現抑制を受ける可能性は低く、ヒトにおける安全性の懸念はないことが示された。

2.4.2.4 安全性薬理試験

ギボシランは、治療用たん白質に似ており、比較的巨大分子（約 15 kDa）であり、主に肝細胞上に高発現しているアシアロ糖たん白質受容体（ASGPR）を特異的な標的とするため、ギボシランの *in vitro* のヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子（hERG）チャネルアッセイは実施しなかった[9]。ギボシランの分子サイズでは、イオンチャネルとの相互作用は不可能である。さらに、ギボシ

ランに結合している ASGPR により認識される 3 分岐型 GalNAc リガンドは、薬物を肝細胞による取り込みの標的にしている[10]。ギボシランは、ASGPR を発現していない細胞膜を効率的に通過しない。したがって、ギボシランは心臓組織に取り込まれる可能性は低く、hERG チャネルの内孔と相互作用する又は内孔を塞ぐ可能性は低い。

ギボシランの心血管系及び呼吸器系への影響については、テレメトリー法を用いて覚醒雄ザルで GLP 適合試験を実施して検討した（[AS1-NCD14-019]試験）。5 匹の雄ザルに滅菌生理食塩液（0.9%塩化ナトリウム注射液）を単回皮下投与し、約 2 週間後に 150 mg/kg のギボシランを 0.75 mL/kg の投与液量で単回皮下投与した。150 mg/kg のギボシランの投与では、一般状態の観察、定性的又は定量的心電図パラメータ、血行動態パラメータ、呼吸数又は体温に、即時的又は遅延的な影響は認められなかった。

神経学的評価は、サルでの 13 週間（[AS1-NCD14-011]試験）及び 39 週間（[AS1-GLP15-018]試験）の GLP 適合反復投与毒性試験の一環として実施した（週 1 回の投与）。いずれの試験においても、ギボシランに関連した神経行動学的影響は認められなかった。神経学的影響に対する無影響量は、13 週間及び 39 週間の GLP 適合反復投与毒性試験でそれぞれ評価した最高投与量である 150 mg/kg 及び 100 mg/kg であった。

これらの試験で有害な変化がみられなかったことから、月 1 回 2.5 mg/kg の MRHD でギボシランのヒトへの投与において、心血管系若しくは呼吸器系への影響又は神経学的影響は予測されない。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 まとめ

マウス、ラット、ウサギ及びサルで行った毒性の試験をサポートするため、種々の *in vitro* 及び非臨床 *in vivo* 試験（表 2.4.3-1 参照）でギボシランの薬物動態（PK）及び吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）の性質を評価した。全体的に、これらの試験は、毒性試験の解釈のサポート、ヒトにおけるギボシランの性質の特徴付けの助け及び AHP の治療のためのギボシランの臨床使用をサポートする。

ギボシランを用いた非臨床 PK 試験の詳細なリストは[表 2.6.5.1]「薬物動態試験」を参照し、個別試験の要約は[2.6.4]項「薬物動態試験の概要文」を参照のこと。

表 2.4.3-1 ギボシランを用いた薬物動態試験

試験番号	試験の種類	投与量（mg/kg）	GLP（適用／非適用）	概要表
吸収 [a]				
[AS1-NCD14-003][b]	ラットにおける PK／PD 試験　単回静脈内、又は単回又は反復皮下投与における組織内分布	10（単回静脈内及び皮下投与）；0.1、1、5、10；1、2.5、5/1（反復皮下投与）	非適用	[2.6.5.3A] [2.6.5.4A] [2.6.5.5A] [2.6.5.5E] [2.6.5.9A] [2.6.5.12C] [2.6.5.13A]
[AS1-DSM18-010]	Sprague Dawley ラットに単回皮下投与後の ALN-AS1 及び代謝物の PK	10	非適用	[2.6.5.3B]
[AS1-NCD14-007][b]	PK／PD 試験－サルにおける肝臓及び腎臓への分布－単回静脈内、又は単回又は反復皮下投与	10（単回静脈内投与）；0.1、1、5、10（単回皮下投与）；1、2.5、5/1（週に 1 回 x8）	非適用	[2.6.5.3D] [2.6.5.4B] [2.6.5.5D] [2.6.5.5F] [2.6.5.9A] [2.6.5.9C]
[AS1-DSM18-009]	PK／PD 試験－カニクイザルに単回静脈内、又は単回又は反復皮下投与後の ALN-AS1 の薬物動態及び薬力学	30	非適用	[2.6.5.3E]

表 2.4.3-1　ギボシランを用いた薬物動態試験（続き）

試験番号	試験の種類	投与量（mg/kg）	GLP（適用／非適用）	概要表
分布				
[AS1-DSM18-008]	マウス、ラット、サル又はヒト血漿への ALN-AS1 の結合	N/A	非適用	[2.6.5.6]
代謝				
[BA14010]	ギボシランの代謝安定性及びプロファイル	10	非適用	[2.6.5.9A] [2.6.5.10A] [2.6.5.10C] [2.6.5.11A]
[AS1-DSM18-015]	CYP P450 酵素の基質としてのギボシランの *in vitro* 評価	10 µmol/L	非適用	[2.6.5.10B]
[redacted]	ALN-AS1 の直接及び時間依存的 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4/5 阻害能評価	N/A	非適用	[2.6.5.12A]
[redacted]	培養ヒト肝細胞における ALN-AS1 の CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 誘導能評価	N/A	非適用	[2.6.5.12B]
[AS1-NCD14-001]、Subreport [redacted]	ALN-AS1 の 30、100 又は 300 mg/kg を週に 1 回投与したラットから調製した肝ミクロソームにおける CYP1A、CYP2B、CYP2D、CYP2E 及び CYP3A 活性の *ex vivo* 評価	30、100、300	非適用	[2.6.7.6-1]
[redacted]	ALN-AS1 単回又は週に 1 回反復投与後の SD ラットから調製した肝ミクロソームにおける CYP1A、CYP2B、CYP2D、CYP2E 及び CYP3A 活性の *ex vivo* 評価	2.5	非適用	[2.6.5.12C]
[AS1-NCD14-002]、Subreport [redacted]	ALN-AS1 の 30、100 又は 300 mg/kg を週に 1 回投与したサルから調製した肝ミクロソームにおける CYP1A、CYP2B、CYP2D、CYP2E 及び CYP3A 活性の *ex vivo* 評価	30、100、300	非適用	[2.6.7.6-1]
[AS1-DSM17-018][b]	ラットにおける生体内分布、代謝及びマスバランスを評価するための放射能標識体での単回投与試験	10	非適用	[2.6.5.5C] [2.6.5.9B] [2.6.5.11B] [2.6.5.13B]
[BA17014]	*in vivo* 代謝プロファイル	サル：単回皮下投与（0.1、1.0、5.0、10）又は反復投与（2.5 又は 1 を週に 1 回 8 回投与；又は 5 を 1 度その後 1 を週に 1 回 7 回投与 ヒト：皮下投与 5	非適用	[2.6.5.9C]

表 2.4.3-1 ギボシランを用いた薬物動態試験（続き）

試験番号	試験の種類	投与量（mg/kg）	GLP（適用／非適用）	概要表
排泄				
[redacted]	雄性ニュージーランド白ウサギに ALN-AS1 を皮下投与後の精液における PK 解析	2.5、20	非適用	[2.6.5.13C]
薬物動態学的薬物相互作用（非臨床）[c]				
[AS1-DSM18-003]	ALN-AS1 がヒト ABC 及び SLC トランスポーターの阻害剤か基質かの *in vitro* 評価	N/A	非適用	[2.6.5.15A]

略語：ABC＝ATP 結合カセット；ALN-AS1＝ギボシラン；CYP＝シトクロム P450；DDI＝薬物相互作用；GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；LC-MS/MS＝液体クロマトグラフィータンデム質量分析；N/A＝該当せず；NADPH＝ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸；PD＝薬力学；PK＝薬物動態；QW＝週に 1 回；SLC=solute carrier。

a AS1-NCD14-018：ALN-AS1 の TK：Sprague Dawley ラットにおける単回皮下投与 4 週間トキシコキネティクス試験は、独立の TK 試験であり、PK 試験ではないが、データは「吸収」項で参照されている。

b 本試験は「分布」及び「排泄」項で参照されている。

c AS1-NCD14-014 及び AS1-DSM17-003 試験は実施したが、臨床における DDI データが得られているため、非臨床においては、これらの試験の詳述はしない。

注：オリジナルの非臨床報告書で示されているギボシラン又は AD-60519、ALN-60519、ALN-AS1 は、溶液中の活性薬物を示す。

2.4.3.2 分析法

複数の生体試料中薬物濃度分析法を用いて、PK、PD 及び免疫原性（ADA）を評価した。その他の分析法は、探索的目的に使用した。[2.6.4.2]項「分析法」参照。

