目次

2.6.1 緒言.....3

略号一覧

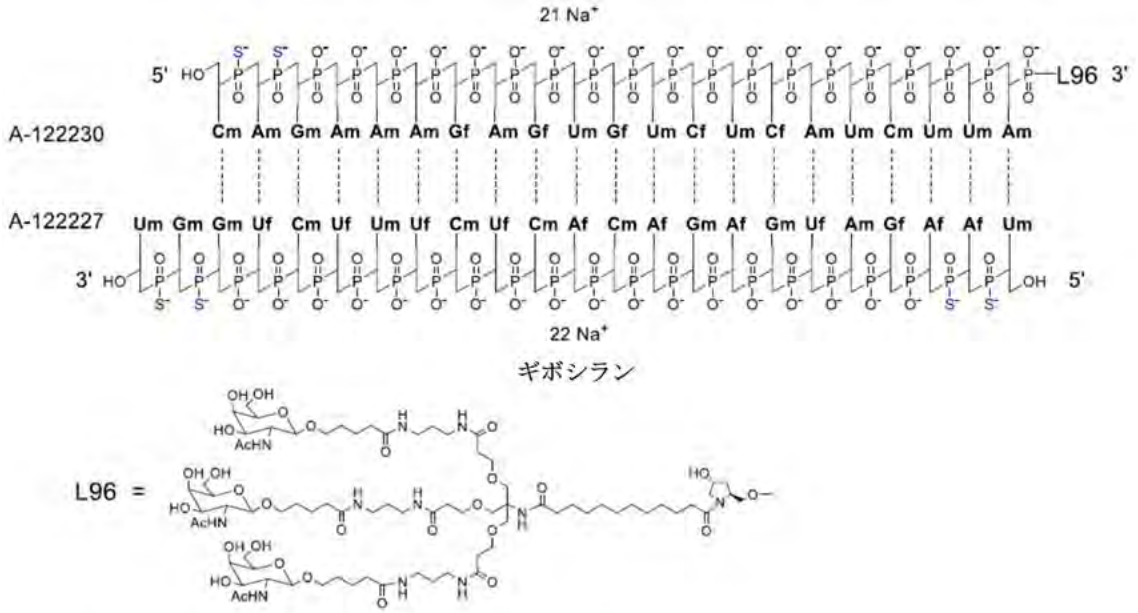
略号・用語	定義	
	英語	日本語
ADA	anti-drug antibodies	抗薬物抗体
ADME	absorption, distribution, metabolism and excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
AHP	acute hepatic porphyria	急性肝性ポルフィリン症
AIP	acute intermittent porphyria	急性間欠性ポルフィリン症
ALA	aminolevulinic acid	アミノレブリン酸
ALAS1	5'-aminolevulinate synthase 1	5'-アミノレブリン酸合成酵素 1
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
DDI	drug-drug interaction	薬物相互作用
GalNAc	*N*-acetylgalactosamine	*N*-アセチルガラクトサミン
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
Hep3B	human liver carcinoma cell line-3B	ヒト肝癌細胞株 3B
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
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
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
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
PBG	porphobilinogen	ポルフォビリノーゲン
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
siRNA	small interfering RNA	低分子干渉 RNA
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス

2.6.1 緒言

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。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の低分子干渉 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。ギボシラン製剤は、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）含有し、2.5 mg/kg の用量を月 1 回皮下投与する。

ギボシランは *ALAS1* を標的とする合成化学修飾二本鎖 siRNA で、3 分岐型 *N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）リガンドを結合することによって肝臓への siRNA 送達効率を高めている。ギボシランの構造を図 2.6.1-1 に示す。すべてのヌクレオチドが 2'-OMe 又は 2'-F で修飾され、3'-5 'ホスホジエステル結合により、当該オリゴヌクレオチドの糖-リン酸骨格を形成している。センス鎖（A-122230）及びアンチセンス鎖（A-122227）はそれぞれ 21 個及び 23 個のヌクレオチドを含む。センス鎖の 3' 末端にはホスホジエステル結合を介して 3 分岐型 GalNAc 部分（L96）が結合している。アンチセンス鎖（A-122227）は 3′末端及び 5′末端にそれぞれ 2 ヵ所ずつ、計 4 ヵ所のホスホロチオエート結合がある。センス鎖（A-122230）は 5′末端に 2 ヵ所のホスホロチオエート結合がある。センス鎖の 21 個のヌクレオチドはアンチセンス鎖の相補的な 21 個のヌクレオチドとハイブリダイズするため、21 個のヌクレオチド塩基対に加えてアンチセンス鎖の 3′末端に 2 塩基のオーバーハングが形成されている。

図 2.6.1-1 ギボシランの構造



ギボシラン

略語：Af＝アデニン 2'-F リボヌクレオシド；Cf＝シトシン 2'-F リボヌクレオシド；Uf＝ウラシル 2'-F リボヌクレオシド；Am＝アデニン 2'-OMe リボヌクレオシド；Cm＝シトシン 2'-OMe リボヌクレオシド；Gm＝グアニン 2'-OMe リボヌクレオシド；s＝ホスホロチオエート；Um＝ウラシル 2'-OMe リボヌクレオシド；L96＝3 分岐型 GalNAc（*N*-アセチルガラクトサミン）。

一連の非臨床の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で、ギボシランの薬効薬理、安全性薬理、薬物動態／吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）、並びに毒性を評価した。Givosiran（引用元の非臨床試験報告書及びこれまでの規制当局とのやりとりでは AD-60519、ALN-60519 又は ALN-AS1 とも記載されている）は、原薬有効成分に付けられた名称（国際一般的名称）である。動物実験で投与した薬物はギボシランのナトリウム塩の溶液で、遊離酸ではない。

ギボシランは siRNA の標的配列が保存されているげっ歯類、サル及びヒトで薬理活性を示す。ギボシランは、ウサギでは薬理活性を示さない。ヒト肝癌細胞株 3B（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 *ALAS1* mRNA 量はギボシランの用量に依存して抑制された。*In silico* 及び *in vitro* 非臨床試験では、*ALAS1* mRNA に対するギボシランの高い特異性が示され、オフターゲットの配列に関連した作用を有する可能性が低いことが示された。マウス、ラット及びカニクイザル（以下、「サル」）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、肝臓内で *ALAS1* mRNA は一貫して減少した。単回投与において肝臓内の *ALAS1* mRNA の減少は投与量に応じて持続し（1～4 週間）、循環 mRNA を測定するアッセイで測定された血清又は尿中で認められた *ALAS1* mRNA の減少の程度と相関した。投与量依存性の定常状態における *ALAS1* の減少も、反復投与レジメンで実証された。げっ歯類の急性間欠性ポルフィリン症（AIP）モデルを用いた試験では、ギボシラン投与による *ALAS1* mRNA 誘導の減少が、血清及び尿中の ALA 及びポルフォビリノーゲン（PBG）ヘム中間体の減少と密接に相関していることが確認されている。

GLP 適合の心血管系及び呼吸器系の安全性薬理試験がサルで実施され、神経学的評価はサルの 13 週間及び 39 週間反復投与 GLP 毒性試験で評価された。

ラット及びサルにおいて、ギボシランの非臨床薬物動態（PK）を 0.1～10 mg/kg の範囲で単回（静脈内及び皮下）及び反復（皮下）投与して評価した。雌雄のラット及びサルを用いて性差の可能性も評価した。トキシコキネティクス（TK）評価は、GLP 毒性試験に含めた。

ギボシランのたん白結合を、マウス、ラット、サル及びヒトの血清を用いて求めた。単回及び反復皮下投与後のギボシランの組織内分布を、マウス、ラット及びサルで評価した。放射能標識したギボシランをラットに皮下投与し、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）を実施した。

ギボシランの代謝安定及び代謝プロファイルを、*in vitro*（マウス、ラット、サル、及び／又はヒト血清及び肝 S9 画分）及び *in vivo*（ラット及びサルの血漿、肝臓、尿；ヒトの血漿及び尿）で評価した。代謝物の同定に液体クロマトグラフィー高分解能精密質量分析（LC/MS-HRAM）法を用いた。主代謝物は、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）法を用いて定量した。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（DDI）は、*in vitro* で評価した。ギボシラン及び代謝物の排泄比及び量をラット及びサルで評価した。

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、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 GLP 適合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。ラット及びサルの反復投与毒性試験で、抗薬物抗体（ADA、免疫グロブリン G／免疫グロブリン M［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、臨床で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。Tg-rasH2 マウスの 26 週間投与がん原性試験は終了している。また、ラットの 2 年間投与がん原性試験が現在実施中であり、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」に従い、試験終了後提出する予定である。

目次

2.6.2 薬理試験の概要文....4
2.6.2.1 まとめ....4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験....9
2.6.2.3 副次的薬理試験....21
2.6.2.4 安全性薬理試験....25
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験....26
2.6.2.6 考察及び結論....26
2.6.2.7 図表....27
2.6.2.8 参考文献一覧....27

略号一覧

略号・用語	定義	
	英語	日本語
ADP	aminolevulinic acid dehydratase deficiency porphyria	アミノレブリン酸脱水酵素欠損性ポルフィリン症
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
ANOVA	analysis of variance	分散分析
ASGPR	asialoglycoprotein receptor	アシアロ糖たん白質受容体
cERD	circulating extracellular RNA detection	循環細胞外 RNA 検出
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database	一塩基多型データベース
DDC	diethyldithiocarbamate	ジエチルジチオカルバミン酸
Dual-Luc	dual-luciferase	二重ルシフェラーゼ
GalNAc	*N*-acetylgalactosamine	*N*-アセチルガラクトサミン
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
HCP	hereditary coproporphyria	遺伝性コプロポルフィリン症
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
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
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information	米国立生物工学情報センター
PB	phenobarbital	フェノバルビタール
PBG	porphobilinogen	ポルフォビリノーゲン
PBGD	porphobilinogen deaminase	ポルフォビリノーゲン脱アミノ酵素

略号一覧（続き）

略号・用語	定義	
	英語	日本語
QTc	QT interval corrected for heart rate	心拍数で補正した QT 間隔
RISC	RNA-induced silencing complex	RNA 誘導サイレンシング複合体
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
SNP	single nucleotide polymorphism	一塩基多型
TPM	transcript per kilobase million	遺伝子長で補正しサンプルごとの総リード数で補正した転写物数
VP	variegate porphyria	異型（多様性）ポルフィリン症

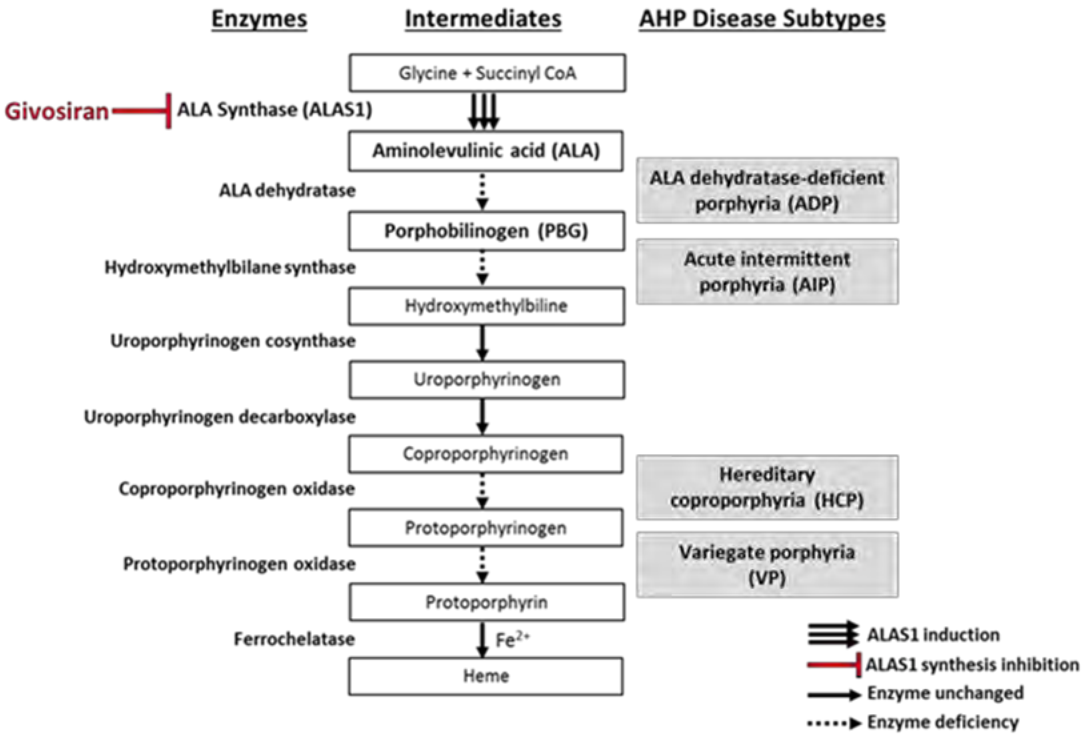
2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ギボシランナトリウム（以下「ギボシラン」と表記する。なお、本概要文に記載されている投与量と濃度はすべて、ギボシランナトリウム塩を示している。また、引用元の非臨床試験報告書ではAD-60519、ALN-60519、又はALN-AS1とも表記されている）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。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の低分子干渉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。

