目次

2.6.6 毒性試験の概要文.....5
2.6.6.1 まとめ.....5
2.6.6.2 単回投与毒性試験.....8
2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）.....9
2.6.6.4 遺伝毒性試験.....22
2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）.....26
2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）.....29
2.6.6.7 局所刺激性試験.....38
2.6.6.8 その他の毒性試験.....38
2.6.6.9 考察及び結論.....43
2.6.6.10 図表.....51
2.6.6.11 参考文献.....52

略号一覧

略号・用語	定義	
	英語	日本語
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
A/G	albumin/globulin ratio	アルブミン／グロブリン比
AHP	acute hepatic porphyria	急性肝性ポルフィリン症
AIP	acute intermittent porphyria	急性間欠性ポルフィリン症
ALA	aminolevulinic acid	アミノレブリン酸
ALAS1	5'-aminolevulinate synthase 1	5′-アミノレブリン酸合成酵素 1
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ASGPR	asialoglycoprotein receptor	アシアロ糖たん白質受容体
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t(last)}$	area under the plasma concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration	最終濃度測定可能時点までの血漿中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t}$	area under the plasma concentration time curve time zero to the end of dosing interval	投与開始後 0 時間から投与間隔終了までの血漿中濃度-時間曲線下面積
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
CP	cyclophosphamide	シクロホスファミド
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
DOTAP	*N*-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium	*N*-[1-(2,3-ジオレオイロキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム
E. coli	*Escherichia coli*	大腸菌
FDA	United States 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
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor	顆粒球コロニー刺激因子
GGT	gamma glutamyl transferase	γ-グルタミルトランスフェラーゼ
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の非臨床試験の実施の基準

略号一覧（続き）

略号・用語	定義	
	英語	日本語
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	顆粒球単球コロニー刺激因子
GMP	Good Manufacturing Practice	医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準
HED	human equivalent dose	ヒト等価用量
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IE	immature erythrocyte	幼若赤血球
IFN	interferon	インターフェロン
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	immunoglobulin M	免疫グロブリン M
IL	interleukin	インターロイキン
IP-10	interferon gamma-induced protein 10	インターフェロンγ誘導たん白質 10
KC	keratinocyte-derived chemokine	ケラチノサイト由来ケモカイン
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1	単球走化性因子-1
ME	mature erythrocyte	成熟赤血球
MIE	micronucleated immature erythrocytes	小核を有する幼若赤血球
MIP	macrophage inflammatory protein	マクロファージ炎症性たん白質
MRHD	maximum recommended human dose	最大臨床推奨用量
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーRNA
NC	not calculated	算出せず
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PD	pharmacodynamics	薬力学
QWBA	quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RA	receptor antagonist	受容体アンタゴニスト
RNAi	ribonucleic acid interference	RNA 干渉
S9	metabolizing system	代謝活性化系
S. typhimurium	*Salmonella typhimurium*	ネズミチフス菌
siRNA	small interfering ribonucleic acid	低分子干渉 RNA

略号一覧（続き）

略号・用語	定義	
	英語	日本語
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
TGF	transforming growth factor	トランスフォーミング増殖因子
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
T_{max}	time of maximum concentration	最高濃度到達時間
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
USP	United States Pharmacopeia	米国薬局方
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮細胞増殖因子
WT	wild type	野生型

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

ギボシランナトリウム（以下、「ギボシラン」と表記する）は、成人及び青年期患者の急性肝性ポルフィリン症（AHP）の治療を目的として開発中の RNA 干渉（RNAi）医薬品である。ギボシランは、肝 5′-アミノレブリン酸合成酵素 1（*ALAS1*）メッセンジャーRNA（mRNA）を特異的に阻害するようにデザインされた二本鎖低分子干渉 RNA（siRNA）で構成され、肝 ALAS1 たん白質産生の減少を導く。その結果、AHP 発作及びその他の疾患兆候の原因となる重要な因子である、アミノレブリン酸（ALA）等の神経毒性を有するヘム中間体の生成が減少する。ギボシランは、糖鎖リガンド（*N*-アセチルガラクトサミン[GalNAc]）と siRNA が共有結合しており、アシアロ糖たん白質受容体（ASGPR）を介した肝細胞の直接的取り込みにより、特異的に肝臓に送達されるようデザインされている。