種々の動物種の血漿中ギボシランを定量するため、LC/MS-HRAM を用いた生体試料中薬物濃度分析法をバリデートした。GLP 試験用の分析法の開発及びバリデーション試験は、FDA 及び EMA の生体試料中薬物濃度分析法バリデーションガイダンス文書に基づいて実施した。実試料再分析（ISR：incurred sample reanalysis）は、試料分析時に実施した。種々のマトリクス及び動物種中のギボシラン及び代謝物を定量するため、Atto プローブを用いた蛍光高速液体クロマトグラフィー法、LC-MS/MS 法、LC/MS-HRAM 検出法及び RT-qPCR 法を適用した。LC/MS-HRAM 法は、代謝安定性試験及び代謝プロファイリングにも使用した。

ADA の酵素結合免疫吸着測定（ELISA）を用いた生体試料中薬物濃度分析法は、FDA 及び EMA のガイダンス文書に従ってバリデートした。本 ADA 分析法は、ギボシランの特異抗体測定のために計画した。試料分析には、カットポイント値に基づく 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。

探索的目的のためのその他の分析も使用した。RT-qPCR による循環 *ALAS1* mRNA の定量のため、cERD PD 法を適用した（[2.6.2.2.2.3]項「サルでのギボシランの単回及び反復投与による *ALAS1* 減少」参照）さらに、ギボシランのたん白結合及び推定代謝物の分析の探索的方法も開発し使用した。

2.4.3.3 吸収

薬効投与量である 0.1 から 10 mg/kg をラット及びサルにおいて単回（静脈内及び皮下）又は反復皮下投与してギボシランの PK を評価した。ラット及びサルに単回皮下投与したとき、T_{max} における最高血漿中濃度の実測値（C_{max}）及び血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）はほぼ投与量に比例して増加した。ラット及びサルの体循環からの消失は、平均消失半減期（$t_{1/2}$）が静脈内及び皮下投与後それぞれ 0.2 時間及び 2.7～3.5 時間と迅速であった。見かけの全身バイオアベイラビリティは 10 mg/kg（静脈内及び皮下投与）においてラット及びサルでそれぞれ 24%と 37%であった。ギボシランを反復皮下投与したときの血漿中 PK プロファイルは、単回投与時と同様であり、蓄積性の証拠はなかった。総じて、ラット及びサルにおけるギボシランのこれらの PK の性質は、0.1～10 mg/kg の範囲の単回及び反復投与したとき時間及び投与量に依存しないことを示していた。さらに、ギボシランの PK に雌雄差は認められなかった。

ギボシランの TK を種々の非臨床動物（マウス、ラット、ウサギ及びサル）で評価した。血漿における曝露（C_{max} 及び AUC）は、試験した投与量範囲でほぼ投与量比例的、又は数例で投与量比をやや上回る増加を示した。一般に、毒性試験における肝臓（標的臓器）及び腎臓のギボシランの曝露は、用量依存的に増加し、腎臓の曝露は投与量比を上回るが肝臓では投与量比を下回る増加を示した。これらの非線形性は、体循環での高濃度における ASGPR による肝臓への取り込みに一時的な飽和が生じるためと考えられ、体循環中の残りのギボシランが腎臓に分布すると考えられる。

2.4.3.4 分布

マウス、ラット、サル及びヒト血漿におけるギボシランの血漿たん白結合を、ギボシラン濃度 1.0～50 μg/mL の範囲で電気泳動移動度シフトアッセイ（EMSA）法を用いて *in vitro* で評価した。たん白結合の程度は、濃度依存的であり、10.1～93.1%であった。結合率は濃度増加と共に減少し、結合率は試験した動物種で類似していた。

ギボシランの組織内分布をラット及びサルで評価した。ギボシランは主に肝臓に分布した。皮下投与後のギボシランの肝臓における曝露は、静脈内投与後より明らかに大きく、このことはギボシランの肝臓への取り込みは、皮下投与がより効果的であることを示している。皮下投与が肝臓への取り込みにより効果的であることは、血漿中濃度の（静脈内投与後の急激な上昇よりも）より緩徐な上昇により、ASGPR 依存的な肝臓への取り込みの飽和を防ぐ可能性があるためと考えられる。皮下投与後の他の組織の濃度を比較したとき、腎臓が肝臓に続く 2 番目に高い濃度を示した。10 mg/kg を皮下投与後のギボシランの肝臓と腎臓の曝露比は、約 4 倍であった。肝臓に比較して、副腎、心臓、肺、脾臓、甲状腺、胸腺、膵臓、空腸及び精巣は、明らかにギボシランは低濃度（100～800 倍低い）であった。ギボシランは脳では検出されなかった。ギボシランの肝臓への優先的な分布は、ASGPR を介する肝細胞への取り込み及び GalNAc を標的とする機構に一致する。同様な結果がトリチウムで標識した[^{3}H]-ギボシランを用いた QWBA での組織分布試験で得られた。高濃度の薬物関連放射能がみられた組織は、肝臓（最高濃度）、リンパ節、膀胱、胸管及び腎臓であった。肝臓対血漿の AUC 比はラット及びサルでそれぞれ約 4500 及び 2500 であり、肝臓の $t_{1/2}$ はラット及びサルの血漿中よりかなり長かった（それぞれ約 120 時間及び 146 時間）。妊娠ラット及びウサギでは、ギボシランの胎盤又は胎児組織への分布はないか無視できるほどであった。

ラットに薬効投与量のギボシランを週に 1 回反復投与したとき、肝臓にはギボシランの蓄積はみられなかった。しかし、腎臓におけるギボシランの曝露は 3～4 倍高く、週に 1 回反復皮下投与後ギボシランは腎臓に蓄積することを示した。ラットと同様にギボシランを週に 1 回反復投与したとき、ギボシランはサルの肝臓では蓄積しなかった（サルの腎臓における PK は測定しなかった）。

2.4.3.5 代謝

ギボシランの代謝安定性及び代謝プロファイルを評価するために *in vitro* 及び *in vivo* 試験を行った。ギボシランの代謝安定性は、マウス、ラット、サル及びヒトの血清及び肝 S9 画分を用いて評価した。ギボシランの *in vitro* 安定性は、動物種を通して一様に類似しており、センス鎖はアンチセンス鎖より安定であった。ラット及びサルにおいてギボシラン投与後の血漿及び肝臓試料を分析して評価したギボシランの *in vivo* における代謝は、*in vitro* でみられた代謝と総じて類似していた。代謝プロファイルをヒト血漿及び尿で検討した。ヒト特異的な代謝物は検出されなかった。ヒト肝 S9 画分で行った *in vitro* 試験で、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方とも安定であり、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）の存在、非存在でも変化しなかったことが確認されたことから、CYP アイソザイムは、ギボシランの代謝に関与していないことが示された。

ギボシランのアンチセンス鎖は血清及び血漿中で主な活性代謝物 AS(N-1)3'ギボシランに代謝された。さらに AS(N-1)3'ギボシランに加えて、肝 S9 画分で AS(N-3)5'ギボシランが生成した。しかし、

AS(N-1)3'ギボシランは *in vivo* 試験における肝臓でのみ検出された。ギボシランセンス鎖の主な代謝物は、3’鎖の末端から 1、2 又は 3 つの GalNAc が失われたものであった。放射能標識[^{3}H]-ギボシランを用いたラット試験において、血漿、尿、及び胆汁中で AS(N-1)3'ギボシランが主要な代謝物であった。この試験で、5 個のマイナーな代謝物（ヌクレオチドがエクソ及びエンドヌクレアーゼで開裂した生成物）が、尿及び胆汁中で検出された。

AS(N-1)3'ギボシランは、ギボシランを皮下投与後のラット、サル及びヒト血漿中で循環している唯一の活性代謝物であった。2.5 mg/kg をヒトに月に 1 回投与後のヒト血漿中の AS(N-1)3'ギボシランの定常状態における AUC は、ギボシランに対して約 45%であった。ギボシランを皮下投与後の AS(N-1)3'ギボシランの全身曝露は、ラット（10 mg/kg）及びサル（30 mg/kg）でそれぞれギボシランの 21%及び 74%であった。すべての毒性試験で特に測定していないが、ラット及びサルの PK 試験で測定された AS(N-1)3'ギボシランの血漿における曝露は、予定している臨床用量におけるヒトの曝露量を実質的に超えていると推定された。

得られたアンチセンス鎖及びセンス鎖の代謝の性質のデータは、全体的に *in vitro* でのギボシラン代謝プロファイルが *in vivo* 試験の試料でみられたプロファイルと類似し、全体的なギボシラン代謝プロファイルが、ヒトを含む試験したすべての動物種で類似していることを示した。