ポルフィリン症は、ヘム生合成に関与する8種類の酵素のいずれかの遺伝子変異を主な原因とする（図 2.6.2.1-1）、稀ではあるが重篤かつ生命を脅かす代謝疾患の一群であり、急性間欠性ポルフィリン症（AIP）、遺伝性コプロポルフィリン症（HCP）、異型（多様性）ポルフィリン症（VP）及びアミノレブリン酸脱水酵素欠損性ポルフィリン症（ADP）が含まれる[1]。ADP以外のすべてのタイプのAHPは、ヘム生合成経路の酵素の常染色体優性突然変異によるものである（ADPは常染色体劣性突然変異による）[2,3]。AHP患者では、ALAS1活性が誘発され、神経毒性物質のポルフィリン前駆体であるALA及びポルフォビリノーゲン（PBG）が蓄積し[4]、これにより急性の衰弱性内臓神経性発作並びに慢性の身体障害性症状が現れ、最も多くは疼痛を発症する[3]。げっ歯類の実験モデル及び臨床での観察所見で得られている非常に多くの証拠から、ALAが主な神経毒性物質であると考えられ、PBGもある程度関与している可能性がある[5]。AIP患者及びVP患者で肝移植後に発作が消失し、AIP患者からドミノ肝移植を受けた非AIP患者でポルフィリン症の発作発現がみられたという経験から、AHPの発症機序において肝臓が果たす重要な役割が示されている[4,6,7,8]。ギボシランは肝臓の*ALAS1*発現を大幅に減少させ、ヘム経路関連酵素の欠損によって生じる神経毒性物質であるALA及びPBGの蓄積を減少させることにより、重篤でしばしば生命を脅かすAHP発作を予防又は大幅に抑制するとともに発作時以外の消耗性症状を軽減する作用を有する。

図 2.6.2.1-1 急性肝性ポルフィリン症の原因となるヘム生合成経路及び酵素の欠損



ヘム生合成経路は 8 段階の酵素反応からなり、グリシンとスクシニル補酵素 A（スクシニル CoA）をヘムに変換する。アミノレブリン酸（ALA）脱水酵素欠損性ポルフィリン症（ADP）、急性間欠性ポルフィリン症（AIP）、遺伝性コプロポルフィリン症（HCP）及び異型（多様性）ポルフィリン症（VP）患者は、それぞれ、ALA 脱水酵素、ポルフォビリノーゲン（PBG）脱アミノ酵素、コプロポルフィリノーゲン酸化酵素及びプロトポルフィリノーゲン酸化酵素に変異を有している。肝臓でのヘム合成の律速段階は ALA 合成酵素（ALAS1）であり、最終産物であるヘムによってフィードバック抑制を受ける。*ALAS1* を直接誘導する要因（特定の薬物やホルモンなど）、又は *ALAS1* 抑制を低下させる要因（ヘムやグルコースの不足）があると肝臓中のヘム合成経路が促進され、神経毒性物質ヘム中間体である ALA 及び PBG が著しく蓄積し（AIP、HCP 及び VP では両方、ADP では ALA のみ）、急性の内臓神経系発作が発現する [9,10]。RNA 干渉治療薬ギボシランは *ALAS1* を標的とする。AHP 患者の肝臓で誘導される *ALAS1* mRNA 量を減少させ、ALA 及び PBG 量を減少させポルフィリン症発作を抑制する目的でギボシランを投与する [11]。

2.6.2.1.1 RNA 干渉（RNAi）のメカニズム

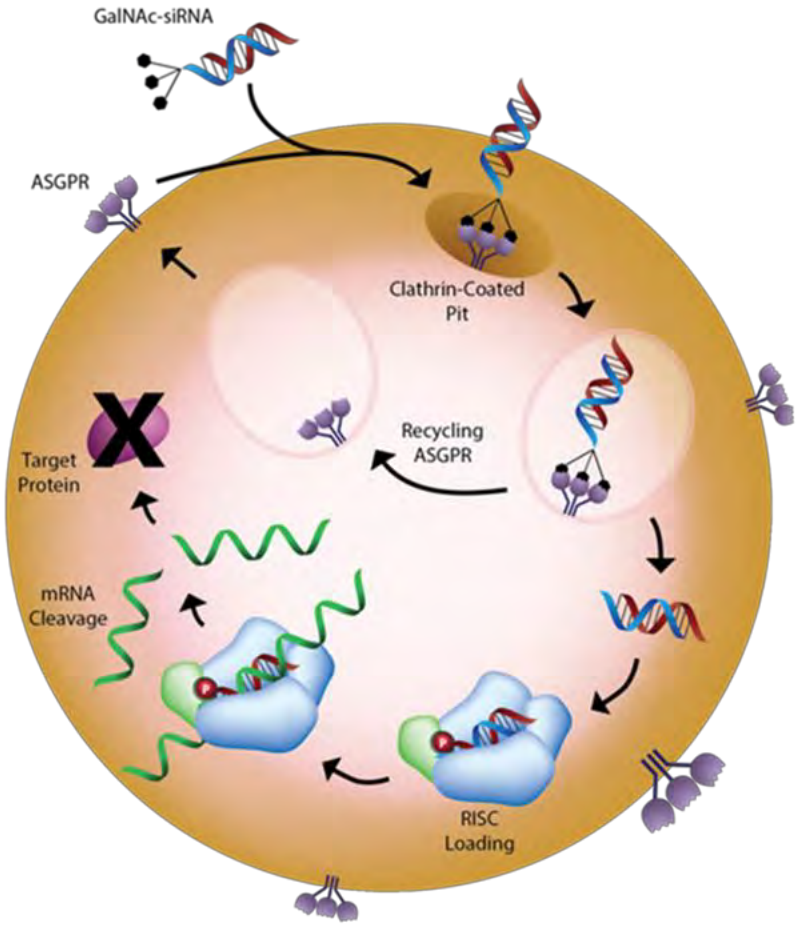
RNAi は、自然界に存在する mRNA 濃度調節のための細胞メカニズムであり、siRNA が関与する。通常、合成 siRNA は 19～25 塩基対の二本鎖オリゴヌクレオチドで、一方又は両方の 3'末端に 2～4 個のヌクレオチドのオーバーハングを有するスタッガード二重鎖構造を呈する [12]。この siRNA は、特定遺伝子の内因性 mRNA 転写物を標的として設計することが可能で、細胞に入ると、siRNA のガイド鎖（アンチセンス鎖）が RNA 誘導サイレンシング複合体（RISC）と呼ばれる酵素複合体に組み込まれる。続いてこの酵素複合体が相補的 mRNA 配列に結合すると、標的 mRNA が分解され、mRNA がコードする標的たん白質が減少する [13]。

未修飾の siRNA は急速に排除され、全身投与後に組織中へ大量に分布することはないため[14]、組織分布を向上させて目的細胞への siRNA 取り込みを促進するために様々な方法が現在使用されている。

ギボシランは、siRNA に糖鎖リガンドを結合することにより肝臓への送達を実現し、アシアロ糖たん白質受容体（ASGPR）を介して siRNA が直接肝細胞に特異的に取り込まれるように設計されている。ASGPR は C 型レクチン受容体の一つであり、末端にガラクトース残基又は *N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）残基を有する糖たん白質を認識し結合する[15]。肝細胞表面に高密度で（細胞 1 個に 50 万～100 万コピー）発現しており[16,17]、血液中の脱シアル化糖たん白質のクリアランスを促進する[18]。糖鎖リガンドが ASGPR に結合すると、受容体を介してリガンド-受容体複合体のエンドサイトーシスが起こり、エンドサイトーシス過程でカーゴであるリガンドを放出した後、受容体が細胞表面に戻って次の取り込みを行う。肝細胞での高発現、複数回の取り込みを仲介する能力及びリガンドの特異性に起因して、ASGPR は動物における肝臓を標的とした薬剤及び遺伝子送達に広く使用されてきた[19]。ASGPR を介した siRNA 送達メカニズムは、動物及びヒトにおいて標的たん白質を有意に減少させることに成功している。ギボシランは ASGPR の利点を活用しており、結合した GalNAc リガンドによってギボシランは皮下投与後に肝臓に特異的に送達され、肝臓内の *ALAS1* の発現を減少させる。

図 2.6.2.1-2 に、リガンド結合 siRNA による肝細胞への標的送達の概略図を示す。

図 2.6.2.1-2 リガンド結合 siRNA の送達メカニズム



略語：*ALAS1*＝5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；ASGPR＝アシアロ糖たん白質受容体；GalNAc＝N-アセチルガラクトサミン；mRNA＝メッセンジャーRNA；siRNA＝低分子干渉 RNA；RISC＝RNA 誘導サイレンシング複合体。

ギボシランは、肝細胞に標的送達され *ALAS1* の発現を特異的に抑制できるように開発された。ギボシランを肝細胞上の ASGPR に標的送達するため、センス鎖の 3'末端に 3 分岐型 GalNAc リガンドが結合している。受容体を介したエンドサイトーシスによって取り込まれた後、GalNAc-siRNA が複数サブユニットからなるたん白質複合体 RISC に組み込まれ、標的 mRNA 配列に導かれる。siRNA の二本鎖が分離し、RISC に残ったアンチセンス鎖の標的である相補的 mRNA 配列の部位特異的切断が生じ、mRNA は分解され、標的たん白質の発現は減少する。

出典：Cummings and McEver[20] から改変。

ギボシランは、siRNA の標的配列が保存されているげっ歯類、非ヒト霊長類（カニクイザル、以下、「サル」）及びヒトで薬理活性を示す。ギボシラン siRNA（原薬は ALN-60519 とも呼ばれる）の選択については、2.6.2.2.1.1 項を参照のこと。ヒト肝癌細胞株 3B（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。米国立生物工学情報センター（NCBI）一塩基多型データベース（dbSNP）の検索を行ったところ、2014 年 6 月 16 日の時点で配列が決定されているすべてのヒト *ALAS1* 遺伝子でギボシランの標的部位は 100%保存されていたことから、ギボシランは地理的及び民族的背景の異なるすべてのヒトで等しく有効であると考えられる。さらに、バイオインフォマティ

クス解析を実施してギボシランハイブリダイゼーションによるオフターゲット作用を示す可能性を検討したところ、ヒト肝癌細胞株 G2（HepG2）細胞へのトランスフェクションにおいてギボシランによるオンターゲットの *ALAS1* 減少と、最も近似する 6 種類の配列のいずれかの推定オフターゲットの減少との差は 100 倍超であり、*ALAS1* に対するギボシランの特異性が確認された。アンチセンス鎖の 3'末端で切断を受けたギボシラン siRNA である AS(N-1)3′は、トランスフェクションによりギボシランと同様の *ALAS1* mRNA 減少を示し、3'切断産物でも *in vivo* 活性は残存しており、ギボシランの薬理活性全般に寄与する可能性が示された。

マウス、ラット及びサル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、肝臓内で *ALAS1* mRNA は一貫して最大 80%減少した。ギボシランはウサギに対して交差反応を示さずウサギでの薬理作用が期待されないことが、ウサギを用いた生殖毒性試験で確認されている（[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）。非臨床 *in vivo* 薬理試験の概要については、2.6.2.2.2 項を参照のこと。ALAS1 はヘム生合成経路の最初の律速段階を仲介し、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（図 2.6.2.1-1）。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を評価するには肝生検を繰り返す必要がある。サルを用いた薬理試験ではエキソソーム（細胞から分泌される膜小胞）を血清と尿から分離し、低侵襲性のアプローチにより *ALAS1* mRNA 量を評価した。エキソソーム中の mRNA 量はこれまでに、肝細胞などのさまざまな細胞の mRNA 発現量を反映する可能性が認められている [21,22]。サルへの単回投与では、投与量に応じて肝臓内 *ALAS1* mRNA の減少が持続し（1～4 週間）、血清又は尿中で認められた *ALAS1* mRNA 減少の程度と相関した。反復投与試験では、投与量に依存した定常状態における *ALAS1* の減少も実証された。したがって、サルの試験では循環細胞外 RNA 検出（cERD）アッセイを用いて *ALAS1* mRNA 低下に対するギボシランの効果を評価した。さらに、リポジトリから入手したドナーが一致したヒトの尿及び血清に関する追加の cERD 分析で *ALAS1* 濃度の尿と血清の顕著な対応及び連続的な検体採取での患者間の低変動性が示され、*ALAS1* の変化を経時的に評価するこのアッセイの潜在的な有用性が強調された [8]。

げっ歯類の AIP モデルを用いた試験では、ギボシラン投与による *Alas1* mRNA 誘導の減少が、AHP 患者で毒性濃度まで増加し発作症状及び神経損傷を引き起こす ALA 及び PBG ヘム中間体の減少と密接に相関することが確認されている [1]。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、特に肝臓での ALA 及び PBG 産生の減少が臨床的利益をもたらす可能性が示唆されている [7,23]。

サルを用いて実施した GLP 適合の安全性薬理試験で、心血管系又は呼吸器系への機能的な影響は認められず、心血管系又は呼吸器系に対する無影響量は 150 mg/kg であった（2.6.2.4 項を参照）。サルの 13 週間及び 39 週間反復投与 GLP 毒性試験では、ギボシランに関連した神経行動学的影響は認められず、神経学的影響に対する無影響量はそれぞれ最高投与量である 150 mg/kg 及び 100 mg/kg であった。*In vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験では、医薬品規制調和国際会議（ICH）S2 (R1)が規定するギボシランの限界濃度／投与量まで試験した結果、すべて陰性であった（[2.6.6]項「毒性試験の概要文」を参照）。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 薬理試験