AHP 患者を対象としたギボシラン（非臨床試験報告書では、AD-60519、ALN-60519 又は ALN-AS1 とも表記される）の臨床適用を担保するために実施した、数種の探索的反復投与毒性試験及び医薬品の非臨床試験の実施の基準（GLP）に適合した反復投与毒性試験において、ギボシランの毒性を評価した。ギボシランの投与経路（皮下注射）及び投与頻度（週 1 回及び月 1 回）は、臨床投与経路及び頻度と整合する。ギボシランの最大臨床推奨用量（MRHD）は、月 1 回皮下投与で 2.5 mg/kg である。本項に記載した非臨床試験は、注射用水で溶解したギボシランの遊離酸を 189 mg/mL（ギボシランナトリウムの 200 mg/mL に相当）又は 165 mg/mL（ギボシランナトリウムの 175 mg/mL に相当）含有する製剤を使用して実施したが、本概要で引用したすべての用量及び濃度は、溶液中のギボシランナトリウム塩として表記した。ナトリウム塩と遊離酸の分子量の差は約 5%であり、本項に記載したトキシコキネティクス（TK）データの解釈に有意な影響を及ぼさない。特に示す場合を除きギボシラン製剤を米国薬局方（USP）注射用生理食塩液（溶媒）で、投与量に必要な適切な濃度に希釈することによって投与溶液を調製した。

ギボシランはげっ歯類及びサルで薬理活性を示すが、ウサギには活性を示さない。マウス、ラット及びサルを用いてギボシランの 2～4 週間の探索的用量設定試験（非 GLP 適合）を実施し、続いて GLP に適合したラットで最長 26 週間及びサルで最長 39 週間の主要な毒性試験を実施した。長期反復投与毒性試験における無毒性量は、ラット及びサルでそれぞれ 10 及び 30 mg/kg であった。これらの試験では肝臓が主要な毒性標的器官であり、副腎、腎臓、膵臓、投与部位及びリンパ節に非有害所見及び二次的所見が認められた。これらの試験を表 2.6.6-1 に示し、その結果を以下に記載した。毒性試験で評価したギボシランの TK の詳細については、[2.6.4.3.2]項「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」参照、概要表は[表 2.6.3.4]「安全性薬理試験」及び[2.6.7]項「毒性試験概要表」を参照されたい。

表 2.6.6-1　ギボシランの毒性試験一覧

試験番号 試験の種類	投与経路	動物種又は試験系	被験物質 製剤バッチ／原薬バッチ
反復投与毒性			
[AS1-NCD14-005] 4 週間投与用量設定	皮下	CD-1 マウス	ギボシラン [redacted]
[AS1-NCD13-001] 2 週間投与用量設定	皮下	Sprague-Dawley ラット	ギボシラン 原薬 Lot: [redacted]
[AS1-NCD14-001] 4 週間投与用量設定	皮下	Sprague-Dawley ラット	ギボシラン [redacted]
[AS1-NCD14-002] 4 週間投与用量設定	皮下	カニクイザル	ギボシラン [redacted]
[AS1-NCD14-010] 13 週間反復投与（GLP）	皮下	Sprague-Dawley ラット	ギボシラン [redacted]
[AS1-GLP16-022] 13 週間反復投与（GLP）	皮下	Sprague-Dawley ラット	ギボシラン [redacted]
[AS1-GLP15-022] 26 週間反復投与（GLP）	皮下	Sprague-Dawley ラット	ギボシラン [redacted]
[AS1-NCD14-011] 13 週間反復投与（GLP）	皮下	カニクイザル	ギボシラン [redacted]
[AS1-GLP15-018] 39 週間反復投与（GLP）	皮下	カニクイザル	ギボシラン [redacted]
遺伝毒性			
[AS1-NCD14-015]（GLP） *In vitro* 細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）	*In vitro*	*S. typhimurium*、*E. coli*	ギボシラン [redacted]
[AS1-NCD14-016]（GLP） *In vitro* 哺乳類細胞を用いる染色体異常試験	*In vitro*	ヒト末梢血リンパ球	ギボシラン [redacted]
[AS1-NCD14-017]（GLP） ラット骨髄の哺乳類赤血球小核試験	皮下	Sprague-Dawley ラット	ギボシラン [redacted]
がん原性			
[AS1-DSM16-003] 8 週間投与用量設定	皮下	Tg-rasH2 WT マウス	ギボシラン [redacted]
[AS1-GLP17-006] 8 週間投与用量設定	皮下	Tg-rasH2 WT マウス	ギボシラン [redacted]
[AS1-GLP17-004] 26 週間投与がん原性	皮下	Tg-rasH2 マウス	ギボシラン [redacted][a]

