目次

2.6.4 薬物動態試験の概要文.....5
2.6.4.1 まとめ.....5
2.6.4.2 分析法.....9
2.6.4.3 吸収.....14
2.6.4.4 分布.....29
2.6.4.5 代謝（動物種間の比較）.....49
2.6.4.6 排泄.....57
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用.....60
2.6.4.8 その他の薬物動態試験.....62
2.6.4.9 考察及び結論.....62
2.6.4.10 図表.....65
2.6.4.11 参考文献一覧.....65

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
ALAS1	5'-aminolevulinate synthase 1	5'-アミノレブリン酸合成酵素 1
ASGPR	asialoglycoprotein receptor	アシアロ糖たん白質受容体
AS(N-1)3'	loss of one nucleotide from the 3' end	アンチセンス鎖 3'末端からヌクレオチド 1 個が失われた（代謝物）
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
BDC	bile duct-cannulated	胆管カニューレ
BLQ	below the level of quantitation	定量下限未満
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸排泄ポンプ
CCP	overall confirmatory cut point	確認試験におけるカットポイント
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
C_0	concentration at 0	投与 0 時間の濃度
CL	total body clearance	総クリアランス
CV	coefficient of variation	変動係数
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
DDI	drug-drug interaction	薬物相互作用
DG	day of gestation	妊娠日
DRF	dose range-finding	用量設定
EFD	embryo-fetal development	胚・胎児発生に関する
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定

略号一覧（続き）

略号・用語	定義	
	英語	日本語
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
F_1	first filial generation	F_1（1 代）
FDA	U.S. Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
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
HPLC	high-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
IgG/IgM	immunoglobulin G/immunoglobulin M	免疫グロブリン G／免疫グロブリン M
ISR	incurred sample reanalysis	実試料再分析
IV	intravenous(ly)	静脈内
JVC	jugular vein-cannulated	頸静脈カニューレ
K_2 EDTA	dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸二カリウム
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計
LD	day of lactation	授乳（日）
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーRNA
MATE	multidrug and toxin extrusion proteins	多剤・毒性化合物排泄たん白質
N/A	not applicable	適用外
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
ND	not detectable / not determined	検出されず／測定せず
NF	normalization factor	正規化係数
NR	not reportable	報告不能

略号一覧（続き）

略号・用語	定義	
	英語	日本語
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
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
P-gp	P-glycoprotein	P 糖たん白
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PPND	pre and post natal development	出生前／出生後の発生に関する
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	定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SC	subcutaneous(ly)	皮下
SD	standard deviation	標準偏差
SLC	solute carrier	-
siRNA	small interfering ribonucleic acid	低分子干渉 RNA
$t_{1/2}$	Elimination half-life	消失半減期
Tg-rasH2	hemizygous rasH2 [CByB6F_1-Tg(HRAS)2Jic Hemizygous]	ヘミ接合型 rasH2 [CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic Hemizygous]
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	time to reach maximum concentration	最高濃度到達時間
TNF	titration normalization factor	タイトレーション正規化係数
Vdss	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 まとめ

マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザル（以下サルと表記）で行った主要な毒性試験、並びに急性肝性ポルフィリン症（AHP）の治療を目的とするギボシランナトリウムの臨床開発をサポートするため、種々の *in vitro* 及び非臨床 *in vivo* 試験（[表 2.6.5.1]「薬物動態試験一覧表」参照）でギボシランナトリウムの薬物動態（PK）及び吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）を評価した。

非臨床報告書中では AD-60519、ALN-60519 又は ALN-AS1 と表記されていることもあるギボシランは、溶液中の活性薬物の名称である。ギボシランは、マウス、ラット、サル及びヒトで薬理活性を示す。動物実験における表示投与量は、ギボシランのナトリウム塩（以下ギボシランと表記）を示し、遊離酸ではない。ナトリウム塩と遊離酸間の違いは、約 5%であり、本 CTD 中に示された PK 及びトキシコキネティクス（TK）データの解釈に影響を与えない。ギボシランは、5'-アミノレブリン酸合成酵素 1（*ALAS1*）を標的とした低分子干渉 RNA（siRNA）で構成される合成二本鎖オリゴヌクレオチドである。センス鎖及びアンチセンス鎖は、それぞれ 21 及び 23 のヌクレオチドを含んでいる。ギボシランの分子量は、ナトリウム塩と遊離酸でそれぞれ 17246 及び 16300 Da である。ギボシランは糖鎖リガンド（*N*-acetylgalactosamine; GalNAc）と siRNA が結合し肝細胞表面に発現しているアシアロ糖たん白質受容体（ASGPR）で siRNA の直接肝細胞特異的な取り込みにより、肝臓に分布するように特にデザインされている。

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）を用いた主な定量法を開発し、血漿及び尿試料中のギボシラン（センス鎖及びアンチセンス鎖の両方）定量法をバリデートした。PK 及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）の毒性試験に用いた測定方法は、当局の生体試料中薬物濃度分析法バリデーションガイドラインに従ってフルバリデーションを行った。非 GLP 試験の他の測定方法は目的に応じて適格化した。

探索的測定法としては、ギボシラン及びその代謝物の安定性／プロファイル用の LC/MS-HRAM、主代謝物 AS(N-1)3'の定量のための液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）、ギボシランの定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）及びギボシラン測定のための蛍光検出（Atto プローブ法）高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用し、非 GLP 試験試料中のギボシラン及び代謝物の分析を使用した。ギボシランのたん白結合率は、電気泳動移動度シフトアッセイ（EMSA）法で評価した。

薬効投与量である 0.1～10 mg/kg をラット及びサルにおいて単回静脈内（IV）及び皮下（SC）又は反復 SC 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 SC 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 IV 及び SC 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ラビリティは 10 mg/kg（IV 及び SC）で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 SC 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、非臨床試験で使用した種々の動物（マウス、ラット、ウサギ及びサル）に 0.5～2000 mg/kg と広い範囲で SC 投与し評価した。血漿中曝露量（C_{max} 及び AUC）は試験した投与量の範囲で、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。おおむね肝臓（標的臓器）における曝露は投与量比を下回る増加を示したが、腎臓は投与量比を上回る増加を示した。これらの逆説的な非線形性は、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。

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 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%（50 µg/mL）から 93.1%（1.0 µg/mL）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。ギボシランは両動物種で主に肝臓に分布した。SC 投与後のギボシランの肝臓における曝露は、IV 投与後より明らかに大きく、これはギボシランの肝臓への取り込みは、SC 投与がより効果的であることを示している。SC 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（IV 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。SC 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 SC 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。同様な結果がラットにおいてトリチウムで標識した[^{3}H]-ギボシランを用いた定量的全身オートラジオグラフィー（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濃度がみられた組織は、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の $t_{1/2}$ 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、胎盤組織へは無視できるほどのギボシラン分布であり両動物種とも胎児組織へは分布しなかった。

ラットに薬効投与量のギボシランを毎週反復投与したとき、単回 SC 投与と比較して肝臓にはギボシラン（の曝露）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、毎週 SC 反復投与後ギボシランは腎臓での $t_{1/2}$ が長いことに一致して腎臓に蓄積することを示した。ラットと同様に薬効投与量のギボシランをサルに毎週反復投与したとき、肝臓ではギボシランは蓄積しなかった。サルでは腎臓におけるギボシランの蓄積性は評価しなかった。

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を、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、非存在でも変化が確認されなかったことから、シトクロム P450（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（アンチセンス鎖の 3'末端からヌクレオチドが 1 個失われたもの）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。ギボシランの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で、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 SC 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 をヒトに毎月投与後のヒト血漿中での 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 SC 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はしていないが、低用量における AS(N-1)3'ギボシランとギボシランの曝露量の比を基にすると、非臨床試験の高用量における AS(N-1)3'ギボシランの血漿における曝露量は、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考えられる。

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、総じて、*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。

ギボシランの薬物相互作用（DDI）を種々の *in vitro*（例：ヒト肝ミクロゾーム、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、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、50%阻害濃度（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 SC 投与したときの定常状態における平均血漿 C_{max} は 19.7 nmol/L であり、C_{max} の 50 倍は 0.985 μmol/L（約 16 μg/mL）（[ALN-AS1-001]試験参照）である。血漿たん白結合率は約 55%と推定されている（表 2.6.4.4-2 参照）。そのため、非結合型の血漿中 C_{max} の 50 倍は、0.44 μmol/L（約 7.2 μg/mL）と推定され、控えめに推定した IC_{50}（又は Ki）の 1 μmol/L より低い値であることから臨床において P-gp が関与する薬物相互作用は起きにくいことを示唆している。AS(N-1)3'ギボシランの DDI の可能性に関し

ては特に評価しなかった。しかし、物理化学的性質がギボシランと類似していることから、AS(N-1)3'ギボシランの 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。

ALAS1 はヘム生合成過程の主要な酵素であることから、*ALAS1* のダウンレギュレーションは、理論的に、肝臓におけるヘム新生を減少させる可能性がある。ギボシランが CYP 活性にどのような影響を与えるかを評価するために、ギボシランを 300 mg/kg まで週に 1 回、3 回又は 5 回投与したラット及びサルから肝ミクロソームを作製した。雄性ラットにおいて、ギボシランの反復 SC 投与により、検討したアイソフォーム CYP1A、CYP2B、CYP3A 及び CYP2D の活性がコントロールより 41%～85%低下した。CYP2E 活性に影響はみられなかった。雌性ラットにおいて、ギボシランの反復 SC 投与により、CYP1A、CYP2B 及び CYP3A の活性がコントロールより 42%～62%低下したが、CYP2D 及び CYP2E に変化はみられなかった。サルにおいては、生理食塩液を投与したサルから得たミクロソームと比較したとき、CYP1A、CYP2B、CYP2D 及び CYP3A 活性は低下しなかった。CYP2E1 では、2 高用量（100 及び 300 mg/kg）において、活性の増加がみられた。これら *ex vivo* の試験における大きなバラツキは、既に報告されている通常のレベル内である [1]。以上、これらの結果は、生物学的意義を持たず、薬効投与量においてギボシランが CYP 活性に意義ある阻害を示すことは予想されないと考えられる。

In vitro 及びラットでの *ex vivo* 両方の結果は、ギボシランは臨床上で CYP アイソザイムが関与する意義ある DDI が起きにくいことを示唆しているが、ギボシランの DDI の可能性を、サルを用いた探索的試験でさらに評価した。DDI 試験は、ギボシランの投与前及び反復投与（5 mg/kg）後に CYP1A、CYP2D、CYP2E、及び CYP3A の基質を投与し CYP の活性を評価するためにサルで実施した。溶媒対照群と比べるとギボシラン投与後に曝露の減少（AUC で平均 71%～84%の減少）を示した CYP3A4 のプローブ基質（シンバスタチン）を除いてそれぞれのプローブ基質の PK は変化しなかった。追跡試験として雄性サルにギボシランを反復 SC 投与後の CYP3A4 の 2 基質（ミダゾラム及びシンバスタチン）の PK を評価した。ミダゾラムでは 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（$AUC_{0\text{-}t(last)}$）の明らかな減少（それぞれ 40%及び 37%）がみられたが、CYP3A4 による代謝物 1-OH ミダゾラムの対応した増加はみられなかった。代わりに、ギボシランを SC 投与後の 6 例の動物で 1-OH ミダゾラムのわずかな減少がみられた。シンバスタチン及びシンバスタチン酸（両方とも CYP3A の基質）では、$AUC_{0\text{-}t(last)}$の増加（それぞれ 35%及び 60%）がみられ、バラツキは大きいもののギボシランを SC 投与後の CYP3A 活性の最小限の阻害を示唆している。総じて、ギボシランの CYP3A 活性への影響は、ミダゾラム及びシンバスタチン両方の PK に対して最小限の変化を伴ったプローブ特異的なものであるように考えられる。患者における主要な CYP アイソザイム DDI 試験（[ALN-AS1-004]試験：Clinicaltrials. gov NCT03505853 A Study to Investigate the Interaction Between givosiran and a 5-probe Drug Cocktail in Patients With Acute Intermittent Porphyria [AIP]参照）を、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実施した。

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 SC 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。ギボシランは最高投与量（30 mg/kg）において 4 例中 1 例の雌ラットの乳汁で検出可能であった。2.5 mg/kg 又は 20 mg/kg を単回 SC 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。

要約すると、ギボシランの PK 及び ADME を、*in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。ギボシランは非臨床の *in vivo* で試験した動物種及び *in vitro* 試験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。データ全体からギボシランの SC 投与により、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。総じて、PK 及び ADME 試験は、毒性試験の解釈のサポート及び 2.5 mg/kg の月 1 回の投与計画でのヒトにおけるギボシランの性質の特徴付けを助け、AHP の治療におけるギボシランの臨床使用をサポートすると考えられる。

2.6.4.2 分析法

複数の生体試料中薬物濃度分析法を用いて、PK、薬力学（PD）及び免疫原性（抗薬物抗体［ADA］）を評価した。バリデートした測定方法及び ADA 分析法は表 2.6.4.2-1 にまとめた。その他の分析法は、探索的目的に使用した。

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、米国食品医薬品局（FDA）及び欧州医薬品庁（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 HPLC 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ィ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法も使用した。RT-qPCR による循環 *ALAS1* メッセンジャーリボ核酸（mRNA）の定量のため、循環細胞外 RNA 検出（circulating extracellular RNA detection：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。

2.6.4.2.1 薬物動態評価に用いた分析法（代謝物を含む）

血漿、尿、組織及びその他の試料中の PK パラメータを特徴づけるためのギボシランの定量法を、以下に簡潔に記述した（[表 2.6.5.2A]参照）。バリデートされた定量範囲、定量下限（LLOQ）、並びに真度及び精度の適合基準を表 2.6.4.2-1 にまとめた。

2.6.4.2.1.1 siRNA 及びその代謝物の定量法

バリデーション法

（CTD：4.2.2.1-1、試験番号[■■■■■■■■]；CTD：4.2.2.1-2、試験番号[■■■■■■■■]）

（CTD：4.2.2.1-4、試験番号[■■■■■■■■]；CTD：4.2.2.1-5、試験番号[■■■■■■■■]）

LC/MS-HRAM 法

LC/MS-HRAM 法は、同時に完全長アンチセンス鎖及びセンス鎖の両方を特異的に定量する。バリデーション評価には、真度及び精度（分析単位内及び分析単位間）、選択性／特異性、標準物質及び内標準物質の回収率、定量範囲及び定量下限（LLOQ）、キャリーオーバー、繰り返し測定の再現性、希釈の妥当性／直線性、及び安定性（凍結融解、ベンチトップ、長期保存、標準原液、及び前処理後試料）が含まれる。長期保存安定性は、試料のバッチ分析を保証する期間で評価した。ISR では、マウス、ラット、ウサギ及びサルの血漿中ギボシランのセンス鎖及びアンチセンス鎖の非臨床 PK 分析の再現性の評価を実施した。ISR の結果は表 2.6.4.2-2 に示すように許容可能であった。ISR の結果より、バリデートした分析法は許容可能な再現性を示した。

探索的分析法

以下の探索的分析法も使用した。これらの方法の詳細は、各試験法報告書に記載した（[表 2.6.5.2A]及び[表 2.6.5.2B]参照）。

RT-qPCR

本法は、標的アンチセンス鎖にステムループプライマーを結合させて PCR 増幅する方法である。本法は、完全長ギボシラン及び代謝物を検出する。一般的に、クロマトグラフ法に比べ処理能力が高くより高感度である。本法は、ウサギ精液中ギボシランの分析に使用した。

質量分析法

定性的 LC/MS-HRAM 法は、非臨床血漿及び乳汁試料中ギボシランの分析に使用した。さらに、LC/MS-HRAM 法は *in vitro* 代謝安定性並びに *in vitro* 及び *in vivo* 代謝物プロファイリングにも使用した。

定性的 LC-MS/MS 法は、代謝物 AS(N-1)3'ギボシランだけでなくギボシランのアンチセンス鎖の分析に使用した。本法は、許容可能な感度があり特異的で、非臨床血漿及び肝臓試料の分析に使用した。

Atto プローブ

標的二重鎖の HPLC 分離と組み合わせた蛍光プローブハイブリダイゼーション法（アンチセンス鎖：Atto プローブ）を使用した。本法は、ギボシランのアンチセンス鎖を検出し、尿及び糞のみならず種々の組織中の非臨床試料の分析に使用した。

2.6.4.2.2 抗薬物抗体（ADA）測定

（CTD：4.2.2.1-3、試験番号[■■■■■■]；CTD：4.2.2.1-7、試験番号[■■■■■■]）

ギボシランに対する特異的抗薬物抗体（ADA）分析法（[表 2.6.5.2D]参照）は、血清中（ADA 免疫グロブリン G／免疫グロブリン M［IgG/IgM］アイソタイプの両方）に対するカスタマイズした ELISA に基づいて開発し、ラット及びサルの血清中免疫原性評価のためにバリデートした（[2.6.6.8.1]

項「抗原性試験」参照）。ギボシランをプレートに固相化し、捕獲した ADA を動物種特異的抗 IgG/IgM 抗体を用いて検出した。

ラット及びサルの ADA 用 ELISA 法は、バリデーション報告書で述べたように、バリデーション実施時の FDA 及び EMA の規制ガイダンス文書に従ってバリデートした。

バリデーション試験は、カットポイント（正規化係数並びにスクリーニング及び抗体価のプレートに特異的なカットポイント）の検討及び%阻害確認用カットポイントを含んでいる（表 2.6.4.2-1）。抗体価及び感度のアッセイ真度（分析単位内及び分析単位間）は、ADA 陽性対照を用いて検討した。アッセイの特異性／選択性、薬物耐性、抗体過剰域効果及び安定性（凍結融解、ベンチトップ、長期保存）も評価した。本法は、スクリーニング試験、確認試験、抗体価測定からなる段階的アプローチに従った試料分析をサポートするバリデーション基準に適合した。

2.6.4.2.3　その他の分析法

マウス、ラット、サル及びヒトの血漿中たん白結合を評価するために、限外ろ過法を初期に使用した。フィルターメンブレンへのギボシランの非特異的結合のため、たん白質非存在化の新法である EMSA 法を用いてたん白結合の評価に使用した。

表 2.6.4.2-1　非臨床試験で使用したバリデートされた分析法の概要

LC/MS-HRAM 法を用いたギボシラン測定							
バリデーション報告書番号	動物種	マトリックス（抗凝固剤）	測定範囲（ng/mL）	定量下限（ng/mL）	分析単位間真度（%Diff）	分析単位間精度（%CV）	使用した試験
[redacted]	マウス	血漿（K_2 EDTA）	25.0～2500	25.0	≤15%（≤20%、LLOQ）	≤15%（≤20%、LLOQ）	[AS1-GLP17-006]
[redacted]	ラット	血漿（K_2 EDTA）	50.0～1000	50.0	≤15%（≤20%、LLOQ）	≤15%（≤20%、LLOQ）	[AS1-NCD14-003] [AS1-NCD14-010] [AS1-NCD14-017] [AS1-NCD14-018] [AS1-GLP15-022] [AS1-GLP16-011] [AS1-GLP16-022] [AS1-GLP17-009]
[redacted]	ウサギ	血漿（K_2 EDTA）	50.0～5000	50.0	≤15%（≤20%、LLOQ）	≤15%（≤20%、LLOQ）	[AS1-GLP16-018]
[redacted]	サル	血漿（K_2 EDTA）	50.0～1000	50.0	≤15%（≤20%、LLOQ）	≤15%（≤20%、LLOQ）	[AS1-NCD14-007] [AS1-NCD14-011] [AS1-NCD14-014] [AS1-NCD14-019] [AS1-GLP15-018]

分析法：ELISA 法を用いた抗 ALN-AS1 IgG/IgM（ADA）測定						
バリデーション報告書番号	動物種	マトリックス	正規化係数及び確認試験カットポイント	感度（ng/mL）	分析単位間精度（%CV）	使用した試験
[redacted]	ラット	血清（N/A）	NF=0.089 TNF=0.150 CCP=21.0% シグナル阻害（A450 nm）	262	≤25%	[AS1-GLP15-022]
[redacted]	サル	血清（N/A）	NF=0.020 TNF=0.049 CCP=22.8% シグナル阻害（A450 nm）	197	≤25%	[AS1-GLP15-018]

略語：CV=変動係数；A450=波長 450 nm における吸光度；ADA=抗薬物抗体；CCP=確認試験におけるカットポイント；K_2 EDTA=エチレンジアミン四酢酸二カリウム；ELISA=酵素結合免疫吸着測定；IgG/IgM=免疫グロブリン G／免疫グロブリン M；LC/MS-HRAM=液体クロマトグラフィー高分解能精密質量分析計；LLOQ=定量下限；N/A=適用外；NF=正規化係数；TNF=タイトレーション正規化係数

表 2.6.4.2-2 実試料再分析（ISR）の概要

バリデーション試験番号	方法	動物種／マトリックス	分析対象物質	分析試験番号	Alnylam 試験番号	基準に達した試料／試験した試料	基準値に達した割合（%）	基準値
[redacted]	LC/MS-HRAM	ラット血漿	A-122227 (AS)	[redacted]	[AS1-NCD14-010]	37/40	92.5	67%が±20%以内
[redacted]	LC/MS-HRAM	ラット血漿	A-122230 (S)	[redacted]	[AS1-NCD14-010]	36/39	92.3	67%が±20%以内
[redacted]	LC/MS-HRAM	ラット血漿	A-122227 (AS)	[redacted]	[AS1-NCD14-017]	15/20	75.0	67%が±20%以内
[redacted]	LC/MS-HRAM	ラット血漿	A-122230 (S)	[redacted]	[AS1-NCD14-017]	14/19	73.7	67%が±20%以内
[redacted]	LC/MS-HRAM	ウサギ血漿	A-122227 (AS)	[redacted]	[AS1-GLP16-018]	19/20	95.0	67%が±20%以内
[redacted]	LC/MS-HRAM	ウサギ血漿	A-122230 (S)	[redacted]	[AS1-GLP16-018]	19/20	95.0	67%が±20%以内
[redacted]	LC/MS-HRAM	サル血漿	A-122227 (AS)	[redacted]	[AS1-NCD14-011]	101/118	85.6	67%が±20%以内
[redacted]	LC/MS-HRAM	サル血漿	A-122230 (S)	[redacted]	[AS1-NCD14-011]	106/122	86.9	67%が±20%以内

略語：AS=アンチセンス；LC/MS-HRAM=液体クロマトグラフィー高分解能精密質量分析計；S=センス

2.6.4.3 吸収

ギボシランの PK 及び TK 試験を表 2.6.4.3-1 に簡潔にまとめた。PK 及び TK パラメータは可能な場合、有効数字 3 桁として示した。そのため、これらの値は数値のまるめのために報告書中のそれぞれの根拠資料とわずかに異なっている可能性がある。

表 2.6.4.3-1 ギボシランの PK 及び TK 試験

試験番号	動物種	投与経路	投与量 (mg/kg)	試験形式	概要表
単回及び反復 PK 試験					
[AS1-NCD14-003]	ラット	急速 IV	10 IV（単回）	非-GLP PK 試験	[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]
		SC	0.1、1、5 及び 10 SC （単回）; 1、2.5 ; 及び 5/1 × 週 1 回 8 週間（反復）		
[AS1-DSM18-010]	ラット	SC	10（単回）	非 GLP PK	[2.6.5.3B]
[AS1-NCD14-007]	サル	急速 IV	10 IV（単回）	非 GLP PK	[2.6.5.3D、2.6.5.4B、2.6.5.5D、2.6.5.5F、2.6.5.9A、2.6.5.9C、2.6.5.13D]
		SC	0.1、1、5 及び 10 SC （単回）; 1、2.5 ; 及び 5/1 × 週 1 回 8 週間（反復）		
[AS1-DSM18-009]	サル	SC	30（単回）	非 GLP PK	[2.6.5.3E]
単回及び反復投与予備及び主 TK					
[AS1-NCD14-005]	マウス	SC	30、100、300 × 週に 1 回 5 週間（反復）	非 GLP TK DRF	[2.6.7.6-1]
[AS1-DSM16-003]	マウス	SC	30、100、300 ×週に 1 回 8 週間（反復）	非 GLP TK	[2.6.7.10-1]
[AS1-GLP17-006]	マウス	SC	500、1000、1500 × 月に 1 回 3 ヵ月（反復）	非 GLP TK	[2.6.7.10-2]
[AS1-NCD14-018]	ラット	SC	3、10、30、100（単回）	非 GLP TK	[2.6.5.3C、2.6.5.5B]
[AS1-NCD14-017]	ラット	SC	500、1000、2000（単回）	GLP TK	[2.6.7.9-1]
[AS1-NCD14-001]	ラット	SC	10、30、100、300 × 週に 1 回 5 週間（反復）	非 GLP TK DRF	[2.6.7.6-1]
[AS1-NCD14-010]	ラット	SC	100（単回）； 3、10、30、100 × 週に 1 回 14 週間（反復）	GLP TK	[2.6.7.7-1]
[AS1-DSM15-041]	ラット	SC	交配前 10、30、100 × 週に 1 回 4 週間；1.5、5、16.5 毎日 DG6 から DG17[a]	非 GLP TK	[2.6.7.11-1]
[AS1-GLP16-011]	ラット	SC	交配前 3、10、30 × 週に 1 回 4 週間 ; 0.5、1.5、5 毎日 DG6 から DG17[a]	GLP TK EFD	[2.6.7.12-1]
[AS1-GLP16-022]	ラット	SC	10、50、150 × 月に 1 回 4 ヵ月（反復）	GLP TK	[2.6.7.7-2]
[AS1-GLP15-022]	ラット	SC	3、10、30 × 週に 1 回 27 週間（反復）	GLP TK	[2.6.7.7-3]
[AS1-GLP17-009]	ラット	SC	3、10、30（毎日 F0 DG 7 から DG 19）	GLP PPND	[2.6.5.7、2.6.7.14-1]

試験番号	動物種	投与経路	投与量 （mg/kg）	試験形式	概要表
[AS1-DSM16-012]	ウサギ	SC	3、10、30（毎日 DG7 から DG19）	非 GLP TK DRF	[2.6.7.11-1]
[AS1-GLP16-018]	ウサギ	SC	20（単回）；0.5、1.5、5（毎日 DG7 から DG19）	GLP TK	[2.6.7.13-1]
[AS1-NCD14-019]	サル	SC	150（単回）	GLP 安全性薬理	[2.6.3.4]
[AS1-NCD14-002]	サル	SC	30、100、300 × 週に 1 回 5 週間（反復）	非 GLP TK DRF	[2.6.7.6-1]
[AS1-NCD14-011]	サル	SC	15、50、150 × 週に 1 回 14 週間（反復）	GLP TK	[2.6.7.7-4]
[AS1-GLP15-018]	幼若サル	SC	10、30、100 × 週に 1 回 40 週間（反復）	GLP TK	[2.6.7.7-5]

略語：DG=妊娠日；DRF=用量設定；EFD=胚・胎児発生に関する；GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；IV=静脈内；PK=薬物動態；PPND=出生前／出生後の発生に関する；SC=皮下；TK=トキシコキネティクス

a 反復 DRF EFD 試験：交配前、週に 1 回 4 回投与（交配前 22 日、15 日、8 日、1 日）及び DG6 から DG17 まで毎日投与。

2.6.4.3.1 ギボシランのラット及びサルにおける PK

ギボシランの血漿中 PK プロファイルを、ラット又はサルに単回 IV 投与又は単回及び反復 SC 投与して評価した。両動物とも PK パラメータに明確な雌雄差がみられなかったため特記していない限り、PK パラメータは両性を合わせた全体平均を基本に示した。雌雄それぞれのデータは各報告書に示した。

2.6.4.3.1.1 ラットにおける血漿中薬物動態

(CTD：4.2.2.2-1、試験番号[AS1-NCD14-003]；CTD：4.2.2.2-2、試験番号[AS1-DSM18-010])

ラットにギボシランを単回 IV 投与（10 mg/kg）及び 0.1～10 mg/kg の幅で単回 SC 投与し、ギボシランの血漿中 PK を評価した（試験番号 AS1-NCD14-003：[表 2.6.5.3A]参照）。さらにラットに反復 SC 投与（1 又は 2.5 mg/kg を週 1 回 8 週間投与：及び 5 mg/kg のローディング投与後 1 mg/kg を週 1 回 7 週間投与［5/1 mg/kg］）して血漿中 PK を検討した。ギボシランの組織内分布も本試験で検討した。結果は 2.6.4.4.2 項参照。

血漿中濃度推移の平均値から求めた単回 IV 投与及び SC 投与したときの血漿 PK パラメータを表 2.6.4.3-2 に示す（試験番号 AS1-NCD14-003 : [表 2.6.5.3A]参照）。10 mg/kg を単回 IV 投与したとき、投与 0 時間の濃度（C_0）の平均値は 148 μg/mL であり、平均 $AUC_{0\text{-}t(last)}$は 11.8 μg·h/mL であった。消失は推定 $t_{1/2}$ が 0.2 時間と迅速であった。平均総クリアランス（CL）及び定常状態における分布容積（Vdss）はそれぞれ 870 mL/h/kg 及び 181 mL/kg であったことから、ギボシランは血管外にも分布することが示唆された。単回 SC 投与後、ギボシランは 0.1 mg/kg 投与群では検出されなかったが、他のすべての投与群で投与後少なくとも 2 時間は測定可能であった。1～10 mg/kg 投与において、血漿におけるギボシランの曝露（C_{max} 及び投与後 0 から 2 時間までの濃度―時間曲線下面積［$AUC_{0\text{-}2}$］）は、評価した投与量の範囲でおおむね投与量に比例して増加した。見かけの血漿 $t_{1/2}$ は、SC 投与群に

共通して一定（2～3 時間）していた。10 mg/kg を SC 投与したときギボシランの見かけの平均バイオアベラビリティは約 24%であった。

表 2.6.4.3-2 単回静脈内又は皮下投与後のギボシランの全体的なラット平均血漿 PK パラメータ

投与経路	IV	SC[a]		
投与量（mg/kg）	10	1	5	10
T_{max}（h）	0.08	0.3	0.4	1.1
C_0（µg/mL）	148	N/A	N/A	N/A
C_{max}（µg/mL）	N/A	0.11	0.43	1.07
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（µg·h/mL）	11.8	0.15	1.29	2.79
$AUC_{0\text{-}1}$（IV）又は $AUC_{0\text{-}2}$（SC）（µg·h/mL）	11.8	0.15	0.72	1.48
$t_{1/2}$（h）	0.2	2.1	2.7	2.7
Vdss（mL/kg）	181	N/A	N/A	N/A
CL（mL/h/kg）	870	N/A	N/A	N/A
F（%）	N/A	N/A	N/A	24

略語：AUC=血漿中濃度-時間曲線下面積；$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；$AUC_{0\text{-}1(2)}$=投与後 1(2)時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積;C_0=投与 0 時間の濃度;CL=総クリアランス;C_{max}=T_{max}における最高血漿中濃度の実測値；F=バイオアベラビリティ；IV=静脈内；N/A=適用外；SC=皮下；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間；Vdss=定常状態における分布容積

注：値は、雌雄を合計した平均値を示す。

a 0.1 mg/kg を SC 投与群はすべての時点で定量下限未満であった。

出典：試験番号 AS1-NCD14-003

ラットにギボシランを種々の投与法（1 又は 2.5 mg/kg を毎週 1 回 8 週間：及び 5 mg/kg のローディング投与後 1 mg/kg を週 1 回 7 週間投与［5/1 mg/kg］）で反復 SC 投与しギボシランの PK プロファイルを評価した。血漿における PK は、8 回目の投与後評価した。C_{max} は 1～2.5 mg/kg の投与量範囲でほぼ投与量に比例して増加し、AUC は、2.5 mg/kg と 5/1 mg/kg の間でほぼ投与量比を示し（表 2.6.4.3-3：試験番号 AS1-NCD14-003：[表 2.6.5.4A]参照）、1 mg/kg 及び 5/1 mg/kg 投与のデータは類似していることを示した。1 mg/kg を SC 投与した群は、ほとんどの値が定量下限未満（BLQ）だったので、いくつかのパラメータは得られなかった。

さらに、濃度測定可能な測定時点が少なかったためいくつかの反復投与群の血漿 $t_{1/2}$ を推定できなかった。反復投与したとき血漿における蓄積性を示す証拠はみられなかった。

表 2.6.4.3-3 ラットに反復 SC 投与後のギボシランの平均血漿 PK パラメータ

投与経路	SC		
投与量（mg/kg）	1	2.5	5/1[a]
T_{max}（h）	2	1	2
C_{max}（µg/mL）	0.11	0.17	0.08
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（µg·h/mL）	NR	0.51	0.12
$t_{1/2}$（h）	NR	NR	NR

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max}における最高血漿中濃度の実測値；NR=報告不能；SC=皮下；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間

注：値は、雌雄を合計した平均値を示す。

a 5 mg/kg のローディング投与の後 1 mg/kg を週 1 回 7 週間投与（5/1 mg/kg）。

出典：試験番号 AS1-NCD14-003

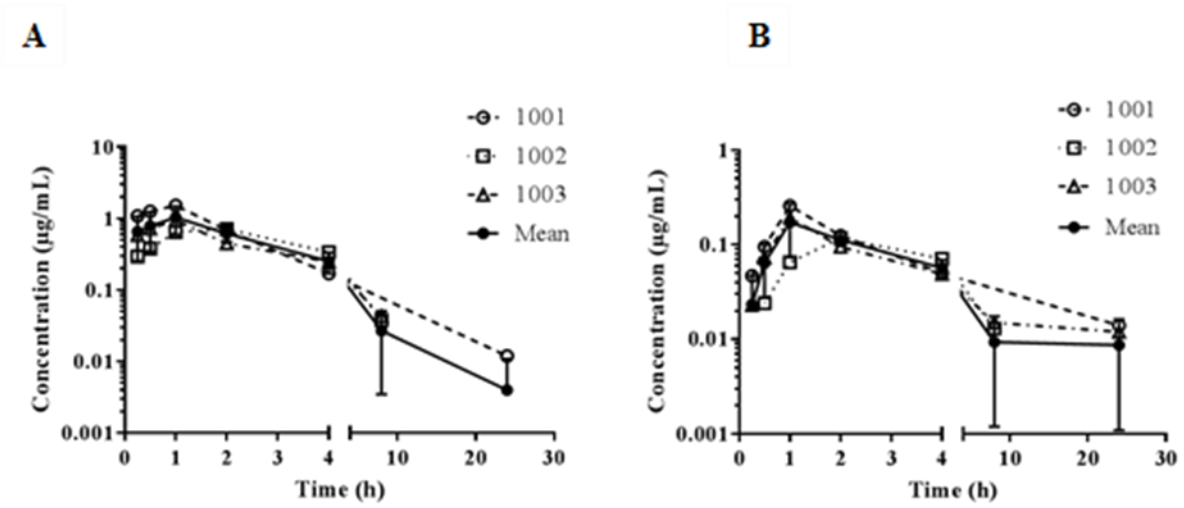
ギボシランを 10 mg/kg 単回 SC 投与（試験番号 AS1-DSM18-010 : [表 2.6.5.3B]参照）し相対的な血漿曝露及び主代謝物 AS(N-1)3'ギボシラン（アンチセンス鎖 3'末端からヌクレオチド 1 個が失われたもの）の PK プロファイルを決定するため、ラットで別な試験を実施した。血漿におけるギボシラン及び AS(N-1)3'ギボシランの C_{max} はそれぞれ 1.06 及び 0.190 µg/mL であった。血漿におけるギボシラン及び AS(N-1)3'ギボシランの $AUC_{0\text{-}t(last)}$はそれぞれ 3.00 及び 0.626 µg·h/mL であった。$AUC_{0\text{-}t(last)}$で評価した AS(N-1)3'ギボシランの曝露は、ギボシランの約 21%であった。C_{max} に到達後、ギボシラン及び AS(N-1)3'ギボシランはそれぞれ $t_{1/2}$ が 3.0 時間及び 8.2 時間で減少した（表 2.6.4.3-4 及び図 2.6.4.3-1）。