2.6.2.2.1.1 ギボシランの特定：*ALAS1* を標的とする強力かつ特異的な siRNA

（CTD: 4.2.1.1-1, [BIO14037]）

In silico バイオインフォマティクス解析、*in vitro* 及び *in vivo* 試験を組み合わせて、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（アクセッション番号 NM_000688.4 ; BIO14037 試験）及びサルのオルソログ mRNA 配列（アクセッション番号 XM_001090440.2）と完全に相補的で、マウス配列（アクセッション番号 NM_020559.2）及びラット配列（アクセッション番号 NM_024484.2）と完全又は部分的に相補的な 23 塩基のアンチセンス配列を設計した。転写物データセットは、2013 年 3 月 15 日にダウンロードした NCBI Refseq を利用した。末端塩基対の熱力学的性質を変更することによりアンチセンス鎖の優先的な RISC への組み込みを増加させる手段として、アンチセンス配列の 5'末端ヌクレオチド G 又は C のサブセットは、アンチセンス鎖の 5'末端ヌクレオチド U 及びセンス鎖の相補的 3'末端ヌクレオチド A に置換した[31]。サル及びヒトの *ALAS1* mRNA とアンチセンス鎖 2～23 位において完全に相補的なアンチセンス鎖、並びにマウス及び/又はラットの *Alas1* mRNA と 1～2 塩基のミスマッチを有するアンチセンス鎖を含む、36 種類の siRNA 配列を特定して合成した。これらのセンス鎖の 3'末端に 3 分岐型 GalNAc リガンドを結合した化学修飾 siRNA の *in vitro* 活性は、0.1 nmol/L 及び 10 nmol/L の siRNA を固定濃度で Hep3B 細胞に一過性トランスフェクションし、*ALAS1* mRNA 発現濃度の減少について評価した。固定濃度アッセイで *ALAS1* を約 65%抑制した活性の高い siRNA について、siRNA を一定範囲の濃度で Hep3B 細胞にトランスフェクションしてさらに解析し IC_{50} 値を求めた。最も強力な siRNA として AD-59129 を特定し、さらに 5 種類の構造類似体を合成して Hep3B 細胞にトランスフェクションして用量反応性を評価した。これらの構造類似体の中から AD-60095 を選択し、さらにセンス鎖の 10 位及び 12 位の修飾によってリード候補品を最適化した。この親二本鎖分子（AD-60489）は RISC 複合体内の標的 mRNA と物理的に結合しない 5'末端ヌクレオチド U[32] を除いてヒト及びサルの *ALAS1* と配列が一致しており、これらに対して薬理活性を示すと考えられる。59 種類の AD-60489 合成類似品を解析し、AD-60489 との比較のために、Hep3B 細胞における *ALAS1* mRNA 発現量の 0.1 nmol/L で約 60%及び 10 nmol/L で 80%の最低減少率に基づき、6 種類の候補を選択した（表 2.6.2.2-1）。IC_{50} 値が約 26 pmol/L で良好な *in vivo* データ（BIO14037 試験、[BIO14008] 試験、[BIO14009]試験及び[■■■■■■■■]試験）を示した ALN-60519（ギボシラン）を、リード開発候補として選択した。なお、“ギボシラン”と記載されている場合すべて、3 分岐型 GalNAc リガンドの結合した二本鎖 siRNA（ギボシラン原薬）を示している。

表 2.6.2.2-1 Hep3B 細胞における高活性 *ALAS1* siRNA の *in vitro* 有効性データ

	二本鎖 ID[a]	固定濃度（対照と比較した%残存率 [b]）		IC_{50} (nmol/L)
		0.1 nmol/L	10 nmol/L	
1	AD-60501	24.7	14.8	0.022
2	AD-60519	16	13.7	0.026
3	AD-60489	22.2	10.1	0.045
4	AD-60495	42.2	16.4	0.05
5	AD-60900	32	16.7	0.116
6	AD-60901	33.7	17.2	0.121
7	AD-60905	41.3	15.7	0.141

略語：*ALAS1*＝5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；Hep3B＝ヒト肝癌細胞株-3B；IC_{50}＝50%阻害濃度；ID＝識別番号：siRNA＝低分子干渉 RNA；RT-qPCR＝定量逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応。

a Hep3B 細胞で求めた IC_{50} 値の順に並べた。

b RT-qPCR で求めた mRNA 濃度。

出典：BIO14037 試験

2.6.2.2.1.2 ギボシラン標的部位の多型解析

（CTD: 4.2.1.1-2, [BIO14024]）

RNAi の活性が配列特異的であることを考えると、*ALAS1* を標的とする siRNA のアンチセンス鎖及びその標的 mRNA 配列との間に 1 塩基のミスマッチがあれば活性の低下又は喪失の可能性がある（BIO14024 試験）[24]。siRNA 標的部位の自然発生の一塩基多型（SNP）は活性に影響する可能性があり、SNP が特定の地理的又は民族的背景の個人に集中している場合は影響が大きい可能性がある。ギボシランは多様な地理的及び民族的背景の AHP 患者での使用を意図しているため、NCBI dbSNP（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/）ビルド 141（2014 年 5 月 21 日）の検索を行い、ギボシラン結合部位に生じる可能性のある SNP をすべて特定した。

その結果、これまでに配列が決定されているすべてのヒト *ALAS1* 遺伝子でギボシランの標的部位は 100%保存されていた（出典：NCBI dbSNP、2014 年 6 月 16 日時点の 1000 ゲノムプロジェクトデータを含む多様な民族起源の数千人から得た 2 億 6000 万超のヒト SNP データ）。*ALAS1* mRNA のギボシラン標的領域内に SNP や他の種類の多型はなく、ギボシランは地理的及び民族的背景の異なるすべてのヒトで等しく有効であると考えられる。

2.6.2.2.1.3 ギボシランの潜在的なアンチセンス鎖（A-122227）末端切断型代謝物の *in vitro* の *ALAS1* mRNA 減少活性

（CTD: 4.2.1.1-3, [BIO18001]）

ギボシランは細胞内ヌクレアーゼに曝露されると、部分分解して薬理活性が損なわれる可能性がある[25]。siRNA の内部配列を標的とするエンドヌクレアーゼによる切断は、siRNA の全体の配列が大きく変わる可能性があり、それにより活性が無効にされる可能性が示された[25]。一方、siRNA 鎖を 5′

又は 3′ 末端から順に分解するエクソヌクレアーゼによる分解は、RNAi 活性が一部残った部分切断体が生じる可能性がある[25]。ラット及びサルの肝臓における *in vivo* の代謝プロファイリング解析で、ギボシランの代謝物は AS(N-1)3'に限定されることが示されている（[2.6.4.5.2]項「ギボシランの代謝プロファイル」、[AS1-DSM18-010]試験及び[AS1-DSM18-009]試験を参照）。この AS(N-1)3'切断代謝物の Hep3B 細胞でのトランスフェクション評価では（BIO18001 試験）、*in vitro* の薬理活性は保持されており、残存量により *in vivo* の薬理活性に寄与する可能性が示された。

2.6.2.2.2 *In vivo* 薬理試験

2.6.2.2.2.1 マウス及びラット AIP 疾患モデルを用いた ALA 及び PBG 神経毒性ヘム中間体の減少

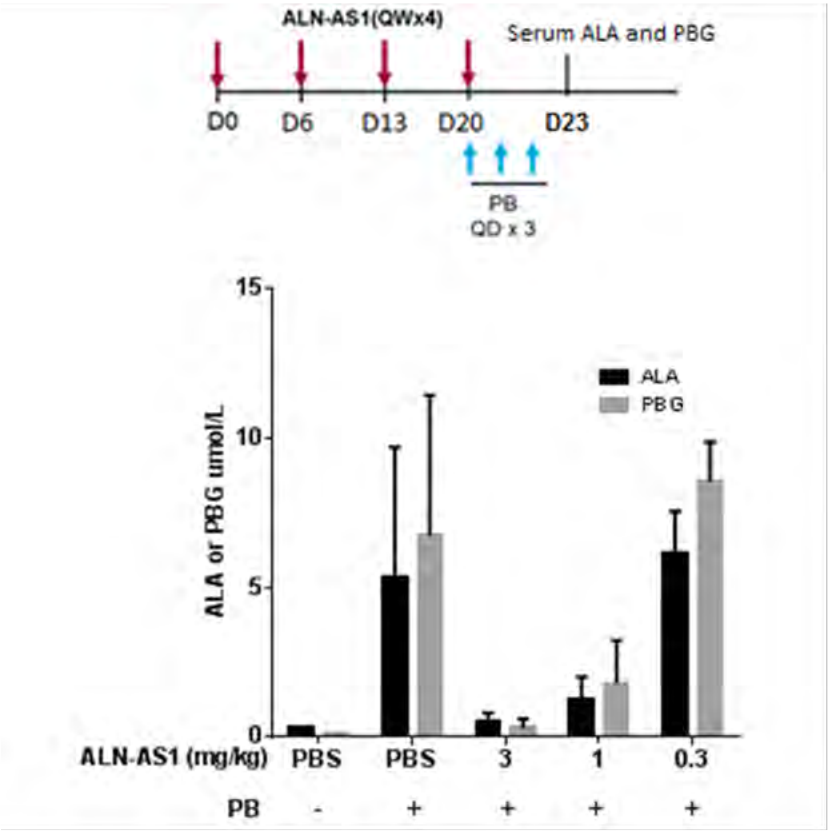
（CTD: 4.2.1.1-5, [BIO14012]、CTD: 4.2.1.1-4, [BIO14050]、CTD: 4.2.1.1-9, [BIO14010]、CTD: 4.2.1.1-10, [BIO14011]）

野生型げっ歯類又はサルでは尿又は血液中の ALA 及び PBG 量は増加しないことから、*ALAS1* mRNA の減少とこれらのヘム中間体の変化との相関を解析することは困難である。ポルフォビリノーゲン脱アミノ酵素（PBGD）が変異した複合ヘテロ接合体で、肝臓での PBGD 活性の減少（約 70%減少）など、ヒト AIP に類似した生化学的特徴を示すマウス AIP モデルが存在する[26]。これらのマウスをシトクロム P450（CYP）誘導薬フェノバルビタール（PB）で処理すると、*Alas1* mRNA が 3～5 倍、ALA 及び PBG が 50～200 倍誘導される。この PB 処理では、AIP 患者の急性発作と同時に起こる ALA 及び PBG 血漿濃度の増加が再現される。

ギボシランによる ALA 及び PBG 中間体の減少活性を評価するために、このマウスモデルでさまざまの投与パラダイムを検討した。予防投与の設定で 3 mg/kg のギボシランを週 1 回、4 週間投与すると、PB 投与で認められる血清中の ALA 及び PBG の増加がほぼ完全に妨げられた（図 2.6.2.2-1；BIO14012 試験）。一方、低投与量 1 mg/kg ではギボシランは ALA 及び PBG 濃度に中間的効果を示し、0.3 mg/kg では有意な効果が認められなかった。次に急性投与レジメンを用い、AIP マウスに PB と第 2 の CYP 誘導薬であるジエチルジチオカルバミン酸（DDC）を毎日腹腔内投与し、ALA 及び PBG の増加をさらに持続させた。その後、これらの動物にヘミン（Panhematin®：米国では AHP 患者に対する現在の標準治療薬）又はギボシランを投与した。20 mg/kg のギボシランを単回皮下投与すると、4 mg/kg で 1 日 1 回 2 日間のヘミン投与と比較して、ALA 及び PBG のより急速な低下が示された（図 2.6.2.2-2；BIO14050 試験）。同様の結果は、*Alas1* siRNA を脂質ナノ粒子で送達したマウス AIP モデルにおいてもみられた[4]。

これらの結果は、予防的に使用されるギボシランが発作中に発生する ALA 及び PBG の増加を妨げることができ、既存の発作中にギボシランを投与すると ALA 及び PBG が減少し、急性発作の標準治療薬 Panhematin®の標準的な投与量及び投与法で達成されるのより作用が速い可能性を示唆している。したがって、ギボシランの投与は、急性発作を被っている AHP 患者に既存薬より急速な症状改善をもたらす可能性がある。