2.4.3.6 排泄

腎臓及び糞中へのギボシラン排泄をラット及びサルに 10 mg/kg を単回皮下投与後 168 時間まで評価した。雄及び雌ラットにおいて、それぞれ投与量の約 11.2%及び 9.6%が尿に排泄された。放射能標識[^{3}H]-ギボシランを用いたマスバランス試験で、ラットでは投与量の 10%未満が尿中に未変化体として排泄され、糞中では未変化体は回収されないことが確認された。ラットと同様に雄及び雌のサルにおいて、それぞれ投与量の 19.1%及び 12.8%が尿中に排泄された。ギボシランの糞中排泄は、投与量のわずか 0.1%がラットにおいて排泄されたが、サルの糞中にはギボシランは検出されなかった。2.5 mg/kg 又は 20 mg/kg を皮下投与後の雄性ウサギの精液において C_{max} は投与後 8 時間であり投与後 216 時間までギボシランは検出可能であった。

2.4.3.7 薬物動態学的相互作用

ギボシランの薬物相互作用をガイドラインに従って種々の *in vitro*（例：ヒト肝ミクロソーム、ヒト肝細胞、遺伝子導入細胞及び膜小胞）で評価した。ギボシランは CYP アイソフォーム（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 又は CYP3A4/5）の直接又は時間依存的阻害物質ではなかった。ギボシランは CYP アイソフォーム（CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4）の誘導物質ではなかった。

ギボシランの薬物相互作用を種々の *in vitro*（例：ヒト肝ミクロソーム、ヒト肝細胞、遺伝子導入細胞及び膜小胞）測定で評価した。ギボシランは CYP アイソフォーム（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 又は CYP3A4/5）の直接又は時間依存的阻害物質ではなかった。ギボシランは CYP アイソフォーム（CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4）の誘導物質でもなかった。ギボシランは種々のヒト ATP 結合カセット（ABC）及び solute carrier（SLC）トランスポーターの基質又は

阻害物質ではなかった。特に乳がん耐性たん白質（BCRP）、胆汁酸排泄ポンプ（BSEP）、組織アニオン輸送ポリペプチド（OATP1B1 及び OATP1B3）、組織アニオン輸送トランスポーター（OAT1 及び OAT3）、組織カチオントランスポーター（OCT1 及び OCT2）又は多剤・毒性化合物排泄たん白質（MATE1 及び MATE2-K）の基質又は阻害物質ではなかった。しかし、ギボシランは、ギボシラン濃度が 1 及び 10 μmol/L で P 糖たん白（P-gp）をそれぞれ 23%及び 69%阻害したことから、IC_{50} は 1～10 μmol/L の間であることを示していると考えられる。ヒトにギボシランの 2.5 mg/kg を皮下投与したときの定常状態における平均血漿 C_{max} は 20 nmol/L 未満である。そのため、IC_{50} が 1 μmol/L であることから[I]／IC_{50} は、0.1 よりかなり低い可能性があり、臨床において P-gp が関与する相互作用は予測されないと考えられる（[I]=阻害剤濃度）。AS(N-1)3'ギボシランの薬物相互作用（DDI）の可能性に関しては特に評価しなかった。しかし、物理化学的性質が類似していることから、DDI の可能性は、ギボシランと類似していると考えられる。これらから、ギボシランは、CYP アイソザイム及び薬物トランスポーターが関与する DDI の可能性は低いと考えられる。

2.4.3.8 その他の薬物動態試験

ギボシランを用いた他の薬物動態試験は、実施していない。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 まとめ

ギボシランの安全性について、表 2.4.4-1 に概略を示す一連の非臨床毒性試験で検討した。ギボシランはげっ歯類及びサルに薬理活性を示すが、ウサギには薬理活性を示さない。マウス、ラット及びサルを用いてギボシランの 2～4 週間の探索的用量設定試験（非 GLP 適合）を実施し、続いて GLP に適合したラットで最長 26 週間及びサルで最長 39 週間の反復投与毒性試験を実施した。週 1 回投与の長期反復投与毒性試験における無毒性量は、ラット及びサルでそれぞれ 10 及び 30 mg/kg であった。これらの試験では肝臓が主要な毒性標的器官であり、副腎、腎臓、膵臓、投与部位及びリンパ節に非有害所見及び二次的所見が認められた。Tg-rasH2 マウスの 26 週間投与がん原性試験では、最高 1500 mg/kg/month の投与量でがん原性を示すエビデンスは認められなかった。非臨床毒性試験の結果から全体的に、AHP 患者の治療のため MRHD の 2.5 mg/kg 月 1 回投与を担保する、ギボシランの良好な安全性プロファイルが示されたと結論される。

ギボシランで実施した非臨床毒性試験の一覧については[表 2.6.7.1-1]「毒性試験一覧表」、各試験の概略は[2.6.6]項「毒性試験の概要文」を参照されたい。

表 2.4.4-1 ギボシランを用いた毒性試験

試験番号	表題	投与量（mg/kg）	GLP	毒性試験概要表
反復投与毒性試験				
用量設定毒性試験				
[AS1-NCD14-005]	マウスの探索的反復投与毒性試験	0、30、100、300	非適合	[表 2.6.7.6-1]
[AS1-NCD13-001]	雄 Sprague-Dawley ラットの 2 週間投与用量設定毒性試験	0、30、100、300	非適合	[表 2.6.7.6-1]
[AS1-NCD14-001]	Sprague-Dawley ラットの 4 週間投与探索的用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験	0、30、100、300	非適合	[表 2.6.7.6-1]
[AS1-NCD14-002]	カニクイザルの 4 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験	0、30、100、300	非適合	[表 2.6.7.6-1]
GLP 適合反復投与毒性試験				
[AS1-NCD14-010]	ラットにおける 13 週間皮下投与（週 1 回）毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験	0、3、10、30、100	適合	[表 2.6.7.7-1]
[AS1-GLP16-022]	ラットにおける 13 週間反復皮下投与（月 1 回）毒性試験	0、10、50、150	適合	[表 2.6.7.7-2]
[AS1-GLP15-022]	ラットにおける 26 週間反復皮下投与（週 1 回）毒性、受胎能及び（着床までの）初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験	0、3、10、30	適合	[表 2.6.7.7-3]
[AS1-NCD14-011]	サルにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験	0、15、50、150	適合	[表 2.6.7.7-4]
[AS1-GLP15-018]	幼若サルにおける 39 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験	0、10、30、100	適合	[表 2.6.7.7-5]

表 2.4.4-1 ギボシランを用いた毒性試験（続き）

試験番号	表題	投与量（mg/kg）	GLP	毒性試験概要表
遺伝毒性試験				
[AS1-NCD14-015]	ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験	1.58、5.0、15.8、50.0、158、500、1581 及び 5000 µg/plate	適合	[表 2.6.7.8-1]
[AS1-NCD14-016]	ヒト末梢血リンパ球を用いる哺乳類細胞 *in vitro* 染色体異常試験	1、2、4、8、16、32、64、128、256 及び 500 µg/mL	適合	[表 2.6.7.8-2]
[AS1-NCD14-017]	ラットの骨髄赤血球を用いる小核試験	0、500、1000、2000	適合	[表 2.6.7.9-1]
がん原性試験				
[AS1-DSM16-003]	近交系ハイブリッドマウス（BALB/cBy × C57BL/6 F1）を用いたギボシランの 8 週間反復皮下投与毒性試験 – *がん原性試験の用量設定を目的とする*	0、30、100、300、週 1 回	非適合	[表 2.6.7.10-1]
[AS1-GLP17-006]	001178-Tg-rasH2（野生型）マウスを用いたギボシランの 8 週間反復皮下投与用量設定毒性試験及びトキシコキネティクス試験 – *がん原性試験の用量設定を目的とする*	0、500、1000、1500、月 1 回	非適合	[表 2.6.7.10-2]
[AS1-GLP17-004]	Tg-rasH2 マウスを用いた 26 週間皮下投与がん原性試験	0、150、500、1500、月 1 回	適合	[表 2.6.7.10-3]
生殖発生毒性試験				
[AS1-DSM15-041]	ラットの受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験	0、10、30、100 週 1 回、0、1.5、5、16.5 1 日 1 回（妊娠期間）	非適合	[表 2.6.7.11-1]
[AS1-GLP16-011]	ラットの受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験	0、3、10、30 週 1 回、0、0.5、1.5、5 1 日 1 回（妊娠期間）	適合	[表 2.6.7.12-1]
[AS1-DSM16-012]	ウサギの胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験	0、3、10、30 1 日 1 回（妊娠期間）	非適合	[表 2.6.7.11-1]
[AS1-GLP16-018]	ウサギの胚・胎児発生に関する皮下投与試験	0、0.5、1.5、5 1 日 1 回、20（妊娠期間、妊娠 7 日）	適合	[表 2.6.7.13-1]
[AS1-GLP17-009]	ラットの周産期及び出生後の発生並びに出生後の行動／機能評価に関する皮下投与生殖毒性試験	0、3、10、30 妊娠 7、13、19 日及び 授乳 6、12、18 日（授乳期間）	適合	[表 2.6.7.14-1]