表 2.6.4.3-4 ラットに単回 SC 投与（10 mg/kg）後のギボシラン及び AS(N-1)3'ギボシランの血漿 PK パラメータ（平均値±SD）

分析対象物質	ギボシラン [a]	AS(N-1)3'ギボシラン [a]
C_{max}（µg/mL）	1.06±0.414	0.190±0.0701
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（µg·h/mL）	3.00±0.458	0.626±0.132
$AUC_{0\text{-}48}$（µg·h/mL）	3.24±NR	0.702±NR
$t_{1/2}$（h）	3.0±NR	8.2±NR

略語：AS(N-1)3'=アンチセンス鎖 3'末端からヌクレオチド 1 個が失われた（代謝物）；$AUC_{0\text{-}48}$=投与後 48 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積；$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；NR=報告不能；$t_{1/2}$=消失半減期；SD=標準偏差；T_{max}=最高濃度到達時間
a n=3
出典：試験番号 AS1-DSM18-010

図 2.6.4.3-1 ラットに単回 SC 投与（10 mg/kg）後のギボシラン（A）及び AS(N-1)3'ギボシラン（B）の個別及び平均値（±SD）血漿中濃度時間推移



略語：AS(N-1)3'=アンチセンス鎖 3'末端からヌクレオチド 1 個が失われた（代謝物）；SD=標準偏差
出典：試験番号 AS1-DSM18-010

2.6.4.3.1.2 サルにおけるギボシラン血漿薬物動態

（CTD：4.2.2.2-4、試験番号[AS1-NCD14-007]；CTD：4.2.2.2-5、試験番号[AS1-DSM18-009]）

サルにギボシランを単回 IV 投与（10 mg/kg）及び 0.1～10 mg/kg の幅で単回 SC 投与し、ギボシランの血漿中 PK を評価した（試験番号 AS1-NCD14-007：[表 2.6.5.3D]参照）。さらにサルに反復 SC 投与（1 又は 2.5 mg/kg を週に 1 回 8 週間投与：及び 5 mg/kg のローディング投与後 1 mg/kg を週 1 回 7 週間投与［5/1 mg/kg］）して血漿中 PK を検討した。ギボシランの肝臓及び腎臓への分布も本試験で検討し結果は 2.6.4.4 項で検討した。

単回 IV 及び SC 投与したときの血漿 PK パラメータを表 2.6.4.3-5 に示す。10 mg/kg を単回 IV 投与したとき、平均 C_0 は 215 μg/mL であり、平均 $AUC_{0\text{-}t(last)}$は 30.5 μg·h/mL であった。体循環からの消失は推定 $t_{1/2}$ は 0.2 時間と迅速であった。平均 CL 及び Vdss はそれぞれ 340 mL/h/kg 及び 104 mL/kg であったことから、ギボシランは血管外にも分布することが示唆された。

表 2.6.4.3-5 サルに単回 IV 又は SC 投与後のギボシランの血漿 PK パラメータ（平均値±SD）

投与経路	IV	SC[a]		
投与量（mg/kg）	10[b]	1[b]	5[b]	10[b]
T_{max}（h）	0.083	1.1±0.5	2.4±1.4	1.7±0.5
C_0（μg/mL）	215±19.9	NA	NA	NA
C_{max}（μg/mL）	NA	0.133±0.055	0.830±0.179	2.14±0.418
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/mL）	30.5±5.85	0.324±0.136	4.65±0.875	11.2±2.09
$t_{1/2}$（h）	0.2±0.1	3.2±1.7	3.5±0.9	3.5±1.1
CL（mL/h/kg）	340±75.1	N/A	N/A	N/A
Vdss（mL/kg）	104±33.8	N/A	N/A	N/A
F（%）	N/A	N/A	N/A	37

略語： $AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_0=投与 0 時間の濃度；CL=総クリアランス；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；F=バイオアベラビリティ；IV=静脈内；N/A=適用外；SC=皮下；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間；Vdss=定常状態における分布容積

注：値は、雌雄を合計した平均値を示す。

a 0.1 mg/kg を SC 投与群はすべての時点で定量下限未満（BLQ）であった。

b n=6（3／性）

出典：試験番号 AS1-NCD14-007

単回 SC 投与したとき、0.1 mg/kg 投与群ではギボシランは検出されなかった。1～10 mg/kg 投与において、検討した投与量ではギボシランの血漿曝露（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$）は、ほぼ投与量に比例して増加した（試験番号 AS1-NCD14-007：[表 2.6.5.3D]参照）。SC 投与を通じて見かけの血漿 $t_{1/2}$ は一定であった（約 3.5 時間）。ギボシランの見かけの平均全身バイオアベラビリティは、10 mg/kg を SC 投与したとき約 37%であった。

サルにギボシランを種々の投与法（1 又は 2.5 mg/kg を毎週 1 回 8 週間：及び 5 mg/kg のローディング投与後 1 mg/kg を週 1 回 7 週間投与［5/1 mg/kg］）で反復 SC 投与しギボシランの PK プロファイルを評価した。血漿における PK は、1 回目及び 8 回目の投与後評価した。平均血漿 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は 1 及び 5/1 mg/kg 投与で類似しており、単回投与の値と同様であった（表 2.6.4.3-6：試験番号 AS1-NCD14-007：[表 2.6.5.4B]参照）。平均血漿 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は 1 及び 5/1 mg/kg 投与群と 2.5 mg/kg 投与群間でほぼ投与量比例性を示した。総じて、サルにおいて単回及び反復投与におけ

る血漿 PK プロファイルは非常に類似しており、反復投与後のギボシランの PK は時間又は投与量依存的ではないことを示している。反復投与したとき血漿における蓄積性を示す証拠はみられなかった。

表 2.6.4.3-6 反復皮下投与後のサルにおけるギボシランの血漿 PK パラメータ（全体的な平均値±SD）

投与量（mg/kg）	2.5		5/1[a]		1	
投与回数	1	8	1	8	1	8
T_{max}（h）	1.6±1.3	1.8±0.4	1.8±0.4	1.4±0.7	1.7±0.5	1.5±0.5
C_{max}（μg/mL）	0.291 ±0.0622	0.305 ±0.0397	0.870 ±0.285	0.135 ±0.0342	0.109 ±0.0239	0.136 ±0.0351
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/mL）	1.17 ±0.159	1.35 ±0.364	3.80 ±1.06	0.340 ±0.150	0.292 ±0.0762	0.379 ±0.175
$t_{1/2}$（h）	4.2±0.2	3.7±0.5	2.9±1.48	2.2±0.7	2.6±N/A	2.8±N/A

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；N/A=適用外；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=6）。
a 投与法 5/1：5 mg/kg のローディング投与の後 1 mg/kg を週 1 回 7 週間投与。
出典：試験番号 AS1-NCD14-007

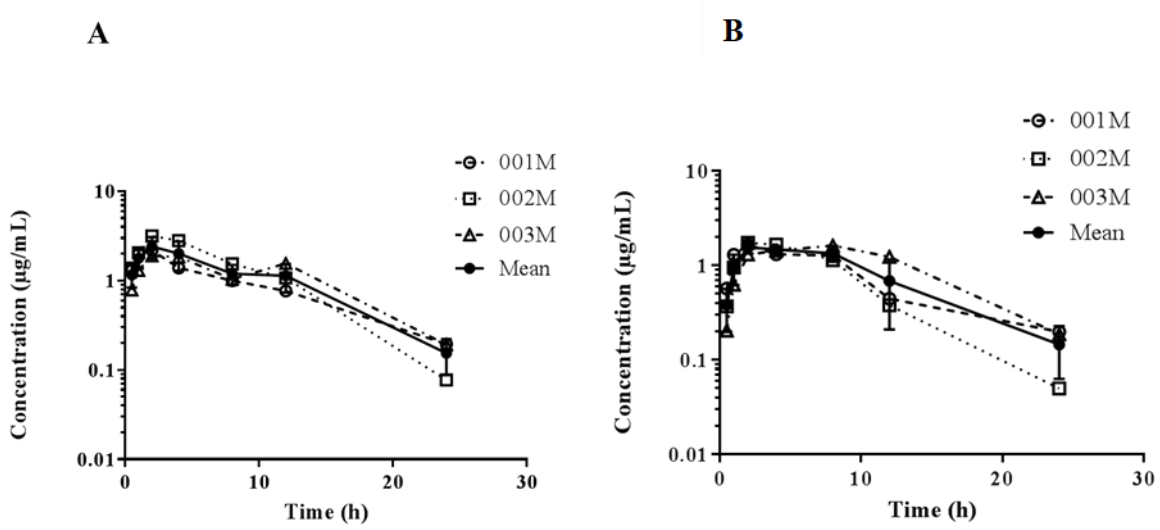
ギボシランを 30 mg/kg 単回 SC 投与（試験番号 AS1-DSM18-009：[表 2.6.5.3E]参照）し相対的な血漿曝露及び主代謝物 AS(N-1)3'ギボシラン（アンチセンス鎖 3'末端からヌクレオチド 1 個が失われたもの）の PK プロファイルを決定するため、サルでの別な試験を実施した。血漿におけるギボシラン及び AS(N-1)3'ギボシランの C_{max} はそれぞれ 2.42 及び 1.67 μg/mL であった。血漿におけるギボシラン及び AS(N-1)3'ギボシランの $AUC_{0\text{-}t(last)}$はそれぞれ 26.4 及び 19.4 μg·h/mL であった。$AUC_{0\text{-}t(last)}$で評価した AS(N-1)3'ギボシランの曝露は、ギボシランの約 74%であった。C_{max} に到達後、ギボシラン及び AS(N-1)3'ギボシランはそれぞれ $t_{1/2}$ が 5.5 時間及び 5.1 時間で減少した（表 2.6.4.3-7 及び図 2.6.4.3-2）。

表 2.6.4.3-7 サルに単回 SC 投与（30 mg/kg）後のギボシラン及び AS(N-1)3'ギボシランの血漿 PK パラメータ（平均値±SD）

分析対象物質	ギボシラン	AS(N-1)3'ギボシラン
C_{max}（μg/mL）	2.42±0.664	1.67±0.0551
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/mL）	26.4±4.96	19.4±4.28
$AUC_{0\text{-}48}$（μg·h/mL）	28.3±4.38	21.2±4.91
$t_{1/2}$（h）	5.5±1.7	5.1±2.1

略語：AS(N-1)3'=アンチセンス鎖 3'末端からヌクレオチド 1 個が失われた（代謝物）；$AUC_{0\text{-}48}$=投与後 48 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積；$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；LLOQ=定量下限；SD=標準偏差；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：LLOQ=10 ng/mL
出典：試験番号 AS1-DSM18-009

図 2.6.4.3-2 サルに SC 投与（30 mg/kg）後のギボシラン（A）及び AS(N-1)3'ギボシラン（B）の個別及び平均値（±SD）血漿中濃度時間推移



略語：AS(N-1)3'=アンチセンス鎖 3'末端からヌクレオチド 1 個が失われた（代謝物）；SD=標準偏差
出典：試験番号 AS1-DSM18-009

2.6.4.3.2 マウス、ラット、ウサギ及びサルにおけるギボシランのトキシコキネティクス

種々の GLP 及び非 GLP 試験において、マウス、ラット、ウサギ及びサルの血漿、肝臓及び腎臓、また妊娠ラット及びウサギの胎盤・胎児組織の TK プロファイルを評価した。本章では血漿 TK のみを示し、組織 TK については 2.6.4.4 項で述べた。それぞれの動物種の詳細なデータは以下の個別の試験で示した。

2.6.4.3.2.1 マウスにおけるギボシランの血漿トキシコキネティクス

（CTD：4.2.3.4.2-1、試験番号[AS1-DSM16-003]；CTD：4.2.3.4.2-2、試験番号[AS1-GLP17-006]）
（CTD：4.2.3.2-1、試験番号[AS1-NCD14-005]）

近交系ハイブリッドマウス（BALB/cBy × C57BL/6 F_1［1 代雑種］）（遺伝性的背景は、がん原性試験に使用したトランスジェニック Tg-rasH2 ヘミ接合型マウスの野生型）におけるギボシランの血漿 TK を探索毒性試験で評価した（試験番号 AS1-DSM16-003：[表 2.6.7.10-1]参照）。マウスにギボシランの 30、100 又は 300 mg/kg を週に 1 回 8 週間（計 8 回投与）SC 投与した。ギボシランの血漿 TK パラメータを表 2.6.4.3-8 に要約した（300 mg/kg 投与群の TK 分析は実施しなかった）。週に 1 回、8 回 SC 投与したとき、30 及び 100 mg/kg 投与群において、C_{max} はそれぞれ 7.58 及び 28.7 µg/mL であった。100 mg/kg 投与群の $AUC_{0\text{-}t(last)}$は 69.0 µg·h/mL であった。30 mg/kg 投与群の $AUC_{0\text{-}t(last)}$は、ギボシランの血漿の濃度-時間データが十分得られなかったため算出できなかった。

表 2.6.4.3-8 反復 SC 投与（週に 1 回、8 回投与）後の BALB/cBy × C57BL/6 F_1 マウス血漿のギボシラン平均 TK パラメータ

投与量（mg/kg）	30	100
T_{max}（h）	0.5	0.5
C_{max}（μg/mL）	7.58	28.7
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/mL）	NR	69.0

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；F_1=F_1 世代；NR=パラメータを算出するための値が不足しているため報告不能；T_{max}=最高濃度到達時間
出典：試験番号 AS1-DSM16-003

野生型の Tg-rasH2 マウスに 500、1000 又は 1500 mg/kg を月に 1 回 8 週間 SC 投与（計 3 回投与）した毒性試験でギボシランの血漿 TK を評価した（試験番号 AS1-GLP17-006 : [表 2.6.7.10-2]参照）。C_{max} 及び投与後 0～24 時間までの血漿濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24}$）で評価したギボシランの曝露は、投与量が 500 から 1500 mg/kg に増加すると共に増加した。ギボシランの C_{max} 増加はわずかに用量比を下回る増加を示したが、$AUC_{0\text{-}24}$ はほぼ投与量比例性を示した（表 2.6.4.3-9）。

表 2.6.4.3-9 反復 SC 投与（月に 1 回、3 回投与）野生型 Tg-rasH2 マウスにおけるギボシランの平均血漿 TK パラメータ

投与量（mg/kg）	500	1000	1500
T_{max}（h）	1.0	1.0	1.0
C_{max}（μg/mL）	155	231	311
$AUC_{0\text{-}24}$（μg·h/mL）	594	1110	1800
$t_{1/2}$（h）	2.0	2.1	2.4

略語：$AUC_{0\text{-}24}$=投与後 24 時間までの血漿中濃度-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；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す。
出典：試験番号 AS1-GLP17-006

雄性 CD-1 マウスに 30、100 又は 300 mg/kg を週に 1 回、5 回 SC 投与したギボシランの血漿 TK を、最終（5 回）投与後、評価した（試験番号 AS1-NCD14-005：[表 2.6.7.6-1]参照）。ギボシランは、30 及び 100 mg/kg 投与群では 24 時間まで、300 mg/kg 投与群では投与後 336 時間までの血漿中で定量可能であった。すべての投与群で、プールした血漿中ギボシランの最高濃度到達時間（T_{max}）は 0.5～1 時間であった（表 2.6.4.3-10）。血漿 C_{max} はほぼ用量比例的に増加したが、$AUC_{0\text{-}t(last)}$はやや投与量比を上回る増加を示した。$t_{1/2}$ は短く投与群全体で一定で 0.5～0.8 時間であった。

表 2.6.4.3-10 反復 SC 投与（週に 1 回、5 回投与）後のマウスにおけるギボシランの平均血漿 TK パラメータ

投与量（mg/kg）	30	100	300
T_{max} (h)	0.5	0.5	1.0
C_{max} (μg/mL)	48.0	227	462
$AUC_{0\text{-}24}$ (μg·h/mL)	79.9	339	1310
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·h/mL)	79.9	339	1331
$t_{1/2}$ (h)	0.7	0.8	0.5

略語：$AUC_{0\text{-}24}$=投与後 24 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積；$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
出典：試験番号 AS1-NCD14-005

2.6.4.3.2.2 ラットにおけるギボシランの血漿トキシコキネティクス

（CTD：4.2.2.2-3、試験番号[AS1-NCD14-018]；CTD：4.2.3.3.2-1、試験番号[AS1-NCD14-017]）
（CTD：4.2.3.2-3、試験番号[AS1-NCD14-001]；CTD：4.2.3.2-4、試験番号[AS1-NCD14-010]）
（CTD：4.2.3.2-5、試験番号[AS1-GLP16-022]；CTD：4.2.3.2-6、試験番号[AS1-GLP15-022]）
（CTD：4.2.3.5.1-1、試験番号[AS1-DSM15-041]；CTD：4.2.3.5.1-2、試験番号[AS1-GLP16-011]）
（CTD：4.2.3.5.3-1、試験番号[AS1-GLP17-009]）

ギボシランの 3～100 mg/kg を投与した毒性試験（試験番号 AS1-NCD14-018：[表 2.6.5.3C]参照）及び500～2000 mg/kg を投与したラット骨髄小核試験（試験番号 AS1-NCD14-017：[表 2.6.7.9-1]参照）での単回 SC 投与後のギボシラン血漿 TK を評価した。これらの試験の TK パラメータを表 2.6.4.3-11 に示した。他の試験と同様に T_{max} は 0.5～1.5 時間であり、迅速な吸収を示した。C_{max} はほとんどの投与群でほぼ投与量比例性を示した。AUC は、1000 mg/kg 投与以下のすべての投与群で投与量比を上回る増加を示し、1000～2000 mg/kg 投与群ではほぼ投与量比例性を示した。見かけの $t_{1/2}$ は一定の値を示さず 0.9～6.3 時間であった。高投与量における平均 $t_{1/2}$ の増加は、低投与量における定量での LLOQ の影響によるものと考えられ、投与量に関連した PK の変化を反映したものではないと考えられる。

表 2.6.4.3-11 単回 SC 投与後のラットにおけるギボシラン平均血漿トキシコキネティクス

試験番号	AS1-NCD14-018				AS1-NCD14-017		
投与量（mg/kg）	3	10	30	100	500	1000	2000
T_{max}（h）	0.8	0.8	1.0	1.5	0.5	0.5	0.5
C_{max}（µg/mL）	0.85	3.59	10.4	18.5	103	169	275
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（µg·h/mL）	1.09	4.25	17.1	65.5	522	1740	3490
$t_{1/2}$（h）	0.9	1.5	1.1	1.3	6.3	1.8	6.0

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、AS1-NCD14-018 試験では雌雄を合計した平均値を示し、AS1-NCD14-017 試験では平均値を示す。

ラットに 10、30、100 又は 300 mg/kg を週に 1 回、5 回 SC 投与したギボシランの血漿 TK を、最終（5 回）投与後、評価した（試験番号 AS1-NCD14-001：[表 2.6.7.6-1]参照）。ギボシランは 10 及び 30 mg/kg 投与群では 168 時間まで、100 及び 300 mg/kg 投与群ではそれぞれ投与後 336 及び 672 時間（最終採取時間）までの血漿中で定量可能であった。すべての投与群で、血漿中ギボシランの最高濃度到達時間（T_{max}）は 0.5～1 時間であった。血漿 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$はすべての投与群で投与量比を上回る増加を示した（表 2.6.4.3-12：試験番号 AS1-NCD14-001：[表 2.6.7.6-1]参照）。$t_{1/2}$ は短く投与群全体で一定で 1.6～4.0 時間であった。

表 2.6.4.3-12 反復 SC 投与（週に 1 度 5 回投与）後のラットにおけるギボシランの平均血漿 TK パラメータ

投与量（mg/kg）[a]	10	30	100	300
T_{max} (h)	0.5	1.0	1.0	0.5
C_{max} (µg/mL)	1.40	8.78	39.8	119
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	7.36	36.4	320	1134
$t_{½}$ (h)	1.6	1.7	4.0	2.5

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
a n=2／投与群／時点
出典：試験番号 AS1-NCD14-001

ラットに 3、10 又は 30 mg/kg を投与した 13 週間 GLP 毒性試験（週に 1 回 14 週間 SC 投与）でギボシランの血漿 TK を評価した（試験番号 AS1-NCD14-010：[表 2.6.7.7-1]参照）。100 mg/kg を単回 SC 投与した投与群が含まれている。Day1 及び Day92（最終投与）に採取した血漿を分析した。平均血漿 TK パラメータを表 2.6.4.3-13 に示す。総じて、本試験で得られた TK プロファイルとパラメータは用量設定（DRF）試験に類似していた。すべての投与群で、血漿中ギボシランの T_{max} は 0.5～1 時間であった。血漿 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は、最初の投与と最後の投与で投与量比を上回る増加を示した。$t_{1/2}$ は短く投与群全体で一定で 1.1～2.9 時間であった。

表 2.6.4.3-13 反復 SC 投与（週に 1 回、14 回投与）後のラットにおけるギボシランの平均血漿 TK パラメータ

試験日	1				92		
投与量（mg/kg）	3	10	30	100	3	10	30
T_{max} (h)	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
C_{max} (µg/mL)	0.330	0.913	5.79	19.7	0.489	1.24	6.31
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	0.681	1.97	11.9	82.6	0.794	3.72	25.2
$t_{½}$ (h)	1.1	1.4	NC	1.4	NC	2.9	2.8

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；NC=計算せず；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
a 値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=2／性／時点）。
出典：試験番号 AS1-NCD14-010

ラットに 10、50 又は 150 mg/kg を投与した 13 週間 GLP 毒性試験（月に 1 回 4 ヵ月 SC 投与）でギボシランの血漿 TK を評価した（試験番号 AS1-GLP16-022：[表 2.6.7.7-2]参照）。Day1 及び Day85 に採取した血漿を分析した。平均血漿 TK パラメータを表 2.6.4.3-14 に示す。すべての投与群で、血漿中ギボシランの T_{max} は 1～2 時間であった。血漿 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は、すべての投与群の最初と最後の投与において、投与量比を上回る増加を示した。

表 2.6.4.3-14 反復 SC 投与（月に 1 回、4 回投与）後のラットにおけるギボシランの平均血漿 TK パラメータ

試験日	1			85		
投与量（mg/kg）	10	50	150	10	50	150
T_{max} (h)	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0
C_{max} (μg/mL)	1.14	12.3	46.3	0.711	8.56	30.4
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·h/mL)	2.77	40.5	199	2.83	52.3	295

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=3／性／時点）。
出典：試験番号 AS1-GLP16-022

ラットに 3、10 又は 30 mg/kg を週に 1 回 26 週間 SC 投与した GLP 長期反復投与毒性試験（全 27 回投与）でギボシランの血漿 TK を評価した（試験番号 AS1-GLP15-022：[表 2.6.7.7-3]参照）。血漿 TK パラメータを表 2.6.4.3-15 に示す。SC 投与後ギボシランは Day1 及び Day183 において T_{max} が 0.5～1 時間と迅速に吸収された。ギボシランの曝露（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$）は Day1 及び Day183 とも 3～30 mg/kg で投与量依存的に増加した。

表 2.6.4.3-15 反復 SC 投与（週に 1 度 27 回投与）後のラットにおけるギボシランの平均血漿 TK パラメータ

	Day1		
投与量（mg/kg）	3	10	30
T_{max}（h）	0.5	1.0	1.0
C_{max}（μg/mL）	0.318	1.58	6.34
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/mL）	0.413	2.50	11.2
	Day183		
投与量（mg/kg）	3	10	30
T_{max}（h）	0.5	0.5	1.0
C_{max}（μg/mL）	0.378	0.849	5.35
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/mL）	0.803	3.69	24.5
$t_{1/2}$（h）	2.1	3.1	3.1

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=2／性／時点）。
出典：試験番号 AS1-GLP15-022

胚・胎児発生に関する（EFD）試験における DRF 試験（試験番号 AS1-DSM15-041：[表 2.6.7.11-1]参照）及び EFD 主試験（試験番号 AS1-GLP16-011：[表 2.6.7.12-1]参照）において、妊娠ラットに反復 SC 投与後のギボシランの血漿 TK を評価した。

DRF 及び EFD 試験において、雌性ラットにギボシランの 10、30 又は 100 mg/kg を交配前 22 日、15 日、8 日及び 1 日に（週に 1 回）4 回 SC 投与した（試験番号 AS1-DSM15-041：[表 2.6.7.11-1]参照）。妊娠（DG）推定 6 日から DG17 日まで動物に 0、1.5、5 又は 16.5 mg/kg/day を 1 日 1 回投与した。血漿 TK パラメータを表 2.6.4.3-16 に示す。母動物の血漿中 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は試験したすべての投与量で投与量比をわずかに上回る増加を示した。

表 2.6.4.3-16 妊娠 Sprague Dawley ラットに反復 SC 投与（4 回投与、週に 1 回及び 1 日 1 回 12 回投与）後のギボシランの母動物の平均血漿 TK パラメータ

投与群 [a] （妊娠前：妊娠）	10 mg/kg/week： 1.5 mg/kg/day	30 mg/kg/week： 5 mg/kg/day	100 mg/kg/week： 16.5 mg/kg/day
T_{max} (h)	2.0	1.0	1.0
C_{max} (µg/mL)	0.0587	0.183	0.770
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	0.306	1.46	10.0
$t_{½}$ (h)	NR	6.63	5.22

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；NR=報告不能；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間

a 100 mg/kg において n=6 又は 4。

出典：試験番号 AS1-DSM15-041

EFD 試験で、妊娠ラットに反復 SC 投与したときのギボシランの血漿 TK を評価した（試験番号 AS1-GLP16-011：[表 2.6.7.12-1]参照）。ギボシランの 0、3、10 又は 30 mg/kg を交配前 22 日、15 日、8 日及び 1 日に 4 回投与（週に 1 回）した。DG 推定 6 日から DG17 日まで動物に 0、0.5、1.5 又は 5 mg/kg を 1 日 1 回投与した。1 日 1 回 SC 投与したとき、ギボシランの全身曝露は 5 mg/kg の DG17 日のみ観察され、C_{max} は 0.340 µg/mL、$AUC_{0\text{-}24}$ は 1.64 µg·h/mL であった。

ラットにおける出生前／出生後の発生に関する試験においてギボシランの血漿の TK を評価した（試験番号 AS1-GLP17-009：[表 2.6.7.14-1]参照）。ギボシランの 3、10 及び 30 mg/kg を全 6 回投与した。母動物の血液を授乳（LD）12 日において乳汁採取の後に投与後 2 時間に採取した。出産後 12 日に母動物投与後約 2 時間の F_1 世代の出生児から血液試料を採取した。3、10 及び 30 mg/kg 投与したとき、母動物の平均血漿中濃度は、投与量比をわずかに上回る増加を示し、それぞれ 95.5、435 及び 2712 ng/mL であった。すべての投与量で出生児からはギボシランは検出されなかった。

2.6.4.3.2.3 ウサギにおけるギボシランの血漿トキシコキネティクス

（CTD：4.2.3.5.2-1、試験番号[AS1-DSM16-012]）

（CTD：4.2.3.5.2-2、試験番号[AS1-GLP16-018]）

DRF 及び EFD 試験において、妊娠ウサギに反復 SC 投与（試験番号 AS1-DSM16-012：[表 2.6.7.11-1]参照）しギボシランの血漿 TK を評価し、EFD 試験においてもギボシランの TK を評価した（試験番号 AS1-GLP16-018：[表 2.6.7.13-1]参照）。

DRF 及び EFD 試験（試験番号 AS1-DSM16-012：表 2.6.7.11-1 参照）において、ギボシランの 3～30 mg/kg を DG7 日から DG19 日まで 1 日 1 回 SC 投与した妊娠ウサギのギボシラン血漿 PK を評価した。母動物血漿中ギボシラン TK パラメータの平均値（±SD）を表 2.6.4.3-17 にまとめた。DG7 日及び DG19 日のすべての投与群で、母動物の血漿中ギボシラン濃度は測定可能であった。1 日 1 回投与したとき、母動物のギボシラン血漿濃度の明らかな蓄積はみられなかった。母動物におけるギボシラン血漿曝露は、3～10 mg/kg/day 投与において、ほぼ投与量比例性を示したが、10～30 mg/kg/day 投与では投与量比を上回る増加を示した。

表 2.6.4.3-17 妊娠ニュージーランド白ウサギに DG7 日から DG19 日まで 1 日 1 回 SC 投与後におけるギボシランの母動物血漿 TK パラメータ（平均値±SD）

試験日	DG7			DG19		
投与群[a]（mg/kg/day）	3	10	30	3	10	30
T_{max}[b]（h）	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	2.0
C_{max}（μg/mL）	0.207 (0.0351)	0.791 (0.153)	4.85 (2.79)	0.172 (0.0256)	0.515 (0.0420)	4.52 (1.24)
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/mL）	1.03 (0.0570)	4.04 (0.477)	27.4 (10.864)	0.864 (0.0986)	3.42 (0.320)	29.6 (5.824)
$t_{1/2}$（h）	NR	NR	NR	NR	NR	16.7[b]

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max}における最高血漿中濃度の実測値；DG=妊娠日；n=動物数；NR=パラメータを算出するための値が不十分なため報告不能；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間；SD=標準偏差

a DG7 から DG19 までギボシランを毎日投与。

b n=2

出典：試験番号 AS1-DSM16-012

ウサギにおける EFD 試験（試験番号 AS1-GLP16-018 : [表 2.6.7.13-1]参照）において、0.5～5 mg/kg の投与量で DG7 日から DG19 日まで 1 日 1 回 SC 投与した妊娠ウサギのギボシラン血漿 TK を評価した。1 群には、DG7 日にギボシランの 20 mg/kg を単回 SC 投与した。

母動物のギボシラン血漿 TK パラメータを表 2.6.4.3-18 にまとめた。SC 投与後、ギボシランは迅速に吸収され、平均 T_{max} は 1.3～2.0 時間であった。ギボシラン平均血漿濃度は、同様の単回投与に比べると反復投与もおおむね類似していたことから、1 日 1 回投与しても蓄積性はないことを示している。ギボシランの母動物における血漿平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$で評価した曝露は、DG7 日において 1.5～20 mg/kg の投与量では、投与量にほぼ比例した増加を示し、DG19 日において 1.5～5 mg/kg の投与量では投与量比をわずかに上回る増加を示した。1.5～5 mg/kg 反復投与したとき、母動物の血漿ギボシランは蓄積性を示さなかった。

表 2.6.4.3-18 DG7 日から DG19 日まで、1 日 1 回 SC 投与後の妊娠ニュージーランド白ウサギにおける母動物ギボシラン血漿 TK パラメータ（平均値±SD）

試験日	DG7				DG19		
投与群[a]（mg/kg/day）	0.5	1.5	5	20[a]	0.5	1.5	5
C_{max}（μg/mL）	NC	0.0996 ±0.0216	0.453 ±N/A	2.99 ±N/A	NC	0.0940 ±0.0196	0.443 ±N/A
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/mL）	NC	NC	2.24 ±N/A	13.5 ±N/A	NC	NC	2.20 ±N/A

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max}における最高血漿中濃度の実測値；DG=妊娠日；N/A=適用外；NC=計算不能；T_{max}=最高濃度到達時間

a 他の投与群は DG7 から DG19 まで、1 日 1 回の投与であったが、DG7 の 20 mg/kg は単回投与である。DG7 から DG19 における 0.5 mg/kg 投与群の血漿中濃度はすべて定量下限未満（BLQ）であった。：非妊娠のウサギ以外は n=3／投与群。

出典：試験番号 AS1-GLP16-018

2.6.4.3.2.4 サルにおけるギボシランの血漿トキシコキネティクス

（CTD：4.2.3.2-7、試験番号[AS1-NCD14-002]；CTD：4.2.3.2-8、試験番号[AS1-NCD14-011]）

（CTD：4.2.3.2-9、試験番号[AS1-GLP15-018]；CTD：4.2.1.3-1、試験番号[AS1-NCD14-019]）

雄性サルに 30、100 又は 300 mg/kg を週に 1 回、5 回 SC 投与し最終投与（5 回目）である Day29 のギボシランの血漿 TK を評価した（試験番号 AS1-NCD14-002：[表 2.6.7.6-1]参照）。ギボシランの初回投与後、30、100 及び 300 mg/kg 投与群でそれぞれ、8、24 及び 48 時間まで血漿中濃度が測定可能であった。すべての投与量群でギボシランの血漿 T_{max} は 0.5～4 時間であった。30～100 mg/kg 投与で血漿 C_{max} はほぼ投与量比例的に増加し、100～300 mg/kg 投与で投与量比を下回る増加を示した（表 2.6.4.3-19：試験番号 AS1-NCD14-002：表 2.6.7.6-1 参照）が、$AUC_{0\text{-}t(last)}$は 30～100 mg/kg 投与で投与量比を上回る増加を示し、100～300 mg/kg 投与でほぼ投与量比例的に増加した。平均 $t_{1/2}$（3.4～5.3 時間）は、初回投与後はすべての投与量群でほぼ一定であった。