図 2.6.2.2-1 マウス AIP モデルでのギボシラン反復皮下投与後の血清中 ALA 及び PBG 濃度

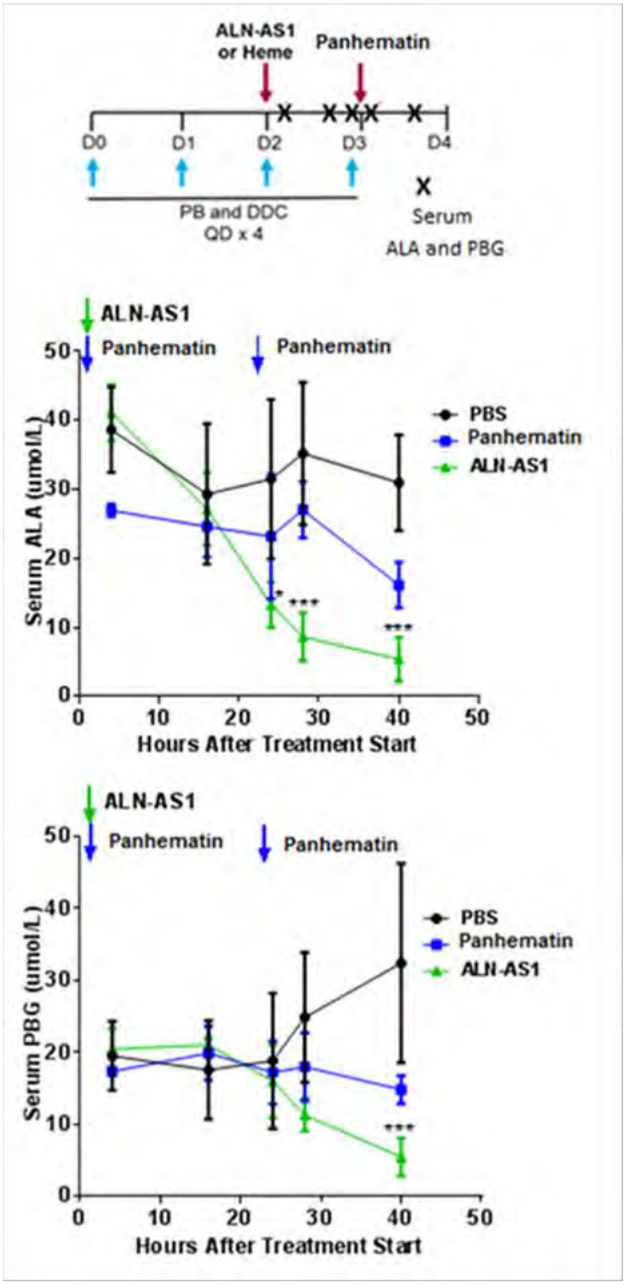


略語：AIP＝急性間欠性ポルフィリン症； ALA＝アミノレブリン酸；*Alas1*＝5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；ALN-AS1＝ギボシラン；D＝投与開始後日数；PB＝フェノバルビタール；PBG＝ポルフォビリノーゲン；*Pbgd*＝ポルフォビリノーゲン脱アミノ酵素；PBS＝リン酸緩衝生理食塩水；QD＝1 日 1 回；QW＝週 1 回。

Pbgd に遺伝的欠損がある AIP マウスに、予防的に 0.3、1 又は 3 mg/kg のギボシランを週 1 回 4 週間皮下投与した。血清中 ALA 又は PBG 濃度は、3 日間の PB 処理（投与開始 20、21 及び 22 日目）により *Alas1* を誘導した 24 時間後の投与開始 23 日目に測定した。棒グラフは 3 匹の動物の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。PBS のみのデータは、試験内に比較可能な他の動物群がないため、試験モデルの要素に含まれない。

出典：BIO14012 試験の Figure 1a 及び 1b を改変。

図 2.6.2.2-2 マウス AIP モデルでのギボシランのヘミンよりも速い血清中 ALA 及び PBG の減少作用



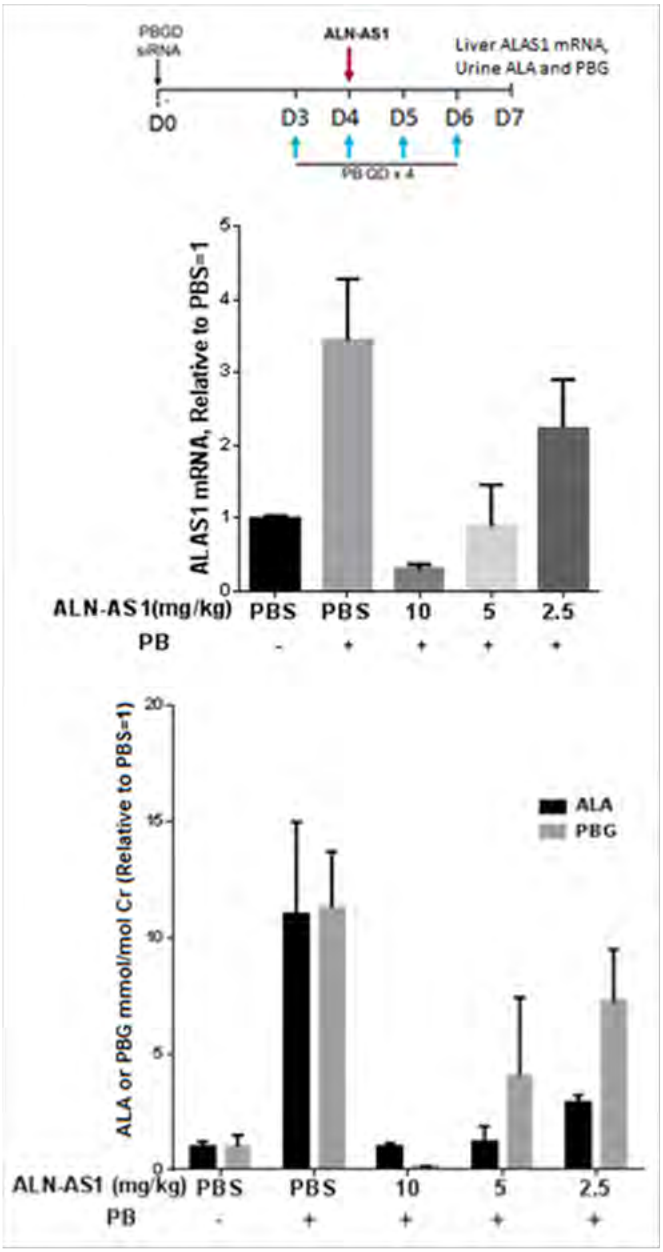
略語：AIP＝急性間欠性ポルフィリン症；ALA＝アミノレブリン酸；*Alas1*＝ 5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；ALN-AS1＝ギボシラン；D＝PB による誘導開始後日数；DDC＝ジエチルジチオカルバミン酸；PB＝フェノバルビタール；PBG＝ポルフォビリノーゲン；PBS＝リン酸緩衝生理食塩水；QD＝1 日 1 回。

AIP マウスに PB 及び DDC を腹腔内に 1 日 1 回 4 日間投与して *Alas1* を誘導し、その後 20 mg/kg のギボシランを単回皮下投与又は 4 mg/kg の Panhematin®を 2 日間連続して静脈内投与した。血清中の ALA 又は PBG 濃度は、ギボシラン又は Panhematin®投与後の 4、16、24、28 及び 40 時間に測定した。棒グラフは 2～5 匹の動物の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。PBS 群と比較して、ギボシラン投与後 24、28、40 時間の血清 ALA に対する効果及び 40 時間の血清 PBG 対する効果は、ANOVA 及び Tukey の各時点での事後検定で有意であった（*＝p＜0.05；***＝p＜0.001）。

出典：BIO14050 試験の Figures 1a 及び 1b を改変。

Alnylam 社で開発されたラット AIP モデルは、脂質ナノ粒子で製剤化した *Pbgd* 特異的な siRNA を静脈内投与すると、ラット肝臓内の *Pbgd* mRNA が約 80%減少する。マウス AIP モデルと同様に、*Pbgd* 欠乏ラットに PB を 1 日 1 回 3～4 日間投与すると、*Alas1* mRNA 並びに ALA 及び PBG 中間体の両方が顕著に誘導され、発作状態が再現された。肝臓の *Alas1* mRNA 濃度を測定し、尿中の ALA 及び PBG 濃度と比較した。単回投与試験では、PB による誘導期の 2 日目に 5 又は 10 mg/kg のギボシランを単回皮下投与すると、ラット肝臓における *Alas1* mRNA の誘導が妨げられた。さらに、10 mg/kg のギボシランを皮下投与では、ALA 及び PBG の産生がほぼ完全に抑制された（図 2.6.2.2-3 ; BIO14010 試験）。ラット AIP モデルでの反復投与試験で、3 mg/kg のギボシランを週 1 回 4 週間投与すると、肝臓での *Alas1* mRNA の PB 誘発性の増加が妨げられた（図 2.6.2.2-4 ; BIO14011 試験）。また、3 mg/kg のギボシランを週 1 回 4 週間投与すると、尿中 ALA 及び PBG の過剰産生が妨げられた。ラットモデルの両試験において、肝臓の *Alas1* mRNA 量は尿中の ALA 及び PBG 濃度と密接に相関していた。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（BIO14011 試験）。

図 2.6.2.2-3 ラット AIP モデルでのギボシラン単回皮下投与後の *Alas1* mRNA 量並びに尿中 ALA 及び PBG 濃度

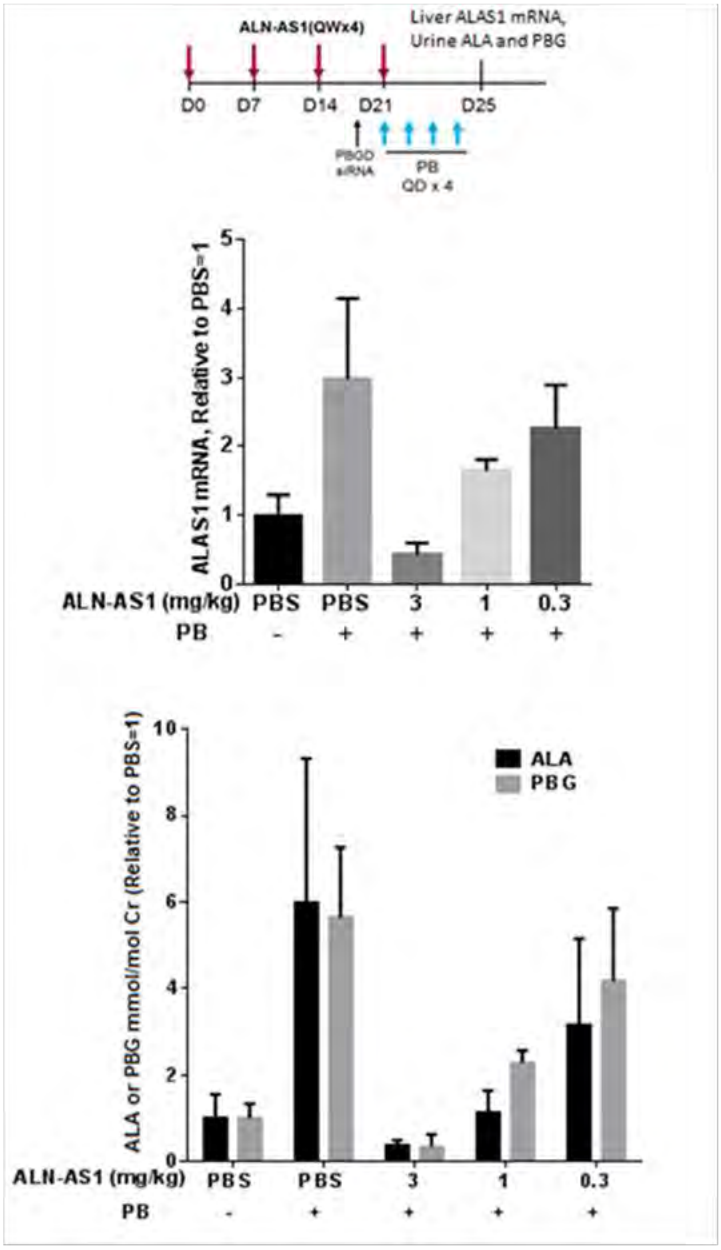


略語 : AIP＝急性間欠性ポルフィリン症 ; ALA＝アミノレブリン酸 ; *Alas1*＝5'-アミノレブリン酸合成酵素 1 ; ALN-AS1＝ギボシラン ; Cr＝クレアチニン ; D＝試験開始後日数 ; LNP＝脂質ナノ粒子 ; mRNA＝メッセンジャーRNA ; PB＝フェノバルビタール ; PBG＝ポルフォビリノーゲン ; PBGD＝ポルフォビリノーゲン脱アミノ酵素 ; PBS＝リン酸緩衝生理食塩水 ; QD＝1 日 1 回 ; siRNA＝低分子干渉 RNA。

肝臓の *Pbgd* 遺伝子発現を抑制する *Pbgd* 特異的な siRNA を LNP で製剤化し、試験開始 0 日目に投与してラットの AIP 実験モデルを作製した。試験開始 3、4、5 及び 6 日目の PB 処理によって発作状態を再現した。AIP ラットに、試験開始 4 日目に、2.5、5 又は 10 mg/kg のギボシランを単回皮下投与した。肝臓の *Alas1* mRNA 量及び尿中 ALA 又は PBG 濃度（ラット尿中の Cr で標準化）を試験開始 7 日目に測定した。棒グラフは 3 匹の動物の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

出典：BIO14010 試験の Figures 1a, 1b 及び 1c を改変。

図 2.6.2.2-4 ラット AIP モデルでのギボシラン反復皮下予防的投与後の *Alas1* mRNA 量並びに尿中 ALA 及び PBG 濃度



略語：AIP＝急性間欠性ポルフィリン症；ALA＝アミノレブリン酸；*Alas1*＝ 5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；ALN-AS1＝ギボシラン；D＝投与開始後日数；LNP＝脂質ナノ粒子；mRNA＝メッセンジャーRNA；PB＝フェノバルビタール；PBG ＝ポルフォビリノーゲン；PBGD＝ポルフォビリノーゲン脱アミノ酵素；PBS＝リン酸緩衝生理食塩水；QD＝1 日 1 回；QW＝週 1 回；siRNA＝低分子干渉 RNA。