表 2.4.4-1 ギボシランを用いた毒性試験（続き）

試験番号	表題	投与量（mg/kg）	GLP	毒性試験概要表
その他の毒性試験				
[BIO14026]	ヒト全血を用いた AD-60519 のサイトカイン誘導に関する *in vitro* 試験	N/A	非適合	[表 2.6.7.17-1]
[AS1-NCD14-013]	雄 CD-1 マウスにおけるギボシランの単回皮下投与免疫刺激探索試験	0、30、100	非適合	[表 2.6.7.17-1]

略語：GLP＝医薬品の非臨床試験の実施の基準；N/A＝該当なし
注：ギボシランは溶液中の活性成分の名称、オリジナルの非臨床試験報告書では AD-60519、ALN-60519 又は ALN-AS1 と表記する場合がある。

2.4.4.2 単回投与毒性

ギボシランの単回投与毒性試験は実施しなかった。ギボシランの単回投与毒性を、ラットの 13 週間反復投与毒性試験の一部として評価した。当該 GLP 適合試験（試験番号[AS1-NCD14-010]）の単回投与毒性評価では、動物にギボシランを 0（0.9%食塩水、5 匹/雌雄）又は 100 mg/kg（10 匹/雌雄）の用量で単回投与し、8 日目に剖検した。ギボシランに関連した一般状態、体重又は摂餌量の変化、投与部位の局所刺激性、あるいは血液凝固及び尿検査パラメータの変化は観察されなかった。ギボシランに関連した臨床病理学的変化は、軽度の ALP 上昇（対照群と比べて 16%～51%上昇）のみであった。ギボシランに関連した器官重量の変化はなかった。肝臓（軽微～軽度の肝細胞空胞化及び軽微な単細胞壊死）、副腎（軽微～軽度の皮質細胞空胞化）及び投与部位（軽微～軽度の空胞化マクロファージ）で、病理組織学的変化が認められた。これらの変化は有害所見とは判断しなかった。100 mg/kg における 1 日目の平均血漿中 C_{max} 及び最終濃度測定可能時点までの血漿中濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}t(last)}$）は、それぞれ 19.7 µg/mL 及び 82.6 µg·h/mL であった。

2.4.4.3 反復投与毒性

マウス、ラット及びサルを用いて、ギボシランの最長 4 週間の探索的用量設定毒性試験（非 GLP 適合）を実施した。マウス（試験番号[AS1-NCD14-005]）、ラット（試験番号[AS1-NCD14-001]）及びサル（試験番号[AS1-NCD14-002]）に、ギボシランを 0、30、100 及び 300 mg/kg（TK 試験用ラットは 10 mg/kg も投与）の用量で週 1 回（合計 5 回）皮下投与して検討し、併せて TK 測定を実施した。別個の探索的試験においても、ラットに同一用量を週 1 回（合計 3 回）皮下投与した（TK 測定は実施せず、試験番号[AS1-NCD13-001]）。非臨床試験に使用したすべての動物種でギボシランの忍容性は良好であり、試験に用いた最高用量の 300 mg/kg まで用量制限毒性は認められなかった。ラットの 4 週間投与試験（試験番号[AS1-NCD14-001]）において肝臓が主要な毒性標的器官であることが明らかとなり、ラットが毒性学的に最も感受性の高い動物種と考えられた。ラットの 4 週間投与試験で肝臓に血清トランスアミナーゼ値の上昇を伴う肝細胞の変化が認められたことから、次に実施する GLP 適合のラット 13 週間投与（週 1 回）毒性試験（試験番号[AS1-NCD14-010]）の最高用量として 30 mg/kg を設定した。規制当局によるオリゴヌクレオチド治療薬の前臨床毒性試験では、非げっ歯類の試験動物種の先例としてサルが使用されていることから、非げっ歯類の動物種としてサルを選定した。

GLP 適合のラットにおける 13 週間投与毒性試験（試験番号[AS1-NCD14-010]）では、ギボシランの 100 mg/kg を単回投与、又は 0、3、10 及び 30 mg/kg の用量で週 1 回投与した。無毒性量は試験に用いた最高用量の 30 mg/kg であった。用量依存的な病理組織学的変化として、3.0 mg/kg 以上で肝臓に一部可逆的で軽微～重度の肝細胞空胞化、10 mg/kg 以上で軽微～軽度の単細胞壊死、肝細胞有糸分裂の増加及びクッパー細胞色素沈着が認められた（100 mg/kg を単回投与した雌で軽微な単細胞壊死もみられた）。空胞化した肝細胞に細胞変性を示すエビデンスは認められず、肝細胞の単細胞壊死は、特に ALT 上昇など関連する臨床病理検査値に一貫した変化がなく、重篤性が低かった。単細胞壊死についても回復性のエビデンスが認められた。したがって、これらの変化は非有害所見と判断された。回復期間には 10 mg/kg 以上の雌雄で軽微～軽度の好酸性細胞変化巣が観察され、発現頻度／程度が用量依存的に増加したが、細胞変化巣の明白な数的増加はみられなかった。30 mg/kg の雌では、肝細胞の再生と一致して、二核及び巨大核の軽微な増加を示す肝細胞が増加した。腎臓では、30 mg/kg で尿細管に可逆的で軽微～軽度の好塩基性顆粒が観察された。この腎臓所見に伴う退行性変化はみられず、腎機能に関連する血清生化学又は尿検査マーカーの変化も伴わなかったことから、非有害所見と判断した。副腎（索状帯）では、ギボシランを投与した雄の全投与量及び雌の 10 mg/kg 以上で、軽微～軽度の皮質空胞化の発現頻度／程度が用量依存的に増加した。13 週間の休薬期間終了時に、回復性試験のいずれの動物においても副腎、腎臓又は投与部位にギボシランと関連した病理組織学的所見は認められなかった。以上のように、ギボシランを 3、10 又は 30 mg/kg で投与した主試験の動物でこれらの組織にみられた変化に関して、完全な回復性が認められた。

ラットにギボシランを 0（0.9%食塩水）、10、50 又は 150 mg/kg の用量で月 1 回投与した結果、おおむね 150 mg/kg 以下の用量で非有害所見が観察された（試験番号[AS1-GLP16-022]）。しかし、150 mg/kg を投与した雌では軽微～中等度の卵円形細胞過形成が観察された。非有害所見は概して、軽微～軽度のアルブミン減少、軽微～中等度の ALP 上昇、軽微～軽度の AST 上昇、並びに軽度の総ビリルビン及び間接ビリルビン増加など、血清生化学検査値の変化と関連がみられた。

GLP 適合のラットにおける 26 週間反復投与毒性、受胎能及び初期胚発生に関する試験（試験番号[AS1-GLP15-022]）では、ギボシランを 0、3、10 及び 30 mg/kg の用量で週 1 回（合計 27 回）投与し、続けて 13 週間の回復期間を設けた。当該試験に組み込んで実施した雄の受胎能評価では、試験の最高用量まで有害な生殖毒性所見は認められなかった。30 mg/kg の雌雄で、ALP（+46%～+132%）及び総ビリルビン（+81%～+128%）の軽度上昇がみられた。30 mg/kg の雌では、AST（+40%）及びトリグリセリド（+88%）の軽度上昇（増加）、並びにアルブミン／グロブリン比の低下を伴う総たん白質（-7%）及びアルブミン（-12%）の軽度減少も認められた。これらの変化は 13 週間の回復期間後に回復した。ギボシランに関連した器官重量（絶対重量及び体重／脳相対重量）の変化として、10 mg/kg 以上の雄で肝重量の減少、30 mg/kg の雌雄で副腎重量の減少、及び 30 mg/kg の雌で腎重量の増加が観察された。器官重量の変化と相関する組織学的変化はなかった。13 週間の回復期間後の器官重量は対照群と同等であり、回復性を示した。肝臓、腎臓、膵臓及び投与部位で、ギボシランに関連した病理組織学的所見が観察された。肝臓では、肝細胞空胞化（軽微～重度）の発現頻度が用量依存的に増加し、概して雌で重度であり、肉眼的に観察された蒼白化及び肥大と関連がみられた。これ以外の肝臓所見として、全投与量の雌雄で軽微～軽度の肝細胞単細胞壊死及び肝細胞有糸分裂の増加、10 mg/kg 以上の雌で軽微な髄外造血の増加、10 mg/kg 以上（雌は 30 mg/kg のみ）で軽微～軽度