週に 1 回、5 回目の SC 投与（Day29）後、ギボシランは 24 時間まで血漿中で定量可能であった。すべての投与量群で血漿中 T_{max} は 1～2 時間であった。血漿中 $AUC_{0\text{-}t(last)}$は 30～100 mg/kg 投与において、投与量比を上回る増加を示し、100～300 mg/kg 投与でほぼ投与量に比例した。5 回目の投与での平均 $t_{1/2}$（4.1～4.8 時間）は、すべての投与量でほぼ一定であり、初回投与後のそれと類似していた。これらのデータはギボシランが時間依存的な TK ではないことを示唆した。Day29 と Day1 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$を比べると、週に 1 回 4 週間 SC 投与したときギボシランの蓄積性はないことが示された（表 2.6.4.3-19：試験番号 AS1-NCD14-002：表 2.6.7.6-1 参照）。

表 2.6.4.3-19 単回及び反復 SC 投与（週に 1 回、5 回投与）したときのサルにおけるギボシラン血漿中 TK（平均値±SD）

試験日	**1**			**29**		
投与量（mg/kg）	30	100	300	30	100	300
T_{max}（h）	1.2 (0.8)	4.0 (0)	4.0 (0)	1.0 (0)	2.0 (0)	1.7 (0.6)
C_{max}（μg/mL）	8.87 (3.01)	28.8 (6.10)	63.3 (5.60)	6.37 (1.93)	27.3 (1.14)	98.7 (8.87)
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/mL）	38.9 (8.83)	230 (83.2)	883 (110)	39.0 (2.05)	273 (10.1)	904 (29.5)
$t_{1/2}$（h）	3.4	NR	5.3	4.1	4.5	4.8

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；NR=報告不能；SD=標準偏差；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間

出典：試験番号 AS1-NCD14-002

サルに 15、50 又は 150 mg/kg を週に 1 回、14 回投与し初回投与と最終投与（14 回目）である Day92 のギボシランの血漿 TK を評価した（試験番号 AS1-NCD14-011：[表 2.6.7.7-4]参照）。これらのデータから算出した TK パラメータを表 2.6.4.3-20 に示す。ギボシランは迅速に吸収され、平均 T_{max} は 0.9～3.3 時間であった。15～150 mg/kg の投与でギボシランの曝露（$AUC_{0\text{-}t(last)}$）は、一般に投与量比を上回る増加を示した。すべての投与群で、週に 1 回の反復投与ではギボシランの蓄積性はみられなかった。平均 $t_{1/2}$ は 1.9～6.1 時間であった。

表 2.6.4.3-20 反復 SC 投与（週に 1 回、14 回投与）したときのサルにおけるギボシランの血漿中 TK（平均値±SD）

試験日	1[a]			92[a]		
投与量（mg/kg）	15	50	150	15	50	150
T_{max}（h）	1.2±0.5	1.3±0.6	1.7±2.0	1.8±0.9	2.5±1.4	3.2±1.3
C_{max}（μg/mL）	2.89±1.10	7.92±2.36	19.5±4.13	3.75±1.55	8.06±1.69	24.2±5.34
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/mL）	12.0±3.14	50.4±9.18	204±52.2	16.3±3.73	72.5±21.2	292±44.5
$t_{½}$（h）	2.7±1.0	4.9±2.5	6.1±3.1	1.9±0.8	3.8±0.5	4.7±1.5

略語： $AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
a n=6（3 匹／性）
出典：試験番号 AS1-NCD14-011

幼若サルに 10～100 mg/kg を週に 1 回 39 週間 SC 投与した長期反復投与毒性試験（全 40 回投与）でギボシランの血漿 TK 及び抗ギボシラン抗体の曝露への影響を評価した（試験番号 AS1-GLP15-018：[表 2.6.7.7-5]参照）。平均血漿 TK パラメータを表 2.6.4.3-21 に示す。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は、ほぼ投与量比例的又はやや投与量比を上回る増加を示した。幼若サルに反復投与したときギボシランの蓄積性はみられなかった。抗ギボシラン抗体陽性の 2 匹の動物の個別の TK パラメータは、抗ギボシラン抗体陰性の動物のそれと類似していた。これらの動物において、血漿中ギボシラン曝露は、抗ギボシラン抗体の存在で影響を受けなかった。

表 2.6.4.3-21 反復 SC 投与（週に 1 回、40 回投与）したときのサルにおける全体的なギボシランの血漿中 TK パラメータ（平均値±SD）

試験日	1			134			274		
投与量（mg/kg）	10	30	100	10	30	100	10	30	100
T_{max}（h）	1.7 ±0.9	1.9 ±0.9	1.7 ±1.5	1.1 ±0.5	1.4 ±0.6	2.1 ±2.0	1.1 ±0.3	1.3 ±0.5	1.3 ±0.6
C_{max}（μg/mL）	1.09 ±0.233	4.73 ±0.937	14.6 ±2.37	1.41 ±0.551	5.35 ±2.02	15.5 ±3.06	1.91 ±0.430	5.98 ±1.95	19.2 ±3.93
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/mL）	4.80 ±1.22	27.7 ±8.08	137 ±33.4	5.76 ±1.27	26.3 ±8.89	166 ±46.7	6.86 ±0.971	28.2 ±5.80	187 ±44.8
$AUC_{0\text{-}24}$（μg·h/mL）	5.44 ±0.823	33.7 ±10.9	153 ±21.2	6.52 ±1.29	31.1 ±8.91	168 ±34.1	7.30 ±0.903	34.3 ±5.49	187 ±44.8
$t_{1/2}$（h）	2.4 ±0.4	2.6 ±0.8	3.7 ±1.0	2.3 ±0.5	3.1 ±0.8	5.5 ±6.8	1.8 ±0.7	3.3 ±1.5	3.4 ±1.1

略語：$AUC_{0\text{-}24}$=投与後 24 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積；$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=12：6 匹／性）。
出典：試験番号 AS1-GLP15-018

ギボシランの心血管系及び呼吸器系への影響を、サルに 150 mg/kg 単回 SC 投与して評価した（試験番号 AS1-NCD14-019：[表 2.6.3.4]参照）。投与後 6 時間及び 24 時間におけるギボシランの血漿中濃度はそれぞれ 6.16～19.1 μg/mL 及び 1.05～3.14 μg/mL であった。24 時間以降の血漿中濃度は定量下限（50 ng/mL）未満であった。

2.6.4.4 分布

ギボシランの分布（血漿たん白結合を含む）の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を表 2.6.4.4-1 に示した。

表 2.6.4.4-1 ギボシランの血漿たん白結合及び分布試験

Alnylam 試験番号	動物種／マトリックス	試験の種類
単回及び反復投与組織内分布		
[AS1-NCD14-005]	マウス	非 GLP、TK、DRF
[AS1-DSM16-003]	マウス	非 GLP、TK
[AS1-GLP17-006]	マウス	非 GLP、TK
[AS1-NCD14-003]	ラット	PK 試験–組織内分布
[AS1-NCD14-018]	ラット	PK 試験–組織内分布
[AS1-DSM17-018]	ラット	放射能標識マスバランス及び QWBA による組織内分布
[AS1-NCD14-001]	ラット	非 GLP、TK、DRF
[AS1-NCD14-010]	ラット	GLP、TK
[AS1-GLP16-022]	ラット	GLP、TK
[AS1-GLP15-022]	ラット	GLP、TK
[AS1-NCD14-007]	サル	PK/PD 試験–組織内分布
[AS1-NCD14-002]	サル	非 GLP、TK、DRF
[AS1-GLP15-018]	サル	GLP、TK
血漿たん白結合		
[AS1-DSM18-008]	マウス、ラット、サル及びヒト血漿	血漿たん白結合
妊娠及び授乳中動物における試験		
[AS1-DSM15-041]	ラット	非 GLP、TK
[AS1-GLP16-011]	ラット	GLP、EFD、TK
[AS1-DSM16-012]	ウサギ	非 GLP、TK、DRF
[AS1-GLP16-018]	ウサギ	GLP、TK

略語：DRF=用量設定；EFD=胚・胎児発生に関する；GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；PD=薬力学；QWBA=定量的全身オートラジオグラフィー；PK=薬物動態；TK=トキシコキネティクス

2.6.4.4.1 血漿たん白結合

（CTD：4.2.2.3-1；試験番号[AS1-DSM18-008]）

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 EMSA を用いて測定した（表 2.6.4.4-2：試験番号 AS1-DSM18-008：[表 2.6.5.6]参照）。ギボシラン濃度 1.0～50 µg/mL で 37°C、1 時間インキュベーションしたとき、血漿たん白結合率はマウス血漿で 91.3%～10.1%、ラット血漿で 93.1%～27.5%、サル血漿で 89.5%～25.9%、ヒト血漿で 91.8%～21.1%であった。試験したすべての動物種で血漿たん白結合は濃度依存的であり、結合率は薬物濃度が増加すると減少した。一般に、血漿たん白結合は動物種を通して類似していた。この血漿たん白結合の非線形性のメカニズムは、高濃度における結合の飽和によるものではないかと考えられる。しかしながら、ヒトに 2.5 mg/kg を SC 投与後の定常状態におけるギボシランの平均血漿 C_{max} は 0.321 µg/mL（試験番号[ALN-AS1-001]参照）であり、この濃度は結合の飽和がみられる濃度よりかなり低い。そのため、血漿たん白結合は、臨床における血漿中濃度においては比較的一定値を保つと予想される。

表 2.6.4.4-2 ギボシランの血漿たん白結合

	平均たん白結合率					
濃度（μg/mL）	**0.5**	**1.0**	**5.0**	**10**	**25**	**50**
マウス	ND	91.3	79.8	61.8	38.1	10.1
ラット	ND	93.1	89.0	78.6	51.6	27.5
サル	ND	89.5	82.7	69.9	43.9	25.9
ヒト	ND	91.8	83.4	71.4	39.2	21.1[a]

略語：ND=試料のレーンの発色が不十分のため測定せず。
a 試料量が不十分ため一つは測定せず、他は n=2。
出典：試験番号 AS1-DSM18-008

2.6.4.4.2 ラットにおける分布

（CTD：4.2.2.2-1：試験番号[AS1-NCD14-003]）

10 mg/kg を単回 SC 投与後 1344 時間までのラットにおける肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、空腸、脳、胸腺、甲状腺、精巣、副腎及び膵臓におけるギボシランの分布を評価した（試験番号 AS1-NCD14-003：[表 2.6.5.5A]参照）。10 mg/kg を単回 IV 又は SC 投与後 1344 時間までの肝臓及び腎臓におけるギボシランの分布比較も行った。肝臓及び腎臓におけるギボシラン濃度を、3 種の反復 SC 投与方法（1 及び 2.5 mg/kg を週に 1 回 8 週間投与：及び 5 mg/kg のローディング投与後 1 mg/kg を週 1 回 7 週間投与［5/1 mg/kg］）における週に 7 回投与のそれぞれの初回投与後 168 時間、及び 8 回目の投与後 672 時間までを含む時点で評価した（試験番号 AS1-NCD14-003：[表 2.6.5.5E]参照）。ギボシランの分布に明らかな性差はみられなかった。

ギボシランは GalNAc と siRNA が結合し肝細胞表面に発現している ASGPR で siRNA の直接な肝細胞特異的な取り込みにより、肝臓に分布するように特にデザインされている。このデザインを考慮すると、ギボシランは、皮下投与（10 mg/kg）したとき主に肝臓に分布する。Alnylam 社の GalNAc conjugate-siRNAs でみられたように、10 mg/kg を単回 SC 投与後、肝臓における曝露は、IV 投与後よりも明らかに高く（表 2.6.4.4-3 及び図 2.6.4.4-1：試験番号 AS1-NCD14-003：[表 2.6.5.5A]及び[表 2.6.5.5E]参照）、このことは SC 投与が（IV 投与に比べて）肝臓への取り込みにより有効であることを示している。SC 投与においてより効果的な肝臓への取り込みは、ASGPR 依存的な肝細胞への取り込みの飽和を避ける可能性のある（IV 投与後の急激な増加よりむしろ）緩徐な血漿中濃度の増加による可能性がある。そのため、IV 急速投与後のより高濃度の血漿中濃度は、血漿からのギボシランの分布が受動的（すなわち、ASGPR 依存的な取り込みではなく）である腎臓におけるギボシランのより高濃度をもたらす結果となった。事実、IV 投与（10 mg/kg）後の肝臓及び腎臓へのギボシランの分布は類似していた一方、SC 投与後のギボシランの肝臓への分布は、実質的に腎臓への分布より多かった（約 4 倍）（表 2.6.4.4-3 及び図 2.6.4.4-2：試験番号 AS1-NCD14-003：[表 2.6.5.5A]及び[表 2.6.5.5E]参照）。

表 2.6.4.4-3 単回 IV 又は SC 投与（10 mg/kg）後のラットにおける全体的なギボシランの肝臓及び腎臓の平均 PK

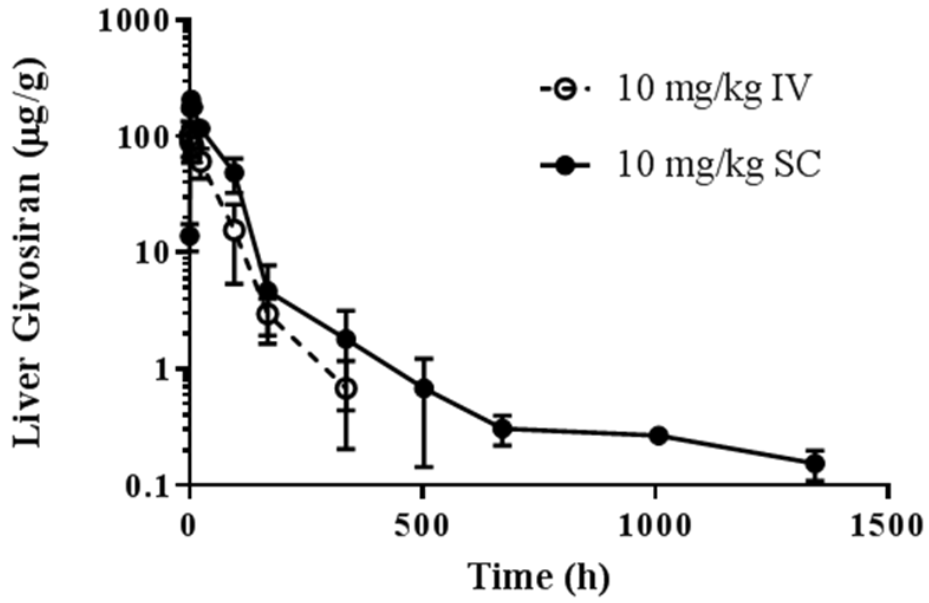
組織	肝臓		腎臓	
投与経路	IV	SC	IV	SC
T_{max}（h）	2.1	4.0	0.3	6.0
C_{max}（µg/g）	102	208	81.0	19.0
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（µg·h/g）	5390	12,600	5440	3190
$t_{1/2}$（h）	55	120	119	172

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；IV=静脈内；SC=皮下；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間

注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=2／性／投与群／時点）。

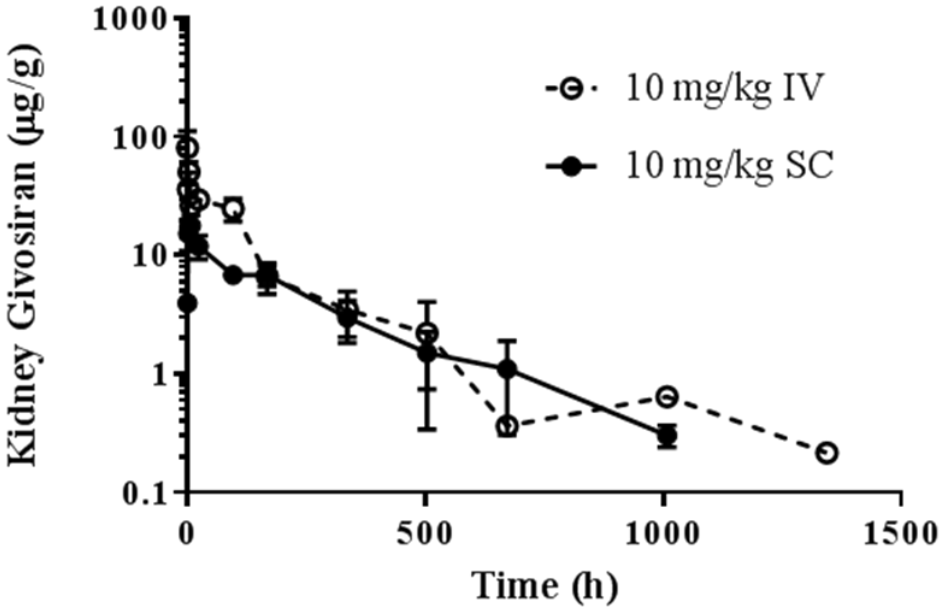
出典：試験番号 AS1-NCD14-003

図 2.6.4.4-1 ラットにおける急速 IV 及び SC 投与（10 mg/kg）したときの肝臓のギボシラン平均濃度時間推移



略語：IV=静脈内；SC=皮下
出典：試験番号 AS1-NCD14-003

図 2.6.4.4-2 ラットにおける急速 IV 及び SC 投与（10 mg/kg）したときの腎臓のギボシラン平均濃度時間推移



略語：IV=静脈内；SC=皮下
出典：試験番号 AS1-NCD14-003

副腎、心臓、肺、脾臓、甲状腺、胸腺、膵臓、空腸及び精巣でギボシランは著しく低濃度（肝臓の 1/100～1/800：腎臓の 1/10～1/70）であった（表 2.6.4.4-4：試験番号 AS1-NCD14-003）。ギボシランは脳では検出されなかった。

表 2.6.4.4-4 10 mg/kg を SC 投与後のラットにおける平均ギボシラン組織中 PK

組織 [a]	副腎		心臓		空腸		肺		膵臓		脾臓		胸腺		甲状腺		精巣
雌雄	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄
T_{max}（h）	4	4	8	4	8	2	4	4	8	4	2	2	4	8	8	8	8
C_{max}（µg/g）	0.44	0.47	0.47	0.37	0.50	0.37	0.58	0.48	1.73	1.17	0.53	0.67	0.28	0.28	0.51	0.52	0.29
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（µg·h/g）	6.56	2.14	8.93	6.99	9.04	6.76	9.76	8.62	28.1	22.2	9.87	9.33	1.64	1.80	9.56	9.34	6.00
$t_{1/2}$（h）	NR	NR	NR	31	NR	NR	25	24	NR	39	32	37	NR	NR	NR	NR	NR

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；NR=報告不能；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間

a n=2／性／投与群／時点

出典：試験番号 AS1-NCD14-003

3 種の投与法で週に 1 回 8 週間投与後の肝臓及び腎臓におけるギボシランの PK パラメータをそれぞれ表 2.6.4.4-5（試験番号 AS1-NCD14-003：[表 2.6.5.5E]参照）及び表 2.6.4.4-6（試験番号 AS1-NCD14-003：[表 2.6.5.5A]参照）に示す。

反復 SC 投与したとき、1～2.5 mg/kg の投与量において肝臓及び腎臓のギボシランの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$はほぼ投与量比例的に増加し、1 又は 5/1 mg/kg 投与の 8 回目の値は類似していた。ラットに単回 SC 投与（10 mg/kg）後の投与量で標準化した C_{max}（1 mg/kg 投与で肝臓及び腎臓それぞれ 20.8 及び 1.90 µg/g）及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$（1 mg/kg 投与で肝臓及び腎臓それぞれ 1259 及び 319 µg·h/g）を比較すると（表 2.6.4.4-3）、ギボシランを週に 1 度反復 SC 投与（1 mg/kg）したとき、肝臓への蓄積性を示す証拠はみられなかった。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 度反復 SC 投与するとギボシランは腎臓に蓄積することが示された。

表 2.6.4.4-5　反復 SC 投与（週に 1 回、8 回投与）後のラットにおける全体的なギボシランの肝臓平均 PK

投与量（mg/kg）	1	2.5	5/1[a]
T_{max}（h）	3	8	6
C_{max}（µg/g）	25.9	65.2	29.8
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（µg·h/g）	1290	3660	1890
$t_{1/2}$（h）	61	57	54

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=2／性／投与群／時点）。
a　5 mg/kg のローディング投与の後 1 mg/kg を週 1 回 7 週間投与（5/1 mg/kg）。
出典：試験番号 AS1-NCD14-003

表 2.6.4.4-6　反復 SC 投与（週に 1 回、8 回投与）後のラットにおける全体的なギボシランの腎臓平均 PK

投与量（mg/kg）	1	2.5	5/1[a]
T_{max}（h）	52	6	8
C_{max}（µg/g）	5.45	14.6	7.98
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（µg·h/g）	1190	2940	1550
$t_{1/2}$（h）	176	174	219

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=2／性／投与群／時点）。
a　5 mg/kg のローディング投与の後 1 mg/kg を週 1 回 7 週間投与（5/1 mg/kg）。
出典：試験番号 AS1-NCD14-003

2.6.4.4.3　ラットの定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）による組織内分布

（CTD：4.2.2.4-6、試験番号[AS1-DSM17-018]）

アンチセンス鎖の 12 番目のアデノシンに放射能標識した[^{3}H]-ギボシラン（図 2.6.4.4-3）を用いてラットにおける QWBA を用いた組織内分布試験を行った（試験番号 AS1-DSM17-018：[表 2.6.5.5C]参照）。この中間位置は、アンチセンス鎖の両端からヌクレアーゼによる開裂の影響を最小にすることを期待して放射能標識部位として選択された。本試験の目的は、1) [^{3}H]-ギボシランのマスバラン

ス及び排泄経路の検討、2) 総放射能の血漿中 PK の特徴付け、3) [^{3}H]-ギボシランの血漿、胆汁、尿及び糞中の代謝プロファイルの決定、4) [^{3}H]-ギボシランの 10 mg/kg を単回 SC 投与後における薬物関連物質の QWBA を用いた組織内分布の検討であった。[^{3}H]-ギボシラン（siRNA の mg 当たり）の比放射能は、264.5 µCi/mg であった。SC 投与液における[^{3}H]-ギボシランの平均比放射能は、50.6 µCi/mg であった。放射能測定前に（試料のすべてを分析に使用しない限り）それぞれの試料をホモジネートした。Ultima Gold XR シンチレーションカクテルを直接試料分析に使用した。すべての試料を、少なくとも 5 分間又は 100,000 カウントまで液体シンチレーションカウンターを用いて放射能濃度を測定した。

図 2.6.4.4-3 [^{3}H]-ギボシランの標識位置



略語 A=アデノシン；C=シチジン；G=グアノシン；GalNAc=N-アセチルガラクトサミン；U=ウリジン：黒丸（OMe）は、2′-*O*-メチル–修飾ヌクレオチドを示す；緑の丸（F）は、2′-フルオロ–修飾ヌクレオチドを示す；黄色い丸（3HAf）はトリチウム（[^{3}H]）-フルオロ-アデノシンを示す；オレンジの線はホスホロチオエート結合を示す

ラットを 3 群に分けた。群の名称、動物数及び目標投与量を表 2.6.4.4-7 に示す。

表 2.6.4.4-7 代謝、排泄、マスバランス及び QWBA を用いた組織内分布の試験デザイン

群	n（雌雄）	目的	投与経路	目標投与量			採取試料
				（mg/kg）	（µCi/kg）	（mL/kg）	
1（無処置）	4（雄）	排泄、マスバランス、代謝物同定	SC	10	500	1	血液、尿、糞、屍体
2（BDC/JVC）	6（雄）	胆汁排泄、代謝物同定	SC	10	500	1	血液、尿、糞、胆汁、屍体
3（無処置）	12（雄）	組織内分布、PK、代謝物同定	SC	10	500	1	血液、QWBA 用屍体

略語：BDC=胆管カニューレ；JVC=頸静脈カニューレ；n=動物数；QWBA=定量的全身オートラジオグラフィー；SC=皮下
出典：試験番号 AS1-DSM17-018

ラット第 1 群は、[^{3}H]-ギボシランの排泄経路（腎臓及び糞）及びマスバランスの検討に用いられた。ラット第 2 群は、胆汁中排泄の検討に用いられ、ラット第 3 群は QWBA を用いた組織内分布の検討に用いられた。3 つの群から得られた血液、血漿及び他の排泄物は、単回 SC 投与後のギボシランの代謝物である可能性がある物質の同定と共に血漿及び全血の PK の理解のために用いられた。

投与溶媒はギボシランの SC 投与に用いる 0.9%塩化ナトリウム溶液であった。投与日に[^{3}H]-ギボシラン溶液（2.20 mL、22.0 mg 当量）にギボシラン溶液 0.417 mL（73.0 mg 当量）と投与溶媒（6.88 mL）を加えた。ラットは夜間（12～16 時間）から投与後約 4 時間絶食した。投与部位をバリカンで剃毛し消えないマーカーで印をつけた。SC 投与は肩甲骨の中間に注射筒と注射針を用いて行った。ギボシランの SC 投与後、決められた時間に、血液、尿、糞、胆汁及び QWBA 用又は放射能分析用の屍体を表 2.6.4.4-8 に示したように採取した。

表 2.6.4.4-8 試料採取の要約

群	血液／血漿 [a]	尿／糞 [b]	胆汁 [b]	屍体	ケージ洗浄液
1[b]	1344 h	投与前、0-6 h、6-12 h、12-24 h 及び 1344 h まで 24 h 間隔	N/A	1344 h	毎日 1320 h まで（ケージを交換しない場合）
2[b]	投与前、6 h、24 h 及び 168 h	投与前、0-6 h、6-12 h、12-24 h 及び 168 h まで 24 h 間隔	投与前、0-6 h、6-12 h、12-24 h 及び 168 h まで 24 h 間隔	168 h	毎日 144 h まで（ケージを交換しない場合）
3[c]	0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、24 h、48 h、96 h、168 h、336 h、672 h 及び 1344 h	N/A	N/A	0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、24 h、48 h、96 h、168 h、336 h、672 h 及び 1344 h	N/A

略語：N/A=適用外

a 1 群から 3 群のラットから採取した血液及び血漿は、放射能測定した。

b 尿、糞及び胆汁はドライアイス上で採取し放射能を測定した。残りの尿、糞及び胆汁は代謝物のプロファイル及び同定のため保存した。

c 屍体はマスバランスの測定のため、総放射能を測定した。

d 屍体は、定量的オートラジオグラフィーにより測定した。

出典：試験番号 AS1-DSM17-018

血液、血漿及び組織の薬物関連放射能の PK パラメータを表 2.6.4.4-9 に示す。[^{3}H]-ギボシランを SC 投与後の放射能は、全時間において限られた数の組織に分布した。ほとんどの組織は投与後 48 時間に C_{max} に到達した。総じて、放射能は主に排泄組織に分布した。

ラットに SC 投与したとき、総放射能の血漿中濃度に対する血液中濃度の比は、通常 1 未満であり、ギボシランの赤血球への分布は、（もしあったとしても）最小限であった。

肝臓、リンパ節、膀胱、胸管及び腎臓を含む組織は、それぞれ高い最高放射能濃度 162、38.2、28.4、17.7 及び 15.2 µg 当量[^{3}H]-ギボシラン／g を示した。低い C_{max} の組織は、前立腺、大腸及び脾臓で、それぞれ 0.691、0.782 及び 0.877 µg·eq./g であった。高い総放射能の $AUC_{0\text{-}t(last)}$ を示した組織は、肝臓、リンパ節及び腎臓で、それぞれ 14200、3690 及び 3340 µg·eq.·h/g であった。肝臓、腎臓及び投与部位を除いて、放射能は、投与後 672 時間ですべての組織から消失した。投与後 1344 時間において、放射能は投与部位で定量可能であった。$AUC_{0\text{-}t(last)}$ を基に算出した薬物由来の放射能の高い血漿に対する組織曝露比は、肝臓、リンパ管及び腎臓で、それぞれ 509、132 及び 120 であった。

表 2.6.4.4-9 [^{3}H]-ギボシランを単回 SC 投与後の雄性 Sprague Dawley ラットから得られた血液、血漿及び組織における放射能の PK パラメータ（第 3 群、10 mg/kg）

試料 [a]	T_{max} (h)	C_{max} (μg·eq./g)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·eq.·h/g)
血液（LSC）	96.0	0.783	229	283
血漿（LSC）	1.00	1.12	197	337
血漿（dry、LSC）	1.00	1.22	181	27.9
血液（QWBA）	1.00	1.16	NC	NR
骨髄	48.0	2.83	NC	577
脳	NR	ND	NR	ND
盲腸	24.0	2.35	NC	NR
腎皮質	48.0	18.6	116	3350
腎髄質	4.00	4.28	NC	200
腎臓	4.00	15.2	171	3340
大腸	4.00	0.782	NC	42.8
肝臓	6.00	162	137	14200
リンパ節	2.00	38.2	NC	3690
膵臓	24.0	1.84	NC	226
脳下垂体	6.00	1.58	NC	NR
前立腺	4.00	0.691	NC	NR
唾液腺	24.0	2.00	NC	459
皮膚（非有色）	0.500	2.04	NC	45.7
脾臓	48.0	0.877	NC	55.8
胸管	2.00	17.7	NC	84.2
甲状腺	24.0	3.08	NC	655
膀胱	4.00	28.4	NC	NR

略語： ^{3}H =トリチウム；$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；eq.=[^{3}H]-ギボシラン当量；LSC=液体シンチレーションカウンター；NC=消失相が明確ではないため計算せず；ND=検出されず（<628 ng·eq.[^{3}H] -ギボシラン／g；NR=定量可能な試料数が 3 未満なため報告不能）；QWBA=定量的オートラジオグラフィー；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：すべての採取時間で放射能が測定不能な組織は本表には示していない。
a QWBA では 1 匹／時点（n=1）。
出典：試験番号 AS1-DSM17-018

2.6.4.4.4 サルにおける分布

（CTD：4.2.2.2-4、試験番号[AS1-NCD14-007]）

雌雄サルの肝臓におけるギボシランの分布を、単回 IV 投与（10 mg/kg）及び／又は SC 投与（0.1、1、5 及び 10 mg/kg）後の 2016 時間まで確認した（試験番号 AS1-NCD14-007：[表 2.6.5.5D]参照）。肝臓中濃度は、3 種の反復 SC 投与方法（1 又は 2.5 mg/kg を毎週 1 回 8 週間：及び 5 mg/kg のローディング投与後 1 mg/kg を週 1 回 7 週間投与［5/1 mg/kg］）における 7 週投与におけるそれぞれの初回投与後 24 時間を含む時点及び投与 8 回目の投与後 1344 時間においても検討した（試験番号 AS1-NCD14-007：[表 2.6.5.5F]参照）。

ギボシラン肝臓中濃度は、単回 IV 投与（10 mg/kg）後 672 時間まで測定可能であった。単回 SC 投与（0.1、1、5 又は 10 mg/kg）後、ギボシラン肝臓中で 168～1008 時間まで検出可能であり、肝臓における最高濃度は投与後 8～24 時間後に観察された。単回 SC 投与（10 mg/kg）後の肝臓における $AUC_{0\text{-}t(last)}$は、同じ投与量の IV における $AUC_{0\text{-}t(last)}$の約 7 倍大きく（表 2.6.4.4-10 及び図 2.6.4.4-4：試験番号 AS1-NCD14-007：[表 2.6.5.5D]及び[表 2.6.5.5F]参照）、このことは肝臓への取り込みは、

IV 投与に比べ SC 投与がより効果的であることを示している。血漿に対する肝臓の AUC 比は約 2500 であり、肝臓における $t_{1/2}$ は血漿より顕著に長かった（約 146 時間）。

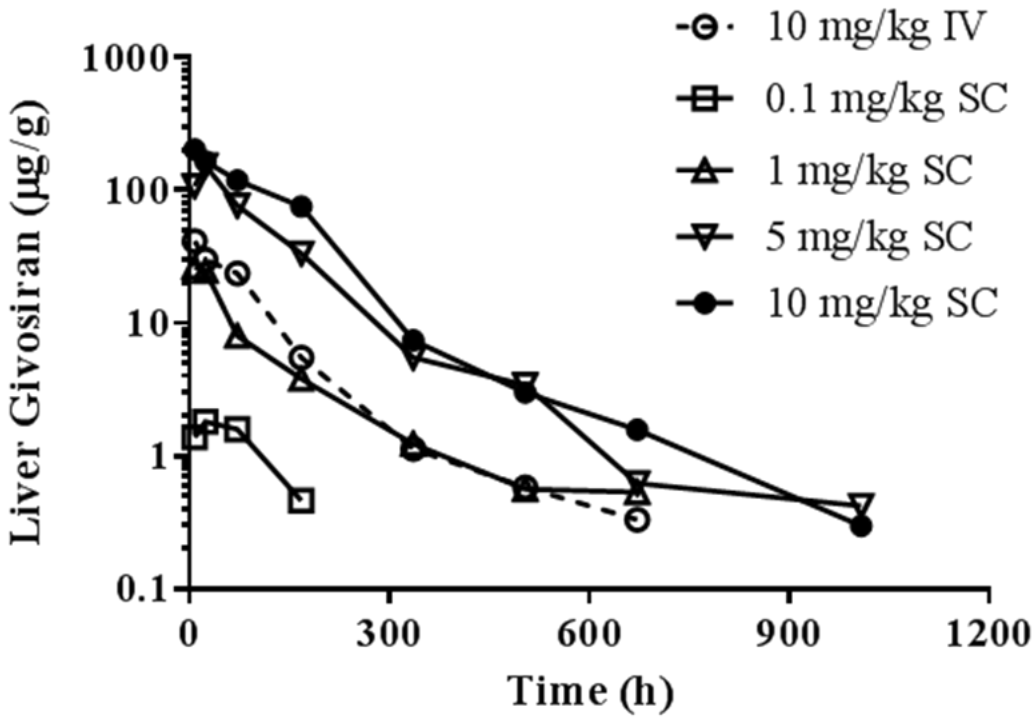
平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は、単回及び反復投与でほぼ投与量比例的に増加した。単回 1 mg/kg 投与に比べて、1 mg/kg を週に 1 回反復投与（8 回投与）又は 5 mg/kg のローディング投与後 1 mg/kg を週に 1 回 7 週間投与後の肝臓の曝露は明らかに顕著な増加はみられず（表 2.6.4.4-11：試験番号 AS1-NCD14-007：[表 2.6.5.5F]参照）、このことは、反復投与しても肝臓での蓄積性は最小限であることを示している。$t_{1/2}$ は投与量及び投与法で一定であり、PK は投与量及び投与時間依存的ではないことを示している。