ラットに予防的に 0.3、1 又は 3 mg/kg のギボシランを週 1 回 4 週間皮下投与した。肝臓の *Pbgd* 遺伝子発現を抑制する *Pbdg* 特異的な siRNA を LNP で製剤化し、ギボシラン投与開始後 18 日目に siRNA を静脈内投与してラットの AIP 実験モデルを作製した。その後 PB を 1 日 1 回 4 日間（投与開始後 21、22、23 及び 24 日目）処理することで発作状態を再現した。肝臓の *Alas1* mRNA 量は核酸サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイで測定した。尿中 ALA 又は PBG 濃度は、投与開始後 25 日目の PB 誘導期後に測定した。棒グラフは 3 匹の動物の平均値を表す、エラーバーは標準偏差を示す。

出典：BIO14011 試験の Figures 1a、1b 及び 1c を改変。

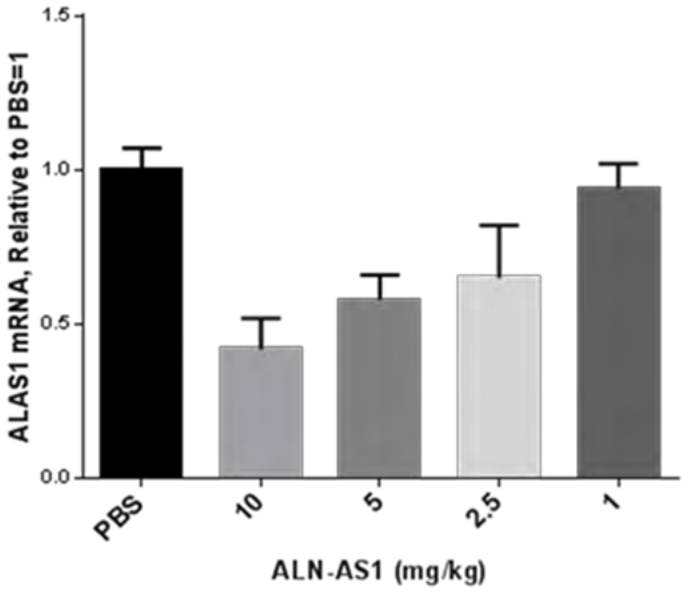
2.6.2.2.2.2 野生型ラットでのギボシランの単回及び反復投与による *Alas1* の減少

（CTD: 4.2.1.1-6, [BIO14008]、CTD: 4.2.1.1-7, [BIO14009]、CTD: 4.2.1.1-8, [BIO18002]）

ギボシランの *in vivo* での有効性を評価するため、野生型ラット（Sprague-Dawley 系）にギボシランを漸増投与量で皮下投与した（BIO14008 試験及び BIO14009 試験）。ギボシランの単回投与後の Sprague-Dawley 系ラットの肝臓の *Alas1* mRNA が投与量依存性に減少し（図 2.6.2.2-5）、10 mg/kg のギボシランで約 60%の減少が認められた（BIO14008 試験）。2.5 mg/kg 及び 5 mg/kg の投与では、肝臓の *Alas1* 量がそれぞれ 30%以上及び 40%以上減少した。

ラットの反復投与においても、投与量依存性の *Alas1* 標的 mRNA 減少が認められた（BIO14009 試験）。週 1 回 4 週間の反復皮下投与では、標的 RNA が単回投与よりも顕著に減少した。5 mg/kg の単回投与で *Alas1* mRNA が約 40%減少したのに対し、5 mg/kg の週 1 回 4 週間反復投与では 60%超減少した（図 2.6.2.2-5 及び図 2.6.2.2-6）。ラットを用いた別の試験で 2.5 mg/kg を週 1 回 8 週間又は 5 mg/kg の初回投与に続き 1 mg/kg を週 1 回 7 週間投与したところ、*Alas1* mRNA の発現抑制はそれぞれ最大 80%及び 70%であった（BIO18002 試験）。

図 2.6.2.2-5 野生型ラットでのギボシラン単回皮下投与による投与量依存性の肝臓の *Alas1* mRNA の減少

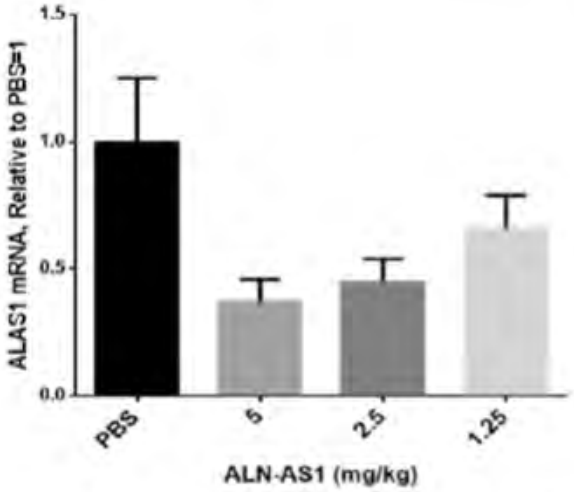


略語：*Alas1*＝5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；ALN-AS1＝ギボシラン；*Gapdh*＝グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素；mRNA＝メッセンジャーRNA；PBS＝リン酸緩衝生理食塩水。

野生型ラットにギボシランを単回皮下投与し、72 時間後に分岐 DNA アッセイで肝臓の *Alas1* mRNA 量を定量した。同一検体の *Gapdh* mRNA 発現量で標準化し *Alas1* の相対量を求めた。ギボシランによる *Alas1* 抑制の程度を求めるため、PBS を投与した対照群のラットと *Alas1* 相対量を比較した。棒グラフは 5 匹の動物の *Alas1* mRNA 平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

出典：BIO14008 試験。

図 2.6.2.2-6　野生型ラットでのギボシラン週1回反復皮下投与による投与量依存性の肝臓の *Alas1* mRNA 減少



略語：*Alas1*＝5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；ALN-AS1＝ギボシラン；*Gapdh*＝グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素；mRNA＝メッセンジャーRNA；PBS＝リン酸緩衝生理食塩水。

野生型ラットにギボシランを週1回4週間皮下投与して72時間後に分岐DNAアッセイで肝臓の *Alas1* mRNA量を定量した。同一検体の *Gapdh* mRNA発現量で標準化し *Alas1* の相対量を求めた。ギボシランによる *Alas1* 抑制の程度を求めるため、PBSを投与した対照群のラットと *Alas1* 相対量を比較した。棒グラフは5匹の動物の *Alas1* mRNA平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

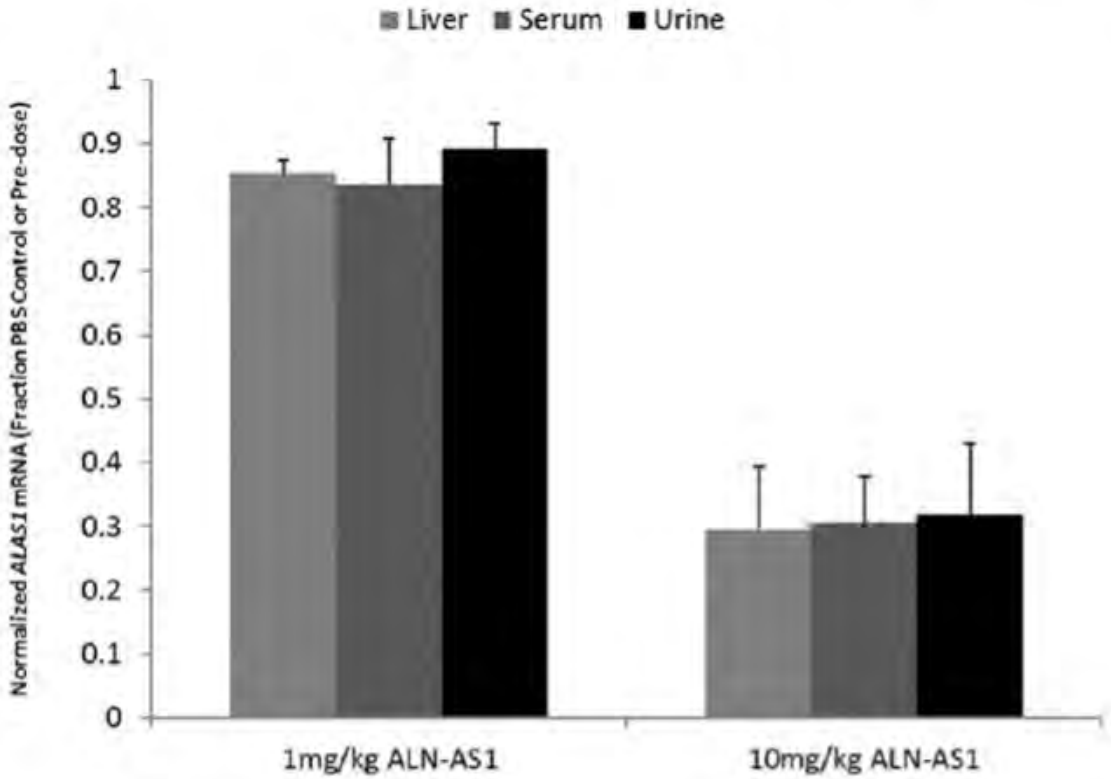
出典：BIO14009試験。

2.6.2.2.2.3　サルでのギボシランの単回及び反復投与による *ALAS1* 減少

（CTD: 4.2.1.1-11, [■■■■■]、CTD: 4.2.1.1-12, [BIO14003]）

ALAS1は血清中に分泌されるたん白質ではないため、肝生検を繰り返さないで薬理作用発現の時間的変化と肝臓の *ALAS1* mRNAの回復を評価することは難しい。一方、これまでにエキソソーム（細胞から分泌される膜小胞）中に検出されるmRNA量は、肝細胞などのさまざまな細胞のmRNA発現量を反映できることが示されている[21,22]。そこで、エキソソームRNAを血清及び尿から分離して *ALAS1* mRNA量を評価する、非臨床動物種を用いた低侵襲性のcERDアッセイを開発した[8,27]。サルの試験で *ALAS1* mRNA量を非侵襲的に評価するために、cERDアッセイを実施してサルの血液又は尿中の *ALAS1* mRNA検出能を評価し、肝生検で測定した *ALAS1* mRNA量と循環RNA量の相関性を検討した。ギボシラン投与後の同一時点で、cERDアッセイで測定した血清及び尿中 *ALAS1* mRNA濃度と肝細胞内 *ALAS1* mRNA量の間に良好な相関と一貫性が示された（図 2.6.2.2-7;■■■■■試験）[8]。したがって、サルの反復投与試験でギボシランの *ALAS1* mRNA減少効果の評価にcERDアッセイを使用した。このアッセイにより、サルの肝臓で *ALAS1* 減少の評価のために生検を繰り返すよりも侵襲性が低いことに加えて、いくつかデータ収集時点を追加して、ギボシラン投与後の *ALAS1* mRNA量の最下降点と回復をより明確にすることが可能になった。さらに、このcERDアッセイは、AIP患者及び健常人から採取したバイオレポジトリの血清及び尿検体中の *ALAS1* mRNA量の測定に採用され[8]、臨床試験におけるギボシランの薬効薬理を評価するための新たな低侵襲アプローチを提供した。

図 2.6.2.2-7 サルでのギボシラン単回皮下投与による投与量依存性の肝臓、血清及び尿中の *ALAS1* mRNA 減少



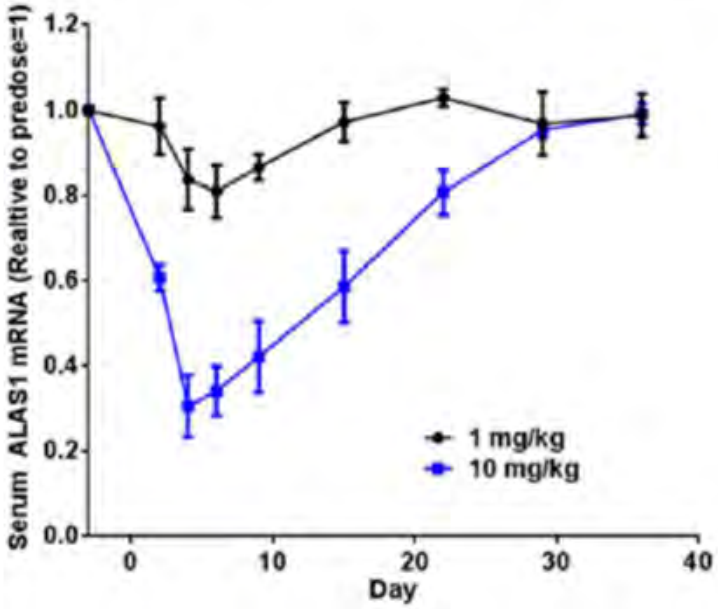
略語：*ALAS1*＝5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；ALN-AS1＝ギボシラン；mRNA＝メッセンジャーRNA；PBS＝リン酸緩衝生理食塩水；RT-qPCR＝定量逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応。