のクッパー細胞内好塩基性顆粒、30 mg/kg でクッパー細胞色素沈着及び好酸性細胞変化巣の発現頻度増加、並びに 30 mg/kg の雌のみ軽微な肝細胞巨大核が観察された。腎臓では、10 mg/kg 以上の雌雄で近位尿細管曲部に軽微～軽度の好塩基性顆粒が観察され、明瞭な用量相関がみられた。さらに、膵臓のランゲルハンス島で用量依存的に血管拡張が観察された。全体的には膵臓で観察された血管拡張の用量依存性とギボシラン投与との関係が示唆されるが、膵臓の外分泌領域に変化はみられず、出血性、退行性又は炎症性変化が認められないことから、膵臓の血管拡張は肝毒性に伴う非有害な二次的変化であることが示唆される。30 mg/kg で肝臓に肝細胞の単細胞壊死及び空胞化などの病理組織学的変化が認められ、AST 及び ALP 上昇の臨床病理学的変化を伴ったことから、ギボシランを週 1 回長期投与した時の無毒性量は 10 mg/kg と判断された。

サルの 4 週間投与探索的毒性試験（試験番号[AS1-NCD14-002]、非 GLP 適合）では、用量制限毒性と考えられる所見が認められなかったことから、その後実施する 13 週間投与毒性試験（試験番号[AS1-NCD14-011]、GLP 適合）の高用量として 150 mg/kg を設定した。GLP に適合したサルの 13 週間投与毒性試験では、ギボシランを 0、15、50 又は 150 mg/kg の用量で週 1 回合計 14 回投与した。肝臓のクッパー細胞、リンパ節及び投与部位にギボシランと関連する影響が認められた。当該試験におけるサルの無毒性量は、試験に用いた最高用量の 150 mg/kg と判断した。

サルの長期（39 週間）投与試験では、ギボシランを 0、10、30 及び 100 mg/kg の用量で週 1 回合計 40 回投与し、その後 13 週間の回復期間を設けた（試験番号[AS1-GLP15-018]）。投与開始時に動物は 13～17 ヵ月齢であった。24～36 ヵ月齢のサルは、一般にヒトでは 12 歳頃の発育年齢に相当すると考えられる [11]。サルの 13 週間投与試験でみられたように、本試験でもギボシランに関連する影響として、30 mg/kg 以上でクッパー細胞及び肝細胞の細胞質内に軽微～中等度の好塩基性顆粒、並びに 100 mg/kg で軽微な肝細胞の単細胞壊死など、肝臓の変化が認められた。100 mg/kg で肝細胞の単細胞壊死、並びにそれと関連する ALT、AST、γ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）及びコレステロールの上昇が認められたことから、本試験の無毒性量は 30 mg/kg と判断された。サルの反復投与試験では、膵臓の血管拡張は観察されなかった。13 週間の回復期間終了時には、ギボシランに関連した肝臓の変化は依然として認められたが、概して頻度及び重篤度が低く、可逆的で回復が進行中であることが示唆された。

2.4.4.3.1 所見と薬物動態の関係

マウス、ラット、ウサギ及びサルの血漿、肝臓及び腎臓、並びに妊娠ラット及びウサギの胎盤及び胎児組織を用いて、ギボシランの TK 特性を検討した。ギボシランの血漿中曝露量は、非臨床試験に使用したすべての動物種で、おおむね用量に比例して又は用量比をやや上回って増加した。肝臓及び腎臓の曝露量については、動物種にかかわらず投与量が増加すると腎臓と比べて肝臓の濃度が相対的に低下する傾向を示した。最高用量では腎臓のギボシラン曝露量が肝臓と同程度かやや上回り、高用量で肝臓の薬物濃度が飽和に近づき、血中に残った薬物が腎臓から排泄されることが示唆された。反復投与毒性試験で主要な所見が認められたギボシランの血漿中曝露量、並びに主要所見が認められた曝露量及び臨床曝露量から算出した曝露量比を表 2.4.4-2 に示した。

表 2.4.4-2 非臨床反復投与毒性試験：主要所見が認められたギボシランの曝露量と臨床曝露量比

主要所見	投与量（mg/kg）	C_{max} [a]（μg/mL）	AUC [a]（μg·h/mL）	臨床曝露量比 C_{max}/AUC [b]
試験番号[AS1-NCD14-010]：ラットにおける 13 週間皮下投与毒性及び TK 試験、並びに 13 週間回復性試験				
投与頻度 － 週 1 回				
可逆的な肝臓蒼白化（雄）、可逆的な副腎重量↓（雄）、一部可逆的な肝細胞空胞化、可逆的な副腎皮質空胞化、可逆的な投与部位反応	3	0.5	0.79	1.6/0.8
上記に加えて、可逆的な肝臓蒼白化（雌）、可逆的な副腎重量↓（雌）、可逆的な肝臓重量↓（雄）、肝細胞の単細胞壊死、肝細胞の有糸分裂↑、可逆的なクッパー細胞色素沈着、可逆的な副腎皮質空胞化（雌）、肝臓の好酸性細胞変化巣（回復性試験の所見）	10	1.2	3.7	3.7/3.6
上記に加えて、可逆的な AST↑（雌）、可逆的な ALP↑、可逆的な TBIL↑及び dBIL↑（雄）、可逆的なアルブミン↓（雌）、可逆的な A/G 比↓(雌)、可逆的な腎臓重量↑(雌)、可逆的なクッパー細胞色素沈着（雌）、可逆的な近位尿細管の好塩基性顆粒（雌）、二核肝細胞及び巨大核（雌、回復性試験の所見）	30（無毒性量）	6.3	25.2	19.6/24.4
試験番号[AS1-GLP16-022]：ラットにおける 13 週間反復投与毒性試験				
投与頻度 － 月 1 回				
肝臓蒼白化（雄）、副腎重量↓、肝臓重量↓、肝細胞空胞化	10	0.7	2.8	2.2/0.7
上記に加えて、肝臓蒼白化（雌）、投与部位反応、尿細管上皮の好塩基性顆粒（雄）	50（無毒性量、雌）	8.6	52.3	26.8/12.7
上記に加えて、体重増加量↓（雌）、摂餌量↓（雌）、白血球・好中球・単球数↑（雌）、血小板・網状赤血球↓（雌）、AST・ALT・ALP↑（雌）、総たん白質・アルブミン・グロブリン↓（雌）、TBIL↑、dBIL↑（雌）、尿細管上皮の好塩基性顆粒（雌）、肝細胞の単細胞壊死、肝細胞の色素沈着、肝細胞の有糸分裂↑、卵円形細胞過形成（雌）、肝臓の好酸性細胞変化巣（雌）	150（無毒性量、雄）	30.4	295	94.7/71.4

表 2.4.4-2　非臨床反復投与毒性試験：主要所見が認められたギボシランの曝露量と臨床曝露量比

（続き）

主要所見	投与量 （mg/kg）	C_{max} [a] （μg/mL）	AUC [a] （μg·h/mL）	臨床 曝露量比 C_{max}/AUC [b]
試験番号[AS1-GLP15-022]：ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性、受胎能及び（着床までの）初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験				
投与頻度 － 週 1 回				
可逆的な投与部位反応、肝細胞の単細胞壊死	3	0.4	0.8	1.2/0.8
上記に加えて、可逆的な肝臓重量↓、一部可逆的な肝細胞空胞化、可逆的で軽微な髄外造血↑（雌）、クッパー細胞内の好塩基性顆粒（雄）、膵臓ランゲルハンス島の可逆的な血管拡張	10 （無毒性量）	0.8	3.7	2.6/3.6
上記に加えて、可逆的な血小板数↓（雌）、可逆的な活性化部分トロンボプラスチン時間↓、可逆的な AST↑（雌）、可逆的なトリグリセリド↑（雌）、可逆的な副腎重量↓、可逆的な腎臓重量↑（雌）、肝細胞巨大核（雌）、クッパー細胞内の好塩基性顆粒（雌）、膵臓ランゲルハンス島の一部可逆的な血管拡張	30	5.4	24.5	16.7/23.7
試験番号[AS1-NCD14-011]：サルにおける 13 週間皮下投与毒性及び TK 試験、並びに 13 週間回復性試験				
投与頻度 － 週 1 回				
投与部位反応、空胞化マクロファージ、肝細胞の単細胞壊死（雄）	15	3.8	16.3	11.8/15.8
上記に加えて、クッパー細胞内の好塩基性顆粒、肝細胞の単細胞壊死（雌）	50	8.1	72.5	25.2/70.2
上記に加えて、可逆的な ALP↑（雄）、可逆的な ALT↑（雄）、可逆的な AST↑（雄）、可逆的な肝細胞内好塩基性顆粒	150 （無毒性量）	24.2	292.0	75.4/282.8
試験番号[AS1-GLP15-018]：幼若サルにおける 39 週間皮下投与毒性及び TK 試験、並びに 13 週間回復性試験				
投与頻度 － 週 1 回				
可逆的な投与部位反応、リンパ節の空胞化マクロファージ	10	1.9	6.9	6.0/6.7
上記に加えて、可逆的な ALP↑、クッパー細胞及び肝細胞内の一部可逆的な好塩基性顆粒	30 （無毒性量）	6.0	28.2	18.6/27.3
上記に加えて、一部可逆的な GGT↑、可逆的な ALT↑、可逆的な AST↑（雄）、可逆的なコレステロール↑（雄）、肝細胞の単細胞壊死	100	19.2	187	59.8/181.1