表 2.6.4.4-10 単回 IV 又は SC 投与後のサルにおける全体的なギボシランの肝臓における平均 PK

投与経路	IV	SC			
投与量（mg/kg）	10	0.1	1	5	10
T_{max}（h）	8.0	24.0	16.0	24.0	8.0
C_{max}（µg/g）	41.5	1.81	28.3	154	204
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（µg·h/g）	4220	212	2540	17,900	28,500
$t_{1/2}$（h）	164	NR	211	167	146

略語： $AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；IV=静脈内；NR=報告不能；SC=皮下；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=1／性／投与群／時点）。
出典：試験番号 AS1-NCD14-007

図 2.6.4.4-4 ギボシランの急速 IV（10 mg/kg）及び SC 投与（0.1～10 mg/kg）後のサルにおける平均肝臓中濃度時間推移



略語：IV=静脈内；SC=皮下
出典：試験番号 AS1-NCD14-007

表 2.6.4.4-11 反復 SC 投与（8 回投与、週に 1 度）後のサルにおける肝臓での平均 PK

投与量（mg/kg）	2.5[a]	5/1[b]	1[a]
T_{max} (h)	24.0	24.0	24.0
C_{max} (µg/g)	64.8	13.9	16.9
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/g)	9080	2650	3340
$t_{1/2}$ (h)	371	236	234

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=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；C_{max}=T_{max} における最高血漿中濃度の実測値；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=1／性／投与群／時点）。
a Day 1、8、15、22、29、36、43 及び 50 に投与。
b Day 1 には 5 mg/kg 投与し、Day 8、15、22、29、36、43 及び 50 には、1 mg/kg 投与。
出典：試験番号 AS1-NCD14-007

2.6.4.4.5 非臨床毒性試験で用いられた動物種におけるギボシランの組織内分布

ギボシランの分布と組織における TK プロファイルを、種々の GLP 及び非 GLP 試験でマウス、ラット、ウサギ及びサルの肝臓及び腎臓また、妊娠ラット及びウサギの胎盤及び胎児組織で検討した。

2.6.4.4.5.1 マウス（近交系ハイブリッドマウス及び野生型 Tg-rasH2 マウス）

（CTD：4.2.3.4.2-1、試験番号[AS1-DSM16-003]）

（CTD：4.2.3.4.2-2、試験番号[AS1-GLP17-006]）

近交系ハイブリッドマウス（BALB/cBy × C57BL/6 F1［1 代雑種］）（遺伝性的背景は、がん原性試験に使用したトランスジェニック Tg-rasH2 ヘミ接合型マウス）におけるギボシランの組織内分布を探索毒性試験で評価した（試験番号 AS1-DSM16-003：[表 2.6.7.10-1]参照）。マウスにギボシランを 30、100 又は 300 mg/kg を週に 1 回 8 週間（計 8 回投与）SC 投与した。週に 1 回、8 回 SC 投与したとき、100 mg/kg 投与群において、肝臓における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$はそれぞれ 283 µg/g 及び 5,530 µg·h/g であった。肝臓の $AUC_{0\text{-}t(last)}$は血漿の値と比較すると、約 80 倍大きかった。腎臓の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は 100 mg/kg 投与群でそれぞれ 116 µg/g 及び 1,310 µg·h/g であった。100 mg/kg 投与群における $AUC_{0\text{-}t(last)}$は、腎臓では肝臓の約 1/4 であり、血漿値の約 20 倍大きかった。

野生型の Tg-rasH2 マウスに 500、1000 又は 1500 mg/kg を月に 1 回 3 回投与した毒性試験でギボシラン及び活性代謝物 AS(N-1)3'ギボシランの分布を評価した（試験番号 AS1-GLP17-006：[表 2.6.7.10-2]参照）。ギボシラン及び活性代謝物 AS(N-1)3'ギボシランの肝臓における曝露は、投与量が 500 から 1500 mg/kg に増加すると共に大きくなったが、増加量は投与量比を下回った。肝臓における AS(N-1)3'ギボシラン濃度はギボシランの約 30%であった（表 2.6.4.4-12）。

表 2.6.4.4-12 ギボシランを SC 投与（週に 1 回投与、8 回目）後（58 日）の肝臓におけるギボシラン及び AS(N-1)3'ギボシラン濃度（全体的な平均値±SD）

投与量（mg/kg）	ギボシラン（µg/g）	AS(N-1)3'ギボシラン（µg/g）
500	278±87.9	94.1±23.3
1000	391±156	113±29.6
1500	521±54.1	138±22.3

略語：AS(N-1)3'=アンチセンス鎖 3'末端からヌクレオチド 1 個が失われた（代謝物）
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す。
出典：試験番号 AS1-GLP17-006

2.6.4.4.5.2 マウス（CD-1）

（CTD：4.2.3.2-1、試験番号[AS1-NCD14-005]）

雄性 CD-1 マウスに 30、100 又は 300 mg/kg を週に 1 回、5 回 SC 投与したギボシランの組織内分布を、最終（5 回）投与後評価した（試験番号 AS1-NCD14-005：[表 2.6.7.6-1]参照）。肝臓中ギボシラン濃度は週に 1 回、5 回 SC 投与後、336～672 時間（最終試料採取時間）まで測定可能であった。肝臓における平均 TK パラメータを表 2.6.4.4-13 に示す。平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は投与量比を下回る増加を示し、平均 $t_{1/2}$ は 37～61 時間であった。腎臓においては、ギボシラン濃度は週に 1 回、5 回 SC 投与後、672 時間（最終試料採取時間）まで測定可能であった。30～300 mg/kg において平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は投与量比を上回る増加を示し、平均 $t_{1/2}$ は 125～347 時間であった（表 2.6.4.4-13）。

表 2.6.4.4-13　反復投与（週に 1 回、5 回投与）後の肝臓及び腎臓における平均ギボシラン TK パラメータ

組織	肝臓			腎臓		
投与量（mg/kg）	30	100	300	30	100	300
T_{max}（h）	8.0	24.0	24.0	2.0	0.5	1.0
C_{max}（μg/g）	202	285	595	19	143	1039
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/g）	15,900	33,400	64,800	1400	9660	39,100
$t_{1/2}$（h）	37	43	61	125	NR	347

略語： $AUC_{0\text{-}t(last)}$=最終濃度測定可能時点までの組織中濃度-時間曲線下面積；C_{max}=T_{max} における最高組織中濃度の実測値；NR=報告不能；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：TK パラメータはそれぞれの組織の濃度-時間の平均値（各時点 n=3）から算出した。
出典：試験番号 AS1-NCD14-005

2.6.4.4.5.3　ラット

（CTD：4.2.2.2-3、試験番号[AS1-NCD14-018]；CTD：4.2.3.2-3、試験番号[AS1-NCD14-001]）
（CTD：4.2.3.2-4、試験番号[AS1-NCD14-010]；CTD：4.2.3.2-5、試験番号[AS1-GLP16-022]）
（CTD：4.2.3.2-6、試験番号[AS1-GLP15-022]；CTD：4.2.3.5.1-1、試験番号[AS1-DSM15-041]）
（CTD：4.2.3.5.1-2、試験番号[AS1-GLP16-011]）

ラットに 30～300 mg/kg を単回 SC 投与したときのギボシランの肝臓及び腎臓における組織内分布を評価した（表 2.6.4.4-14 及び表 2.6.4.4-15：試験番号 AS1-NCD14-018、[表 2.6.5.5B]参照）。ラットでの肝臓及び腎臓におけるギボシランの曝露は、投与量増加と共に増加した。

表 2.6.4.4-14　単回投与後のラットにおける全体的なギボシランの肝臓における平均 PK

投与量（mg/kg）	3	10	30	100
T_{max}（h）	8.0	4.0	5.0	8.0
C_{max}（μg/g）	75.6	379	634	2237
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/g）	4440	29,200	39,700	161,000
$t_{1/2}$（h）	39.1	60.3	67.3	47.4

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=最終濃度測定可能時点までの組織中濃度-時間曲線下面積；C_{max}=T_{max} における最高組織中濃度の実測値；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=2／性／投与群／時点）。
出典：試験番号 AS1-NCD14-018

表 2.6.4.4-15　単回投与後のラットにおける全体的なギボシランの腎臓における平均 PK

投与量（mg/kg）	3	10	30	100
T_{max}（h）	12.1	14.0	49.0	6.0
C_{max}（μg/g）	8.27	13.7	24.2	522
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/g）	715	1670	2510	48,700
$t_{1/2}$（h）	119	66.9	NR	81.1

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=最終濃度測定可能時点までの組織中濃度-時間曲線下面積；C_{max}=T_{max} における最高組織中濃度の実測値；NR=報告不能；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=2／性／投与群／時点）。
出典：試験番号 AS1-NCD14-018

ラットに 10、30、100 又は 300 mg/kg を週に 1 回、5 回 SC 投与したギボシランの肝臓及び腎臓における組織内分布を評価した（試験番号 AS1-NCD14-001：[表 2.6.7.6-1]参照）。肝臓では最終 SC 投与後、504 時間までギボシランが定量可能であった 10 mg/kg 投与群を除いて、ギボシランは 672 時間（最終試料採取時間）まで測定可能であった。肝臓における平均 TK パラメータを表 2.6.4.4-16 に示す。平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は投与量比とほぼ同じかやや下回る増加を示し、平均 $t_{1/2}$ は 66～107 時間と長い消失を示した。300 mg/kg 投与群で 5 回投与 24 時間後のギボシランの肝臓における平均濃度は、初回投与後 24 時間後の濃度に比べると 2 倍以上であった（表 2.6.4.4-17）。腎臓においては、ギボシラン濃度は週に 1 回、5 回 SC 投与後、672 時間（最終試料採取時間）まで測定可能であった。平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は投与量比を上回る増加を示し、平均 $t_{1/2}$ は 82～204 時間と長い消失を示した。5 回投与 24 時間後のギボシランの腎臓における平均濃度は、試験したすべての投与量で初回投与後 24 時間後の濃度に比べると約 2～3 倍高く、報告された $t_{1/2}$ に一致して、反復投与したときわずかな蓄積性があることが示された。

表 2.6.4.4-16 反復 SC 投与（週に 1 回、5 回投与）後の肝臓及び腎臓におけるラットの平均ギボシラン TK

組織	肝臓				腎臓			
投与量（mg/kg）	10	30	100	300	10	30	100	300
T_{max}（h）	24	24	24	24	24	24	24	24
C_{max}（μg/g）	94	362	597	1550	14.7	72.5	443	1082
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（μg·h/g）	8750	37,000	77,100	211,000	2840	11,100	59,000	248,000
$t_{1/2}$（h）	66	70	74	107	204	162	82	NR

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=最終濃度測定可能時点までの組織中濃度-時間曲線下面積；C_{max}=T_{max} における最高組織中濃度の実測値；NR=報告不能；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：n=2／投与群／時点
出典：試験番号 AS1-NCD14-001

表 2.6.4.4-17 反復 SC 投与（週に 1 回、5 回投与）後（Day1 及び Day29 の 24 時間後）の肝臓及び腎臓における平均ギボシラン濃度

濃度（μg/g）				
組織	肝臓		腎臓	
投与量（mg/kg）	Day 1	Day 29	Day 1	Day 29
10	92.4	93.9	6.31	14.7
30	220	362	26.0	72.5
100	455	597	137	443
300	689	1550	363	1080

注：n=2／投与群／時点
出典：試験番号 AS1-NCD14-001

ラットに 3、10 又は 30 mg/kg を週に 1 回、14 回 SC 投与したギボシランの肝臓及び腎臓における組織内分布を評価した（試験番号 AS1-NCD14-010：[表 2.6.7.7-1]参照）。肝臓及び腎臓の試料は最終投与後分析した。最終投与（Day92）後、すべての投与群で、腎臓におけるギボシラン濃度は投与後 56 日（1344 時間、最終試料採取時間）まで測定可能であったが、肝臓におけるギボシラン濃度は

投与後 7 日（168 時間）～42 日（1008 時間）まで測定が可能であった。30 mg/kg 投与群の肝臓を除いて、平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は投与量に依存して増加した（表 2.6.4.4-18）。

表 2.6.4.4-18 ラットにおける最終投与（Day92、週に 1 回、14 回 SC 投与）後の肝臓及び腎臓における平均ギボシラン TK パラメータ

組織	肝臓			腎臓		
投与量（mg/kg）	3	10	30	3	10	30
T_{max}（h）	4	8	4	8	8	4
C_{max}（µg/g）	72.1	226	356	19.5	24.4	126
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（µg·h/g）	3360	22,000	18,800	7370	16,000	40,800
$t_{1/2}$（h）	25	NR	426	274	493	492

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=最終濃度測定可能時点までの組織中濃度-時間曲線下面積；C_{max}=T_{max} における最高組織中濃度の実測値；NR=報告不能；$t_{1/2}$=消失半減期；T_{max}=最高濃度到達時間
注：TK パラメータは雌雄を合計した濃度-時間の平均値（n=2／性／投与群／時点）から算出した。
出典：試験番号 AS1-NCD14-010

ラットに 10、50 又は 150 mg/kg を月に 1 回、4 回 SC 投与したギボシランの肝臓及び腎臓における組織内分布を評価した（試験番号 AS1-GLP16-022：[表 2.6.7.7-2]参照）。肝臓及び腎臓の試料は最終投与後分析した。腎臓の平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は投与量比を上回る増加を示したが、肝臓ではほぼ投与量比例性を示した（表 2.6.4.4-19）。

表 2.6.4.4-19 ラットにおける最終投与（Day85、月に 1 回、4 回 SC 投与）後の肝臓及び腎臓における全体的な平均ギボシラン TK パラメータ

組織	肝臓			腎臓		
投与量（mg/kg）	10	50	150	10	50	150
T_{max}（h）	8	24	24	24	8	8
C_{max}（µg/g）	297	1130	3930	24.8	352	1230
$AUC_{0\text{-}t(last)}$（µg·h/g）	16,600	101,000	293,000	3110	37,200	152,000

略語：$AUC_{0\text{-}t(last)}$=最終濃度測定可能時点までの組織中濃度-時間曲線下面積；C_{max}=T_{max} における最高組織中濃度の実測値；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=3／性／投与群／時点）。
出典：試験番号 AS1-GLP16-022

ラットに 3、10 又は 30 mg/kg を週に 1 回、27 回 SC 投与したギボシランの肝臓及び腎臓における組織内分布を評価した（表 2.6.4.4-20、試験番号 AS1-GLP15-022：[表 2.6.7.7-3]参照）。腎臓のギボシランの曝露は投与量比を上回る増加を示したが、肝臓ではほぼ投与量に比例して増加した。

表 2.6.4.4-20 ラットにおける最終投与（Day183、週に 1 回、26 回 SC 投与）後の肝臓及び腎臓における全体的な平均ギボシラン TK パラメータ

組織	肝臓			腎臓		
投与量（mg/kg）	3	10	30	3	10	30
T_{max}（h）	8	8	16	24	5	24
C_{max}（μg/g）	41.4	208	489	28.7	91.6	931
AUC_{0-24}（μg·h/g）	777	4140	9500	516	1910	15,900

略語：AUC_{0-24}=投与後 24 時間までの組織中濃度-時間曲線下面積；C_{max}=T_{max} における最高組織中濃度の実測値；T_{max}=最高濃度到達時間
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=2／性／投与群／時点）。
出典：試験番号 AS1-GLP15-022

探索的 DRF、EFD 試験（試験番号 AS1-DSM15-041：[表 2.6.7.11-1]参照）及び EFD 試験（試験番号 AS1-GLP16-011：[表 2.6.7.12-1]参照）において、妊娠ラットに反復 SC 投与後の母動物の肝臓及び胎盤へのギボシランの分布を評価した。

DRF、EFD 試験において、雄と交配 22 日、15 日、8 日及び 1 日前にギボシランの 10、30 又は 100 mg/kg を雌性ラットに 4 回（週に 1 回）SC 投与した（試験番号 AS1-DSM15-041：表 2.6.7.11-1 参照）。DG6 から DG17 まで、動物に毎日 0、1.5、5 又は 16.5 mg/kg/day を投与した。母動物の肝臓における平均値（±SD）ギボシラン濃度を表 2.6.4.4-21 にまとめた。毎週投与の最後の投与（DG0）において、最高投与量群（100 mg/kg/wk）での母動物の肝臓におけるギボシラン濃度は、投与量比を下回る増加を示し、ギボシランの肝臓への取り込みの飽和を示した。しかし、低用量のギボシランの毎日投与（1.5～16.5 mg/kg/day）では、母動物の肝臓の DG18 におけるギボシラン濃度は、ほぼ投与量比例的に増加した。胎盤におけるギボシラン濃度は、最高投与量群（100 mg/kg/wk；16.5 mg/kg/day）での動物のみで測定可能であった。胎盤におけるギボシラン濃度（0.293 μg/g）は、対応する母動物の肝臓中濃度（512 μg/g）より明らかに低かった（1/1700）。すべての投与量群の胎児でギボシラン濃度は測定不能であった。

表 2.6.4.4-21 妊娠 Sprague Dawley ラットに反復 SC 投与（週に 1 回、4 回投与、その後毎日 12 回投与）後の母動物の肝臓におけるギボシラン濃度（μg/g）（平均値±SD）

試験日	処置群 [a]（妊娠前：妊娠後）		
	10 mg/kg/wk：1.5 mg/kg/day	30 mg/kg/wk：5 mg/kg/day	100 mg/kg/wk：16.5 mg/kg/day
DG 0	63.9±48.7	164±46.5	421±32.4
DG 18	32.5±3.91	149±69.5	512±32.4

略語：DG=妊娠日；SD=標準偏差
a n= 9／投与群
出典：試験番号 AS1-DSM15-041

EFD 試験（試験番号 AS1-GLP16-011：[表 2.6.7.12-1]参照）では、雄と交配 22 日、15 日、8 日及び 1 日前にギボシランの 0、3、10 又は 30 mg/kg を雌性ラットに 4 回（週に 1 回）投与した。DG6 から DG17 まで、動物に毎日ギボシランの 0、0.5、1.5 又は 5 mg/kg を投与した。試験終了時（DG18）の

母動物の肝臓における平均（±SD）ギボシラン濃度を表 2.6.4.4-22 にまとめた。低投与量から中投与量の投与群では、母動物の肝臓における平均ギボシラン濃度は、投与量比を上回る増加を示し（投与量が 3 倍に対し約 6 倍の増加）、中投与量から高投与量群ではほぼ投与量比例性を示した。胎盤におけるギボシラン濃度は、最高投与量群（30 mg/kg/wk : 5 mg/kg/day）での動物のみで測定可能であり、50%の胎盤で測定可能の濃度であった。胎盤における平均ギボシラン濃度（0.388 µg/g）は、対応する母動物の肝臓中濃度（347 µg/g）より明らかに低かった（約 1/890）。すべての投与量群の胎児でギボシラン濃度は測定不能であった。

表 2.6.4.4-22 妊娠 Sprague Dawley ラットに反復 SC 投与（週に 1 回、4 回投与、その後毎日 12 回投与）後（DG18）の母動物の肝臓におけるギボシラン濃度（µg/g）（平均値±SD）

ギボシラン処置群 （妊娠前：妊娠後）		
3 mg/kg/wk： 0.5 mg/kg/day[a]	**10 mg/kg/wk： 1.5 mg/kg/day[b]**	**30 mg/kg/wk： 5 mg/kg/day[b]**
23.5±9.57	133±23.3	347±218

略語：DG=妊娠日；SD=標準偏差
a n=8
b n=9
出典：試験番号 AS1-GLP16-011

2.6.4.4.5.4 ウサギ

（CTD：4.2.3.5.2-1、試験番号[AS1-DSM16-012]）
（CTD：4.2.3.5.2-2、試験番号[AS1-GLP16-018]）

探索的 DRF、EFD 試験（試験番号 AS1-DSM16-012：[表 2.6.7.11-1]参照）及び EFD 試験（試験番号 AS1-GLP16-018：[表 2.6.7.13-1]参照）において、妊娠ウサギに反復 SC 投与後の母動物の肝臓及び胎盤へのギボシランの分布を評価した。

DRF、EFD 試験（試験番号 AS1-DSM16-012：表 2.6.7.11-1 参照）において、雌性ウサギに DG7 から DG19 まで、ギボシランの 3～30 mg/kg を毎日 SC 投与した。母動物の肝臓におけるギボシラン濃度を表 2.6.4.4-23 にまとめた。3～30 mg/kg/day の投与量範囲での母動物の肝臓におけるギボシラン濃度は、投与量比を上回る増加を示した。胎盤におけるギボシラン濃度は、２つの低投与量群（3 mg/kg/day 及び 10 mg/kg/day）で測定できなかった。ギボシランの 30 mg/kg/day 投与群で、全体の 30%の胎盤で測定可能な濃度であり平均濃度は 442 ng/g であった。

表 2.6.4.4-23 妊娠ニュージーランド白ウサギに DG7 から DG19 まで毎日反復 SC 投与したとき DG19 における母動物の肝臓におけるギボシラン濃度（μg/g）（平均値±SD）

ギボシラン投与量（mg/kg/day）			
0[a]	**3[b]**	**10[b]**	**30[a]**
2.17±1.61	84.3±17.7	894±69.3	4410±875

略語：DG=妊娠日；SD=標準偏差
a n=4
b n=5
出典：試験番号 AS1-DSM16-012

ウサギ EFD 試験（試験番号 AS1-GLP16-018：[表 2.6.7.13-1]参照）において、妊娠ウサギに DG7 から DG19 まで、ギボシランの 0.5～5 mg/kg を毎日 SC 投与した。1 つの群には、DG7 にギボシランの 20 mg/kg を SC 投与した。DG22（最終投与後約 72 時間）における母動物の肝臓、胎盤及び胎児組織のギボシラン濃度を測定した。

DG22 における母動物の肝臓におけるギボシラン濃度を表 2.6.4.4-24 にまとめた。0.5～5 mg/kg/day の範囲の投与量での母動物の肝臓におけるギボシラン濃度は、投与量比を上回る増加を示した。胎盤及び胎児試料ではギボシラン濃度は測定されず、試験した投与量範囲ではギボシランは胎盤を通過しないことを示している。

表 2.6.4.4-24 妊娠ニュージーランド白ウサギに DG7 から DG19 まで毎日反復 SC 投与したとき DG22 における母動物の肝臓におけるギボシラン濃度（μg/g）（平均値±SD）

0.5 mg/kg Daily (DG 7-DG 19)	1.5 mg/kg Daily (DG 7-DG 19)	5 mg/kg Daily (DG 7-DG 19)	20 mg/kg[a] (DG 7)
7.47±1.47	64.6±12.8	562±107	4.51±1.62

略語：DG=妊娠日；SD=標準偏差
a DG7 に 20 mg/kg を単回投与；すべての群で n=3。
出典：試験番号 AS1-GLP16-018

2.6.4.4.5.5 サル

（CTD：4.2.3.2-7、試験番号[AS1-NCD14-002]）
（CTD：4.2.3.2-9、試験番号[AS1-GLP15-018]）

雄性サルに 30、100 又は 300 mg/kg を週に 1 回、5 回 SC 投与し、最終投与（5 回目）後のギボシランの肝臓及び腎臓における組織内分布を評価した（試験番号 AS1-NCD14-002：[表 2.6.7.6-1]参照）。週に 1 回、5 回目 SC 投与後 24 時間における肝臓における平均ギボシラン濃度は、30、100 及び 300 mg/kg 投与でそれぞれ 1943、3504 及び 5699 μg/g であり、肝臓の曝露増加は投与量比を下回る増加を示すことが示された。週に 1 回 5 回目 SC 投与後 24 時間における腎臓における平均ギボシラン濃度は、30、100 及び 300 mg/kg 投与でそれぞれ 25.3、140 及び 242 μg/g であり、曝露増加は 30～100 mg/kg では投与量比を上回る増加を示し、100 から 300 mg/kg では投与量比を下回る増加を示すことが示された。

幼若サルに 10、30 又は 100 mg/kg を週に 1 回、39 週間 SC 投与後のギボシランの肝臓及び腎臓における組織内分布を評価した（試験番号 AS1-GLP15-018：[表 2.6.7.7-5]参照）。

週に 1 回 SC 投与（Day275）及び最終投与から 91 日後（Day365）の幼若サルにおける肝臓及び腎臓中の平均ギボシラン濃度をそれぞれ表 2.6.4.4-25 及び表 2.6.4.4-26 に示す。肝臓及び腎臓の平均ギボシラン濃度は、投与量依存的に増加した。Day275 における肝臓中ギボシラン濃度は、腎臓に比べ 34～54 倍高く、Day365 では 10～100 mg/kg の投与量範囲で肝臓では腎臓に比べて 179～1062 倍高濃度であった。

表 2.6.4.4-25 反復 SC 投与（週に 1 回、40 回投与）後のサルにおける肝臓中ギボシラン濃度（μg/g）（平均値±SD）

投与量（mg/kg）	10	30	100
主試験– Day275			
濃度（μg/g）	497±80.5	2660±585	4770±714
回復期 – Day365			
濃度（μg/g）	53.2±12.0	548±127	808±508

略語：SD=標準偏差
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=3／性／投与群／時点）。
出典：試験番号 AS1-GLP15-018

表 2.6.4.4-26 反復 SC 投与（週に 1 回、40 回投与）後のサルにおける腎臓中ギボシラン濃度（μg/g）（平均値±SD）

投与量（mg/kg）	10	30	100
主試験–Day275			
濃度（μg/g）	9.79±0.857	49.3±5.24	141±7.77
肝臓：腎臓の平均比	50.8	54.0	33.9
回復期–Day365			
濃度（μg/g）	0.297±NC	0.516±0.112	1.53±1.50
肝臓：腎臓の平均比	179	1062	527

略語：NC=算出せず；SD=標準偏差
注：値は、雌雄を合計した平均値を示す（n=3／性／投与群／時点）。
出典：試験番号 AS1-GLP15-018

2.6.4.5　代謝（動物種間の比較）

In vitro 及び *in vivo* 試験で、ギボシランの代謝を評価した。これらの試験を表 2.6.4.5-1 に示す。

表 2.6.4.5-1　ギボシラン代謝試験

Alnylam 試験番号	動物種／マトリックス	試験の種類
[AS1-DSM17-018]	ラット／血漿、尿、胆汁、糞	放射能標識[^{3}H]-ギボシランを用いた代謝プロファイル
[BA14010]	マウス、ラット、サル及びヒト／血漿、血清、肝 S9 画分及び肝臓	*In vitro* 代謝安定性及びプロファイル
[BA17014]	サル／血漿、肝臓、尿 ヒト／血漿、尿	*In vivo* 代謝プロファイル
[AS1-DSM18-015]	ヒト／肝 S9 画分	酸化的代謝に必要なコファクター（NADPH）の有無における *in vitro* 代謝安定性
[redacted]	ヒト／肝ミクロソーム	*In vitro* CYP 阻害
[redacted]	ヒト／ヘパトサイト	*In vitro* CYP 誘導
[AS1-NCD14-001], Subreport [redacted]	ラット／肝ミクロソーム	*Ex vivo* CYP 活性
[redacted]	ラット／肝ミクロソーム	*Ex vivo* CYP 活性
[AS1-NCD14-002], Subreport [redacted]	サル／肝ミクロソーム	*Ex vivo* CYP 活性

略語：^{3}H=トリチウム；CYP=シトクロム P450；NADPH=ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸

2.6.4.5.1　血清及び肝 S9 画分におけるギボシランの *in vitro* における代謝安定性

（CTD：4.2.2.4-1、試験番号[BA14010]）

（CTD：4.2.2.4-2、試験番号[AS1-DSM18-015]）

C57BL/6 マウス、ラット、サル及びヒトのプール血清及び肝 S9 画分における濃度 5 µmol/L でのギボシランの *in vitro* における代謝安定性を評価した（試験番号 BA14010：[表 2.6.5.10A]参照）。反応液を血清及び肝 S9 画分とも 37℃で 24 時間までインキュベーションした。試料は LC/MS で定量した。

血清中のギボシランの安定性は、概して動物種間で類似しており、センス鎖はアンチセンス鎖に比べてより安定であった。マウス、ラット、サル及びヒト血清中でギボシラン（5 µmol/L）を 24 時間インキュベーションしたとき、アンチセンス鎖はそれぞれ約 75%、59%、63%及び 89%残存していた。センス鎖はそれぞれ約 95%、95%、100%及び 95%残存していた。

マウス、ラット、サル及びヒトの肝 S9 画分をギボシラン（5 µmol/L）とインキュベーションしたとき、4 種における安定性を安定順に示すと、両方の鎖ともマウス＞サル＞ヒト＞ラットであった。マウス、サル、ヒト及びラットにおけるアンチセンス鎖の残存パーセントは、それぞれ約 103%、68%、49%及び 36%であり、センス鎖の残存パーセントはそれぞれ約 102%、88%、65%及び 64%であった。

コファクターとして NADPH を必要とする薬物代謝酵素（例えばシトクロム P450［CYPs］）によりギボシランが代謝されるかを検討するために NADPH の有無によるヒト肝 S9 画分を用いた別の *in vitro* 試験（試験番号 AS1-DSM18-015：[表 2.6.5.10B]参照）が行われた。ヒト肝 S9 画分（総たん白質濃度 1 mg/mL）の NADPH（1 mmol/L）の有り無しの条件でギボシラン（10 µmol/L）を 37℃、1 時

間インキュベーションした。ギボシランのセンス鎖及びアンチセンス鎖両方とも安定であり、NADPHの有無で変化はみられなかったことから、ギボシランの代謝に CYP 酵素は関与しないことを示している（表 2.6.4.5-2：試験番号 AS1-DSM18-015 参照：[表 2.6.5.10B]参照）。ヒト肝 S9 画分の機能を確認するためにベラパミル（5 μmol/L）を陽性対照として用いた。

表 2.6.4.5-2 コファクター（NADPH）の有無によるヒト肝 S9 におけるギボシランの *in vitro* 代謝安定性

時間（h）	残存%（平均値±SD）[a]					
	ギボシラン（-NADPH）			ギボシラン（+NADPH）		
	アンチセンス	センス	ベラパミル	アンチセンス	センス	ベラパミル
0	100±2.66	100±2.94	100±7.81	100±3.53	100±7.49	100±7.01
1	104±2.28	97±3.44	88±5.71	98±1.53	96±4.61	33±5.42

略語：-=無：+=有；NADPH=ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸；SD=標準偏差
a n=3
出典：試験番号 AS1-DSM18-015

2.6.4.5.2 ギボシランの代謝プロファイル

ギボシランはアンチセンス鎖とセンス鎖で構成される siRNA 二本鎖である。アンチセンス鎖とセンス鎖の代謝プロファイルを *in vivo* 及び *in vitro* 両方の非臨床試験で得た試料で評価した（試験番号[BA14010]：[表 2.6.5.9A] [*in vivo*]参照、及び[表 2.6.5.10C] [*in vitro*]参照：試験番号[BA17014]：[表 2.6.5.9C]参照）。加えて、第 1 相臨床試験（試験番号[ALN-AS1-001]参照）の代表的な患者の血漿及び尿を、体循環中又は腎臓から排泄されるギボシランの代謝物の同定のために分析した（試験番号[BA17014]：[表 2.6.5.9C]参照）。

2.6.4.5.2.1 アンチセンス鎖の代謝

（CTD：4.2.2.4-1、試験番号[BA14010]；CTD：4.2.2.1-6、試験番号[BA17014]）
（CTD：4.2.2.2-2、試験番号[AS1-DSM18-010]；CTD：4.2.2.2-5、試験番号[AS1-DSM18-009]）
（CTD：4.2.1.1-3、試験番号[BIO18001]）

代謝プロファイルを、*in vitro* 安定性試験で得た血清試料及び *in vivo* 薬物動態試験で採取した血漿試料を用いて検討した（試験番号 BA14010：[表 2.6.5.9A] [*in vivo*]参照、及び[表 2.6.5.10C] [*in vitro*]：試験番号 BA17014：[表 2.6.5.9C]参照）。血清（マウス、ラット、サル及びヒト）又は血漿（ラット及びサル）においても、ギボシランのアンチセンス鎖は、AS(N-1)3'ギボシラン（3'末端から 1 ヌクレオチド 1 個が失われたもの）及び AS(N-1)5'ギボシラン（5'末端からヌクレオチド 1 個が失われたもの）の 2 種の主な代謝物に代謝された。M/S スペクトルから、代謝物 AS(N-1)3'ギボシラン及び AS(N-1)5'ギボシランは、同じ精密質量を持ち、おそらくアンチセンス鎖の 3'又は 5'末端からウリジン一リン酸ヌクレオチドが失われた構造であるあることが示された。特異的 LC-MS/MS 法で、主な代謝物は AS(N-1)3'ギボシランであることが判明した。

2 名の患者から得たヒト血漿及び尿を、代謝物を同定するために分析した。ラット及びサル血漿における代謝物プロファイルと同様に、AS(N-1)3'ギボシランが体循環における主な代謝物であり、ヒト血漿中には他の代謝物は検出されなかった。血漿での情報と一致して、AS(N-1)3'ギボシランが 2

名の患者の尿で検出された唯一の代謝物であった。これらの結果は、ギボシランのアンチセンスの代謝プロファイルは、すべての動物種で類似していることを示した。

AS(N-1)3'ギボシランは、ヒトにギボシランを SC 投与後の薬理活性を持つ主な体循環の代謝物であった。AS(N-1)3'ギボシランの定常状態における AUC（曝露）は、月に 1 回 2.5 mg/kg 投与後ギボシランに対して約 45%であった（試験番号[ALN-AS1-001]参照）。ギボシランを SC 投与後の AS(N-1)3'ギボシランの体循環における曝露は、ギボシランに対してラット（10 mg/kg、試験番号 AS1-DSM18-010：[表 2.6.5.3B]参照）及びサル（30 mg/kg：試験番号 AS1-DSM18-009：[表 2.6.5.3E]参照）でそれぞれ 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、AS(N-1)3'ギボシランの血漿における曝露は、臨床で計画している投与量において、ヒトでの曝露を十分に超えていると期待された。

AS(N-1)5'ギボシランより AS(N-1)3'ギボシランが生成するのは、センス鎖の 3'末端にある GalNAc リガンドの存在による立体障害（すなわち、アンチセンスの 5'末端に近いこと）に起因する可能性がある。このような立体障害は、センス鎖の 3'末端及びそれを補足するアンチセンス鎖の 5'末端のエクソヌクレアーゼ依存的な代謝を阻害する可能性がある。アンチセンス鎖の 5'末端とは対照的にアンチセンス鎖の 3'末端は、単鎖でありそのため 3'エクソヌクレアーゼの分解の影響を受けやすい。