1 又は 10 mg/kg のギボシランを単回皮下投与し 4 日目の肝生検、血清又は尿中の *ALAS1* mRNA 量を測定した。採取した検体は、TaqMan RT-qPCR で *ALAS1* mRNA 量を測定した。グラフの各血清及び尿検体の値は、投与前値に対する *ALAS1* mRNA 測定値の割合を示し、又、グラフの各肝臓の値は、PBS 対照検体の値に対する割合を示した。棒グラフは 3 匹の動物の *ALAS1* mRNA 平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

出典：[redacted] 試験。

サルでは、1 又は 10 mg/kg のギボシランを単回皮下投与すると、cERD アッセイで評価した血清中の *ALAS1* mRNA 濃度が減少し、肝臓の mRNA 減少と一致した（[redacted] 試験）。10 mg/kg の皮下投与では、血清中 *ALAS1* mRNA 濃度が 4 日目に約 70%減少した（図 2.6.2.2-8）。血清中の *ALAS1* mRNA 濃度は、1 mg/kg 又は 10 mg/kg の単回皮下投与のそれぞれ約 1 又は 4 週間後にベースラインに回復した。

図 2.6.2.2-8　サルでのギボシラン単回皮下投与による血清中 *ALAS1* mRNA 減少活性の経日変化



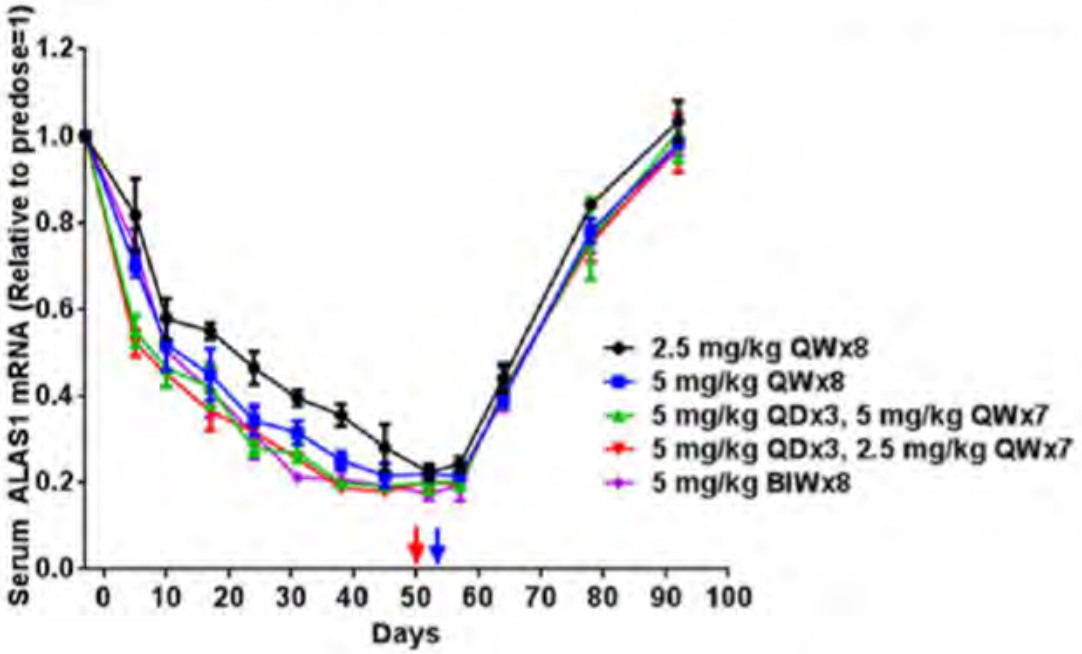
略語：*ALAS1*＝5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；cERD＝循環細胞外 RNA 検出；mRNA＝メッセンジャーRNA。

カニクイザルに 1 又は 10 mg/kg のギボシランを単回皮下投与（投与 1 日目）後、血清中の *ALAS1* mRNA 濃度は cERD アッセイにより定量し、投与前値（投与-3 日目）に対する割合を示した。*ALAS1* mRNA は投与 36 日目まで測定した。グラフの各値は、3 匹の動物検体の群平均値を投与前値と比較した残存する *ALAS1* mRNA の割合を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

出典：[redacted] 試験の Figure 3 を改変。

サルでは、いくつかの異なる反復投与レジメンを検討した。すなわち、第 1 週は 1 日 1 回投与を 5 回行い、その後の第 2～4 週は週 1 回投与するレジメン（合計 8 回投与）、又は第 2～4 週は週 2 回投与するレジメン（合計 11 回投与）の 2 種類の 4 週間投与試験を実施した（BIO14003 試験）。その結果、第 1 週に 5 mg/kg の 1 日 1 回皮下投与を 5 回行い、その後 5 mg/kg を週 1 回 3 週間投与すると、*ALAS1* mRNA 濃度は最下降点で約 75%減少した。すべての投与群で *ALAS1* mRNA 濃度は、4 週間の投与後約 30 日までにベースラインに戻った。また、別の投与レジメンで *ALAS1* の低下をさらに評価するため 8 週間投与試験を実施した（図 2.6.2.2-9；[redacted] 試験）。この試験では、投与第 1 週は 1 日 1 回投与を 3 回、第 2～8 週は週 1 回投与を 7 回行う投与群、第 1～8 週のすべてで 2.5 又は 5 mg/kg を週 1 回投与する群、並びに第 1～8 週のすべてで 5 mg/kg を週 2 回投与する群の 3 種類の投与レジメンを設定した。5～8 週間のギボシラン投与により、すべての投与群で最大 80%の *ALAS1* mRNA の減少を示した。投与第 1 週に 1 日 1 回投与を 3 回行った群は、週 1 回 8 週間投与した群よりも早い *ALAS1* mRNA 減少の発現を示した。すべての動物は、最終投与後 35～45 日でベースラインの *ALAS1* に戻った。以上、サルでのギボシランの反復投与は、*ALAS1* mRNA の強力かつ投与量依存性の持続的な減少をもたらした。

図 2.6.2.2-9　サルでのギボシラン 8 週間投与による血清中 *ALAS1* mRNA 減少活性の経日変化



略語：*ALAS1*＝5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；BIW＝週 2 回；cERD＝循環細胞外 RNA 検出；mRNA＝メッセンジャーRNA； QD＝1 日 1 回；QW＝週 1 回。

サルにギボシランを反復投与し、血清中の *ALAS1* mRNA 濃度を cERD アッセイで定量し、投与前値（-3 日目）に対する割合を求めた。動物にギボシランを 2.5 若しくは 5 mg/kg を週 1 回 8 週間投与、又は第 1 週に 1 日 1 回 5 mg/kg を 3 回投与し続いて 2～8 週に 2.5 又は 5 mg/kg を週 1 回投与した。さらに、ギボシランの 5 mg/kg を週 2 回 8 週間投与する群を設定した。最終投与は週 1 回投与群では投与 50 日目（赤矢印）又は週 2 回 8 週間投与群では投与 53 日目（青矢印）に行い、すべての投与群で測定値が投与前値に戻った投与 92 日目（週 1 回投与群）又は投与 95 日目（週 2 回投与群）まで *ALAS1* mRNA 濃度を測定した。グラフの各値は、3 匹の動物検体の群平均値を投与前値と比較した残存する *ALAS1* mRNA の割合を表し、エラーバーは標準偏差を示す。

出典：[redacted] 試験の Figure 3 を改変。

2.6.2.3　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　ギボシランのオフターゲット活性の解析

（CTD: 4.2.1.2-1, [BIO14038]、CTD: 4.2.1.2-2, [BIO20002]）

シード領域の 1 塩基ミスマッチ及びアンチセンス鎖の切断部位によっては、siRNA 活性が失活する可能性がある[28]。これを踏まえて、オフターゲット活性を防ぐため、ヒトゲノム内の他の既知又は予想される転写物すべてに対して 2 つ以上のミスマッチを有するようにギボシランを設計した。ここでオフターゲット活性とは、*ALAS1* 遺伝子から発現される以外の mRNA が RNAi によって減少することと定義される。使用した選択パラダイムは、siDirect 2.0[33] に詳述されているルールと一致している。siDirect 2.0 Web アプリケーションは、強力かつ特異的な siRNA を設計することが可能なソフトウェアパッケージであり、2 塩基以上のミスマッチのあるオフターゲット転写物を検索する機能も含有している。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 3'末端への 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[29]。この設計によりギボシランがオフターゲット活性を示す可能性は低くなるが、ギボシランのアンチセンス鎖に最も近似する配列を含むヒト mRNA 転写物が意図しないオフターゲット活性を示す可能性が高いと考えられる。潜在的オフターゲットマッチングを識別するために、Python スクリプト「BruteForce.py」で独自のブルートフォース（総当たり）アルゴリズムを開発し、成熟 mRNA 上の可能な限りの開始位置と siRNA 鎖の間の不適正塩基対の数及び位置を系統的に定量化した。NCBI が提供する RefSeq をリファレンスヒトトランスクリプトームとして使用し、検索領域にコード配列、非コード配列及びミトコンドリア配列のすべてを含めた。ブルートフォースアルゴリズムスコアは、配列の関係するシード領域の不適正塩基対に他領域より優先度の重みを与えることで siRNA の特異性をスコア化し順位付けした。シード領域（■～■位）の不適正塩基対の相対的な重みは■、mRNA の切断部位の対立領域（■～■位）では■、残りの■～■位は■とした。■位のヌクレオチドは、RISC 複合体内で mRNA と塩基対を形成しないため、配列に含まれない[30]。オフターゲットスコアは、ミスマッチの位置により重み付けしたスコアを合計した。「BruteForce.py」アルゴリズムで採用した不適合塩基対の重み付け及びシード領域の不適合塩基対の不均衡な重み付けは、文献[34]で報告されている値及び Alnylam 社で生成した大量の未公開データと合致している。合計したスコアに従って、潜在的オフターゲット活性に特異性のカテゴリーを割り当てた。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。特異性スコアが■～■のオフターゲット転写物でギボシランに対する反応を実験的に評価した。スコアが■を超える転写物にはミスマッチが多数含まれるため、■を超える特異性スコアの転写物のアッセイは行わなかった。ギボシランによる mRNA 減少の最初の *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実施した。Python スクリプト「BruteForce.py」による網羅的アルゴリズムを用いたヒトトランスクリプトーム（ヒト NCBI RefSeq セット内の NM_及び XM_データセットと定義される）に対する包括的検索を実施し、ギボシランのアンチセンス鎖の■～■位の部分配列を含む■の特異性を予測した。（BIO14038 試験）。

Alnylam 社で開発した「BruteForce」検索ツールによる最新の検索は、ヒト Refseq データセット（ver.74）の NM_、XM_及び NR_登録データを使用して 2019 年 8 月 28 日に実施された。検索により、オフターゲット活性を示す可能性が最も高い 6 種類の転写物を特定した（アクセッション番号 NM_012365.1、NM_005513.2、NR_045861.1、NM_152381.5、NM_014892.3 及び NR_045128.1）。これらはアンチセンス鎖による意図しない mRNA 抑制を受ける可能性が最も高いと予測された。ギボシランのアンチセンス鎖と相同性を示すこれら 6 種類の転写物を潜在的オフターゲット遺伝子減少の候補とみなし、*in vitro* でさらに評価した（表 2.6.2.3-1）。

表 2.6.2.3-1 ギボシランの潜在的オフターゲット遺伝子減少の候補

アクセッション番号	遺伝子	ミスマッチの位置 [a]
NM_000688.4	*ALAS1*	N/A
NM_012365.1	*OR2A5* olfactory receptor family 2 subfamily A member 5	16, 17, 19
NM_005513.2	*GTF2E1* general transcription factor IIE subunit 1	13, 16, 19
NR_045861.1	*ARMCX4* armadillo repeat containing X-linked 4	11, 12, 19
NM_152381.5	*XIRP2* xin actin binding repeat containing 2	11, 14, 15
NM_014892.3	Homo sapiens SR-related CTD associated factor 8 (*SCAF8*), transcript variant 4	10, 11, 15
NR_045128.1	*TXLNG2P* taxilin gamma pseudogene, Y-linked	9, 17

略語：*ALAS1*＝5'-アミノレブリン酸合成酵素 1；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'方向に番号付けした。すなわち、「1」位は、ギボシランのアンチセンス鎖の最も 5'側のヌクレオチドに相補的な塩基に対応する。

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作用を評価するため、HepG2 細胞を用いた定量逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）によって内因性に発現する転写物応答を評価した（BIO14038 試験）。予想したとおり、ギボシランのトランスフェクションによって HepG2 細胞での *ALAS1* mRNA 発現は濃度依存的に減少し、IC_{50} は約 88 pmol/L であった。これに対し、ギボシランをトランスフェクションした HepG2 細胞では、潜在的オフターゲット転写物はいずれも濃度依存性の明らかな mRNA 減少を生じさせず、潜在的オフターゲット遺伝子のいずれに対しても IC_{50} 値を得ることができなかった。これらの結果から、ギボシランによる *ALAS1* のオンターゲットの減少といずれかの推定オフターゲット転写物のオフターゲット減少との差は 113 倍超であり、*ALAS1* に対するギボシランの特異性が確認された。

mRNA の認識はアンチセンス鎖のシード領域によって導かれ、アンチセンス鎖 3'末端のヌクレオチドは siRNA の特異性に寄与しないため、ギボシランの代謝物 AS(N-1)3′がオフターゲット作用を示す可能性はギボシランと同等と考えられる。AS(N-1)3'は 23 位のヌクレオチドの欠失によって生成されるため、その mRNA 認識特性は完全長のギボシランと同等である。