表 2.4.4-2 非臨床反復投与毒性試験：主要所見が認められたギボシランの曝露量と臨床曝露量比（続き）

主要所見	投与量（mg/kg）	C_{max} [a]（μg/mL）	AUC [a]（μg·h/mL）	臨床曝露量比 C_{max}/AUC [b]

略語：A/G＝アルブミン/グロブリン比；ALP＝アルカリホスファターゼ；ALT＝アラニンアミノトランスフェラーゼ；AST＝アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ；AUC＝血漿中濃度-時間曲線下面積；C_{max}＝T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；dBIL＝直接ビリルビン；GGT＝γ-グルタミルトランスフェラーゼ；TBIL＝総ビリルビン；TK＝トキシコキネティクス；↑＝増加；↓＝減少

a: 反復投与毒性試験では、AUC 値及び C_{max} 値は雌雄合算の平均血漿中濃度を表す。投与終了に近い時点で得られた値であり、$AUC_{0\text{-}24}$ 又は $AUC_{0\text{-}t(last)}$として報告した。

b: ギボシランを 2.5 mg/kg 月 1 回投与した発作が再発する AIP 患者で 3 回目の投与後に到達したヒトの曝露量（C_{max} 0.321 μg/mL 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$ 4.130 μg·h/mL）を基に、曝露量比を算出した［ギボシラン（ALN-AS1）の急性間欠性ポルフィリン症（AIP）患者における第 1 相試験、[ALN-AS1-001]試験パート C、ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02452372］。非臨床における週 1 回の投与間隔と臨床における月 1 回の投与間隔を調整するため、必要な場合は AUC 値を 4 で除して標準化した。

2.4.4.3.2 毒性標的器官

ギボシランは糖鎖リガンド（GalNAc）と siRNA が共有結合しており、主に肝細胞の表面に発現する ASGPR を介した肝細胞による siRNA の直接取り込みによって、特異的に肝臓に送達されるようデザインされている。マウス、ラット及びサルを用いて実施した反復投与毒性試験において、ギボシランに関連した肝毒性のエビデンスが認められ、非臨床試験の動物種としてラットが最も感受性が高いことが明らかとなった。ラット及びサルの反復投与毒性試験で認められた、ギボシランに関連した肝臓所見を 2.4.4.3 項に要約した。この肝臓所見は、細胞内へのギボシランの蓄積に起因する代謝の変化が関与した細胞順応と解釈される [12]。この適合性変化に関連する炎症又は線維化のエビデンスはなんら認められなかったが、単細胞壊死のエビデンスが認められた。単細胞壊死は、回復性のエビデンスも認められた。ギボシランの *ALAS1* mRNA に対する薬理作用及びその結果生じるヘム中間体生成の減少は、ラットで観察された肝重量の減少に関して、可能性のある作用機序的な説明として無視することはできない。ラットで観察された微小及び大空胞性脂肪変性は種特異的と考えられ、ヒトとの関連は不明である。

これ以外のギボシラン投与と関連した非有害又は二次的所見として、副腎、腎臓、膵臓、投与部位及びリンパ節に影響が認められた。

2.4.4.4 遺伝毒性

GLP に適合したギボシランの遺伝毒性試験、すなわち細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号[AS1-NCD14-015]）、ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験（試験番号[AS1-NCD14-016]）、及びラット骨髄小核試験（試験番号[AS1-NCD14-017]）を実施した。遺伝毒性試験では、ICH S2(R1)「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」に示す限界用量／濃度まで試験した結果、すべて陰性であった。これらの試験結果から、ギボシランは突然変異誘発能及び染色体異常誘発能をいずれも有さないことが示された。

2.4.4.5 がん原性

Tg-rasH2 野生型マウスを使用してがん原性用量設定試験を実施した。Tg-rasH2 マウスを用いた 26 週間投与がん原性試験（試験番号[AS1-GLP17-004]）では、マウスにギボシランを 0、150、500 及び 1500 mg/kg/month の用量で皮下投与した結果、がん原性を示すエビデンスは認められなかった。

さらに、ギボシランに関する文献情報及び得られた非臨床データの精査に基づき、ギボシランの作用機序及び毒性プロファイル（遺伝毒性を示さない、ホルモンの変化がない、長期投与毒性試験で前がん病変が認められない、及び免疫抑制作用は認められない）では、がん原性の懸念を引き起こす要因は認められない。試験が終了した Tg-rasH2 マウスの 26 週間投与がん原性試験で所見が認められなかったことから、エビデンスの重みに基づく評価により、ギボシランががん原性を示す可能性は低いと結論する重要なデータが得られた。

Sprague-Dawley ラットの 2 年間投与がん原性試験を現在実施中であり、試験終了後提出する予定である。本手順は ICH M3(R2)ガイドライン「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（薬食審査発 0219 第 4 号、平成 22 年 2 月 19 日）の記述、「がん原性試験が推奨される場合であっても、重篤な疾患の治療のために開発された医薬品については、成人患者／小児患者用を問わず、製造販売承認後にがん原性試験の結論を出すことができる」に適合するものである。

2.4.4.6 生殖発生毒性

ギボシランを雄ラットに 0、3、10 及び 30 mg/kg の用量で週 1 回皮下投与（試験番号[AS1-GLP15-022]）、並びに雌ラットの交配前及び交配期間中から器官形成期を通して投与を継続した（試験番号[AS1-GLP16-011]）結果、評価した雌雄の受胎能エンドポイントに有害な影響は認められなかった。

ラット及びウサギを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する用量設定試験、並びに受胎能及び胚・胎児発生に関する試験を実施し、ギボシラン投与が胚・胎児発生に及ぼす影響を評価した。ラットを用いた用量設定試験（試験番号[AS1-DSM15-041]）では、交配前 22、15、8 及び 1 日にギボシランを 0、10、30 及び 100 mg/kg の用量で週 1 回（合計 4 回）皮下投与した。妊娠 6～17 日は 0、1.5、5 及び 16.5 mg/kg の用量で毎日動物に投与した。妊娠動物及び胚・胎児発生に対する有害作用を評価するのに十分な曝露量を確保するため、臨床で予定する月 1 回の投与頻度とは異なり妊娠 6～17 日は連日投与を行った。ギボシランを投与した結果、100/16.5 mg/kg（交配前/妊娠 6～17 日）で母動物の死亡例及び一過性の体重・摂餌量減少が認められ、100/16.5 mg/kg は最大耐量を上回った。ラットの受胎能及び胚・胎児発生に関する試験（試験番号[AS1-GLP16-011]）では、雌ラットの交配前 22、15、8 及び 1 日に、ギボシランを 0、3、10 又は 30 mg/kg の用量で週 1 回（合計 4 回）皮下投与した。妊娠 6～17 日の間は 0、0.5、1.5 又は 5 mg/kg の用量で毎日動物に投与した。ギボシランに関連した母動物に対する影響として、10/1.5 mg/kg 以上で AST、トリグリセリド及びカリウム濃度の上昇、さらに 30/5 mg/kg で ALT、ALP 及びリン濃度の上昇並びにアルブミン濃度の減少が認められた。これらの所見に基づき、母動物の無毒性量は 3/0.5 mg/kg と結論した。ギボシラン投与の結果、発情周期、交配、受胎能、胚・胎児生存率又は胎児体重に影響は認められなかった。ギボシランに関連した胎児

の奇形はみられなかった。ギボシランに関連する唯一の胎児骨格異常として、30/5 mg/kg で恥骨の骨化不全が認められ、母動物で観察された肝毒性に伴うストレスが関係すると考えられた[13]。ラットの胚・胎児発生に関するギボシランの無毒性量は 30/5 mg/kg であった。当該試験の胚・胎児発生期での投与頻度が連日である一方、臨床で予定する投与頻度は月 1 回であることを考慮する必要がある。以上を考慮して、ラットの投与量をヒト等価用量（HED、mg/kg 単位）に変換して MRHD を 1 日投与量に標準化（28 で除す）すると、胚・胎児発生に関する無毒性量でのギボシランの投与量は MRHD の 9.1 倍に相当する。

ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験（試験番号[AS1-DSM16-012]）では、ギボシランを 0、3、10 及び 30 mg/kg の用量で妊娠 7～19 日まで 1 日 1 回皮下投与した。ラットと同様に、妊娠した雌及び胚・胎児の発生に及ぼす潜在的な有害作用の評価に十分な曝露量を確保するため、連日投与を実施した。ギボシラン投与の結果、全投与量で母動物の体重／体重増加量減少、及び 10 mg/kg 以上で摂餌量減少など、母動物に対する影響が認められた。さらに、全投与量で早期吸収胚数の増加、及びそれと一致した着床後胚損失率の上昇がみられた。ウサギの胚・胎児発生に関する試験（試験番号[AS1-GLP16-018]）では、ギボシランを 0、0.5、1.5 及び 5 mg/kg の用量で妊娠 7～19 日まで 1 日 1 回、又は妊娠 7 日に 20 mg/kg を 1 回皮下投与した。ギボシランに関連した母動物に対する影響として、全投与群で母動物の顕著な平均体重／体重増加量及び摂餌量の減少がみられた。1.5 mg/kg/day 以上で肝臓に肉眼的病理所見が認められた。臨床病理検査でギボシランに関連した母動物に対する影響として、5 mg/kg で ALT、AST、フィブリノゲン、血小板数及び網状赤血球数の増加、並びに 0.5 mg/kg 以上の反復投与で赤血球数、血色素量及びヘマトクリット値の低下が観察された。これらのデータから、母動物の無毒性量は決定できなかった。5 mg/kg/day 及び 20 mg/kg 投与群で、それぞれ 1 及び 2 例の流産が認められた。ギボシラン投与の結果、1.5 mg/kg 以上で着床後胚損失率の上昇、20 mg/kg で低頻度の骨格変異が観察された。ウサギの胚・胎児発生に関するギボシランの無毒性量は 0.5 mg/kg/day であり、これを HED（mg/kg 単位）に変換し、MRHD を 1 日投与量に標準化して比較すると、ウサギの無毒性量は MRHD の 1.8 倍に相当する。肝臓 *ALAS1* mRNA 濃度の薬力学的解析では、ギボシランはウサギに薬理学的活性を示さなかった。ウサギで観察された母動物毒性及び顕著な体重減少は、マウス、ラット又はサルで観察された所見と一致せず、これらの所見の臨床的意義は不明である。観察された着床後胚損失及び骨格変異は、食餌制限ウサギでの顕著な母動物の体重減少に伴って観察される所見と一致する[13,14,15,16]ことから、母動物毒性に伴う間接的影響と解釈される。胎盤及び胎児組織でギボシランが検出されないことから、この結論が一層支持される。

出生後の発生に関する試験（試験番号[AS1-GLP17-009]）では、妊娠雌ラットにギボシランを最高 30 mg/kg の用量で妊娠 7、13 及び 19 日並びに授乳 6、12 及び 18 日に離乳まで皮下投与した。出生児の成長及び発達に影響はみられなかった。

幼若動物を用いたギボシランの毒性試験は実施しなかった。サルを用いた GLP 適合の長期投与毒性試験では、ギボシランを 0、10、30 及び 100 mg/kg の用量で週 1 回 39 週間投与し、その後 13 週間の回復期間を設けた。投与開始時に動物は 13～17 ヵ月齢であった。24～36 ヵ月齢のサルは、一般にヒトでは 12 歳頃の発育年齢に相当すると考えられる[11]。したがって、これまでに得られた幼若サルを用いたギボシランの毒性試験データにより、12 歳以上の青年期投与が担保されると判断した。

2.4.4.7 局所刺激性

ラット及びサルの 13 週間投与試験において、改良ドレイズスコア法により試験の最高投与量まで局所刺激性を検討した。サルでは濃度 200 mg/mL まで局所刺激性所見は認められなかった。

2.4.4.8 その他の毒性試験

ギボシランは低い免疫原性を有する。ラット及びサルにそれぞれ 26 及び 39 週間、ギボシランを週 1 回投与した血漿で ADA を測定した。サルの 39 週間反復投与毒性試験（試験番号[AS1-GLP15-018]）では、ギボシランを投与したサルに低頻度（36 例中 2 例）で、低抗体価の抗ギボシラン抗体が確認された。ギボシランの血漿中曝露量に対する影響はなく、これらの動物で ADA の存在に起因する毒性所見は認められなかった。ギボシランを投与したラットでは、ADA は検出されなかった。

ギボシランの免疫毒性試験は実施しなかった。ギボシランで実施した反復投与毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo* 免疫刺激試験で所見が認められないことから、ギボシランは免疫刺激作用あるいは免疫毒性作用を有さないと考えられる。

ギボシランの光毒性試験は実施していない。ICH S10「医薬品の光安全性評価ガイドライン」の 1.3 項に述べられているように、一般的に当該ガイドラインはオリゴヌクレオチドに適用されない。ギボシランの物理・化学的特性及び反復投与毒性試験で動物の行動に関連する所見が認められないことから、ギボシランに依存性の懸念はないことが示された。

ギボシランに関連する代謝物及び不純物の安全性については、ギボシランで実施した包括的な非臨床毒性試験パッケージで十分に検討された。非臨床毒性試験で使用した原薬バッチの不純物プロファイルは、臨床試験及び予定市販製剤で使用する物質の不純物プロファイルと同等であった。

2.4.5 総括及び結論

RNAi 治療薬ギボシランの標的は、ヘム生合成経路の最初の段階の律速酵素をコードする *ALAS1* である。ギボシランの投与は、AHP 患者の肝臓の *ALAS1* 量を低下させ、疾患の発現に関与する ALA 及び PBG の蓄積を減少させることを目的としている。AHP 発作症状は肝移植によって完全に消失することが示されており、具体的に肝臓での ALA 及び PBG 産生の減少が臨床的利益をもたらすことが示唆されている [17,18]。

非臨床薬理試験は、ギボシランが肝臓の *ALAS1* の発現を特異的かつ強力に正常範囲に減少させ、AHP 疾患関連症状の原因として考えられている ALA 及び PBG 毒性中間体の蓄積を減少させることを示している。複数の動物種を用いた複数の試験でギボシランは皮下投与により強力かつ投与量依存性の薬理活性を示し、*ALAS1* mRNA の一貫した減少をもたらした。単回皮下投与後 4 日目までに認められた肝臓の *ALAS1* mRNA の最大 70%の減少は、投与量に応じて持続的（1～4 週間）で、エキソソーム中の RNA 検出のための cERD アッセイで測定された血清又は尿で認められた *ALAS1* mRNA の減少の程度と相関した。投与 5～8 週間後に認められた、投与量依存性の定常状態における *ALAS1* の最大 80%の減少も、さまざまな反復投与レジメンで実証されている。げっ歯類の AIP モデル試験ではギボシランを週 1 回、反復投与すると投与後 4 日目に *Alas1* mRNA の最大 86%の減少が認められ、ALA 及び PBG ヘム中間体のそれぞれ 90%及び 58%の減少と密接に相関していることが確認された。サルを用いた安全性薬理試験では、ギボシランは心血管系、呼吸器系及び神経系にオフターゲット作用がないことが示された。以上、薬理試験において、ギボシランの投与が *ALAS1* mRNA 並びに ALA 及び PBG の投与量依存的な減少をもたらすことが裏付けられた。

ギボシランの PK 及び ADME を、*in vitro* 及び *in vivo* で検討した。ギボシランは非臨床の *in vivo* で試験した動物種及び *in vitro* でのヒト及び動物を通して類似の PK 及び ADME の性質を示した。全体のデータにおいて、ギボシランの皮下投与は標的臓器（肝臓）への適切な siRNA の曝露がなされることを示した。

ラット及びサルにおいて、薬効投与量である 0.1～10 mg/kg を皮下投与後、血漿中曝露（C_{max} 及び AUC）は、ほぼ投与量比例性を示した。ギボシランの排泄は、10 mg/kg を両動物種に単回静脈内投与後、平均 $t_{1/2}$ が約 0.2 時間と迅速であった。平均 $t_{1/2}$ は、静脈内投与と比較すると皮下投与では長かった（ラットで約 2.7 時間、サルで約 3.5 時間）。ギボシランの 10 mg/kg を皮下投与後のギボシランの体循環における平均絶対バイオアベイラビリティは、ラット及びサルでそれぞれ 24%及び 37%であり、ギボシランの PK の性質に雌雄差はみられなかった。反復投与したときの血漿における PK は、単回投与時のデータと類似しており、ラット及びサル両方で蓄積性の証拠はみられなかった。総じて、ラット及びサルにおけるギボシランの PK の性質は、0.1～10 mg/kg を皮下投与後では時間又は投与量依存的ではないことを示している。

試験したマウス、ラット、サル及びヒトにおけるギボシランの血漿たん白結合率は 1.0～50 µg/mL の濃度範囲で動物種を通じて類似しており、10.1%～93.1%であった。ギボシランのたん白結合率の程度は、ギボシラン濃度が増加すると低下した。