代謝プロファイルを、マウス、ラット、サル及びヒト肝 S9 画分を用いて行い、ギボシランのアンチセンス鎖は、2 種の主な代謝物 AS(N-3)5'ギボシラン（5'末端から 3 ヌクレオチドが失われたもの）及び AS(N-1)3'ギボシランに代謝され、AS(N-3)5'ギボシランが量的に最も多いことが確認された。代謝プロファイルは、試験したすべての動物種で類似していた。しかし、ラット及びサルの PK 試験で採取した肝臓試料で、ギボシランのアンチセンス鎖は、主な代謝物である AS(N-1)3'ギボシランに代謝されることが示された。そのため、肝 S9 画分（*in vitro*）での結果に反して、AS(N-3)5'ギボシランはラット及びサルの肝臓（*in vivo*）では観察されなかった。

ヒト肝癌細胞株 3B（Hep3B）細胞による代謝物 AS(N-1)3'ギボシランの評価で、AS(N-1)3'ギボシランは、*in vitro* における薬理活性を保持していることが示され（試験番号 BIO18001 : [2.6.2.2.1.3]項「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」参照）、このことは、AS(N-1)3'ギボシランが存在することで *in vivo* での薬理効果の拡大に貢献している可能性が考えられる。

2.6.4.5.3 センス鎖の代謝

（CTD：4.2.2.4-1、試験番号[BA14010]）

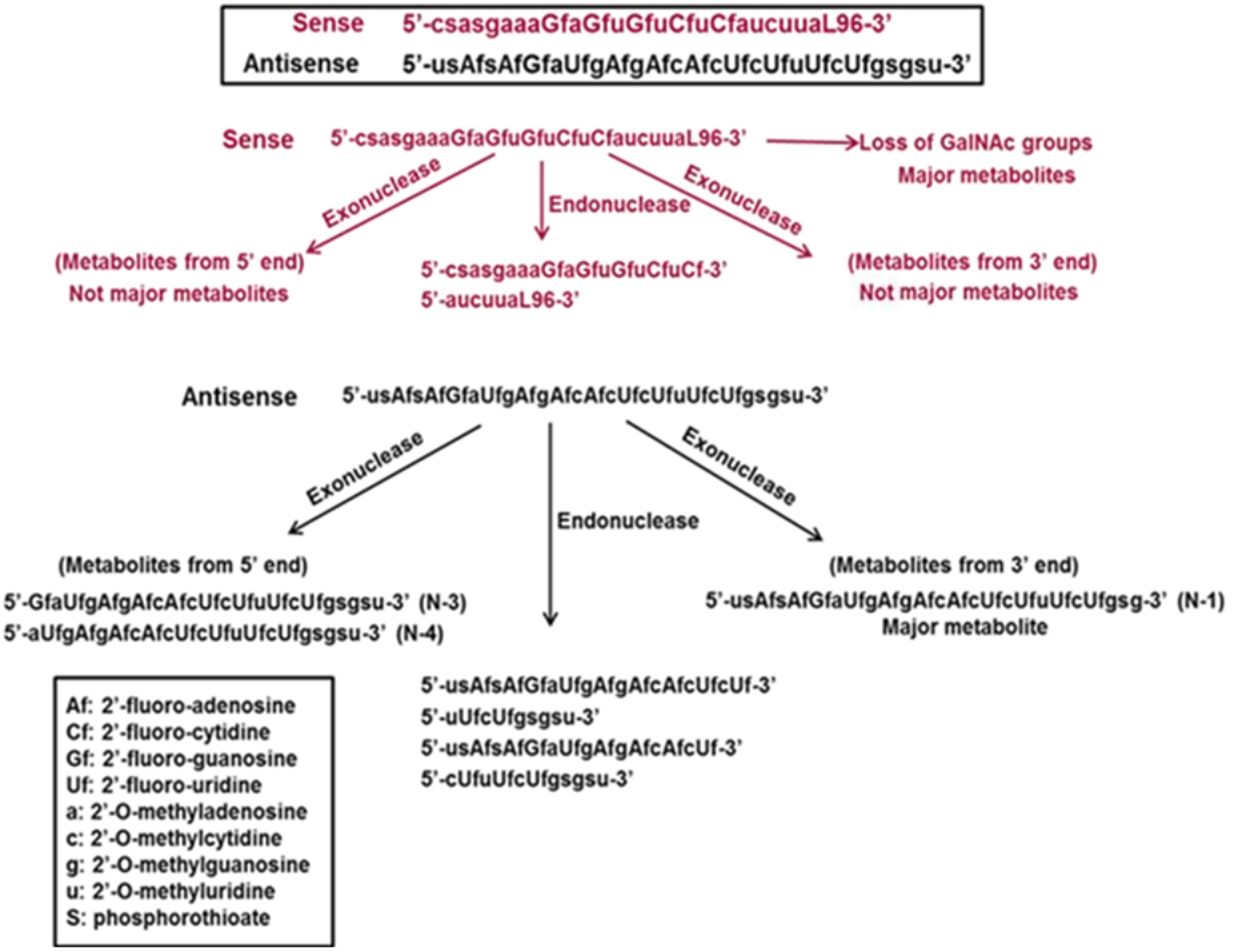
血清（マウス、ラット、サル及びヒト）又は血漿（ラット及びサル）の両方において、ギボシランのセンス鎖は、主に 3'末端の 3 分岐型リガンドから GalNAc グループの 1 つが脱落した代謝物を産生する最小限の代謝を受ける（図 2.6.4.5-1：試験番号 BA14010：[表 2.6.5.11A]参照）。ラット及びサルの血漿でみられたように、GalNAc グループの 1 又は 3 つが欠落したギボシランのセンス鎖が、2 名の患者の血漿及び尿中に検出された。

肝 S9 画分（マウス、ラット、サル及びヒト）における *in vitro* 代謝プロファイル及びラット及びサル肝臓試料における *in vivo* 代謝プロファイルで、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 つ全部が脱落して生成することが示された。GalNAc の脱落は、2 時間の初期の時点で明らかであり、肝臓試料中では 24 時間後には未変化体は存在していなかった。

アンチセンス鎖及びセンス鎖の代謝を特徴付ける収集されたデータは、全体のギボシランの *in vitro* 代謝プロファイルは *in vivo* 試験の試料中でみられること、また、全体のギボシランの代謝プロファイルはヒトを含む試験した動物種で類似していることを示した。

図 2.6.4.5-1 ギボシランの推定代謝経路



2.6.4.5.4 [^{3}H]-ギボシランを SC 投与後のラットにおける代謝物の同定及び代謝プロファイル

（CTD：4.2.2.4-6、試験番号[AS1-DSM17-018]）

無処置及び胆管カニューレ（BDC）したラットに[^{3}H]-ギボシランを単回 SC 投与（10 mg/kg）し、ギボシランの *in vivo* 代謝プロファイルを検討した。血漿、尿及び胆汁を採取し代謝物の同定のために分析した。

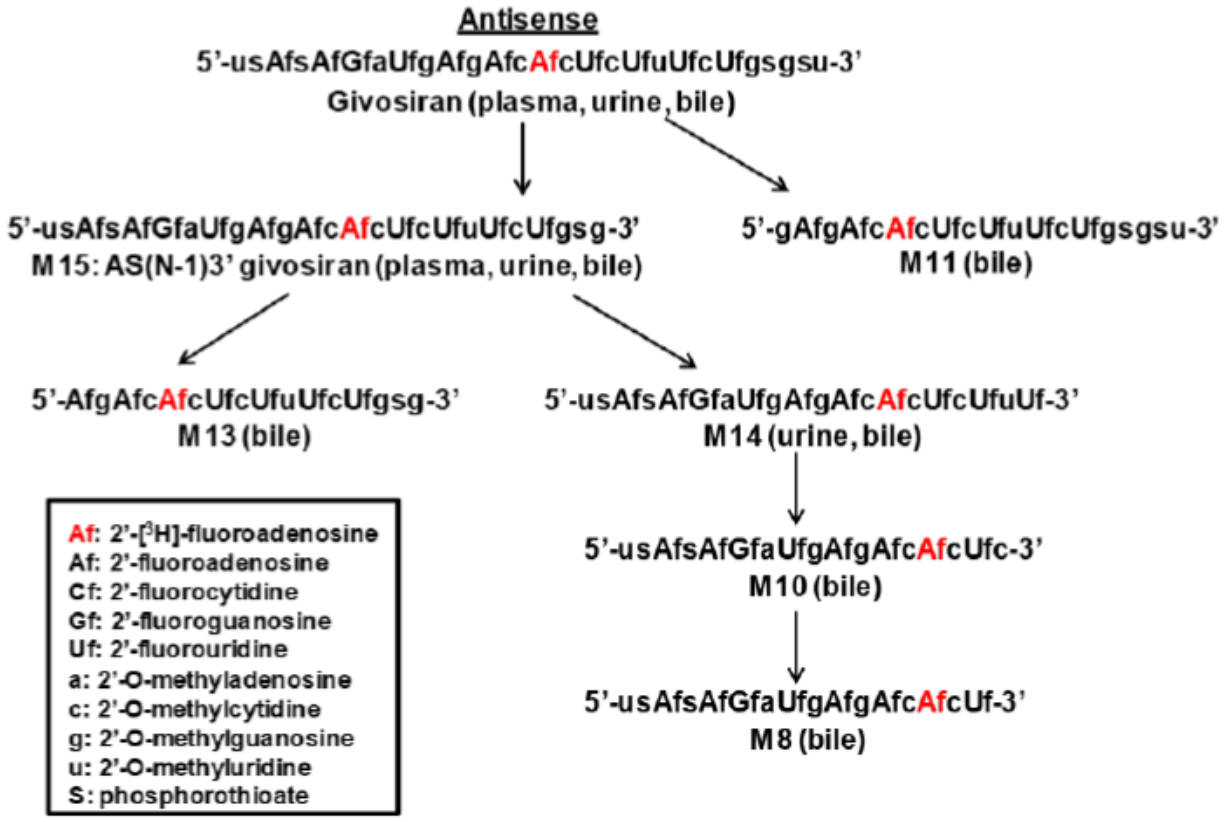
プール血漿試料での AUC のプロファイルにおいて、放射能の主な成分はギボシランの未変化体に関連し、48 時間までの曝露（$AUC_{0\text{-}48}$）を通して総放射能の約 54%とみなされることを示した（試験番号 AS1-DSM17-018：[表 2.6.5.9B]参照）。AS(N-1)3'ギボシラン（M15）は、総放射能曝露の 13.0%である主な体循環している代謝物であった。

尿中の主な放射能は、C18 カラムで分離したときボイドボリュームに溶出することから、それらは極性でより小さいオリゴヌクレオチドの可能性があることが示唆され、無処置及び BDC したラットにおいて、それぞれ投与量の 38.7%及び 18.8%であった。ギボシランの未変化体は、無処置及び BDC ラット両方で尿中から回収され、それぞれ、投与量の 3.38%及び 3.90%であった。AS(N-1)3'ギボシラン（M15）は、無処置及び BDC ラット尿中でそれぞれ 0.971%及び 1.96%であった。胆汁中には、ギ

ボシランの未変化体及び AS(N-1)3'ギボシラン（M15）はそれぞれ投与量の約 6%及び 5%が回収された。糞中ではギボシランの未変化体は回収されなかった。

AS(N-1)3'ギボシラン（M15）に加えてギボシランアンチセンス鎖の 5 つの代謝物が暫定的に同定され、これらの代謝物を図 2.6.4.5-2 に示す（試験番号 AS1-DSM17-018：[表 2.6.5.11B]参照）。これらの代謝物は、3'及び 5'末端から 1 つ又は 2 つのヌクレオチドが開裂して生成したものであった。

図 2.6.4.5-2 ラットにおける[^{3}H]-ギボシランの推定代謝経路



略語：^{3}H=トリチウム

2.6.4.5.5 *in vitro* における CYP 阻害

（CTD：4.2.2.4-3、試験番号[■■■■■■■■]）

プールしたヒト肝ミクロソーム（200 名分）及び CYP 特異的基質を用いて、7 種のヒト CYP アイソフォーム（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5）へのギボシランの直接及び時間依存的な阻害能を評価するための試験を実施した（試験番号■■■■■■■■表 2.6.5.12A]参照）。

ギボシランの直接阻害能を、CYP アイソフォーム特異的基質について、n=3 でギボシランの広い濃度範囲で（0.614 nmol/L［0.01 µg/mL］～613.6 µmol/L［10,000 µg/mL］）で評価した。時間依存的阻害能を、コファクターである NADPH の存在あるいは非存在下でギボシランの種々の濃度を用いて、プレインキュベーションした肝ミクロソームにより評価した。両試験とも適切な陽性コントロールを含んでいた。

ギボシランは、評価したいずれの CYP アイソフォームに対しても直接又は時間依存的な阻害を示さなかった。AS(N-1)3'ギボシランの阻害能は、特に評価しなかった。しかし、類似した物理化学的性質を持つことから、AS(N-1)3'ギボシランは、CYP アイソザイムを阻害するとは考えられない。これらのデータは、ギボシランが CYP アイソフォームの活性を阻害して生じる DDI に介在する可能性は低いことを示唆している。

2.6.4.5.6 *in vitro* における CYP 誘導

（CTD：4.2.2.4-4、試験番号[■■■■■■■■]）

凍結肝細胞及び新鮮な初代ヒト肝細胞を用いて、代表的な主な CYP 酵素 CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 に対するギボシランの誘導能を評価するための試験を実施した（試験番号■■■■■■■■：[表 2.6.5.12B]参照）。ギボシラン濃度を変えて（0.6 nmol/L［0.01 μg/mL］～6.1 μmol/L［100 μg/mL］）肝細胞のサンドイッチ培養プレートで反応させたのち mRNA の変化及び酵素活性両方を評価した。試験には、誘導の適切な陽性及び陰性コントロールを含めた。mRNA の変化は RT-PCR で評価し、CYP 活性の変化は、フェナセチン、ブプロピオン及びミダゾラムのカクテルを用いて測定した。

ギボシランを反応させた肝細胞は、試験した濃度において CYP1A2、CYP2B6 又は CYP3A4 の mRNA 量、又は酵素活性を統計学的に有意に増加させないことを示した。これらの結果から、ギボシランは 100 μg/mL（6.1 μmol/L）又はこれ未満の濃度において、CYP の誘導能を持たないと思われることが明らかとなった。AS(N-1)3'ギボシランの誘導能は、特に評価しなかった。しかし、物理化学的類似性から、AS(N-1)3'ギボシランは、CYP 酵素を誘導するとは考えられない。予想通り陰性コントロール化合物では変化はみられなかったが、顕著な mRNA 及び酵素活性レベルの上昇が陽性コントロール化合物でみられた。

2.6.4.5.7 ラット及びサルにおける *ex vivo* 肝ミクロソーム CYP 活性

ALAS1 はヘム生合成経路のカギとなる酵素であるため、*ALAS1* のダウンレギュレーションは理論的には肝臓におけるヘム生合成を低下させる可能性がある。ギボシランの CYP 活性への影響を調べるために、ギボシランの 30、100 又は 300 mg/kg を週に 1 回、3 又は 5 回投与したラット及びサルの肝ミクロソームを調製した。調製した肝ミクロソームを、5 種の CYP アイソフォーム（CYP1A、CYP2B、CYP2D、CYP2E 及び CYP3A）の活性評価に用いた。両動物種で投与に用いたギボシランの用量で、*ALAS1* 阻害の目標である最大約 80%の減少が達成された。

2.6.4.5.7.1 ギボシランを反復投与したラットにおける *ex vivo* CYP 活性

（CTD：4.2.3.2-3、試験番号[AS1-NCD14-001]）

（CTD：4.2.2.4-5、試験番号[■■■■■■■■]）

ラット試験（試験番号 AS1-NCD14-001、Subreport [■■■■■■■■]：[表 2.6.7.6-1]参照）では、動物に 30、100 及び 300 mg/kg を週に 1 回反復皮下投与（計 5 回投与）した。それぞれの投与の最後に肝臓を採取しミクロソームを調製し、CYP1A、CYP2B、CYP2D、CYP2E 及び CYP3A アイソフォームの特異的活性を測定するするために使用した。

30、100 及び 300 mg/kg を週に 1 回 5 週間反復皮下投与した雄性ラットでは、CYP1A、CYP2B、CYP3A 及び CYP2D 活性の低下が示され、評価したアイソフォームによりコントロールに対して 41%～85%の低下であった。CYP2E 活性には影響はみられなかった。雌性ラットにおける CYP アイソフォーム活性の *ex vivo* 試験では、CYP1A、CYP2B 及び CYP3A のコントロール活性に対して 42%～62%の低下であり、CYP2D 又は CYP2E では変化はみられなかった。

別の試験（試験番号■■■■■■■■：[表 2.6.5.12C]参照）において、ギボシランの 2.5 mg/kg を単回 SC 投与又は 5 mg/kg をローディング単回投与後に 1 mg/kg を 7 週間投与したラットから採取した肝臓の

CYP 活性を評価した。ギボシランは、両投与方法でも雌雄ラットにおけるコントロール活性からの統計学的な変化を起こさなかった。CYP 活性の低下の大きさは、コントロールに対して 3 倍以内であり、測定の誤差の範囲内であった。

これらの *ex vivo* 試験でみられた大きなばらつきは、以前に報告された正常値の範囲内である[1]。このことを考慮すると、これらの結果は、薬効投与量において、ギボシランが CYP 活性を有意に阻害する結果となると予測される又は生物学的に意義があるとはならないと考えられる。

2.6.4.5.7.2 ギボシランを反復投与したサルにおける *ex vivo* CYP 活性

（CTD：4.2.3.2-7、試験番号[AS1-NCD14-002]）

サルの試験（試験番号 AS1-NCD14-002、Subreport[[redacted]]：[表 2.6.7.6-1]参照）では、動物にギボシランの 30、100 及び 300 mg/kg を週に 1 回、5 回 SC 投与した。ラットの試験と同様に、それぞれの投与の最後に肝臓を採取しミクロソームを調製し、CYP1A、CYP2B、CYP2D、CYP2E 及び CYP3A アイソフォームの特異的活性を測定するするために使用した。

生理食塩液を投与したサルから調製したミクロソームと比べたとき、CYP1A、CYP2B、CYP2D 又は CYP3A 活性の減少はみられなかった。CYP2E1 では、2 高投与量（100 及び 300 mg/kg）で活性の増加がみられた。しかし、みられた活性は、コントロール値の 3 倍以内であり、サルにおける生物学的及び使用した測定法のバラツキの範囲内であった。観察された CYP 活性の変化は、生物学的に意義があるとは考えられない。

2.6.4.6 排泄

ラット、サル及びウサギにおけるギボシランの排泄を調べるために *in vivo* 試験を行った。これらの試験を表 2.6.4.6-1 に示した。

表 2.6.4.6-1 ギボシランの排泄試験

Alnylam 試験番号	動物種／マトリックス	試験の種類
[AS1-NCD14-003]	ラット／尿、糞	*In vivo* 排泄
[AS1-DSM17-018]	ラット／胆汁、尿、糞	*In vivo* 放射能排泄
[AS1-GLP17-009]	ラット／乳汁	*In vivo* 出生前／出生後の発生に関する試験
[[redacted]]	ウサギ／精液	*In vivo* 排泄
[AS1-NCD14-007]	サル／尿、糞	*In vivo* 排泄

2.6.4.6.1 ラットにおける排泄

（CTD：4.2.2.2-1、試験番号[AS1-NCD14-003]）

（CTD：4.2.3.5.3-1、試験番号[AS1-GLP17-009]）

ラットにおいて、10 mg/kg を SC 投与後 168 時間にわたり採取したプール尿及び糞中の、ギボシランを定量した（試験番号 AS1-NCD14-003：[表 2.6.5.13A]参照）。雄性及び雌性ラットにおいてそれぞれ平均総投与量の約 10.2%及び 8.7%が、最初の 24 時間以内に尿中にギボシランの未変化体として排泄された。168 時間後までの尿中における回収されたギボシランの総量の平均は、雄性及び雌性ラ

ットでそれぞれ投与量の約 11.2%及び 9.7%であった。未変化体としてのアンチセンス鎖を基準としたとき投与後 48 時間までに採取した糞試料では、雌雄ラットで平均総投与量の約平均 0.1%であった。まとめると、総投与量の約平均 11.3%及び 9.7%が、それぞれ雄性及び雌性の尿及び糞中にギボシランの未変化体として排泄された。そのため、ラットに SC 投与後、ギボシランの腎臓による排泄は、マイナーな排泄経路である。

雌性ラットにおけるギボシランの乳汁への排泄を、出生前／出生後の発生に関する試験で評価した（試験番号 AS1-GLP17-009：[表 2.6.5.7]及び[表 2.6.7.14]参照）。ギボシランの 3、10 及び 30 mg/kg を計 6 回投与した。少なくとも乳汁採取 5 分前の母動物にオキシトシン 1 単位を IV 投与し、乳汁試料を採取した。乳汁試料を、LD12 のギボシラン投与後約 2 時間後に採取した。乳汁中ギボシラン濃度は、3 及び 10 mg/kg 投与群では測定できなかった。30 mg/kg 投与群の 4 匹中ただ 1 匹の母動物のみ乳汁中濃度 229 ng/mL（LLOQ：200 ng/mL）が測定可能であった。

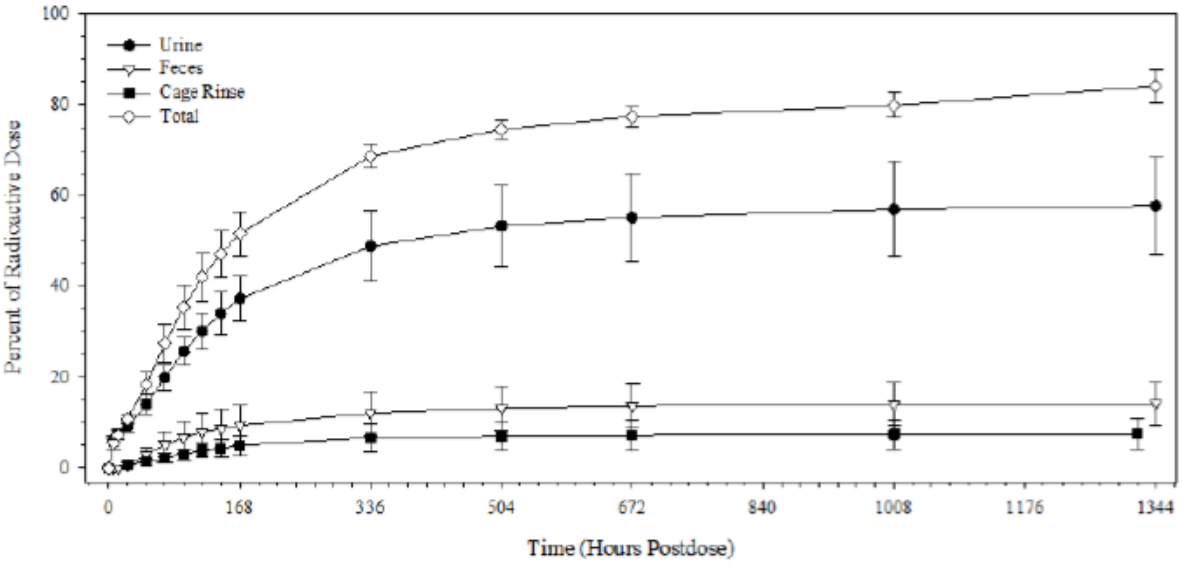
2.6.4.6.2 ラットにおける排泄（放射能標識 [^{3}H]-ギボシランを用いたマスバランス試験）

（CTD：4.2.2.4-6、試験番号[AS1-DSM17-018]）

放射能標識したギボシランの ADME を、雄性未処置ラット及び BDC／頸静脈カニューレ（JVC）ラットに[^{3}H]-ギボシランを単回 SC 投与（10 mg/kg）して評価した（試験番号 AS1-DSM17-018：[表 2.6.5.13B]参照）。無処置のラットに SC 投与後の尿糞中への放射能の排泄を投与後 1344 時間まで測定した。BDC／JVC ラットでは、胆汁、尿及び糞中への排泄を投与後 168 時間まで測定した。

ほとんどの[^{3}H]-ギボシランに由来する放射能は、主に尿中に 336 時間（無処置ラット）以内に排泄された。無処置のラットでは、投与後 1344 時間までに投与した放射能の 57.8%及び 14.3%がそれぞれ尿（拭った尿を含む）及び糞中に排泄された（図 2.6.4.6-1）。BDC/JVC ラットでは、投与後 168 時間までに投与した放射能の 30.4%、27.4%及び 1.42%がそれぞれ尿、胆汁及び糞中に排泄された。SC 投与後、多くの放射能が尿及び胆汁中に排泄され、このことは、腎臓及び胆汁中排泄が、[^{3}H]-ギボシラン関連放射能の主な排泄経路であることを示している。乾燥前と後の尿及び胆汁の放射能の分析により、無処置のラットでのすべての採取期間で、トリチウム水を含む放射能画分が尿で観察されることが示される一方、BDC/JVC ラットの尿及び胆汁では、限られた採取期間中に定量可能なトリチウム水が検出された。無処置及び BDC/JVC ラットに SC 投与後の放射能の平均総回収率は、それぞれ 84.1%及び 86.6%であった。

図 2.6.4.6-1　ラットに[^{3}H]-ギボシランを単回 SC 投与後の各期間における尿糞中及びケージ洗浄液中の投与した放射能に対する平均累積排泄率



略語：^{3}H=トリチウム
出典：試験番号 AS1-DSM17-018

2.6.4.6.3　ウサギ精液への排泄

（CTD：4.2.2.5-1、試験番号[　　]）

精液中ギボシラン濃度を、2.5 又は 20 mg/kg 単回 SC 投与後の雄性ウサギで評価した（試験番号　　：[表 2.6.5.13C]参照）。ギボシランは両投与群ですべての時間（投与後 8、24、72 及び 216 時間）で検出可能であり、投与後 8 時間に C_{max} になった。精液中の平均 C_{max} は、2.5 及び 20 mg/kg を単回 SC 投与後それぞれ 0.499 及び 68.9 ng/mL であり、C_{max} は投与量比を上回る増加をすることを示している。20 mg/kg を単回 SC 投与後の精液中 C_{max} である 68.9 ng/mL は、同様に 20 mg/kg を単回 SC 投与された妊娠雌性ウサギの血漿中 C_{max}（2990 ng/mL）の 3%未満であった（試験番号[AS1-GLP16-018]：[表 2.6.7.13-1]参照）。射精時の平均精液量はヒトでは 2～5 mL である。このことは、射精された 5 mL 中の総ギボシラン量は、最も控えめな見積もりによっても、0.4 µg 未満であると考えられることから、精液からの移行での女性のリスクを示すものではない。

2.6.4.6.4　サルにおける排泄

（CTD：4.2.2.2-4、試験番号[AS1-NCD14-007]）

尿及び糞試料を、ギボシランの 10 mg/kg を単回 SC 投与したサルから採取した。試料は投与前及び投与後 168 時間まで採取した（試験番号 AS1-NCD14-007 及び[表 2.6.5.13D]参照）。168 時間までの尿中ギボシラン平均総回収率は、雄及び雌サルでそれぞれ投与量の 19.1%及び 12.8%であった。投与後 24 時間～168 時間に採取した尿中には、ギボシランはごく微量検出されたにすぎず、主な排泄は、投与後 24 時間以内であった。ギボシランは、採取しプールしたどの糞試料でも検出できなかった。したがって、サルに SC 投与後の未変化体としてのギボシランの腎臓からの排泄は、マイナーな排泄経路である。

2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用

In vitro 及び *in vivo* 試験を、CYP アイソザイム及びトランスポーターを含む薬物相互作用評価のために行った。これらの試験を表 2.6.4.7-1 に示す。

表 2.6.4.7-1 薬物相互作用試験

Alnylam 試験番号	動物種／マトリックス	試験の種類
[AS1-DSM18-003]	ヒト細胞株及び膜小胞	*In vitro* トランスポーター基質／阻害試験
[AS1-NCD14-014]	サル	*In vivo* 薬物相互作用試験
[AS1-DSM17-003]	サル	*In vivo* 薬物相互作用試験

2.6.4.7.1 *In vitro* 薬物トランスポーター

（CTD：4.2.2.6-1、試験番号[AS1-DSM18-003]）

ギボシランが種々のヒト ABC 及び SLC トランスポーターの阻害剤及び／又は基質として働くかを評価するために試験を実施した（試験番号 AS1-DSM18-003：[表 2.6.5.15A]参照）。評価したトランスポーターは、P-gp、BCRP、BSEP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1 及び OCT2 並びに多剤・毒性化合物排泄たん白（MATE1 及び MATE2-K）であった。阻害試験は、最終培地濃度としてギボシランの 1 及び 10 µmol/L で行い、基質試験では、最終培地中ギボシラン濃度 0.3 µmol/L で行った。評価した最も高濃度のギボシラン濃度（10 µmol/L）は、臨床において月に 1 回 2.5 mg/kg を投与後のヒトにおけるギボシラン平均 C_{max} の約 500 倍であった。

P-gp では約 23%及び 69%の阻害が、それぞれギボシラン濃度 1 及び 10 µmol/L でみられ、これから IC_{50} は、1～10 µmol/L の間であると考えられる。ヒトにおいて 2.5 mg/kg を SC 投与後の定常状態における平均血漿中ギボシラン C_{max} は、19.7 nmol/L であり、C_{max} の 50 倍は、0.985 µmol/L（約 16 µg/mL）（試験番号[ALN-AS1-001]参照）である。ギボシランの血漿たん白結合率は、濃度依存的であり、約 55%と推定される（表 2.6.4.4-2 参照）。そのため、血漿での遊離酸の C_{max} の 50 倍は 0.44 µmol/L（約 7.2 µg/mL）と推定され、控えめに見積もった IC_{50}（又は Ki）1 µmol/L よりも小さい。このことから、P-gp が関与する臨床における薬物相互作用は生じないと考えられる。試験した条件下では、ギボシランはいずれの他のトランスポーターを阻害しなかった。

遺伝子導入した MDCKII 細胞株（P-gp 及び BCRP）、細胞小胞（BSEP）及びトランスフェクション細胞（OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K）を用いて、ギボシランが上に示したトランスポーターの基質かを評価した。ギボシランは、試験したいずれの基質でもない。AS(N-1)3'ギボシランは、阻害剤又は／及び基質であるかの試験は行わなかった。しかしながら、物理化学的類似性から AS(N-1)3'ギボシランは、トランスポーターと相互作用するとは考えられない。

2.6.4.7.2 サルにおける *in vivo* 薬物相互作用（Ⅰ）

（CTD：4.2.2.6-2、試験番号[AS1-NCD14-014]）

2.6.4.5.6 項で述べた *ex vivo* CYP 試験を拡張するため、また、ギボシランへの曝露後の CYP 活性を特徴付けるために、*in vivo* での DDI 試験をサルで実施した（試験番号 AS1-NCD14-014：[表 2.6.5.15B]参照）。

クロスオーバーデザインを採用し、それぞれのサル（n = 4）に 4 種の CYP アイソフォーム特異的基質（カフェイン、CYP1A：デキストロメトルファン、CYP2D：クロルゾキサゾン、CYP2E：シンバスタチン、CYP3A）を含む経口 CYP プローブカクテルを、ギボシランの反復 SC 投与前及び投与後の両方に投与した。ギボシランがいずれかの CYP アイソフォーム特異的プローブ基質の PK に影響を与えるかどうかを測定するために、ギボシランプローブカクテルの投与前及び投与後に 4 種のプローブ基質のそれぞれの PK プロファイルを評価した。

ギボシランの投与後、CYP1A、CYP2D 又は CYP2E の CYP プローブ基質の PK プロファイルへギボシランの一貫した影響はみられなかった。CYP3A に関しては、ギボシラン投与後、溶媒投与と比べるとすべての動物でシンバスタチンの曝露が低く（AUC が平均 71%～84%減少）なった。この結果は、ギボシラン投与後 CYP3A 活性が上昇したためシンバスタチンの代謝が亢進した可能性を示唆している。活性の亢進の可能性のメカニズムは明確ではなく、予想されるギボシランの薬効と矛盾すると思われる。理論的には、肝臓における *ALAS1* 阻害は、肝臓におけるヘム生合成を特に減少させることができると予想される。細胞のヘムの大部分は、CYP など様々なヘムたん白質の補欠分子として働く（肝臓内ヘムの 50%以上が CYP 合成に使用される[2]）。そのため、誘導とは反対に CYP 酵素活性の減少が予想されうる。

2.6.4.7.3 サルにおける *in vivo* 薬物相互作用（Ⅱ）

（CTD：4.2.2.6-3、試験番号[AS1-DSM17-003]）

ギボシランの反復 SC 投与が 2 種の CYP3A4 の基質（ミダゾラム及びシンバスタチン）の PK に与える影響を、雌性サルで評価した（試験番号 AS1-DSM17-003：[表 2.6.5.15C]参照）。比較するベースラインを作成するため、サルにミダゾラムの 2 mg/kg を Day1 に単回経口投与後、Day4 にシンバスタチン 20 mg/kg を単回経口投与した。その後ギボシランの 5 mg/kg を Day5～Day19 まで SC 投与した。最終的にサルにミダゾラムの 2 mg/kg を Day20 に単回経口投与し、Day23 にシンバスタチンの 20 mg/kg を単回経口投与した。ギボシラン、ミダゾラム、1-OH ミダゾラム、シンバスタチン及びシンバスタチン酸の血漿中濃度を測定した。

ミダゾラムでは、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の見かけの減少（それぞれ 40%及び 37%）がみられたが、対応する CYP3A が介在する代謝物 1-OH ミダゾラムの増加はみられなかった。そのかわり、ギボシランを SC 投与後の 6 匹の動物に 1-OH ミダゾラムのわずかな減少がみられた。シンバスタチン及びシンバスタチン酸（両方とも CYP3A の基質）では、ばらつきは大きいが、ギボシランの SC 投与後に CYP3A 活性の最小限の阻害があることを示す $AUC_{0\text{-}t(last)}$のわずかな増加（それぞれ 35%及び 60%）がみられた。