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及び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、配列相同性及び GTEx データベース（https://gtexportal.org/home/）におけるヒト肝臓での 1.5 TPM 以上の発現量に基づき、第 2 のバイオインフォマティクス解析を行い、A-122230（ギボシランのセンス鎖）によってオフターゲット作用を示す可能性のある 11 種類の転写物及び A-122227（ギボシランのアンチセンス鎖）によってオフターゲット作用を示す可能性のある 8 種類の転写物を特定した。1.5 TPM の閾値は、1 TPM が細胞あたり約 1 コピーの完全長転写物を産生することを示す文献 [35] に基づいて確立された。2 遺伝子が *in silico* 解析基準に適合したが、ヒト肝臓で 1.5 TPM 未満の発現であるため、さらに *in vitro* での評価は実施しなかった。推定されたオ

フターゲット遺伝子すべてが、ギボシランのセンス又はアンチセンス鎖と複数のミスマッチを有していた。*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、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二重ルシフェラーゼ（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 種類の遺伝子で、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} 値は大幅に高かった（*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よって、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。

表 2.6.2.3-2 *RNF216*、*BZW1* 及び *ABCC5* の発現

遺伝子	ヒト肝臓での発現（TPM）[a]	発現の高い組織
RNF216	5.779	ほとんどの組織で発現しており、精巣、子宮、動脈、脾臓及び消化管で発現が高い
BZW1	19.11	ほとんどの組織で発現しており、脂肪、血管、精巣及び消化管で発現が高い
ABCC5	2.659	ほとんどの組織で発現しており、筋肉、脳及び消化管で発現が高い

略語：TPM＝遺伝子長で補正しサンプルごとの総リード数で補正した転写物数；GTEx＝Genotype-Tissue Expression。

a GTEx データベース及び Web ポータル。

出典：BIO20002 試験。

BZW1、*ABCC5* 及び *RNF216* は、そのミスマッチの数及び位置により、生物学的意義のあるオフターゲット作用を受ける可能性は低下する。*RNF216* 及び *ABCC5* の肝臓での発現量は低く（2 TPM は細胞あたり約 1 個の転写物に相当する；表 2.6.2.3-2）、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。ギボシランは肝臓特異的な ASGPR によって細胞内に速やかに取り込まれるため、肝臓以外の曝露は非常に少ない[36,37]。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。以上、全体的なデータから、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。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 サ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

（CTD: 4.2.1.3-1, [AS1-NCD14-019]）

覚醒サルでのテレメトリー法を用いた GLP 適合の心血管系及び呼吸器系の安全性薬理試験を実施した（AS1-NCD14-019 試験及び[表 2.6.3.4]を参照）。クロスオーバー試験デザインを用いて、溶媒対照（滅菌生理食塩液）及び（2 週間のウォッシュアウト期間後）150 mg/kg のギボシランを投与液量 0.75 mL/kg で、サル（n＝5；雄）に単回皮下投与した。心血管機能に対するギボシランに関連した影響の可能性について、呼吸機能測定（1 回換気量、呼吸数及び分時排出量）、動脈血圧（収縮期、拡張期、脈拍及び平均動脈圧）、心拍数、定量的心電図間隔（PR、QRS、QT 及び心拍数で補正した QT 間隔［QTc］）及び体温により評価した。心電図波形の定性的評価は、投与前にそれぞれ 2 回（少なくとも 30 分間隔）及び投与後それぞれ 1、2、4、8、12、18、24、48 及び 72 時間に獣医循環器認定医によって実施された。ギボシランのバイオアナリシス用の血液検体は、初回投与（0 mg/kg）では投与後 6 及び 24 時間、2 番目の投与（150 mg/kg）では投与前及び投与後 6、24、48 及び 72 時間に採取した。

サルに 150 mg/kg を投与した場合、投与 8 日目に採取した血漿検体の解析により、ギボシランへの曝露が確認された。ギボシランの濃度は投与後 6 時間で 6.2～19.1 µg/mL の範囲で、これは 150 mg/kg の単回投与後の他のトキシコキネティックデータと一致していた。

さらに、一般状態観察、体重、摂餌量及び体温によりサルの全般的な健康状態を評価した。

150 mg/kg のギボシランの単回皮下投与による死亡又は一般的状態の変化は試験中認められなかった。150 mg/kg のギボシランの投与を受けた動物の収縮期、拡張期、脈拍及び平均動脈圧、心拍数、心電図間隔 PR、QRS、QT 及び QTc、体温、又は呼吸機能に、ギボシランに関連した影響は認められなかった。定性的な心電図の異常は認められなかった。したがって、ギボシランの心血管及び呼吸機能への影響に対する無影響量は 150 mg/kg 以上であった。

さらに、サルでの 13 週間（[AS1 NCD14-011]試験；[表 2.6.7.7-4]を参照）及び 39 週間（[AS1-GLP15-018]試験；[表 2.6.7.7-5]を参照）の GLP 適合反復投与毒性試験の一環として、神経学的評価を実施した（[2.6.6]項「毒性試験の概要文」を参照）。ギボシランの 13 週間及び 39 週間の GLP 適合反復投与毒物試験では、両試験それぞれの最高投与量 150 mg/kg/week 及び 100 mg/kg/week まで神経学的変化は認められなかった。したがって、ギボシランの神経学的機能的影響に対する無影響量は 150 mg/kg 以上であった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用を評価する試験は実施していない。サルを用いて、ギボシランへの曝露による CYP アイソザイムとトランスポーターが関与する薬物相互作用の可能性を試験するために、*in vivo* で 2 試験を実施した（[2.6.4.7]項「薬物動態学的薬物相互作用」を参照）。CYP 基質カクテル（シンバスタチン［CYP3A4］、カフェイン［CYP1A2］、デキストロメトルファン［CYP2D6］及びクロルゾキサゾン［CYP2E］）を投与した雄ザルにギボシランを皮下投与すると、循環血清中の *ALAS1* の最大約 65%の減少が認められた（[AS1-NCD14-014]試験）。同様に、CYP3A4 基質ミダゾラム及びシンバスタチンを投与したサルにギボシランを皮下投与する 2 番目の試験で、循環血清中の *ALAS1* の最大 80%の減少が認められた（[AS1-DSM17-003]試験；[表 2.6.5.15C]を参照）。以上、データを総合すると、CYP3A4、CYP1A2、CYP2D6 及び CYP2E 基質の存在下においてギボシランの強力な薬理活性ポテンシャルが示された。

2.6.2.6 考察及び結論

AHP は、ヘム生合成に関与する 8 種類の酵素のいずれかの遺伝子変異を主な原因とする、稀ではあるが重篤かつ生命を脅かす代謝疾患の一群であり、AIP、HCP、VP 及び ADP が含まれる [1]。AHP 患者では、急性衰弱性内臓神経発作を発症する神経毒性のポルフィリン前駆体である ALA 及び PBG が蓄積する。

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 患者の肝臓で誘導される *ALAS1* 量の低下及び部分的な PBGD 欠乏によって生じる ALA 及び PBG の蓄積の減少を目的としている。げっ歯類の AIP モデルでの非臨床薬理試験は、ギボシランが肝臓で誘導される *Alas1* 発現量を正常範囲に特異的かつ強力に減少させ、AIP の疾患関連症状の原因であると考えられる 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。これらのデータは、慢性高排泄者（ALA 及び PBG の安定上昇に関連する遺伝子異常を有する）及び AIP 患者の臨床試験によって裏付けられており（[2.5]項「臨床に関する総括評価」を参照）、AHP の治療に対するギボシランの開発を担保する。

ギボシランは皮下投与により複数の動物種を用いた複数の試験で一貫して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、肝臓の *ALAS1* mRNA の減少は投与量に応じて持続的（1～4 週間）であり、循環 mRNA を測定するアッセイ（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。投与量依存性の定常状態における *ALAS1* の減少も、さまざまな反

復投与レジメンによって実証された。げっ歯類の AIP モデル試験では、ギボシラン投与による *Alas1* mRNA 誘導の減少は、ALA 及び PBG ヘム中間体の減少と密接に相関することが確認された。サルの安全性薬理試験では、ギボシランが心血管系、呼吸器系及び神経系にオフターゲット作用を及ぼさないことが示された。要約すると、非臨床薬理試験では、ギボシランの投与が、*ALAS1* mRNA、並びに AHP の神経毒性発現の基盤となるたん白質である ALA 及び PBG の投与量依存的な減少をもたらすことが示された。

2.6.2.7 図表

図表はいずれも本文中に示した。

2.6.2.8 参考文献一覧

1. Anderson KE, Bloomer JR, Bonkovsky HL, Kushner JP, Pierach CA, Pimstone NR, et al. Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias. Ann Intern Med. 2005;142(6):439-50.
2. Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrias. Lancet. 2010;375(9718):924-37.
3. Bonkovsky HL, Maddukuri VC, Yazici C, Anderson KE, Bissell DM, Bloomer JR, et al. Acute porphyrias in the USA: features of 108 subjects from porphyria consortium. Am J Med. 2014;127(12):1233-41.
4. Yasuda M, Gan L, Chen B, Kadirvel S, Yu C, Phillips JD, et al. RNAi-mediated silencing of hepatic *Alas1* effectively prevents and treats the induced acute attacks in acute intermittent porphyria mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(21):7777-82.
5. Bissell DM, Wang B. Acute hepatic porphyria. J Clin Transl Hepatol. 2015;3(1):17-26.
6. Balwani M, Desnick RJ. The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. Blood. 2012;120(23):4496-504.
7. 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.
8. 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.
9. Sassa S. Modern diagnosis and management of the porphyrias. Br J Haematol. 2006;135(3):281-92.
10. Shah MA, Remoroza R, Aziz K. Acute intermittent porphyria. Hospital Physician. 2002(February):67-71.
11. James MF, Hift RJ. Porphyrias. Br J Anaesth. 2000;85(1):143-53.

12. Vaishnaw AK, Gollob J, Gamba-Vitalo C, Hutabarat R, Sah D, Meyers R, et al. A status report on RNAi therapeutics. Silence. 2010;1(1):14.

13. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes D. 2001;15(2):188-200.

14. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. Nature. 2004;432(7014):173-8.

15. Ashwell G, Morell AG. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1974;41:99-128.

16. Baenziger JU, Fiete D. Galactose and N-acetylgalactosamine-specific endocytosis of glycopeptides by isolated rat hepatocytes. Cell. 1980;22(2 Pt 2):611-20.

17. 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.

18. Geffen I, Spiess M. Asialoglycoprotein receptor. Int Rev Cytol. 1992;137B:181-219.

19. Wu J, Nantz MH, Zern MA. Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications. Front Biosci. 2002;7:d717-25.

20. Cummings RD, McEver RP. C-type lectins. Essentials of Glycobiology. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2008.

21. Kamm RC, Smith AG. Nucleic acid concentrations in normal human plasma. Clin Chem. 1972;18(6):519-22.

22. 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.

23. 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.

24. Du Q, Thonberg H, Wang J, Wahlestedt C, Liang Z. A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. Nucleic Acids Res. 2005;33(5):1671-7.

25. Bartlett DW, Davis ME. Effect of siRNA nuclease stability on the in vitro and in vivo kinetics of siRNA-mediated gene silencing. Biotechnol Bioeng. 2007;97(4):909-21.

26. Lindberg RL, Porcher C, Grandchamp B, Ledermann B, Bürki K, Brandner S, et al. Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. Nat Genet. 1996;12(2):195-9.

27. Sehgal A, Chen Q, Gibbings D, Sah DWY, Bumcrot D. Tissue-specific gene silencing monitored in circulating RNA. RNA. 2014;20(2):143-9.

28. Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, et al. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. RNA. 2006;12(7):1179-87.

29. 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.

30. Wee LM, Flores-Jasso CF, Salomon WE, Zamore PD. Argonaute divides its RNA guide into domains with distinct functions and RNA-binding properties. Cell. 2012;151(5):1055-67.

31. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell. 2003;115(2):199-208.

32. Patel DJ, Ma J-B, Yuan Y-R, Ye K, Pei Y, Kuryavyi V, et al. Structural biology of RNA silencing and its functional implications. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006;71:81-93.

33. Naito Y, Ui-Tei K. siRNA design software for a target gene-specific RNA interference. Front Genet. 2012;3:102.

34. Gu S, Zhang Y, Jin L, Huang Y, Zhang F, Bassik MC, et al. Weak base pairing in both seed and 3' regions reduces RNAi off-targets and enhances si/shRNA designs. Nucleic Acids Res. 2014;42(9):12169-76.

35. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nature Methods. 2008;5(7):621-8.

36. 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.