In vitro 及び *in vivo* 試験で、ギボシランの代謝を評価した。AS(N-1)3'ギボシランは、ギボシランを皮下投与後のラット、サル及びヒト血漿中で循環している唯一の活性代謝物であった。ギボシランの

センス鎖の主な推定代謝物は、3'末端における GalNAc 部分の 1、2 又は 3 つの全部が脱落して生成することが示された。得られたセンス鎖及びアンチセンス鎖の代謝の性質のデータは、*in vitro* でのギボシラン代謝プロファイルが *in vivo* 試験の試料でみられたプロファイルと類似し、全体的なギボシラン代謝プロファイルが、ヒトを含む試験したすべての動物種で類似していることを示した。

In vitro 試験で、ギボシランは、直接又は時間依存的阻害物質ではなくまた CYP 酵素の誘導物質でもないことが確認された。またギボシランは、種々のヒト ABC 及び SLC トランスポーターの基質や阻害物質でもないことから、ギボシランは、CYP アイソザイム及び薬物トランスポーターを含む DDI の可能性は低いことが示されている。AS(N-1)3'ギボシラン（活性代謝物）は物理化学的性質が類似していることから、DDI の可能性は、ギボシランと類似していると考えられる。しかし、ALAS1 はヘム生合成過程の主要な酵素であり、*ALAS1* のダウンレギュレーションは CYP 活性を低下させる可能性がある。患者における主要な CYP アイソザイム DDI 試験（試験番号[ALN-AS1-004]参照）が、臨床において *ALAS1* の誘発低下の CYP 活性への影響の評価をするために行われた。

腎臓及び糞中へのギボシラン排泄をラット及びサルに 10 mg/kg を単回皮下投与後 168 時間まで評価した。雄及び雌ラットにおいて、それぞれ投与量の約 11.2%及び 9.6%が尿に排泄された。ラットと同様に雄及び雌のサルにおいて、それぞれ投与量の 19.1%及び 12.8%が尿中に排泄された。ギボシランの糞中排泄は、投与量の 0.1%のみがラットにおいて排泄されたが、サルの糞中にはギボシランは検出されなかった。

AHP 患者を対象とするギボシランの臨床適用を担保するため、マウス、ラット及びサルを用いた探索的反復投与毒性試験を数試験、並びにラット及びサルの GLP に適合した反復投与毒性試験を実施して、ギボシランの毒性を評価した。ギボシランをラットに 10 mg/kg まで（試験の最高用量は 30 mg/kg）の用量で週 1 回 26 週間投与、又はサルに 30 mg/kg まで（試験の最高用量は 100 mg/kg）の用量で週 1 回 39 週間投与した結果、有害作用は認められず、無毒性量はラット及びサルでそれぞれ 10 及び 30 mg/kg であった。これらの試験で認められた所見から、ラット及びサルの両動物種で主な毒性標的器官が肝臓であり、ギボシランに起因する影響に対してラットが最も感受性の高い動物種であることが明らかとなった（以下参照）。簡略には、ギボシランをサルに週 1 回中期／長期投与後に、肝臓の病理組織学的変化として軽微な肝細胞の単細胞壊死、並びに肝細胞及びクッパー細胞内の好塩基性顆粒が認められた。ギボシランを週 1 回中期／長期投与したラットの肝臓で、ギボシランに関連した典型的な所見として、肝細胞の空胞化、単細胞壊死及び巨大核を伴う有糸分裂の増加、クッパー細胞の色素沈着、並びに肝細胞の変化巣が観察された。膵臓及び副腎で間接的所見が観察された。また、腎尿細管に好塩基性顆粒、並びに最終投与部位で空胞化マクロファージ及び混合型／単核細胞浸潤が観察された。

ギボシランをラットに 10 mg/kg（試験の最高用量は 30 mg/kg）の用量で週 1 回 26 週間投与、又はサルに 30 mg/kg（試験の最高用量は 100 mg/kg）の用量で週 1 回 39 週間投与した結果、有害作用は認められず、無毒性量はラット及びサルでそれぞれ 10 mg/kg 及び 30 mg/kg であった。ラット及びサルの無毒性量における血漿中曝露量（AUC）を、ギボシランを 2.5 mg/kg 月 1 回皮下注射した AIP 患者の血漿中曝露量（AUC）と比較すると、曝露量比はラット及びサルでそれぞれ 3.6 倍及び 27.3 倍であった。ギボシランは変異原性や染色体異常誘発性を示さず、免疫刺激作用あるいは免疫毒性作用を有さないと考えられる。Tg-rasH2 マウスを用いた 26 週間投与がん原性試験では、最高

1500 mg/kg/month までの投与量でがん原性を示すエビデンスは認められなかった。生殖能、胚・胎児発生及び生後発生に及ぼす影響の評価では、ギボシランの曝露に伴う直接的な影響は認められなかった。

以上のように、包括的な非臨床開発プログラムによりギボシランを評価し、ICH ガイダンス及び規制当局の助言に従い、ギボシランの薬効薬理、薬物動態及び毒性学的特性を明らかにした。これまでに実施した非臨床試験の結果は良好な安全性プロファイルを示し、AHP 患者の治療のために 2.5 mg/kg を月 1 回皮下注射する推奨レジメンでのギボシランの投与を担保する。

2.4.6 参考文献一覧

1. Kamm RC, Smith AG. Nucleic acid concentrations in normal human plasma. Clin Chem. 1972;18(6):519-22.
2. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. PLoS One. 2008;3(11):e3694.
3. Sehgal A, Chen Q, Gibbings D, Sah DWY, Bumcrot D. Tissue-specific gene silencing monitored in circulating RNA. RNA. 2014;20(2):143-9.
4. Salido-Guadarrama I, Romero-Cordoba S, Peralta-Zaragoza O, Hidalgo-Miranda A, Rodríguez-Dorantes M. MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. Onco Targets Ther. 2014;7:1327-38.
5. Revenfeld ALS, Bæk R, Nielsen MH, Stensballe A, Varming K, Jørgensen M. Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood. Clin Ther. 2014;36(6):830-46.
6. Taylor DD, Gercel-Taylor C. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. Front Genet. 2013;4:142.
7. Chan A, Liebow A, Yasuda M, Gan L, Racie T, Maier M, et al. Preclinical development of a subcutaneous *ALAS1* RNAi therapeutic for treatment of hepatic porphyrias using circulating RNA quantification. Mol Ther Nucleic Acids. 2015;4:e263.
8. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, et al. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. RNA. 2006;12(7):1197-205.
9. Schwartz AL, Rup D, Lodish HF. Difficulties in the quantification of asialoglycoprotein receptors on the rat hepatocyte. J Biol Chem. 1980;255(19):9033-6.
10. Baenziger JU, Fiete D. Galactose and N-acetylgalactosamine-specific endocytosis of glycopeptides by isolated rat hepatocytes. Cell. 1980;22(2 Pt 2):611-20.
11. Kimmel, C, Buelke-Sam J. Reproductive and developmental toxicology. In: Bingham E, Cohrssen B, Powell CH, editors. Patty's toxicology, 5th ed vol I. Wiley-Blackwell. 2001. p. 53-115.
12. Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. Toxicol Pathol. 2010;38(7 Suppl): 5S-81S.
13. Danielsson BR. Maternal toxicity. Chapter 24, In: Teratogenicity Testing, Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Barrow PC, editor. Springer; 2013. 947:p. 311-25.
14. Cappon GD, Fleeman TL, Chapin RE, Hurtt ME. Effects of feed restriction during organogenesis on embryo-fetal development in rabbit. Birth Defects Res (Part B). 2005;74(5):424-30.

15. Clark R, Robertson RT, Peter CP, Bland JA, Nolan TE, Oppenheimer L, et al. Association between adverse maternal and embryo-fetal effects in norfloxacin-treated and food-deprived rabbits. Fundam Appl Toxicol. 1986;7(2):272-86.

16. Matsuzawa T, Nakata M, Goto I, Tsushima M. Dietary deprivation induces fetal loss and abortion in rabbits. Toxicology. 1981;22(3):255-9.

17. Singal AK, Parker C, Bowden C, Thapar M, Liu L, McGuire BM. Liver transplantation in the management of porphyria. Hepatology. 2014;60(3):1082-9.

18. Yasuda M, Erwin AL, Liu LU, Balwani M, Chen B, Kadirvel S, et al. Liver transplantation for acute intermittent porphyria: biochemical and pathologic studies of the explanted liver. Mol Med. 2015;21:487-95.

19. Carito B, Harbison C, Janas M, Keirstead N, Jiang Y, Placke M. RNAi Therapeutics: ASGPR Tissue Expression Evaluation in Rat, Mouse, Non Human Primate and Human. American College of Veterinary Pathologists. 2016;New Orleans, LA, USA.

20. GTEx database [www.gtexportal.org/home/].