総じて、ギボシランの CYP3A 活性への影響は、ミダゾラム及びシンバスタチン両方の PK に最小限の変化をもたらすプローブ特異的であると思われる。しかしながら、ギボシランの CYP3A4 の阻

害の可能性は除外することはできない。そのため、患者において、主要な CYP アイソフォームの評価の DDI 試験（試験番号[ALN-AS1-004]、NCT03505853 参照）を、臨床において *ALAS1* の誘発低下の CYP 活性への影響を評価するために実施した。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

ギボシランを投与した他の薬物動態試験は、動物では実施されていない。

2.6.4.9 考察及び結論

ギボシランは、大人及び青年期 AHP 患者の治療のために SC 投与可能な製剤として開発された RNA 干渉（RNAi）製剤である。ギボシランは糖鎖リガンド（GalNAc）と siRNA が結合し肝細胞表面に発現している ASGPR で siRNA の直接肝細胞特異的な取り込みにより、肝臓に分布するように特にデザインされている。ギボシランの臨床での開発のために、ギボシランの PK 及び ADME の性質を種々の *in vitro* 及び非臨床の *in vivo* 試験により評価した。

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 SC 投与後、血漿中曝露（C_{max} 及び AUC）はほぼ投与量に比例した。10 mg/kg を単回 IV 投与後のギボシランの排泄は両動物とも平均 $t_{1/2}$ は約 0.2 時間と迅速であった。平均 $t_{1/2}$ は IV 投与に比較すると、SC 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）。10 mg/kg を SC 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 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 SC 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。

ギボシランの TK プロファイルを、マウス、ラット、ウサギ及びサルの血漿、肝臓及び腎臓また、妊娠ラット及びウサギの胎盤及び胎児の組織で評価した。一般に、血漿における曝露は、試験した非臨床の動物種において、ほぼ投与量比例的又は投与量比をわずかに上回る増加を示した。肝臓と腎臓の曝露は、動物種を通して、投与量が増加すると、腎臓に比べて肝臓中濃度は減少する傾向を示した。

予想通り、ギボシランは、ASGPR を介した肝細胞への取り込みにより、主に肝臓に分布した。SC 投与後の肝臓におけるギボシランの曝露は、IV 投与後より明らかに高く、このことは、ギボシランの肝臓への取り込みは、SC 投与により、より効果があることを示している。SC 投与後のより効果的な肝臓への取り込みは、IV 投与後の急激な増加よりむしろ緩徐な血漿中濃度の増加による可能性があり、ASGPR 依存的な肝細胞への取り込みの飽和を避けるうる可能性がある。SC 投与後の他のすべての組織内濃度を比べると、腎臓が肝臓の次に高い濃度であった。10 mg/kg を SC 投与後、ギボシランの肝臓の腎臓に対する曝露比は、約 4 倍であった。肝臓に比較すると、顕著に低いギボシラン濃度が、副腎、心臓、肺、脾臓、甲状腺、胸腺、膵臓、空腸及び精巣（100～800 倍低い）にみられた。同様の知見が、放射能標識体[^{3}H]-ギボシランを用いた QWBA での組織内分布で観察された。高い薬物由来放射能がみられた組織は、肝臓（最高濃度）、リンパ節、膀胱、腎皮質、胸管及び腎臓であった。肝臓の血漿に対する AUC 比は、ラット及びサルでそれぞれ約 4500 及び 2500 であり、肝臓における $t_{1/2}$ はそれぞれラット及びサルの血漿中 $t_{1/2}$ より顕著に長かった（約 120 及び 146 時間）。妊娠ラット及びウサギにおいて、胎児又は胎盤組織へのギボシランの分布は、ないか無視し得るものであった。ギボシランは、脳中には検出されなかった。

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。この血漿たん白結合の非線形性のメカニズムは明確ではないが、高濃度における結合の飽和によるものではないかと考えられる。*In vitro* 及び *in vivo* 試験で、ギボシランの代謝を評価した。ギボシランの代謝安定性を、マウス、ラット、サル及びヒトの血清及び肝 S9 画分での *in vitro* 及びラット、サル及びヒトでの *in vivo* の両方で評価した。ギボシランの *in vivo* における代謝は、一般に *in vitro* で観察された代謝と類似していた。ヒト肝 S9 画分で行った *in vitro* 試験で、ギボシランのセンス鎖及びアンチセンス鎖両方とも安定であることが確認され、NADPH の有無で変化はみられず、このことは、ギボシランの代謝に CYP 酵素は関与しないことが示された。

ギボシランのアンチセンス鎖は、血清又は血漿中で活性代謝物の一つである AS(N-1)3'ギボシランに代謝された。AS(N-1)3'ギボシランに加えて、AS(N-3)5'ギボシランが肝 S9 画分中で生成した。しかし、AS(N-1)3'ギボシランのみが、*in vivo* 試験での肝臓中に検出された。

AS(N-1)3'ギボシランは、ギボシランを SC 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 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 SC 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。特別に測定していないが、ラット及びサルの長期毒性における AS(N-1)3'ギボシランの血漿における曝露は、実質的に、臨床で予定している投与量におけるヒトでの曝露を超えていると予測される。そのため、AS(N-1)3'ギボシランの安全性は、実質的にラット及びサルの長期毒性試験中で評価されている。

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 全部が脱落して生成した。ラッ

トにおける放射能標識した[^{3}H]-ギボシランを用いた試験で、AS(N-1)3'ギボシランが血漿、尿及び胆汁中の主な代謝物であることが確認された。その試験では 5 個の代謝物（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。

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、*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。

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い。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 ABC 及び SLC トランスポーターの基質又は阻害物質ではない。特に BCRP、BSEP、組織アニオン輸送ポリペプチド（OATP1B1 及び OATP1B3）、OAT1、OAT3、OCT1 及び OCT2 並びに多剤・毒性化合物排泄たん白（MATE1 及び MATE2-K）の基質又は阻害物質ではない。しかし、ギボシランは、濃度が 1 及び 10 μmol/L で 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 SC 投与したときの定常状態における平均血漿 C_{max} は 19.7 nmol/L であり、C_{max} の 50 倍は 0.985 μmol/L（約 16 μg/mL）（[ALN-AS1-001]

試験参照）である。血漿たん白結合率は約 55%と推定されている（表 2.6.4.4-2 参照）。そのため、C_{max} の 50 倍の非結合型の血漿中濃度は、0.44 µmol/L（約 7.2 µg/mL）と推定され、安全側に推定した IC_{50}（又は Ki）の 1 µmol/L より低い値であることから臨床において P-gp が関与する薬物相互作用は起きにくいと考えられることを示唆している。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。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。

ALAS1 はヘム生合成過程の主要な酵素であることから、理論的に、*ALSA1* のダウンレギュレーションは、肝臓におけるヘム新生を減少させる可能性がある。ギボシランが CYP 活性にどのような影響を与えるかを評価するために、300 mg/kg まで週に 1 回ギボシランを 3 回又は 5 回投与したラット及びサルから肝ミクロソームを作製した。雄性ラットにおいて、ギボシランの反復 SC 投与により、検討したアイソフォーム、CYP1A、CYP2B、CYP3A 及び CYP2D の活性がコントロールより 41%～85%低下した。CYP2E 活性に影響はみられなかった。雌性ラットにおいて、ギボシランの反復 SC 投与により、CYP1A、CYP2B 及び CYP3A の活性がコントロールより 42%～62%低下したが、CYP2D 及び CYP2E に変化はみられなかった。サルにおいては、生理食塩液を投与したサルから得たミクロソームと比較したとき、CYP1A、CYP2B、CYP2D 及び CYP3A 活性は低下しなかった。CYP2E1 では、2 高用量（100 及び 300 mg/kg）において、活性の増加がみられた。これら *ex vivo* の試験における大きなバラツキは、既に報告されている通常のレベル内である [1]。以上これらから、これらの結果は生物学的意義を持たず、ギボシランが薬効投与量において CYP が意義ある阻害を示すことは予想されないと考えられる。

In vitro 及びラットにおける *ex vivo* 両方の結果は、ギボシランは臨床上で CYP アイソザイムが関与する意義ある DDI が生じにくいことを示唆しているが、ギボシランの DDI の可能性を、サルを用いた探索的試験でさらに評価した。DDI 試験は、ギボシランの投与前及び反復投与（5 mg/kg）後に CYP1A、CYP2D、CYP2E、及び CYP3A の基質をカクテル投与し CYP の活性を評価するためにカニクイザルで実施した。溶媒対照群と比べるとギボシラン投与後に曝露の減少（AUC で平均 71%～84%の減少）を示した CYP3A4 のプローブ基質（シンバスタチン）を除いてそれぞれのプローブ基質の PK は変化しなかった。追跡試験として雄性サルにギボシランを反復 SC 投与後の CYP3A4 の 2 基質（ミダゾラム及びシンバスタチン）の PK を評価した。ミダゾラムでは C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$ の明らかな減少がみられたが、CYP3A4 による代謝物 1-OH ミダゾラムの対応した増加はみられなかった。代わりに、ギボシランを SC 投与後の 6 例の動物で 1-OH ミダゾラムのわずかな減少がみられた。シンバスタチン酸だけでなくシンバスタチン（両方とも CYP3A の基質）でも、$AUC_{0\text{-}t(last)}$ のわずかな増加がみられ、バラツキは大きいもののギボシランを SC 投与後の CYP3A 活性の最小限の阻害を示唆している。総じて、ギボシランの CYP3A 活性への影響は、ミダゾラム及びシンバスタチン両方の PK に対して最小限の変化を伴ったプローブ特異的なものであると考えられる。患者における主要な CYP アイソザイム DDI 試験（[ALN-AS1-004]試験、NCT03505853 参照）を、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実施した。

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 SC 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 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。ギボシランは最高投与量（30 mg/kg）において 4 例中 1 例の雌ラットの乳汁で検出可能であった。
2.5 mg/kg 又は 20 mg/kg を単回 SC 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。

以上要約すると、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。以上のデータはギボシランの SC 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。総じて、PK 及び ADME 試験は、毒性試験の解釈のサポート及び 2.5 mg/kg の月 1 回の投与計画でのヒトにおけるギボシランの性質の特徴付けを助け、AHP の治療におけるギボシランの臨床使用をサポートすると考えられる。

2.6.4.10 図表

本文中に記載した。

2.6.4.11 参考文献一覧

1. Uehara S, Murayama N, Nakanishi Y, Darryl CZ, Yamazaki H, Uno Y. Immunochemical detection of cytochrome P450 enzymes in liver microsomes of 27 cynomolgus monkeys. J Pharmacol Exp Ther. 2011; 339(2):654-61.
2. Correia MA, Sinclair PR, Matteis FDe. Cytochrome P450 regulation: the interplay between its heme and apoprotein moieties in synthesis, assembly, repair, and disposal. Drug Metab Rev. 2011; 43(1):1-26.

目次

2.6.5 薬物動態試験概要表 2
2.6.5.1 薬物動態試験 2
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験 6
2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収 15
2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収 20
2.6.5.5 薬物動態試験：分布 22
2.6.5.6 薬物動態試験：たん白結合 29
2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 30
2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験 31
2.6.5.9 薬物動態試験：*In Vivo* における代謝 32
2.6.5.10 薬物動態試験：*In Vitro* における代謝 35
2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路 38
2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 40
2.6.5.13 薬物動態試験：累積排泄 45
2.6.5.14 薬物動態試験：胆汁中排泄 51
2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用 52
2.6.5.16 薬物動態試験：その他 55

2.6.5 薬物動態試験概要表

2.6.5.1 薬物動態試験

一覧表 被験物質：ギボシランナトリウム

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number CTD Location
Absorption				
Single- and multiple-dose PK/PD	Sprague Dawley rats	Givosiran[a]; single IV bolus (10 mg/kg) injection, single SC (0.1, 1, 5, 10 mg/kg) injection, or repeat SC (1, 2.5, 5/1 mg/kg) injections (once weekly ×8 weeks)	Alnylam Pharmaceuticals	[AS1-NCD14-003] CTD: 4.2.2.2-1
Single-dose PK	Sprague Dawley rats	Givosiran; single SC (10 mg/kg) injection	Alnylam Pharmaceuticals	[AS1-DSM18-010] CTD: 4.2.2.2-2
Single-dose TK	Sprague Dawley rats	Givosiran; single SC (3, 10, 30, 100 mg/kg) injection	Alnylam Pharmaceuticals	[AS1-NCD14-018] CTD: 4.2.2.2-3
Single- and multiple-dose PK/PD	Cynomolgus monkeys	Givosiran; single IV bolus (10 mg/kg) injection, single SC (0.1, 1, 5, 10 mg/kg) injection, or repeat SC (1, 2.5, 5/1 mg/kg) injections (weekly ×8 weeks)	[redacted]	[AS1-NCD14-007] CTD: 4.2.2.2-4
Single-dose PK	Cynomolgus monkeys	Givosiran; single SC (30 mg/kg) injection	[redacted]	[AS1-DSM18-009] CTD: 4.2.2.2-5
Distribution				
Organ Distribution				
Single- and multiple-dose PK/PD – Tissue distribution	Sprague Dawley rats	Givosiran, single IV bolus (10 mg/kg) injection, single SC (10 mg/kg) injection, or repeat SC (1, 2.5, 5/1 mg/kg) injections (weekly ×8)	Alnylam Pharmaceuticals	[AS1-NCD14-003] CTD: 4.2.2.2-1
Single-dose TK – Tissue distribution	Sprague Dawley rats	Givosiran; single SC (3, 10, 30, 100 mg/kg) injection	Alnylam Pharmaceuticals	[AS1-NCD14-018] CTD: 4.2.2.2-3

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number CTD Location
Radiolabeled mass balance and tissue distribution by QWBA	Sprague Dawley rats	[^{3}H]-givosiran; single SC, 10 mg/kg	[redacted]	[AS1-DSM17-018] CTD: 4.2.2.4-6
Single- and multiple-dose PK/PD – Tissue distribution	Cynomolgus monkeys	Givosiran; single IV bolus (10 mg/kg) injection, single SC (0.1, 1, 5, 10 mg/kg) injection, or repeat SC (1, 2.5, 5/1 mg/kg) injections (weekly ×8)	[redacted]	[AS1-NCD14-007] CTD: 4.2.2.2-4
Distribution – Plasma Protein Binding				
Protein binding study	CD-1 mouse, Sprague Dawley rat, cynomolgus monkey, and human plasma	NA	Alnylam Pharmaceuticals	[AS1-DSM18-008] CTD: 4.2.2.3-1
Distribution – Studies in Pregnant or Nursing Animals				
Prenatal and postnatal development – distribution in milk and plasma	Sprague Dawley rats	Givosiran; multiple SC (3, 10, 30) injections (6 doses, once daily DG 7 to LD 18)	[redacted]	[AS1-GLP17-009] CTD: 4.2.3.5.3-1
Metabolism				
Metabolism *In Vivo*				
In vivo metabolic profiling	Rat and monkey plasma	Givosiran; single SC (10 mg/kg) injection (AS1-NCD14-003 and AS1-NCD14-007)	Alnylam Pharmaceuticals	[BA14010] CTD: 4.2.2.4-1
In vivo metabolic profiling	Sprague Dawley rats (intact and BDC/JVC)	[^{3}H]-givosiran; single SC, 10 mg/kg	[redacted]	[AS1-DSM17-018] CTD: 4.2.2.4-6
In vivo metabolic profiling	Monkey plasma, liver, and urine; human plasma and urine	Givosiran in monkeys: single SC (0.1, 1.0, 5.0, 10 mg/kg) or repeat (× 8 doses, once weekly at 2.5 or 1 mg/kg; or once at 5 mg/kg then (once weekly × 7 doses at 1 mg/kg) injections (AS1-NCD14-007); Givosiran in humans: SC doses at 5 mg/kg (ALN-AS1-001)	Alnylam Pharmaceuticals	[BA17014] CTD: 4.2.2.1-6

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number CTD Location
Metabolism *In Vitro*				
In vitro serum and liver S9 fraction metabolic stability and profiling	Mouse, rat, monkey, and human liver S9 fractions	NA	Alnylam Pharmaceuticals	[BA14010] CTD: 4.2.2.4-1
In vitro human liver S9 fraction metabolic stability and profiling	Human liver S9 fractions	NA	Alnylam Pharmaceuticals	[AS1-DSM18-015] CTD: 4.2.2.4-2
Metabolism – Induction/Inhibition of Drug-Metabolizing Enzymes				
In vitro CYP inhibition study	Human liver microsomes	NA	[redacted]	[redacted] CTD: 4.2.2.4-3
In vitro CYP induction study	Cultured human hepatocytes	NA	[redacted]	[redacted] CTD: 4.2.2.4-4
Multiple-dose PK – *ex vivo* liver microsomal CYP activity[b]	Sprague Dawley rats	Givosiran; single SC (2.5 mg/kg) or repeat SC (single loading dose of 5 mg/kg followed by 7 weekly doses at 1 mg/kg)	[redacted]	[redacted] CTD: 4.2.2.4-5
Excretion				
Single- and multiple-dose PK/PD – Renal and fecal excretion	Sprague Dawley rats	Givosiran; single SC (10 mg/kg) injection	Alnylam Pharmaceuticals	[AS1-NCD14-003] CTD: 4.2.2.2-1
Radiolabeled mass balance and tissue distribution by QWBA	Sprague Dawley rats	[^{3}H]-givosiran; single SC (10 mg/kg) injection	[redacted]	[AS1-DSM17-018] CTD: 4.2.2.4-6
Single-dose PK seminal fluid excretion	New Zealand White rabbits	Givosiran; single SC (2.5 and 20 mg/kg) injection	[redacted]	[redacted] CTD: 4.2.2.5-1
Single- and multiple-dose PK/PD – Renal and fecal excretion	Cynomolgus monkeys	Givosiran; single SC (10 mg/kg) injection	[redacted]	[AS1-NCD14-007] CTD: 4.2.2.2-4

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number CTD Location
Drug-Drug Interactions				
In vitro transporter substrate/inhibitor	Transfected cells and membrane vesicles	NA	[redacted]	[AS1-DSM18-003] CTD: 4.2.2.6-1
Multiple-dose PK – *in vivo* DDI	Cynomolgus monkeys	Vehicle (0.9% NaCl) on Days 1 through 5 Givosiran; repeat SC (5 mg/kg) injections (once daily × 5 days) on Days 14 through 18 followed by a washout period and a single SC (5 mg/kg) injection on Day 24	[redacted]	[AS1-NCD14-014] CTD: 4.2.2.6-2
Repeat dose PK – effect on PK properties of CYP3A4 substrates midazolam and simvastatin	Cynomolgus monkeys	Givosiran; repeat SC (5 mg/kg) injection (once daily × 15 days) from Day 5 through Day 19	[redacted]	[AS1-DSM17-003] CTD: 4.2.2.6-3

Abbreviations: BDC=bile duct-cannulated; CYP=cytochrome P450; DDI=drug-drug interaction; DG=day of presumable gestation; GLP=Good Laboratory Practice; IV=intravenous; JVC=jugular vein-cannulated; LD=day of lactation; NA=not applicable; NaCl=sodium chloride; PD=pharmacodynamic; PK=pharmacokinetic; QWBA=quantitative whole-body autoradiography; SC=subcutaneous; TK=toxicokinetic.

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 *Ex vivo* liver microsomal CYP activity was also evaluated in rats and monkeys as part of the repeat-dose toxicity studies; results from these analyses are presented in the toxicology tabulated summary for these nonpivotal studies (refer to[表 2.6.7.6-1], [AS1-NCD14-001] [rats] and [AS1-NCD14-002] [monkeys]).

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験

表 2.6.5.2A ギボシランの非臨床安全性薬理及び毒性試験で用いられたバリデート／適合した分析方法

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method Reference / Method / GLP Status[a]
Mice / CD-1	AS1-NCD14-005	Repeat dose range-finder (dosing once weekly for 5 doses)	givosiran	givosiran	Plasma, Liver, Kidney	AS1-NCD14-005 (TK memo) / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
Mice / BALB/cBy × C57BL/6 F1	AS1-DSM16-003	Repeat dose toxicity (dosing once monthly for 8 doses)	givosiran	givosiran	Plasma	BA16016 / LC/MS-HRAM / Non-GLP
					Liver, Kidney	BA16016 / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
Mice / 001178-W wild-type Tg-rasH2	AS1-GLP17-006	Repeat dose range-finder (dosing once monthly for 3 doses)	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
				givosiran, AS(N-1)3' givosiran metabolite	Liver	TK18001 / LC-MS/MS / Non-GLP
Rats / Sprague Dawley	AS1-NCD14-010	Repeat dose toxicity (dosing once weekly for 14 doses)	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
					Liver, Kidney	BA15008 / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP

表 2.6.5.2A ギボシランの非臨床安全性薬理及び毒性試験で用いられたバリデート／適合した分析方法（続き）

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method Reference / Method / GLP Status[a]
Rats / Sprague Dawley	AS1-NCD14-017	Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test in Rat Bone Marrow	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
Rats / Sprague Dawley	AS1-NCD14-018	Single dose TK (4 week)	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
					Liver, Kidney	BA15009 / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
Rats / Sprague Dawley	AS1-GLP15-022	Toxicity & Fertility and Early Embryonic Development (dosing once weekly for 27 doses)	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
					Liver, Kidney	BA16042 / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
				ADA	Serum	[redacted] / ELISA / GLP
Rats / Sprague Dawley	AS1-DSM15-041	Repeat dose Range-Finding Fertility and Embryo-Fetal Development Study (weekly for 4 doses and then daily from GD6 to GD17)	givosiran	givosiran	Plasma	BA16013 / LC/MS-HRAM / Non-GLP
					Liver, Placenta, Fetus	BA16013 / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP

表 2.6.5.2A ギボシランの非臨床安全性薬理及び毒性試験で用いられたバリデート／適合した分析方法（続き）

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method Reference / Method / GLP Status[a]
Rats / Sprague Dawley	AS1-GLP16-011	Fertility and Embryo-fetal development (weekly for 4 doses and then daily from GD6 to GD17)	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
					Liver, Placenta, Fetus	BA16033 / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
Rats / Sprague Dawley	AS1-GLP16-022	Repeat dose toxicity (dosing once monthly for 4 doses)	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
					Liver, Kidney	BA17008 / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
Rats / Sprague Dawley	AS1-GLP17-009	Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
				givosiran	Milk	[redacted] / LC/MS-HRAM / Non-GLP
Rabbits / New Zealand White	AS1-DSM16-012	Dose Range-finding Embryo-Fetal Development	givosiran	givosiran	Plasma	BA16035 / LC/MS-HRAM / Non-GLP

表 2.6.5.2A ギボシランの非臨床安全性薬理及び毒性試験で用いられたバリデート／適合した分析方法（続き）

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method Reference / Method / GLP Status[a]
					Liver, Placenta	BA16035 / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
Rabbits / New Zealand White	AS1-GLP16-018	Embryo-Fetal Development (daily from GD7 to GD19)	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
					Liver, Placenta, Fetus	BA16041 / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
Rabbits / New Zealand White	[redacted]	Seminal Fluid Transfer	givosiran	givosiran	Semen	BA17018 / RT-qPCR / Non-GLP
Cynomolgus monkeys	AS1-NCD14-011	Repeat-dose toxicity (dosing once weekly for 14 doses)	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
Cynomolgus monkeys	AS1-NCD14-019	Cardiovascular and Respiratory Safety Pharmacology	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
Cynomolgus monkeys (juvenile)	AS1-GLP15-018	Repeat-dose toxicity (dosing once weekly for 40 doses)	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
				givosiran	Liver, Kidney	BA16040 / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
				ADA	Serum	[redacted] / ELISA / GLP

Abbreviations: ADA=anti-drug antibody; ELISA=enzyme linked immunosorbent assay; GD=presumed day of gestation; GLP=Good Laboratory Practice; HPLC=high-performance liquid chromatography; LC/MS-HRAM=liquid chromatography mass spectrometry-high resolution accurate mass; LC-MS/MS=liquid chromatography/tandem mass spectrometry; RT-qPCR=quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction; TK=toxicokinetic.

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

表 2.6.5.2B ギボシランの非臨床薬物動態試験で用いられたバリデート／適合した分析方法

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method (Report Reference / Platform / GLP Status[a])
Rats; Sprague Dawley	AS1-NCD14-003	Single & Multiple dose PK/PD study	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / GLP
					Liver, Kidney, Lung, Spleen, Heart, Brain, Jejunum, Testes, Pancreas, Adrenal, Thyroid, Thymus, Urine, Feces	BA14016 / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
Rats; Sprague Dawley	AS1-DSM18-010	Single dose PK study	givosiran	givosiran, AS(N-1)3' givosiran	Plasma	AS1-DSM18-010 / LC-MS/MS / Non-GLP
Cynomolgus monkeys	AS1-NCD14-007	Single & Multiple dose PK/PD study	givosiran	givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / Non-GLP
					Liver, Urine, Feces	BA14015 / Atto-probe with HPLC/Fluorescence / Non-GLP
Cynomolgus monkeys	AS1-NCD14-014	Effect on the PK Profile of Four CYP450 Probe Substrates Following Multiple Subcutaneous Doses	Dextromethorphan HBr monohydrate, Simvastatin, Caffeine, Chlorzoxazone, givosiran	Dextromethorphan HBr monohydrate, Simvastatin, Caffeine, Chlorzoxazone	Plasma	N/A
				givosiran	Plasma	[redacted] / LC/MS-HRAM / Non-GLP

表 2.6.5.2B ギボシランの非臨床薬物動態試験で用いられたバリデート／適合した分析方法（続き）

Species / Strain	Study No.	Study Type	Test Article	Analyte(s)	Matrix	Method (Report Reference / Platform / GLP Status[a])
Cynomolgus monkeys	AS1-DSM17-003	Repeat Dose Effect on the Pharmacokinetic Profiles of CYP 3A4 Substrates, Midazolam and Simvastatin	Midazolam, α-Hydroxymidazolam, Simvastatin, Simvastatin Acid, givosiran	Midazolam, α-Hydroxymidazolam,	Plasma	[redacted] / LC-MS/MS / Non-GLP
				Simvastatin, Simvastatin Acid	Plasma	[redacted] / LC-MS/MS / Non-GLP
Cynomolgus monkeys	AS1-DSM18-009	Single dose PK study	givosiran	givosiran, AS(N-1)3' givosiran	Plasma	AS1-DSM18-009 / LC-MS/MS / Non-GLP

Abbreviations: GLP=Good Laboratory Practice; LC/MS-HRAM=liquid chromatography mass spectrometry-high resolution accurate mass; LC-MS/MS=liquid chromatography/tandem mass spectrometry; PD=pharmacodynamic(s); PK=pharmacokinetic(s).

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

表 2.6.5.2C 分析方法及びバリデーション報告書：個別の要約

Validation Report Number: [redacted] **CTD Location: 4.2.2.1-1**							
Method	**Species**	**Matrix (anticoagulant)**	**Analyte(s)**	**Quantification Range**	**LLOQ**	**QC Levels (ng/mL)**	**Stability**
LC/MS-HRAM	Mice	Plasma (K_2EDTA)	givosiran	25.0 to 2,500 ng/mL	25.0 ng/mL	25.0 (LLOQ), 75.0 (Low), 1,000 (Med), 2,000 (High)	Freeze/thaw: 4 cycles; Long-term storage (-70°C): 146 days
Intra-day accuracy and precision: LLOQ, Low, Med, High QC: -10.0 to 0.0% difference; 3.5 to 12.0% CV **Inter-day accuracy and precision:** LLOQ, Low, Med, High QC: -6.5 to -0.8% difference; 4.6% to 9.0% CV **Additional parameters evaluated:** Selectivity, Carryover, Recovery, Reinjection reproducibility, Dilution linearity, Solution stability, Matrix stability, Maximum batch size, Whole blood stability, Hemolysis							
Validation Report Number: [redacted] **CTD Location: 4.2.2.1-2**							
Method	**Species**	**Matrix (anticoagulant)**	**Analyte(s)**	**Quantification Range**	**LLOQ**	**QC Levels (ng/mL):**	**Stability:**
LC/MS-HRAM	Rats	Plasma (K_2EDTA)	givosiran	50.0 to 1,000 ng/mL	50.0 ng/mL	50.0 (LLOQ), 150 (Low), 400 (Med), 800 (High)	Freeze/thaw: 8 cycles; Long-term storage (-70°C): 712 days
Intra-day accuracy and precision: LLOQ, Low, Med, High QC: -2.5 to 8.8% difference; 3.0 to 10.3% CV **Inter-day accuracy and precision:** LLOQ, Low, Med, High QC: -1.0 to 5.8% difference; 0.0% to 1.7% CV **Additional parameters evaluated:** Selectivity, Carryover, Recovery, Reinjection reproducibility, LLOQ reproducibility, Dilution linearity, Matrix stability, Maximum batch size, Whole blood stability, Hemolysis							
Validation Report Number: [redacted] **CTD Location: 4.2.2.1-4**							
Method	**Species**	**Matrix (anticoagulant)**	**Analyte(s)**	**Quantification Range**	**LLOQ**	**QC Levels (ng/mL):**	**Stability:**
LC/MS-HRAM	Rabbits	Plasma (K_2EDTA)	givosiran	50.0 to 5,000 ng/mL	50.0 ng/mL	50.0 (LLOQ), 150 (Low), 2,000 (Med), 4,000 (High)	Freeze/thaw: 4 cycles; Long-term storage (-70°C): 346 days

表 2.6.5.2C 分析方法及びバリデーション報告書：個別の要約（続き）

Intra-day accuracy and precision: LLOQ, Low, Med, High QC: -9.4 to 1.2% difference; 2.7 to 8.9% CV
Inter-day accuracy and precision: LLOQ, Low, Med, High QC: -5.4 to -3.3% difference; 5.0% to 9.1% CV
Additional parameters evaluated: Selectivity, Carryover, Recovery, Reinjection reproducibility, Dilution linearity, Matrix stability, Maximum batch size, Whole blood stability, Hemolysis

Validation Report Number: [redacted]
CTD Location: 4.2.2.1-5

Method	Species	Matrix (anticoagulant)	Analyte(s)	Quantification Range	LLOQ	QC Levels (ng/mL):	Stability:
LC/MS-HRAM	Monkeys	Plasma (K_2EDTA)	givosiran	50.0 to 1,000 ng/mL	50.0 ng/mL	50.0 (LLOQ), 150 (Low), 400 (Med), 800 (High)	Freeze/thaw: 4 cycles; Long-term storage (-70°C): 641 days

Intra-day accuracy and precision: LLOQ, Low, Med, High QC: -12.2 to 6.7% difference; 2.6 to 13.2% CV
Inter-day accuracy and precision: LLOQ, Low, Med, High QC: -3.8 to 4.0% difference; 0.0% to 7.3% CV
Additional parameters evaluated: Selectivity, Carryover, Recovery, Reinjection reproducibility, Dilution linearity, LLOQ reproducibility, Matrix stability, Maximum batch size, Whole blood stability, Hemolysis

Abbreviations: CV=coefficient of variance; EDTA=ethylenediaminetetraacetic acid; LC/MS-HRAM=liquid chromatography mass spectrometry-high resolution accurate mass; LLOQ=lower limit of quantification; QC=quality control.

表 2.6.5.2D 抗体測定法及びバリデーション報告書：個別の要約

Validation Report Number: [redacted] **CTD Location: 4.2.2.1-3**							
Method	**Species**	**Matrix**	**Analyte(s)**	**Normalization Factors and Cut Point**	**Sensitivity**	**PC Levels (ng/mL):**	**Stability:**
ELISA	Rats	Serum	ADA	NF = 0.089 TNF = 0.150 CCP = 21.0% signal inhibition (A450 nm)	262 ng/mL	250 (LLPC), 400 (LPC), 1,000 (MPC), 4,000 (HPC)	Freeze/thaw: 6 cycles Long-term storage (-80°C): 243 days
Intra-day precision: LLPC, LPC, MPC, HPC: 0.9 to 39.1% CV; **Inter-day precision:** LLPC, LPC, MPC, HPC: 6.3 to 17.6% CV **Additional parameters evaluated:** Selectivity, Specificity, Stability, Drug Tolerance, Prozone, and Precision of Titers							
Validation Report Number: [redacted] **CTD Location: 4.2.2.1-7**							
Method	**Species**	**Matrix**	**Analyte(s)**	**Normalization Factors and Cut Point**	**Sensitivity**	**PC Levels (ng/mL):**	**Stability:**
ELISA	Monkeys	Serum	ADA	NF = 0.020 NF = 0.049 CCP = 22.8% signal inhibition (A450 nm)	197 ng/mL	350 (LLPC), 500 (LPC), 1,500 (MPC), 6,000 (HPC)	Freeze/thaw: 6 cycles Long-term storage (-80°C): 227 days
Intra-day precision: LLPC, LPC, MPC, HPC: 1.3 to 14.8% CV; **Inter-day precision:** LLPC, LPC, MPC, HPC: 7.6 to 10.3% CV **Additional parameters evaluated:** Selectivity, Specificity, Stability, Drug Tolerance, Prozone, and Precision of Titers							

Abbreviations: ADA=anti-drug antibody; CCP=confirmatory cut-point; CV=coefficient of variance; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; HPC=high positive control; LLPC=low, low positive control; LPC=low positive control; MPC=medium positive control; NF=normalization factor; PC=positive control; TNF=titration normalization factor.

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収

表 2.6.5.3A ラットに単回静脈内及び皮下投与したときの薬物動態／薬力学試験

Study Title: The Pharmacokinetics, Bioavailability, Tissue Distribution and Pharmacodynamics of ALN-AS1 After a Single Intravenous, or Single or Multiple Subcutaneous, Doses to Sprague-Dawley Rats				**Test Article**: Givosiran **Study No**. AS1-NCD14-003
Species:	Sprague Dawley rats			
Sample/Assay:	Plasma/LC/MS-HRAM			
Analyte:	Givosiran			
Method of Administration:	IV bolus			
Dose (mg/kg):	10			
Sex/No. of Animals:	(24M+24F)/48			
PK Parameters[a]	Overall (M+F) Mean			
T_{max} (h)	0.083			
C_0 (µg/mL)	148			
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	11.8			
$AUC_{0\text{-}1}$ (µg·h/mL)	11.8			
Apparent $t_{1/2}$ (h)	0.2			
CL (mL/h/kg)	870			
Vdss (mL/kg)	181			
Method of Administration:	SC			
Dose (mg/kg):	0.1[b]	1	5	10
Sex/No. of Animals:	(24M+24F)/48	(24M+24F)/48	(24M+24F)/48	(24M+24F)/48
PK Parameters[a]	Overall (M+F) Mean			
T_{max} (h)	NA	0.25	0.4	1.1
C_{max} (µg/mL)	NA	0.11	0.43	1.07
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	NA	0.15	1.29	2.79
$AUC_{0\text{-}2}$ (µg·h/mL)	NA	0.15	0.72	1.48
Apparent $t_{1/2}$ (h)	NA	2.1	2.7	2.7
F (%)	NA	NA	NA	24

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; $AUC_{0\text{-}1}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to 1 h postdose; $AUC_{0\text{-}2}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to 2 h postdose;C_0=concentration at time 0; CL=total body clearance; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; F=female; F=bioavailability; IV=intravenous; LC/MS-HRAM=liquid chromatography mass spectrometry-high resolution accurate mass; M=male; NA=not applicable; PK=pharmacokinetic; SC=subcutaneous; T_{max}=time to reach maximal concentration; $t_{1/2}$=elimination half-life; Vdss=volume of distribution at steady-state.

a The plasma PK parameters were determined from mean plasma concentration-time data for the single IV or SC administration.

b Givosiran was not detectable for the 0.1-mg/kg SC dose group; hence, it was not possible to generate PK parameters.