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

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 9
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 10

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 薬理試験一覧表

Overview			**Test Article: Givosiran[a]**	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number CTD Location**
Primary Pharmacodynamics				
Identification of Givosiran (*In vitro*)	Hep3B cells	*In vitro*	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14037] CTD: 4.2.1.1-1
Evaluation of Single Nucleotide Polymorphisms in the Givosiran Target Region	*In silico*	*In silico*	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14024] CTD: 4.2.1.1-2
In vitro Activity of Potential Givosiran Antisense Strand (A 122227) Truncation Metabolites (*In vitro*)	Hep3B cells	*In vitro*	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO18001] CTD: 4.2.1.1-3
Evaluation of a Single Dose of Givosiran Compared to Hemin in a Mouse Model of AIP	T1/T2 AIP mice (C57BL/6)	Subcutaneous	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14050] CTD: 4.2.1.1-4
Evaluation of Givosiran in a Mouse AIP Model Following Multiple Subcutaneous Injections	T1/T2 AIP mice (C57BL/6)	Subcutaneous	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14012] CTD: 4.2.1.1-5
Evaluation of Givosiran in Wild-Type Rats Following Single Subcutaneous Injection	Sprague Dawley rats	Subcutaneous	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14008] CTD: 4.2.1.1-6
Evaluation of Givosiran in Wild-Type Rats Following Multiple Subcutaneous Injections	Sprague Dawley rats	Subcutaneous	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14009] CTD: 4.2.1.1-7
Pharmacodynamic Evaluation: Pharmacokinetics, Bioavailability, Tissue Distribution, and Pharmacodynamics of Givosiran in Sprague-Dawley Rats	Sprague Dawley rats	Intravenous/ Subcutaneous	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO18002] CTD: 4.2.1.1-8
Evaluation of Givosiran in a Rat AIP Model After a Single Subcutaneous Injection	Sprague Dawley rats with reduced liver PBGD	Subcutaneous	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14010] CTD: 4.2.1.1-9
Evaluation of Givosiran in a Rat AIP Model Following Multiple Subcutaneous Injections	Sprague Dawley rats with reduced liver PBGD	Subcutaneous	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14011] CTD: 4.2.1.1-10

表 2.6.3.1 薬理試験一覧表（続き）

Overview			Test Article: Givosiran[a]	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number CTD Location**
Evaluation of Givosiran Lowering of *ALAS1* mRNA in Liver, Serum, and Urine in Cynomolgus Monkeys Following Single and Multiple Subcutaneous Injections	Cynomolgus monkeys	Subcutaneous	[redacted]	[redacted] CTD: 4.2.1.1-11
Evaluation of Multiple SC Injections of AD-58632, AD 60519, AD-61193, and AD-60819 in Liver and Serum in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus monkeys	Subcutaneous	[redacted]	[BIO14003] CTD: 4.2.1.1-12
Secondary Pharmacology				
Off-target Analysis of Givosiran (*In vitro*)	HepG2 cells	*In silico* and *in vitro*	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14038] CTD: 4.2.1.2-1
Off-target Analysis of Givosiran (*In vitro*)	HepG2, Hep3B cells Cos7 cells (Dual-Luc system)	*In silico* and *in vitro*	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO20002] CTD: 4.2.1.2-2
Safety Pharmacology				
Givosiran: A Cardiovascular and Respiratory Safety Pharmacology Study in the Cynomolgus Monkey Using Telemetry[b] *Note: CNS evaluation is included in the 13 week and 39 week cynomolgus monkey toxicology studies [[AS1-NCD14-011]) and [AS1-GLP15-018]].*	Cynomolgus monkeys	Subcutaneous	[redacted] Canada)	[AS1-NCD14-019] CTD: 4.2.1.3-1

Abbreviations: AIP=acute intermittent porphyria; *ALAS1*=5'-aminolevulinate synthase 1; mRNA=messenger RNA; CNS=central nervous system; Dual-Luc=dual-luciferase; PBGD=porphobilinogen deaminase; RNA=ribonucleic acid; SC=subcutaneous.

a Givosiran, also referred to as AD-60519, ALN-60519, or ALN-AS1 in original nonclinical source reports, is the name of the active drug substance in solution.

b Good Laboratory Practice (GLP)-compliant study.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test Article: Givosiran[a]							
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Assessments Completed**	**Doses (mg/kg)**	**No. per Group/ Gender**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Identification of Givosiran (*In vitro*)	Hep3B cell line	*In vitro*	*ALAS1*	NA	NA	Givosiran exhibited dose dependent inhibition of *ALAS1* mRNA (IC_{50}~26 pmol/L).	[BIO14037]
Evaluation of Single Nucleotide Polymorphisms in the Givosiran Target Region	NA	*In silico*	Other[b]	NA	NA	Diverse ethnic and geographical populations demonstrated 100% *ALAS1* sequence conservation within the givosiran target region.	[BIO14024]
Activity of Potential Givosiran Antisense Strand (A-122227) Truncation Metabolites (*In vitro*)	Hep3B cell line	*In vitro*	*ALAS1*	NA	NA	At 10 and 0.1 nmol/L, the loss of 3 or more residues resulted in a marked loss of activity relative to givosiran DS. Truncation of the antisense strand from the 3′ end is much better tolerated, where removal of the first 5 bases from the 3′ end of the antisense strand does not impact activity. An evaluation of the AS(N-1)3′ truncation metabolite (givosiran-limited metabolite in rat and monkey) by transfection in Hep3B cells demonstrated retention of pharmacological activity *in vitro*, and suggests that it may, to the extent that it is present, contribute to observed *in vivo* pharmacology.	[BIO18001]

表 2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: Givosiran[a]							
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Assessments Completed**	**Doses (mg/kg)**	**No. per Group/ Gender**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Evaluation of a Single Dose of Givosiran Compared to Hemin in a Mouse Model of AIP	Mouse/ T1/T2 AIP (C57BL/6)	SC	Liver *Alas1*, Serum ALA and PBG	20	N=3 (PBS), N=2 (hemin), N=5 (givosiran, all male)	Givosiran treatment of AIP mice showed more rapid prevention of ALA and PBG heme intermediates increase than did the standard of care heme.	[BIO14050]
Evaluation of Givosiran in a Mouse AIP Model Following Multiple Subcutaneous Injections	Mouse/ T1/T2 AIP (C57BL/6)	SC	Liver *Alas1*, Serum ALA and PBG	0.3, 1, 3 QWx4	N=3, all male	Givosiran treatment of AIP mice prevented ALA and PBG increases in serum following phenobarbital induction (1 and 3 mg/kg dose demonstrated near [1 mg/kg] and complete prevention [3 mg/kg] of ALA/PBG).	[BIO14012]
Evaluation of Givosiran in Wild-Type Rats Following Single SC Injection	Rats/Sprague Dawley	SC	Liver *Alas1*	Givosiran: 1, 2.5, 5, 10	N=5 per group, all female	Givosiran exhibited dose-dependent reduction of the *Alas1* mRNA in liver (58% max reduction at 10 mg/kg).	[BIO14008]
Evaluation of Givosiran in Wild-Type Rats Following Multiple SC Injections	Rats/Sprague Dawley	SC	Liver *Alas1*	Givosiran: 1.25, 2.5, 5	N=5 per group, all female	Givosiran exhibited dose dependent reduction of the *Alas1* mRNA in liver 72 hours after 4 weekly SC doses (63% max reduction at 5 mg/kg).	[BIO14009]

表 2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: Givosiran[a]							
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Assessments Completed**	**Doses (mg/kg)**	**No. per Group/ Gender**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Pharmacodynamic Evaluation: Pharmacokinetics, Bioavailability, Tissue Distribution, and Pharmacodynamics of Givosiran in Sprague-Dawley Rats	Rats/Sprague Dawley	IV/SC	Liver *Alas1* mRNA in support of [AS1-NCD14-003]	Givosiran: Single IV: 10; Single SC: 0.1 to 10; Multiple SC: 2.5 QWx8 and 5 Wk1/1 QWx7	2 animals/ time point/ sex/group	Givosiran dosed with weekly regimens weekly (QW). Two dose levels achieved maximal 70% to 80% *Alas1* mRNA reduction within 6 and 8 weeks of dosing. All animals returned to baseline by 28 days post last dose.	[BIO18002]
Evaluation of Givosiran in a Rat AIP Model After a Single Subcutaneous Injection	Rats/Sprague Dawley with reduced liver PBGD	SC	Liver *Alas1*, Urine ALA and PBG	Givosiran: 2.5, 5, 10	N=3 per group, all female	A single dose of givosiran dose-dependently reduced *Alas1* mRNA and blunted increases in urinary ALA and PBG (complete blunting of ALA/PBG production at 10 mg/kg).	[BIO14010]
Evaluation of Givosiran in a Rat AIP Model Following Multiple Subcutaneous Injections	Rats/Sprague Dawley with reduced liver PBGD	SC	Liver *Alas1*, Urine ALA and PBG	Givosiran: 0.3, 1, 3 QWx4	N=3 per group, all female	Givosiran dosed weekly for 4 weeks prevented increases in *Alas1* mRNA and increases in urinary ALA and PBG (complete blunting of ALA/PBG at 3 mg/kg).	[BIO14011]

表 2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: Givosiran[a]							
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Assessments Completed**	**Doses (mg/kg)**	**No. per Group/ Gender**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Evaluation of Givosiran Lowering of *ALAS1* mRNA in Liver, Serum, and Urine in Cynomolgus Monkey Following Single and Multiple Subcutaneous Injection	Cynomolgus monkeys	SC	Liver, serum, and urine *ALAS1*	Givosiran: 1, 10 (single dose) Givosiran: 2.5 QWx8, 5 QWx8, 5 QDx3 and 5 QWx7, 5 QDx3 and 2.5 QWx7, 5 BIWx8	N=3 per group, all male	Single dose: Givosiran exhibited dose-dependent reduction of the *ALAS1* mRNA in liver and in serum/urine using the circulating RNA detection assay (cERD) (~70% to 80% max reduction at 10 mg/kg on day 4 postdose). *ALAS1* mRNA levels recovered back to baseline about 30 days postdose. Multiple dose: Givosiran dosed with several different regimens weekly (QW), bi-weekly (BIW), or daily (QD) followed by weekly achieved maximal 80% *ALAS1* mRNA reduction after between 5 and 8 weeks of dosing. All animals returned to baseline between 35 to 45 days post last dose.	[redacted]
Evaluation of Multiple SC Injections of AD-58632, Givosiran, AD-61193, and AD-60819 in Liver and Serum in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus monkeys	SC	Liver and serum *ALAS1*	Givosiran: 2.5 or 5 QDx5 Wk1/ QW Wks 2-4 and 1.25 or 2.5 QDx5/BIW Wks 2-4	N=3 per group, all male	Givosiran dosed with several different regimens (QD), followed by QW or BIW achieved maximal 62% to 78% *ALAS1* mRNA reduction after 8 and 10 doses. All animals returned to baseline by 60 days post first dose.	[BIO14003]

Abbreviations: Admin.=administration; AIP=acute intermittent porphyria; ALA=aminolevulinic acid; *ALAS1* (*Alas1*)=5'-aminolevulinate synthase 1; BIW=twice weekly; cERD=circulating extracellular RNA detection; CNS=central nervous system; DS=drug substance; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; IV=intravenous; mRNA=messenger RNA; NA=not applicable; PBG=porphobilinogen; PBGD=porphobilinogen deaminase; QD=once daily; QW=once weekly; RNA=ribonucleic acid; SC=subcutaneous; vs.=versus; Wk=week.

a Givosiran, also referred to as AD-60519, ALN-60519, or ALN-AS1 in original nonclinical source reports, is the name of the active drug substance in solution.

b To determine whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) are present in the region of *ALAS1* gene targeted by givosiran.

2.6.3.3 副次的薬理試験

表 2.6.3.3 副次的薬理試験

Overview				**Test Article: Givosiran[a]**		
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Off-target Analysis of Givosiran (*In vitro*)	HepG2 cells	*In silico* and *in vitro*	NA	NA	Givosiran is highly specific for *ALAS1*; there is a >100 fold difference between the "on-target" reduction of *ALAS1* by givosiran and the "off-target" reduction of transcripts with closely related sequences.	[BIO14038]
Off-target Analysis of Givosiran (*In vitro*)	HepG2, Hep3B, and Cos7 cells (Dual-Luc system)	*In silico* and *in vitro*	NA	NA	All potential off-target transcripts identified in the *in silico* analysis contained multiple mismatches and *in vitro* testing of givosiran did not produce substantial off-target reduction at concentrations far exceeding the IC_{50} for *ALAS1* inhibition, confirming the specificity of givosiran for *ALAS1*.	[BIO20002]

Abbreviations: Admin.=administration; *ALAS1*=5'-aminolevulinate synthase 1; Dual-Luc=dual-luciferase; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; NA=not applicable.

a Givosiran, also referred to as AD-60519, ALN-60519, or ALN-AS1 in original nonclinical source reports, is the name of the active drug substance in solution.

2.6.3.4 安全性薬理試験

表 2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: Givosiran[a]							
Organ Systems Evaluated	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study Number**
Cardiovascular and Respiratory	Cynomolgus monkeys	SC	Givosiran: 0 (0.9% sterile saline) or 150	5 males	No noteworthy findings to measured cardiovascular or respiratory endpoints. The plasma concentration of givosiran ranged from 6.16 to 19.1 µg/mL and 1.05 to 3.14 µg/mL at 6 and 24 hours postdose, respectively. The plasma concentrations beyond 24 hours were below a quantifiable level (50 ng/mL).	Yes	[AS1-NCD14 019]

Abbreviations: Admin.=administration; GLP=Good Laboratory Practice; No.=number; SC=subcutaneous.

a Givosiran, also referred to as AD-60519, ALN-60519, or ALN-AS1 in original nonclinical source reports, is the name of the active drug substance in solution.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用を評価する試験は実施していない。[2.6.5.15]項「薬物動態学的薬物相互作用」を参照。