表 2.6.5.3B ラットに単回皮下投与したときの薬物動態試験

Study Title: Pharmacokinetics Study of ALN-AS1 and Metabolite in Sprague Dawley Rats After a Single Subcutaneous Injection		Test Article: Givosiran Study No. AS1-DSM18-010
Species:	Sprague Dawley rats	
Sample/Assay:	Plasma/LC-MS/MS	
Analyte:	Givosiran, AD-62763 [givosiran metabolite AS(N-1)3']	
Method of Administration:	SC	
Dose (mg/kg):	10	
Sex/No. of Animals:	M/3	
Analyte	Givosiran (ALN-60519)	AD-62763
PK Parameters	Mean (±SD)	
C_{max} (μg/mL)	1.06 (0.414)	0.190 (0.0701)
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·h/mL)	3.00 (0.458)	0.626 (0.132)
$AUC_{0\text{-}24}$ (μg·h/mL)	3.24 (NR)	0.702 (NR)
Apparent $t_{1/2}$ (h)	3.0 (NR)	8.2 (NR)
% AD-62763 Plasma Exposure Relative to ALN-60519		
$AUC_{0\text{-}t(last)}$	NA	21%

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}24}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to 24 h postdose; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; LC-MS/MS=liquid chromatography/tandem mass spectrometry; M=male; NA=not applicable; NR=not reported; PK=pharmacokinetic; SC=subcutaneous; SD=standard deviation; $t_{1/2}$=elimination half-life.

表 2.6.5.3C ラットに単回皮下投与したときのトキシコキネティクス試験

Study Title: Toxicokinetic Aspects of "ALN-AS1: A 4-Week, Single Subcutaneous Dose Toxicokinetic Study in the Sprague-Dawley Rat"			**Test Article**: Givosiran **Study No**. AS1-NCD14-018	
Species:	Sprague Dawley rats			
Sample/Assay:	Plasma/LC/MS-HRAM			
Analyte:	Givosiran			
Method of Administration:	SC			
Dose (mg/kg):	3	10	30	100
Sex/No. of Animals:	(16M+16F)/32	(16M+16F)/32	(16M+16F)/32	(26M+26F)/52
TK Parameters	Overall (M + F) Mean			
T_{max} (h)	0.8	0.8	1.0	1.5
C_{max} (μg/mL)	0.85	3.59	10.4	18.5
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·h/mL)	1.09	4.25	17.1	65.5
Apparent $t_{1/2}$ (h)	0.9	1.5	1.1	1.3

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max} ; F=female; LC/MS-HRAM=liquid chromatography mass spectrometry-high resolution accurate mass; M=male; SC=subcutaneous; TK=toxicokinetic; $t_{1/2}$=elimination half-life.

表 2.6.5.3D サルに単回静脈内及び皮下投与したときの薬物動態／薬力学試験

Study Title: The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ALN-AS1 After a Single Intravenous, or Single or Multiple Subcutaneous, Doses to Cynomolgus Monkeys			**Test Article**: Givosiran **Study No.** AS1-NCD14-007	
Species:	Cynomolgus monkeys			
Sample/Assay:	Plasma/LC/MS-HRAM			
Analyte:	Givosiran			
Method of Administration:	IV bolus			
Dose (mg/kg):	10			
Sex/No. of Animals:	(3M+3F)/6			
PK Parameters	Overall (M+F) Mean			
T_{max} (h)	0.083			
C_0 (µg/mL)	215			
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	30.5			
Apparent $t_{1/2}$ (h)	0.224			
CL (mL/h/kg)	340			
Vdss (mL/kg)	104			
Method of Administration:	SC			
Dose (mg/kg):	0.1[a]	1	5	10
Sex/No. of Animals:	(3M+3F)/6	(3M+3F)/6	(3M+3F)/6	(3M+3F)/6
PK Parameters	Overall (M+F) Mean			
T_{max} (h)	NA	1.08	2.42	1.67
C_{max} (µg/mL)	NA	0.133	0.830	2.14
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	NA	0.324	4.65	11.2
Apparent $t_{1/2}$ (h)	NA	3.21	3.47	3.53
F (%)	NA	NA	NA	36.9

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_0=concentration at time 0; CL=total body clearance; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; F=female; F=bioavailability; IV=intravenous; LC/MS-HRAM=liquid chromatography mass spectrometry-high resolution accurate mass; M=male; NA=not applicable; PK=pharmacokinetic; SC=subcutaneous; T_{max}=time to reach maximal concentration; $t_{1/2}$=elimination half-life; Vdss=volume of distribution at steady state.

a Givosiran was not detectable for the 1-mg/kg SC dose group; hence, it was not possible to generate PK parameters.

表 2.6.5.3E　サルに単回皮下投与したときの薬物動態試験

Study Title: Pharmacokinetics Study of ALN-AS1 and Metabolite in Cynomolgus Monkeys After a Single Subcutaneous Injection		**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-DSM18-009
Species:	Cynomolgus monkeys	
Sample/Assay:	Plasma/LC-MS/MS	
Analyte:	Givosiran, AD-62763 [givosiran metabolite AS(N-1)3’]	
Method of Administration:	SC	
Dose (mg/kg):	30	
Sex/No. of Animals:	M/3	
Analyte	Givosiran (ALN-60519)	AD-62763
PK Parameters	Mean (±SD)	
C_{max} (µg/mL)	2.42 (0.664)	1.67 (0.0551)
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	26.4 (4.96)	19.4 (4.28)
$AUC_{0\text{-}48}$ (µg·h/mL)	28.3 (4.38)	18.5 (4.91)
Apparent $t_{1/2}$ (h)	5.5 (1.7)	5.1 (2.1)
% AD-62763 Plasma Exposure Relative to ALN-60519		
$AUC_{0\text{-}t(last)}$	NA	73.5%

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; LC-MS/MS=liquid chromatography/tandem mass spectrometry; M=male; NA=not applicable; PK=pharmacokinetic; SC=subcutaneous; SD=standard deviation; $t_{1/2}$=elimination half-life.

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収

表 2.6.5.4A ラットに反復皮下投与（週に 1 回 8 週間投与）したときの薬物動態／薬力学試験

Study Title: The Pharmacokinetics, Bioavailability, Tissue Distribution and Pharmacodynamics of ALN-AS1 After a Single Intravenous, or Single or Multiple Subcutaneous, Doses to Sprague-Dawley Rats			**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-NCD14-003
Species:	Sprague Dawley rats		
Sample/Assay:	Plasma/LC/MS-HRAM		
Analyte:	Givosiran		
Method of Administration:	SC (8 doses; once weekly)		
Dose (mg/kg):	1	2.5	5/1[a]
Sex/No. of Animals:	(34M+34F)/68	(34M+34F)/68	(34M+34F)/68
PK Parameters[b]	Overall (M+F) Mean		
T_{max} (h)	2	1	2
C_{max} (µg/mL)	0.11	0.17	0.08
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	NR	0.51	0.12
Apparent $t_{1/2}$ (h)	NR	NR	NR

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; F=female; LC/MS-HRAM=liquid chromatography mass spectrometry-high resolution accurate mass; M=male; NR=not reportable; PK=pharmacokinetic; SC=subcutaneous; T_{max}=time to reach maximal concentration; $t_{1/2}$=elimination half-life.

a A single 5-mg/kg loading dose was administered on Day 1, followed by 7 weekly doses at 1 mg/kg.

b The plasma PK parameters were determined from mean plasma concentration-time data. PK parameters were determined after the last (eighth) weekly SC dose.

表 2.6.5.4B サルに反復皮下投与（週に 1 回 8 週間投与）したときの薬物動態／薬力学試験

Study Title: The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ALN-AS1 After a Single Intravenous, or Single or Multiple Subcutaneous, Doses to Cynomolgus Monkeys					**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-NCD14-007	
Species:	Cynomolgus monkeys					
Sample/Assay:	Plasma/LC/MS-HRAM					
Analyte:	Givosiran					
Method of Administration:	SC (8 doses; once weekly)					
Dose (mg/kg):	1[a]		2.5[a]		5/1[b]	
Sex/No. of Animals:	(3M+3F)/6		(3M+3F)/6		(3M+3F)/6	
PK Parameters[c]	Overall (M +F) Mean					
Dose Number[c]	**1**	**8**	**1**	**8**	**1**	**8**
T_{max} (h)	1.67	1.50	1.58	1.83	1.83	1.42
C_{max} (µg/mL)	0.109	0.136	0.291	0.305	0.870	0.135
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	0.292	0.379	1.17	1.35	3.80	0.340
Apparent $t_{1/2}$ (h)	2.64	2.83	4.15	3.70	2.94	2.18

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; F=female; LC/MS-HRAM=liquid chromatography mass spectrometry-high resolution accurate mass; M=male; PK=pharmacokinetic; SC=subcutaneous; T_{max}=time to reach maximal concentration; $t_{1/2}$=elimination half-life.

a Monkeys were dosed on Days 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, and 50.

b Monkeys were administered a loading dose at 5 mg/kg on Day 1, followed by 7 weekly doses at 1 mg/kg on Days 8, 15, 22, 29, 36, 43, and 50.

c Pharmacokinetic profiles were determined after the first dose on Day 1 and after the last weekly SC dose (Day 50).

2.6.5.5 薬物動態試験：分布

表 2.6.5.5A ラットに単回静脈内及び皮下投与したときの薬物動態／薬力学試験

Study Title: The Pharmacokinetics, Bioavailability, Tissue Distribution and Pharmacodynamics of ALN-AS1 After a Single Intravenous, or Single or Multiple Subcutaneous, Doses to Sprague-Dawley Rats																	**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-NCD14-003
Species:	Sprague Dawley rats																
Sample/Assay:	Tissues/Hybridization-HPLC with fluorescence detection																
Analyte:	Givosiran																
Sex/No. of Animals:	(24M+24F)/48																
Dose (mg/kg):	10																
Method of Administration:	IV Bolus								SC								
Tissue Type:	Liver				Kidney				Liver				Kidney				
PK Parameters	Overall (M+F) Mean																
T_{max} (h)	2.1				0.25				4				6				
C_{max} (µg/g)	102				81.0				208				19.0				
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/g)	5389				5436				12,592				3188				
$t_{1/2}$ (h)	54.8				119				120				172				
Method of Administration:	SC																
Tissue Type:	Adrenal		Heart		Jejunum		Lung		Pancreas		Spleen		Thymus		Thyroid		Testes
Sex:	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
PK Parameters	Mean																
T_{max} (h)	4	4	8	4	8	2	4	4	8	4	2	2	4	8	8	8	8
C_{max} (µg/g)	0.44	0.47	0.47	0.37	0.50	0.37	0.58	0.48	1.73	1.17	0.53	0.67	0.28	0.28	0.51	0.52	0.29
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/g)	6.56	2.14	8.93	6.99	9.04	6.76	9.76	8.62	28.1	22.2	9.87	9.33	1.64	1.80	9.56	9.34	6.00
$t_{1/2}$ (h)	NR	NR	NR	30.5	NR	NR	25.4	24.1	NR	38.5	32.3	37.3	NR	NR	NR	NR	NR

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; F=female; HPLC=high-performance liquid chromatography; IV=intravenous; M=male; NR=not reportable; PK=pharmacokinetic; SC=subcutaneous; T_{max}=time to reach maximal concentration; $t_{1/2}$=elimination half-life.

表 2.6.5.5B ラットに単回皮下投与したときのトキシコキネティクス試験

Study Title: Toxicokinetic Aspects of "ALN-AS1: A 4-Week, Single Subcutaneous Dose Toxicokinetic Study in the Sprague-Dawley Rat"					**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-NCD14-018			
Species:	Sprague Dawley rats							
Analyte:	Givosiran							
Method of Administration:	SC							
Sample/Assay:	Liver/Hybridization-HPLC with fluorescence detection				Kidney/Hybridization-HPLC with fluorescence detection			
Dose (mg/kg):	3	10	30	100	3	10	30	100
Sex/No. of Animals:	(16M+16F)/32	(16M+16F)/32	(16M+16F)/32	(26M+26F)/52	(16M+16F)/32	(16M+16F)/32	(16M+16F)/32	(26M+26F)/52
TK Parameters	Overall (M + F) Mean							
T_{max} (h)	8.0	4.0	5.0	8.0	12.1	14.0	49.0	6.0
C_{max} (µg/g)	75.6	379	634	2237	8.27	13.7	24.2	522
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/g)	4439	29248	39736	160744	715	1667	2512	48739
$t_{1/2}$ (h)	39.1	60.3	67.3	47.4	119	66.9	NR	81.1

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; F=female; HPLC=high-performance liquid chromatography; M=male; NR=not reportable; SC=subcutaneous; TK=toxicokinetic; T_{max}=time to reach maximal concentration; $t_{1/2}$=elimination half-life.

表 2.6.5.5C ラットに[^{3}H]-ギボシランを単回皮下投与後の定量的全身オートラジオグラフィーを用いた組織内分布

Study Title: [^{3}H]-ALN-AS1: Metabolism, Excretion and Mass Balance, and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague-Dawley Rats Following a Single Subcutaneous Administration			**Test Article:** [^{3}H]-Givosiran **Study No.** AS1-DSM17-018	
Species:	Sprague Dawley rats (intact)			
Sample/Assay:	Blood, plasma/LSC; Tissues/QWBA			
Analyte:	[^{3}H]-Givosiran			
Method of Administration:	SC			
Dose (mg/kg):	10			
Sex/No. of Animals:	12/M			
Sample:	**Mean PK Parameters**[a]			
	T_{max} (h)	**C_{max} (µg eq./g)**	$t_{1/2}$ **(h)**	**$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg eq.·h/g)**
Blood (LSC)	96.0	0.783	229	283
Plasma (LSC)	1.00	1.12	197	337
Plasma (dry; LSC)	1.00	1.22	181	27.9
Blood (QWBA)	1.00	1.16	NC	NR
Bone marrow	48.0	2.83	NC	577
Cecum	24.0	2.35	NC	NR
Kidney cortex	48.0	18.6	116	3350
Kidney medulla	4.00	4.28	NC	200
Kidney(s)	4.00	15.2	171	3340
Large intestine	4.00	0.782	NC	42.8
Liver	6.00	162	137	14200
Lymph node(s)	2.00	38.2	NC	3690
Pancreas	24.0	1.84	NC	226
Pituitary gland	6.00	1.58	NC	NR
Prostate gland	4.00	0.691	NC	NR
Salivary gland(s)	24.0	2.00	NC	459
Skin (nonpigmented)	0.500	2.04	NC	45.7
Spleen	48.0	0.877	NC	55.8
Thoracic duct	2.00	17.7	NC	84.2
Thyroid	24.0	3.08	NC	655
Urinary bladder	4.00	28.4	NC	NR

Study Title: [^{3}H]-ALN-AS1: Metabolism, Excretion and Mass Balance, and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Autoradiography in Male Sprague-Dawley Rats Following a Single Subcutaneous Administration	**Test Article:** [^{3}H]-Givosiran **Study No.** AS1-DSM17-018

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; LSC=liquid scintillation counting; M=male; NC=not calculated; NR=not reportable; PK=pharmacokinetics; QWBA=quantitative whole-body autoradiography; SC=subcutaneous; TK=toxicokinetic; T_{max}=time to reach maximal concentration; $t_{1/2}$=elimination half-life.

a n=1

表 2.6.5.5D サルに単回静脈内及び皮下投与したときの薬物動態／薬力学試験

Study Title: The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ALN-AS1 After a Single Intravenous, or Single or Multiple Subcutaneous, Doses to Cynomolgus Monkeys				**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-NCD14-007	
Species:	Cynomolgus monkeys				
Sample/Assay:	Liver/Hybridization-HPLC with fluorescence detection				
Analyte:	Givosiran				
Method of Administration:	IV Bolus	SC			
Dose (mg/kg):	10	0.1	1	5	10
Sex/No. of Animals:	(3M+3F)/6	(3M+3F)/6	(3M+3F)/6	(3M+3F)/6	(3M+3F)/6
PK Parameters[a]	Overall (M+F) Mean				
T_{max} (h)	8.0	24.0	16.0	24.0	8.0
C_{max} (µg/g)	41.5	1.81	28.3	154	204
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/g)	4217	212	2543	17,917	28,496
$t_{1/2}$ (h)	164	NR	211	167	146

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; F=female; HPLC=high-performance liquid chromatography; IV=intravenous; M=male; NR=not reportable; PK=pharmacokinetic; SC=subcutaneous; T_{max}=time to reach maximal concentration; $t_{1/2}$=elimination half-life.

a n=2

表 2.6.5.5E ラットに反復皮下投与したときの薬物動態／薬力学試験

Study Title: The Pharmacokinetics, Bioavailability, Tissue Distribution and Pharmacodynamics of ALN-AS1 After a Single Intravenous, or Single or Multiple Subcutaneous, Doses to Sprague-Dawley Rats					**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-NCD14-003	
Species:	Sprague Dawley rats					
Sample/Assay:	Tissues/Hybridization-HPLC with fluorescence detection					
Analyte:	Givosiran					
Method of Administration:	SC (8 doses; once weekly)					
Dose (mg/kg):	1		2.5		5/1[a]	
Sex/No. of Animals:	(34M+34F)/68	(34M+34F)/68	(34M+34F)/68	(34M+34F)/68	(34M+34F)/68	(34M+34F)/68
Tissue Type:	Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Kidney
PK Parameters[b]	Overall (M + F) Mean					
T_{max} (h)	3	52	8	6	6	8
C_{max} (µg/g)	25.9	5.45	65.2	14.6	29.8	7.98
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/g)	1285	1191	3656	2940	1891	1546
$t_{1/2}$ (h)	60.7	176	56.5	174	54.0	219

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; F=female; HPLC=high-performance liquid chromatography; M=male; PK=pharmacokinetic; SC=subcutaneous; T_{max}=time to reach maximal concentration; $t_{1/2}$=elimination half-life.

a A single 5 mg/kg loading dose was administered on Day 1, followed by 7 weekly doses at 1 mg/kg.

b PK parameters were determined after the last (eighth) weekly SC dose (n=2).

表 2.6.5.5F サルに反復皮下投与（週に 1 回 8 週間投与）したときの薬物動態／薬力学試験

Study Title: The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ALN-AS1 After a Single Intravenous, or Single or Multiple Subcutaneous, Doses to Cynomolgus Monkeys		**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-NCD14-007	
Species:	Cynomolgus monkeys		
Sample/Assay:	Liver/Hybridization-HPLC with fluorescence detection		
Analyte:	Givosiran		
Method of Administration:	SC (8 doses; once weekly)		
Dose (mg/kg):	2.5[a]	5/1[b]	1[a]
Sex/No. of Animals:	(3M+3F)/6	(3M+3F)/6	(3M+3F)/6
PK Parameters[c]	Overall (M+F) Mean		
T_{max} (h)	24.0	24.0	24.0
C_{max} (µg/g)	64.8	13.9	16.9
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/g)	9083	2651	3341
$t_{1/2}$ (h)	371	236	234

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; F=female; HPLC=high-performance liquid chromatography; M=male; PK=pharmacokinetic; SC=subcutaneous; T_{max}=time to reach maximal concentration; $t_{1/2}$=elimination half-life.

a Monkeys were dosed on Days 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, and 50.

b Monkeys were administered a loading dose at 5 mg/kg on Day 1, followed by 7 weekly doses at 1 mg/kg on Days 8, 15, 22, 29, 36, 43, and 50.

c Pharmacokinetic profiles were determined after the last weekly SC dose (Day 50); n=2.

2.6.5.6 薬物動態試験：たん白結合

表 2.6.5.6 薬物動態試験：血漿たん白結合

Study Title: Binding of ALN-AS1 (ALN-60519) to Mouse, Rat, Monkey, or Human Plasma Proteins				**Test Article:** Givosiran		
Study System: *In vitro*				**Study No.** AS1-DSM18-008		
Sample/Assay: Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)						
Givosiran Concentration (µg/mL):	Mean Percent (%) Bound[a]					
	0.5[b]	1.0	5	10	25	50
Mouse Plasma	ND	91.3	79.8	61.8	38.1	10.1
Rat Plasma	ND	93.1	89.0	78.6	51.6	27.5
Monkey Plasma	ND	89.5	82.7	69.9	43.9	25.9
Human Plasma	ND	91.8	83.4	71.4	39.2	21.1[c]

Abbreviations: ND=not determined.

a n=2

b Samples were unable to be analyzed due to insufficient staining of sample lanes.

c One replicate masked due to insufficient quality of sample.

2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

表 2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

Report Title: ALN-AS1: A Subcutaneous Injection Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Study in Sprague Dawley Rats, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation			**Test Article:** Givosiran	
Placental transfer: Not evaluated. **Excretion into Milk**			**Study No.** AS1-GLP17-009	
Species: Sprague Dawley rats				
Lactating Date/Number of Animals: LD 12 / 5F/group (dams), 3/sex/group (F1 pups)				
Feeding Condition: Fed				
Vehicle/Formulation: 0.9% NaCl				
Method of Administration: SC injection				
Analyte: Givosiran				
Assay: LC/MS-HRAM				
Time (h): 2 hours postdose				
Maternal Dose (mg/kg)	0	3	10	30
Concentration (Mean ±SD) (ng/mL)				
Milk:	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ[b]
Plasma[a]:	BLQ	95.5±15.5	435±83.3	2712±486
Pups (F1 generation plasma):	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Additional Information: NA				

Abbreviations: BLQ=below the lower limit of quantitation; F=female; LC/MS-HRAM=liquid chromatography mass spectrometry-high resolution accurate mass; LD=day of lactation; NA=not applicable; SC=subcutaneous; SD=standard deviation.

Note: Refer to Reproductive and Developmental Toxicology Study [AS1-GLP17-009]; [表 2.6.7.14-1] for additional details.

a Maternal plasma samples (n=3 to 4 per group) were collected on LD 12 at 2 hours postdose (following milk collection), while pup plasma samples (n=6/group) from the F1 generation were collected on Day 12 postpartum at 2 hours post maternal dose.

b Mean average for 30-mg/kg group BLQ; single dam showed detectable level of 229 ng/mL.

2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験

その他の分布試験は実施しなかった。分布試験については、2.6.5.5 項参照。

2.6.5.9 薬物動態試験：*In Vivo* における代謝

表 2.6.5.9A ラット及びサル血漿における *in vivo* 代謝プロファイル

Study Title: *In Vitro* Metabolic Stability of ALN-60519 in Mouse, Rat, Monkey, and Human Serum and Liver S9-Fractions, and *In Vitro* and *In Vivo* Metabolic Profiling of ALN-60519	**Test Article:** Givosiran **Study No.** BA14010
Method: The *in vivo* metabolic profiling of givosiran was conducted using plasma and liver samples obtained from the rat and monkey pharmacokinetic studies (AS1-NCD14-003 and AS1-NCD14-007) after a single SC dose at 10 mg/kg. Metabolic profiling was performed by an LC/MS method. The resultant possible metabolic pathway is presented in 表 2.6.5.11A.	
Results: **Metabolism of Antisense Strand:** AS(N-1) 3' and AS(N-1) 5' metabolites were the major metabolites detected in the plasma and liver obtained from the rat and monkey pharmacokinetic studies. Both metabolites have the same mass and are presumably formed by the loss of one uridine monophosphate nucleotide from either the 3' or 5' end of the antisense strand. **Metabolism of Sense Strand:** In the plasma obtained from the rat and monkey pharmacokinetic studies, the sense strand was minimally metabolized primarily generating a metabolite corresponding to the loss of one GalNAc group from the 3' end. In the liver obtained from the rat and monkey pharmacokinetic studies, the major metabolite of sense strand was generated by the loss of 1, 2, or all 3 GalNAc moieties at the 3' end.	

Abbreviations: GalNAc=*N*-acetylgalactosamine; LC/MS=liquid chromatography mass spectrometry; SC=subcutaneous.

表 2.6.5.9B ラット血漿における *in vivo* 代謝プロファイル

Study Title: [^{3}H]-ALN-AS1, Metabolism, Excretion and Mass Balance, and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Auto Radiography in Male Sprague-Dawley Rats Following a Single Subcutaneous Administration	**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-DSM17-018
Method: The *in vivo* metabolic profiling of givosiran was conducted using samples obtained from Sprague Dawley rats after a single SC dose at 10 mg/kg. Metabolic profiling was performed by an LC/MS method. The resultant possible metabolic pathway is presented in 表 2.6.5.11B.	
Results: The profile of an AUC-pooled plasma sample showed that the majority of the radioactivity was associated with unchanged givosiran and accounted for approximately 54% of the total radioactivity exposure through 48 hours (AUC_{0-48}). AS(N-1)3' givosiran (M15) was a major circulating metabolite, contributing 13.0% of the total radioactivity exposure. The majority of the unknown radioactivity (M1) in urine was eluted at the void volume and accounted for 38.7% and 18.8% of the dose in intact and bile duct-cannulated (BDC) rats, respectively. Unchanged givosiran was recovered in urine from both intact and BDC rats, accounted for 3.38% and 3.90% of the dose, respectively. AS(N-1)3' givosiran (M15) accounted for 0.971% and 1.96% of the dose in urine from intact and BDC rats, respectively. In bile, approximately 6% and 5% of the dose was recovered as unchanged givosiran and AS(N-1)3' givosiran (M15), respectively. No unchanged givosiran was recovered in feces. Six metabolites of the antisense strand of givosiran were tentatively identified, in addition to AS(N-1)3' givosiran (M15), and the tentative identity of these metabolites are shown in 表 2.6.5.11B. Metabolite profiling and identification results indicate that givosiran was cleared in rats via a combination of metabolism and unchanged parent drug.	

Abbreviations: AUC=area under the plasma concentration-time curve; LC/MS=liquid chromatography mass spectrometry; SC=subcutaneous.

表 2.6.5.9C　サルの血漿、肝臓及び尿並びにヒト血漿及び尿における *in vivo* 代謝プロファイル

Study Title: Development of an LC-MS/MS Method for Quantitation of ALN-AS1 Antisense Strand Full Length and N-1 Metabolites and Exploratory Analysis in Monkey and Human to Confirm Assay Feasibility	**Test Article:** Givosiran
	Study No. BA17014
Method: An LC-MS/MS method was developed to differentiate and quantitate givosiran AS(N-1)3' and AS(N-1)5' metabolites and full-length antisense strand in selected monkey plasma (8 weekly SC doses at 2.5 mg/kg), liver (single SC doses at 0.1, 1.0, 5.0, 10 mg/kg; once-weekly SC doses at 2.5 or 1 mg/kg for 8 weeks; or a single SC dose at 5 mg/kg then once weekly × 7 SC doses at 1 mg/kg), and urine (single SC dose at 10 mg/kg) samples from Study AS1-NCD14-007 and in selected human plasma and urine samples from 2 patients from Part C of Study ALN-AS1-001 (SC injections at 5 mg/kg). The *in vivo* metabolic profiles of givosiran in monkey urine and human plasma and urine were also determined using solid-phase extraction and analysis by LC/MS using a Q-exactive mass spectrometer.	
Results: Initial analysis during method development demonstrated that givosiran metabolite from antisense strand 3' end with loss of one nucleotide [AS(N-1)3'] was the major N-1 metabolite in monkey plasma, liver, and urine, as well as in human plasma and urine. Givosiran metabolite from antisense strand 5' end with loss of one nucleotide [AS(N-1)5'] was not detected in any of these samples. Subsequent determination of *in vivo* metabolite profiles from monkey urine and human plasma and urine samples indicated that the givosiran antisense strand was metabolized to form two possible major metabolites: AS(N-1)3' and/or AS(N-1)5'. Spectra showed that metabolites AS(N-1)3' and AS(N-1)5' have the exact same mass and are formed by the loss of a uridine monophosphate nucleotide from either the 3' or 5' end of the antisense strand. *In vivo* metabolite profiles from monkey urine indicate that the sense strand was metabolized mainly by the loss of 1, 2, or all 3 sugar moieties and with different linkers from GalNAc moieties at the 3' end. *In vivo* metabolite profiles from human plasma and urine indicate that the givosiran sense strand was metabolized by loss of 1 or 3 sugar moieties from the GalNAc group.	

Abbreviations: AUC=areaSC=subcutaneous.

2.6.5.10 薬物動態試験：*In Vitro* における代 謝

表 2.6.5.10A 血清及び肝 S9 画分における *in vitro* 代謝安定性

Study Title: *In Vitro* Metabolic Stability of ALN-60519 in Mouse, Rat, Monkey, and Human Serum and Liver S9-Fractions, and *In Vitro* and *In Vivo* Metabolic Profiling of ALN-60519							**Test Article:** Givosiran **Study No.** BA14010	
Method: The *in vitro* metabolic stability of givosiran was evaluated in pooled serum and liver S9-fractions obtained from C57BL/6 mice, Sprague Dawley rats, cynomolgus monkeys, and humans at a final concentration of 5 µmol/L, incubated at 37°C at different time points up to 24 hours in serum and liver S9 fractions. Givosiran sense and antisense strands in each sample (n=2) were quantified using a liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) method.								
Percent (%) of Baseline in Serum								
Species:	**Mice**		**Rats**		**Cynomolgus Monkeys**		**Humans**	
Time Point (h)	**Antisense**	**Sense**	**Antisense**	**Sense**	**Antisense**	**Sense**	**Antisense**	**Sense**
0	100	100	100	100	100	100	100	100
0.5	92	102	92	100	97	95	100	95
1	95	110	97	102	94	97	97	97
2	93	106	95	104	97	98	96	92
4	91	107	99	107	91	96	100	97
6	94	106	92	107	83	88	90	85
8	85	95	88	99	89	104	97	97
24	75	95	59	95	63	100	89	95
Percent (%) of Baseline in Liver S9 Fractions								
Species:	**Mice**		**Rats**		**Cynomolgus Monkeys**		**Humans**	
Time Point (h)	**Antisense**	**Sense**	**Antisense**	**Sense**	**Antisense**	**Sense**	**Antisense**	**Sense**
0	100	100	100	100	100	100	100	100
0.5	106	105	98	108	106	105	95	98
1	107	103	94	105	92	93	92	93
2	110	100	78	102	102	103	94	92
4	104	98	65	97	87	98	85	90
7	93	94	56	97	81	96	73	80
24	103	102	36	64	68	88	49	65

表 2.6.5.10B ヒト肝 S9 画分における *in vitro* 代謝安定性

Study Title: Metabolic Stability of ALN-AS1 in Human Liver S9 With and Without cofactor (NADPH)	**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-DSM18-015

Method and Results: The *in vitro* metabolic stability of givosiran was evaluated at a final concentration of 10 μmol/L incubated at 37°C in human liver S9 (1 mg/mL) for durations of 0 and 1 hour in triplicate. Reactions were terminated by the addition of EDTA solution and followed by lysis in the presence of lysis-loading buffer (Phenomenex Inc, Torrance, CA). The resultant samples after extractions were evaluated by LC/MS; givosiran sense and antisense strands can be separated into corresponding peaks by liquid chromatography and detected by a high-resolution exact mass spectrometer. Percent remaining was calculated comparing different time points against the 0 time points using peak area ratio (analyte/IS). Verapamil was used as a positive control.
After 1 hour of incubation of givosiran in human liver S9 (1 mg/mL) at 37°C, there was no change for both the sense and antisense strand. The percent of antisense strand remaining was approximately 98%±1.53%, and the percent of sense strand remaining was approximately 96%±4.61%. For positive control verapamil, the percent remaining was only 33%±4.56%, which indicated that the human liver S9 lot was very active in presence of NADPH.

Time (h)	**% Remaining (Mean±SD)**[a]					
	Givosiran (- NADPH)			**Givosiran (+ NADPH)**		
	Antisense	**Sense**	**Verapamil**	**Antisense**	**Sense**	**Verapamil**
0	100±2.66	100±2.94	100±7.81	100±3.53	100±7.49	100±7.01
1	104±2.28	97±3.44	88±5.71	98±1.53	96 ±4.61	33±5.42

Abbreviations: EDTA=ethylenediaminetetraacetic acid; IS=internal standard; LC/MS=liquid chromatography mass spectrometry; NADPH=nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; SD=standard deviation.

a n=3

表 2.6.5.10C *In vitro* 代謝プロファイル

Study Title: *In Vitro* Metabolic Stability of ALN-60519 in Mouse, Rat, Monkey, and Human Serum and Liver S9-Fractions, and *In Vitro* and *In Vivo* Metabolic Profiling of ALN-60519	**Test Article:** Givosiran **Study No.** BA14010
Method: The *in vitro* metabolic profiling of givosiran was evaluated in pooled serum and liver S9-fractions obtained from C57BL/6 mice, Sprague Dawley rats, cynomolgus monkeys, and humans, and incubated at 37°C. Metabolic profiling was performed by an LC/MS method. The resultant possible metabolic pathway is presented in 表 2.6.5.11A.	
Results: **Metabolism of Antisense (AS) Strand:** AS(N-1) 3' and AS(N-1) 5' metabolites were the major metabolites detected in the serum of mouse, rat, monkey, and human. In the liver S9 fractions of mouse, rat, monkey, and human, the major metabolites were AS(N-3)5', AS(N-1)3', and AS(N-1)5' metabolite. **Metabolism of Sense Strand:** The sense strand was minimally metabolized primarily generating a metabolite corresponding to the loss of one GalNAc group from the 3' end in the serum of mouse, rat, monkey, and human. In the liver S9 fractions of mouse, rat, monkey, and human, the major metabolites of sense strand were generated by the loss of 1, 2, or all 3 GalNAc moieties at the 3' end.	

Abbreviations: GalNAc=*N*-acetylgalactosamine; LC/MS=liquid chromatography mass spectrometry.

2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路

表 2.6.5.11A 血清及び肝 S9 画分における *in vitro* 代謝安定性及び代謝プロファイル

Study Title: *In Vitro* Metabolic Stability of ALN-60519 in Mouse, Rat, Monkey, and Human Serum and Liver S9-Fractions, and *In Vitro* and *In Vivo* Metabolic Profiling of ALN-60519	**Test Article:** Givosiran **Study No.** BA14010
Method: See 表 2.6.5.9A and 表 2.6.5.10C.	

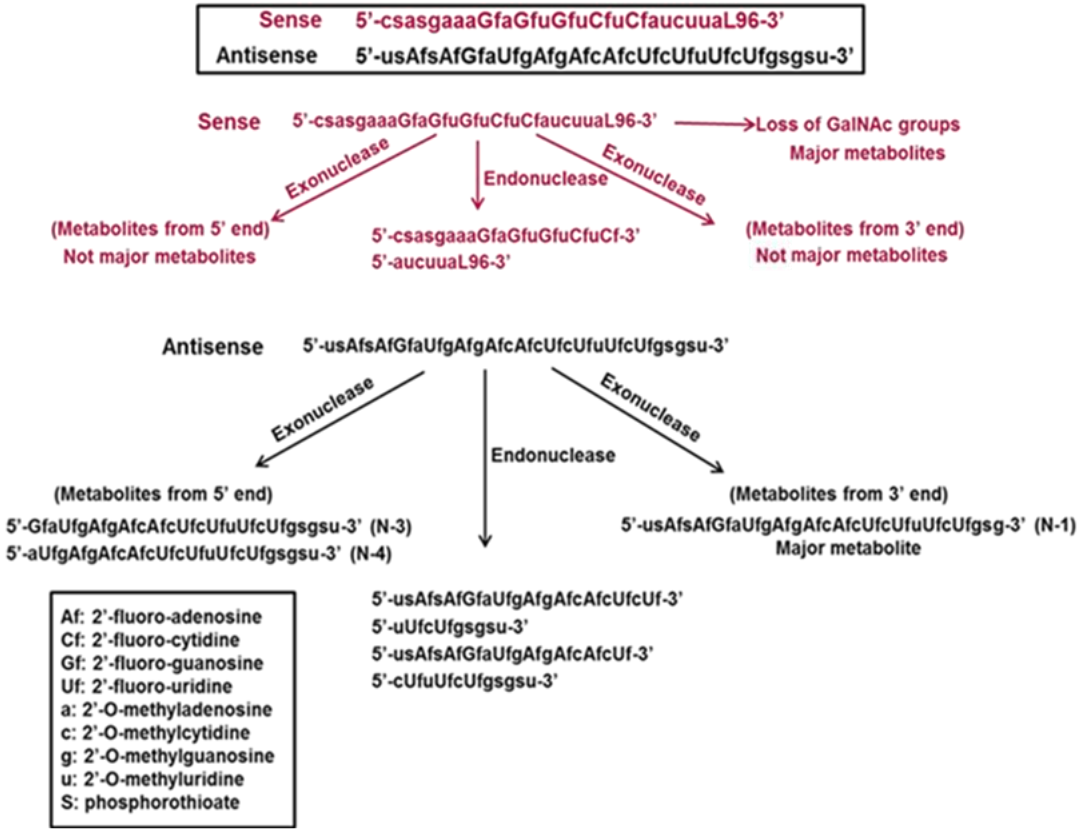
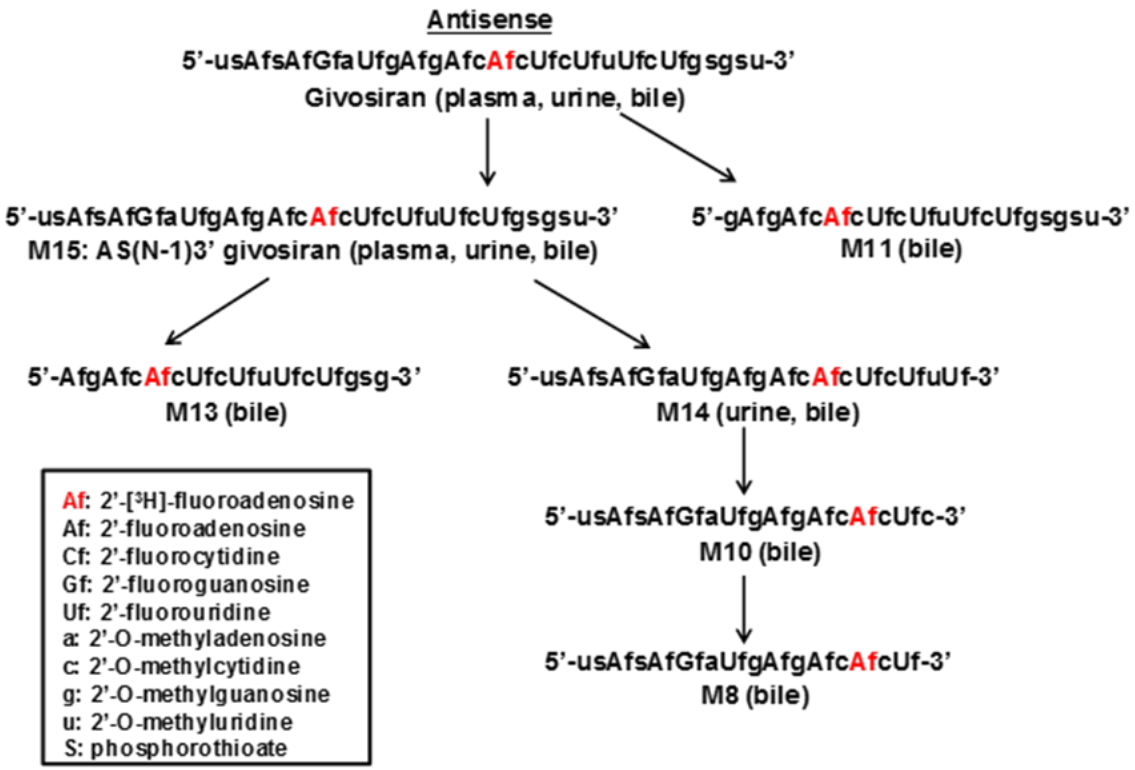


表 2.6.5.11B [^{3}H]-ギボシランの *in vivo* 代謝プロファイル

Study Title: [^{3}H]-ALN-AS1, Metabolism, Excretion and Mass Balance, and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Auto radiography in Male Sprague-Dawley Rats Following a Single Subcutaneous Administration	**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-DSM17-018
Method: See 表 2.6.5.9B	



2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

表 2.6.5.12A *In vitro* におけるヒト肝ミクロソームの直接又は時間依存的 CYP 阻害

Study Title: Evaluation of the Direct and Time-dependent Inhibitory Potential Against Seven Human Cytochrome P450 Isoforms Using Human Liver Microsomes	**Test Article:** Givosiran **Study No.** [redacted]

Method:

Direct inhibition: The direct inhibitory potential of givosiran towards 7 human cytochrome P450 isoforms (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4/5) was tested *in vitro* in human liver microsomes (HLMs), using 8 CYP-specific marker substrate reactions. For each reaction, CYP activity was assessed by the formation of the marker substrate metabolite in the absence (vehicle control) and presence of givosiran at 0.000614, 0.0614, 0.614, 3.07, 6.14, 30.7, 61.4, 306.8, and 613.6 µmol/L (0, 0.01, 1, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, and 10,000 µg/mL). Incubations with givosiran were conducted in triplicate for determination of the concentration inhibiting maximal activity by 50% (IC_{50}). Incubations with a selective inhibitor of the CYP isoform (CYP1A2:furafylline, CYP2B6:tranylcypromine, CYP2C8:montelukast, CYP2C9:sulfaphenazole, CYP2C19:benzylnirvanol, CYP2D6:quinidine, and CYP3A4/5:itraconazole), at or above the reported IC_{50} values, were conducted concurrently in duplicate for confirmation of enzymatic activity and comparison of inhibitory potential (positive controls).

Time-dependent inhibition: Time-dependent inhibition potential towards the 7 CYPs was assessed with 2 sets of simultaneous incubations. In 1 set, HLMs were pre-incubated at concentrations of givosiran noted above in the presence of β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH); in the other set, HLMs were pre-incubated with the same concentrations of givosiran in the absence of NADPH. The residual CYP isoform activity was analyzed by incubation of each pre-incubation mixture with the respective probe substrate. Incubations with a single concentration of selective inhibitor of the CYP isoform (CYP1A2:furafylline:1 µmol/L, CYP2B6:ThioTEPA:5 µmol/L, CYP2C8:gemfibrozil glucuronide:25 µmol/L, CYP2C9:tienilic acid:1 µmol/L, CYP2C19:ticlopidine:10 µmol/L, CYP2D6:paroxetine:0.5 µmol/L, and CYP3A4/5:azamulin:0.5 µmol/L) were conducted concurrently in triplicate for confirmation of enzymatic activity and comparison of inhibitory potential (positive controls).

The metabolites of the probe substrates were measured using LC-MS/MS.

Results: Givosiran did not demonstrate any direct or time-dependent inhibition by givosiran towards any of the CYP isoforms evaluated. These data suggest that givosiran has a low likelihood of mediating a drug-drug interaction (DDI) caused by direct inhibition of the activity of these CYP isoforms.

Mean IC_{50} (µmol/L) for Positive Controls (Direct Inhibition)

CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5[a]	CYP3A4/5[b]
5.1	2.2	0.08	0.17	0.18	0.04	0.09	0.03

Mean IC_{50} (µmol/L) for Givosiran (Direct Inhibition)

CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5[a]	CYP3A4/5[b]
NI	NI	NI	NI	>613.6	>613.6	NI	NI

% Activity relative to Vehicle Control (Time-dependent Inhibition with NADPH)

CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5[a]	CYP3A4/5[b]
39.8	19.7	25.8	26.4	29.3	60.1	42.6	35.0

Mean IC_{50} (µmol/L) for Givosiran (Time-dependent Inhibition with and without NADPH)

CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5[a]	CYP3A4/5[b]
NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

Study Title: Evaluation of the Direct and Time-dependent Inhibitory Potential Against Seven Human Cytochrome P450 Isoforms Using Human Liver Microsomes	**Test Article:** Givosiran
	Study No. [redacted]

Abbreviations: CYP=cytochrome P450; IC_{50}=inhibitor concentration which inhibits maximal activity by 50%; NADPH=nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen; NI=no inhibition.

a Midazolam was used as substrate.

b Testosterone was used as substrate.

表 2.6.5.12B 培養ヒト肝細胞における *in vitro* CYP 誘導

Study Title: Evaluation of the Potential of ALN-AS1 to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes	**Test Article:** Givosiran **Study No.** [redacted]

Method: Human hepatocytes from 3 separate adult donors were cultured on collagen-coated plates and incubated with vehicle alone, positive and negative control compounds, or test article for 48 or 72 hours (to determine mRNA and enzyme activity, respectively). Givosiran was evaluated at 4 concentrations: 0.01, 1, 10, and 100 µg/mL (0.0006, 0.06, 0.61, and 6.1 µmol/L, respectively). Changes in mRNA and activity of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 were measured *in situ* with a cocktail of phenacetin, bupropion, and midazolam using qualified LC-MS/MS methods. The criteria for positive CYP induction were: increases in mRNA levels ≥2-fold above vehicle control, or enzyme activity ≥40% (or 0.4-fold) of the relevant positive control induction. Additionally, lactate dehydrogenase (LDH) leakage was assessed at 48 or 72 hours to gauge any cytotoxic effects of givosiran.

Results: There was no increase in LDH leakage with any concentration of givosiran with any of the 3 donors used in this study. Marked induction of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 mRNA expression and corresponding enzyme activity was observed with positive controls (omeprazole, phenobarbital, and rifampin, respectively). No statistically significant induction was observed with the negative control, flumazenil. Hepatocytes treated with givosiran showed no statistically significant increase in CYP1A2, CYP2B6, or CYP3A4 mRNA levels at the concentrations tested and no increased CYP1A2, CYP2B6, or CYP3A4 enzyme activity under the conditions utilized in this study. Based on these results, givosiran appears unlikely to be a CYP inducer at concentrations that are at or below 100 µg/mL (6.1 µmol/L).

Fold mRNA Changes in Hepatocytes Treated with Givosiran[a]

Donor No.	0.01 µg/mL (0.0006 µmol/L)	1 µg/mL (0.06 µmol/L)	10 µg/mL (0.61 µmol/L)	100 µg/mL (6.1 µmol/L)
CYP1A2				
1	0.83±0.26	1.02±0.78	0.89±0.18	0.83±0.12
2	0.59±0.09	0.61±0.12	0.53±0.08	0.62±0.04
3	0.99±0.31	0.75±0.18	0.90±0.24	1.42±0.32
CYP2B6				
1	0.97±0.24	1.22±0.15	1.37±0.23	1.01±0.13
2	0.59±0.13	0.80±0.14	0.71±0.18	0.64±0.01
3	1.18±0.14	1.35±0.21	1.49±0.34	1.27±0.33
CYP3A4				
1	0.98±0.26	1.05±0.70	0.92±0.10	0.78±0.15
2	0.65±0.09	0.75±0.12	0.52±0.06	0.57±0.03
3	2.16±0.84	1.58±NA	1.45±0.14	1.82±0.25

Fold Activity Changes in Hepatocytes Treated with Givosiran[a]

Donor No.	0.01 µg/mL (0.0006 µmol/L)	1 µg/mL (0.06 µmol/L)	10 µg/mL (0.61 µmol/L)	100 µg/mL (6.1 µmol/L)
CYP1A2				
1	0.99±0.16	0.93±0.10	0.94±0.11	1.00±0.05
2	0.79±0.05	0.55±0.02	0.51±0.02	0.44±0.03
3	1.00±0.02	0.82±0.21	0.78±0.05	0.63±0.04

表 2.6.5.12B 培養ヒト肝細胞における in *vitro* CYP 誘導（続き）

Study Title: Evaluation of the Potential of ALN-AS1 to Induce CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 in Cultured Human Hepatocytes			**Test Article:** Givosiran **Study No.** [redacted]	
CYP2B6				
1	0.91±0.12	1.05±0.11	1.10±0.14	1.06±0.11
2	0.94±0.12	0.65±0.04	0.58±0.04	0.38±0.05
3	0.96±0.04	0.95±0.14	0.84±0.01	0.40±0.03
CYP3A4				
1	0.99±0.08	0.86±0.02	0.82±0.04	0.82±0.03
2	0.98±0.12	0.73±0.04	0.68±0.07	0.55±0.02
3	1.06±0.05	0.94±0.23	0.94±0.06	0.74±0.06

Abbreviations: CYP=cytochrome P450; LC-MS/MS=liquid chromatography/tandem mass spectrometry; LDH=lactate dehydrogenase; mRNA=messenger RNA; NA=not applicable, n=2.

a Data are mean ± standard deviation (n=3). The fold change is calculated by dividing the specific activity of the treatment condition by the specific activity of the vehicle control.

表 2.6.5.12C 単回又は週に 1 回皮下投与後のラットミクロソームにおける *ex vivo* CYP1A、2B、2D、2E 及び 3A 活性の検討

Study Title: *Ex Vivo* Evaluation of CYP1A CYP2B, CYP2D, CYP2E and CYP3A Activities in Hepatic Microsomes Prepared from Sprague Dawley Rats Treated with a Single or Multiple Once-Weekly Doses of ALN-AS1	**Test Article:** Givosiran **Study No.** [redacted]
Method: Sprague Dawley rat liver samples were obtained from a PK study in which rats were administered a single dose of givosiran at 10 mg/kg [IV, SC], SC: 1 and 2.5 mg/kg [8 weekly doses], or a single loading dose of 5 mg/kg followed by once-weekly doses of givosiran at 1 mg/kg for 7 weeks (Study No. AS1-NCD14-003). Liver samples from treated rats were obtained 24 hours after the last dose. For CYP activity determination, the microsomes were incubated in duplicate with CYP isoform-specific probe substrates of CYP1A, CYP2B and CYP3A, CYP2D, and CYP2E. The metabolites (acetaminophen for CYP1A, 16β-hydroxytestosterone for CYP2B, dextrorphan for CYP2D, 6-hydroxychlorzoxazone for CYP2E, and 6β-hydroxytestosterone for CYP3A) formed in microsomal incubations were analyzed using LC-MS/MS with electrospray ionization technique.	
Results: Both of the dosing regimens for givosiran examined in this study caused similar changes in CYP1A, CYP2B, CYP2D, CYP2E, and CYP3A activities. The statistically significant changes exhibited in rats after dosing with givosiran were relatively small and not expected to cause biologically relevant problems. Overall, the magnitude of activity decreases (CYP1A, CYP2B, CYP2E, and CYP3A, observed in females only) was within 3-fold of the control values and within the biological variability of the rats and the error of the assay. The changes were not likely to be biologically significant.	

Abbreviations: CYP=cytochrome P450; PK=pharmacokinetic; IV=intravenous; LC-MS/MS=liquid chromatography/tandem mass spectrometry; SC=subcutaneous.

2.6.5.13 薬物動態試験：累積排泄

表 2.6.5.13A ラットに単回皮下投与後の尿糞中への排泄

Study Title: The Pharmacokinetics, Bioavailability, Tissue Distribution and Pharmacodynamics of ALN-AS1 After a Single Intravenous, or Single or Multiple Subcutaneous, Doses to Sprague-Dawley Rats		**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-NCD14-003
Species:	Sprague Dawley rats	
Analyte:	Givosiran	
Method of Administration:	SC	
Dose (mg/kg):	10	
Sex/No. of Animals:	(24M + 24F)/48	
Sample/Assay:	Urine/Hybridization-HPLC with fluorescence detection	Feces/Hybridization-HPLC with fluorescence detection
Time (h)	Overall (M+F) Mean Percent (%) of Dose in Urine by Interval After SC Dosing	Overall (M F) Mean Percent (%) of Dose in Feces by Interval After SC Dosing
0-8	6.93	0.05
8-24	2.50	0.04
24-48	0.27	0.00
48-72	0.23	0.00
72-96	0.16	0.00
96-120	0.12	0.00
120-144	0.09	0.00
144-168	0.07	0.00
Total Recovered (%)	10.4	0.09

Abbreviations: F=female; HPLC=high-performance liquid chromatography; LLOQ=lower limit of quantitation; M=male; SC=subcutaneous.

Note: Urine LLOQ=8 ng/mL; feces LLOQ=240 ng/g; n=12 (6 animals/sex/time point).

表 2.6.5.13B [^{3}H]-ギボシランを単回皮下投与後のラット尿、胆汁及び糞中への排泄

Study Title: [^{3}H]-ALN-AS1, Metabolism, Excretion and Mass Balance, and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Auto radiography in Male Sprague-Dawley Rats Following a Single Subcutaneous Administration		**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-DSM17-018	
Species:		Sprague Dawley rats (both intact and BDC/JVC)	
Sample/Assay:		Liquid scintillation counting	
Analyte:		[^{3}H]-givosiran and givosiran-derived radioactivity	
Method of Administration:		SC	
Dose (mg/kg):		10 mg/kg (combined unlabeled and labeled)	
Sex/No. of Animals:		M/16 intact, 6 BDC	
Sample	**Time Point (h)**	**Mean±SD Percent of Radioactive Dose**	
		Intact Rats (Group 1)	**BDC Rats (Group 2)**
Urine	Predose	0.00±0.00	0.00±0.00
	0-6	5.66±1.34	5.54±2.59
	6-12	1.42±0.883	2.38±1.04
	12-24	1.77±0.379	1.88±0.691
	24-48	4.89±1.15	4.88±0.702
	48-72	5.96±0.652	4.15±0.902
	72-96	5.71±0.759	3.81±0.664
	96-120	4.54±0.971	3.16±0.631
	120-144	3.82±1.01	2.61±0.430
	144-168	3.25±0.646	2.04±0.370
	168-336	11.6±3.46	NA
	336-504	4.42±1.56	NA
	504-672	1.88±0.869	NA
	672-1008	1.79±0.791	NA
	1008-1344	0.835±0.367	NA
	Subtotal	57.5±11.1	30.4±4.11
Urine Wipe	0-12	NA	NA
	Subtotal	NA	NA
Feces	Predose	0.00±0.00	0.00±0.00
	0-6	0.0113±0.0201	0.0218±0.0475
	6-12	0.0386±0.0473	0.0111±0.0102
	12-24	0.772±0.466	0.114±0.0602
	24-48	2.20±1.23	0.154±0.0445
	48-72	2.15±1.22	0.172±0.0449

表 2.6.5.13B [^{3H}]-ギボシランを単回皮下投与後のラット尿、胆汁及び糞中への排泄（続き）

Study Title: [^{3}H]-ALN-AS1, Metabolism, Excretion and Mass Balance, and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Auto radiography in Male Sprague-Dawley Rats Following a Single Subcutaneous Administration			**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-DSM17-018
	72-96	1.56±0.712	0.381±0.437
	96-120	1.26±0.582	0.169±0.0508
	120-144	0.805±0.218	0.257±0.275
	144-168	0.668±0.173	0.135±0.0364
	168-336	2.67±0.379	NA
	336-504	1.09±0.177	NA
	504-672	0.522±0.117	NA
	672-1008	0.417±0.155	NA
	1008-1344	0.159±0.0809	NA
	Subtotal	14.3±4.69	1.42±0.455
Cage Rinse	0-24	0.864±0.490	0.490±0.185
	24-48	0.545±0.154	0.462±0.200
	48-72	0.844±0.356	0.604±0.221
	72-96	0.793±0.289	0.524±0.169
	96-120	0.842±0.513	0.474±0.104
	120-144	0.544±0.332	0.362±0.127
	144-168	0.554±0.344	NA
	168-336	1.70±1.01	NA
	336-504	0.361±0.107	NA
	504-672	0.243±0.132	NA
	672-1008	0.182±0.0759	NA
	1008-1320	0.0888±0.0565	NA
	Subtotal	7.56±3.33	2.92±0.764
Cage Wash	0-168	NA	0.626±0.0587
	0-336	0.632±0.413	NA
	336-672	0.0748±0.0421	NA
	672-1008	0.0282±0.0135	NA
	1008-1344	0.0246±0.0142	NA
	Subtotal	0.759±0.461	0.626±0.0587
Cage Wipe	0-168	NA	1.45±1.19
	0-336	0.423±0.325	NA
	336-672	0.100±0.0711	NA

表 2.6.5.13B [^{3H}]-ギボシランを単回皮下投与後のラット尿、胆汁及び糞中への排泄（続き）

Study Title: [^{3}H]-ALN-AS1, Metabolism, Excretion and Mass Balance, and Tissue Distribution via Quantitative Whole-Body Auto radiography in Male Sprague-Dawley Rats Following a Single Subcutaneous Administration			**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-DSM17-018
	672-1008	0.0228±0.00329	NA
	1008-1344	0.0505±0.0283	NA
	Subtotal	0.596±0.386	1.45±1.19
Bile	Predose	NA	0.00±0.00
	0-6	NA	0.294±0.0298
	6-12	NA	0.453±0.512
	12-24	NA	5.67±2.67
	24-48	NA	9.21±3.23
	48-72	NA	4.97±2.78
	72-96	NA	3.19±1.36
	96-120	NA	1.77±0.690
	120-144	NA	1.14±0.532
	144-168	NA	0.737±0.313
	Subtotal	NA	27.4±8.61
Bile Cannula	0-168	NA	0.00135±0.000739
	Subtotal	NA	0.00135±0.000739
Jacket Rinse	0-168	NA	0.00318±0.00374
	Subtotal	NA	0.00318±0.00374
Carcass	0-168	NA	22.4±7.57
	0-1344	3.12±0.677	NA
	Subtotal	3.12±0.677	22.4±7.57
Total		84.1±3.68	86.6±2.05
Additional Information: Most of the [^{3}H]-givosiran-derived radioactivity was excreted within 336 hours (intact rats), primarily in urine. In intact rats, 57.8% and 14.3% of administered radioactivity was excreted in urine (including urine wipe) and feces, respectively, by 1344 hours postdose. In BDC/JVC rats, 30.4%, 27.4%, and 1.42% of the administered radioactivity were excreted in urine, bile, and feces, respectively, by 168 hours postdose. A large amount of radioactivity was eliminated in urine and bile after SC dosing, indicating that renal and biliary excretion were the major routes of elimination of [^{3}H]-givosiran-derived radioactivity. Mean overall recoveries of radioactivity after SC dosing to intact and BDC/JVC rats were 84.1% and 86.6%, respectively.			

Abbreviations: BDC=bile duct-cannulated; JVC=jugular vein-cannulated; M=male; NA=not applicable; SC=subcutaneous; SD=standard deviation.

表 2.6.5.13C 単回皮下投与後の精液への排泄

Study Title: Pharmacokinetic Analysis in Seminal Fluid After a Subcutaneous Injection of ALN-AS1 to Male New Zealand White Rabbits		**Test Article:** Givosiran **Study No.** [redacted]
Species:	New Zealand White rabbits	
Sample/Assay:	Seminal fluid/RT-qPCR method	
Analyte:	Givosiran	
Method of Administration:	SC	
Dose (mg/kg):	2.5	20
Sex/No. of Animals:	M/5	M/5
Toxicokinetics in Seminal Fluid:	Mean (SD)	Mean (SD)
C_{max} (ng/mL)	0.499 (0.317)	68.9 (55.3)
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (ng·h/mL)	36.3 (23.9)	2040 (1670)

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; M=male; RT-qPCR=quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction; SC=subcutaneous; SD=standard deviation.

表 2.6.5.13.D サルに単回皮下投与後の排泄

Study Title: The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ALN-AS1 After a Single Intravenous, or Single or Multiple Subcutaneous, Doses to Cynomolgus Monkeys	**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-NCD14-007
Species:	Cynomolgus monkeys
Sample/Assay:	Urine and feces[a]/Hybridization-HPLC with fluorescence detection
Analyte:	Givosiran
Method of Administration:	SC
Dose (mg/kg):	10
Sex/No. of Animals:	(3M+3F)/6
Time (h)	Overall (M+F) Mean Percent (%) ±SD of Dose[b] in Urine by Interval After SC Dosing
0-8	8.39±5.89
8-24	6.24±3.69
24-48	0.66±0.489
48-72	0.279±0.139
72-96	0.160±0.105
96-120	0.109±0.0502
120-144	0.096±0.0504
144-168	0.125±0.0560
Total Recovered (%)	15.9±5.364

Abbreviations: F=female; HPLC=high-performance liquid chromatography; M=male; SC=subcutaneous; SD=standard deviation.

a Percent of dose in fecal samples was not determined because givosiran concentrations were below the lower limit of quantitation for pooled fecal samples collected over the 168-hour postdose period.

b n=3/sex/timepoint

2.6.5.14 薬物動態試験：胆汁中排泄

胆汁中排泄は、表 2.6.5.13B 参照。

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用

表 2.6.5.15A ヒト ABC 及び SLC トランスポーターへの阻害及び基質能の *in vitro* 評価

Study Title: *In Vitro* Evaluation of ALN-AS1 (Givosiran) as an Inhibitor and a Substrate of Human ABC and SLC Transporters	**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-DSM18-003
Method: This study was designed to evaluate unlabeled ALN-AS1 as an inhibitor and radiolabeled [^{3}H]-givosiran as a substrate of human transporters (namely, P-gp, BCRP, BSEP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, MATE1 and MATE2-K). Known substrates and inhibitors were included as positive controls in all experiments.	
Results: Givosiran inhibited P-gp by 69% at the highest concentration evaluated (10 µmol/L). Less than 10% inhibition of BCRP, BSEP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, MATE1 or MATE2-K was observed. [^{3}H]-Givosiran was not a substrate of P-gp, BCRP, BSEP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, MATE1 and MATE2-K under the conditions examined.	

Inhibitor					**Substrate**			
Transporter	**Test System**	**Substrate**	**Givosiran Conc.**	**Inhibition[a] (%)**	**Transporter**	**Test System**	**[^{3}H]-Givosiran Conc.**	**Potential Substrate[b]**
P-gp	Caco-2 cells	Digoxin (10 µmol/L)	1 and 10 µmol/L	69	P-gp	MDCKII cells	0.3 µmol/L	No
BCRP	MDCKII cells	Prazosin (1 µmol/L)		No inhibition	BCRP			No
BSEP	Vesicles	[^{3}H]-taurocholic acid (0.4 µmol/L)		No inhibition	BSEP	Vesicles		No
OATP1B1	HEK-293 cells	[^{3}H]-estradiol-17β-glucuronide (50 nmol/L)		6.7	OATP1B1	HEK-293 cells	1 µmol/L	No
OATP1B3				0.8	OATP1B3			No
OAT1		[^{3}H]-*p*-aminohippurate (1 µmol/L)		7.0	OAT1		0.3 µmol/L	No
OAT3		[^{3}H]-estrone-3-sulfate (50 nmol/L)		6.7	OAT3			No
OCT1		[^{14}C]tetraethylammonium bromide (5 µmol/L)		No inhibition	OCT1		1 µmol/L	No
OCT2		[^{14}C]metformin (10 µmol/L)		9.5	OCT2		0.3 µmol/L	No
MATE1				No inhibition	MATE1			No
MATE2-K				1.9	MATE2-K			No

Abbreviations: BCRP=breast cancer resistance protein; BSEP=bile salt export pump; Conc.=concentration; MATE1=multidrug and toxic extrusion protein 1; MATE2-K=multidrug and toxic extrusion protein 2-K; OAT1=organic anion transporter 1; OAT3=organic anion transporter 3; OATP1B1=organic anion-transporting polypeptide 1B1; OATP1B3=organic anion-transporting polypeptide 1B3; OCT1=organic cation transporter 1; OCT2=organic cation transporter 2; P-gp=permeability-glycoprotein.

a Inhibition at highest test article concentration evaluated. % inhibition was calculated by subtracting % of control in the presence of test article from 100%.

b Defined as having uptake or efflux ratio ≥2 and reduced in presence of inhibitor.

表 2.6.5.15B サルに反復皮下投与後の CYP 基質薬物動態への *in vivo* での影響

Study Title: Determination of ALN-AS1 Effect on the Pharmacokinetic (PK) Profile of Four CYP450 Probe Substrates Following Multiple Subcutaneous Doses of ALN-AS1 to Monkeys	**Test Article:** Givosiran **Study No.** AS1-NCD14-014
Method: A cross-over design was employed where each monkey (n=4) received administration of an oral cytochrome P450 (CYP) probe drug cocktail that contained 4 CYP isoform-specific substrates (caffeine for CYP1A; dextromethorphan for CYP2D; chlorzoxazone for CYP2E; simvastatin for CYP3A), both before and after multiple SC doses of givosiran. Quantification of probe substrate concentrations in plasma was performed using LC-MS/MS assays. The PK profiles were evaluated after each pre- and post-givosiran probe cocktail dose to determine if givosiran had an effect on the PK profile of the 4 CYP isoform-specific probe substrates.	
Results: After SC administration, there was no consistent effect of givosiran on the PK profiles of the CYP probe substrates for CYP1A, CYP2D, or CYP2E. While no apparent change was evident in CYP1A activity, data (change in exposure) were variable for both CYP2D and CYP2E probe substrates, making the interpretation of results difficult. However, the PK changes observed were within biological variability. Based on these data, givosiran does not appear to affect the activity of CYP1A, CYP2D, and CYP2E. For CYP3A, the exposure of simvastatin was lower (AUC ranged 16% to 29% of control) after givosiran SC administration compared with vehicle control treatment, in all animals. These results may suggest that simvastatin metabolism increased possibly due to an increase in CYP3A activity after SC administration of givosiran. The mechanism of this possible increase in activity is unclear and appears inconsistent with the expected pharmacologic effects of givosiran.	

Abbreviations: AUC=area under the plasma concentration-time curve; CYP=cytochrome P450; LC-MS/MS= liquid chromatography/tandem mass spectrometry; PK=pharmacokinetics; SC=subcutaneous.

表 2.6.5.15C サルに反復皮下投与後の CYP3A4 基質薬物動態への *in vivo* での影響

Study Title: Evaluation of Repeat Dose ALN-AS1 Effect on the Pharmacokinetic Profiles of CYP3A4 Substrates, Midazolam and Simvastatin, in Male Cynomolgus Monkeys	**Test Article:** Givosiran
	Study No. AS1-DSM17-003

Method: Cynomolgus monkeys (n=6) were administered midazolam, simvastatin, and givosiran according to the regimen outlined below. Before oral dosing on Days 1, 4, 20, and 23, animals were fasted overnight (≥6 hours) through approximately 4 hours postdose. Animals were not fasted for SC dose administration on Days 5 through 19 unless fasted for other study-related events. Oral doses of midazolam or simvastatin were administered to all animals by nasogastric intubation. The givosiran SC dose was administered to all animals by syringe and needle in the midscapular region once daily for 15 days, beginning on Day 5. Plasma PK samples were collected at specified time points during each phase for evaluation of PK.

Phase/Group	Day(s)	Number of Males	Test Article	Dose Route	Target Dose Level (mg/kg)	Target Dose Concentration (mg/mL)	Target Dose Volume (mL/kg)
1/1	1	6	Midazolam	Oral	2	2	1
2/1	4	6	Simvastatin	Oral	20	2	10
3/1	5-19	6	Givosiran	SC	5	3.33	1.5
4/1	20	6	Midazolam	Oral	2	2	1
5/1	23	6	Simvastatin	Oral	20	2	10

Results: For midazolam, there was an apparent decrease in C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$; however, there was no corresponding increase in the CYP3A mediated metabolite, 1-OH-midazolam. Instead there was a slight decrease in 1-OH-midazolam in the 6 animals after SC administration of givosiran. For simvastatin as well as simvastatin acid (both CYP3A substrates), there was a slight increase in $AUC_{0\text{-}t(last)}$, suggesting minimal inhibition of CPY3A activity after SC administration of givosiran, although variability was high. Overall, the impact of givosiran on CYP3A activity appeared probe specific, with minimal changes on the PK of both midazolam and simvastatin.

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the plasma concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CYP=cytochrome P450; PK=pharmacokinetics; SC=subcutaneous.

2.6.5.16 薬物動態試験：その他

その他の薬物動態試験は実施していない。