表 2.6.6-1　ギボシランの毒性試験一覧（続き）

試験番号 試験の種類	投与経路	動物種又は試験系	被験物質 製剤バッチ／原薬バッチ
生殖発生毒性			
[AS1-DSM15-041] 受胎能／初期胚発生用量設定	皮下	Sprague-Dawley ラット	ギボシラン [redacted]
[AS1-GLP16-011] 受胎能／初期胚発生（GLP）	皮下	Sprague-Dawley ラット	ギボシラン [redacted]
[AS1-DSM16-012] 胚・胎児発生用量設定	皮下	New Zealand white ウサギ	ギボシラン [redacted]
[AS1-GLP16-018] 胚・胎児発生（GLP）	皮下	New Zealand white ウサギ	ギボシラン [redacted]
[AS1-GLP17-009] 出生前・出生後の発生（GLP）	皮下	Sprague-Dawley ラット	ギボシラン [redacted]
その他の試験			
[BIO14026] サイトカイン誘導	*In vitro*	ヒト全血	ギボシラン 原薬 Lot: [redacted]
[AS1-NCD14-013] 単回投与免疫刺激	皮下	CD-1 マウス	ギボシラン [redacted]

略号: *E. coli* = *Escherichia coli*（大腸菌）；GLP = 医薬品の非臨床試験の実施の基準；*S. typhimurium* = *Salmonella typhimurium*（ネズミチフス菌）；WT = 野生型

a: 医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準（GMP）適合製剤

非臨床毒性試験で使用した原薬バッチの不純物プロファイルは、臨床試験用製剤及び予定市販製剤で使用する原薬の不純物プロファイルと同等である。ギボシランの不純物プロファイルは、ギボシランの原薬の規格及び試験方法（[2.3]項「規格及び試験方法」参照）に詳述している。毒性試験に使用した製剤及び原薬のバッチ番号を表 2.6.6-1 に示した。

ギボシランで実施した GLP 適合の毒性試験は、医薬品規制調和国際会議（ICH）M3(R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス（薬食審査発 0219 第 4 号、平成 22 年 2 月 19 日）」に示された一般的原則に従って実施した。すべての GLP 適合試験は、経済協力開発機構（OECD）加盟国で、OECD の試験ガイダンス及び GLP の原則に従って実施した。探索的試験及び用量設定試験は、必ずしも厳格に GLP 手順に従って実施されたものではないが、データの完全性を確保するために、適切なプロトコール及び文書管理の下で実施した。

ギボシランの長期投与では、ラットで 10 mg/kg の 26 週間週 1 回投与（試験の最高用量は 30 mg/kg）、又はサルで 30 mg/kg の 39 週間週 1 回投与（試験の最高用量は 100 mg/kg）で有害所見は認められず、これらの用量が無毒性量であった。ラットはギボシランに関連した影響に最も感受性が高い動物種であり、ラット及びサルのいずれにおいても肝臓が主要な毒性標的器官であることが確認されている。ギボシランをサルに週 1 回中期又は長期投与した結果、肝臓で肝細胞及びクッパー細胞の軽微な単細胞壊死及び好塩基性顆粒等の病理組織学的所見が認められた。ギボシランを中期又は長期投与（週 1 回注射）したラットの肝臓で、ギボシランに関連した典型的な所見として、肝細胞空胞化、単細胞壊死及び巨大核を伴う有糸分裂の増加、並びにクッパー細胞色素沈着及び肝細胞巣の変化が観察された。膵臓及び副腎で、主要な標的細胞に対するギボシランの作用が関与しない間接的な所見が観察された。

また、腎尿細管に好塩基性顆粒、並びに最終投与部位で空胞化マクロファージ及び混合型／単核細胞浸潤が観察された。

GLP 適合の標準的な *in vitro* 及び *in vivo* 試験でギボシランの遺伝毒性を評価した。評価したいずれの濃度／用量においても、遺伝毒性又は染色体損傷のエビデンスは認められなかった。

Tg-rasH2 マウスの野生型（WT）を用いて、がん原性用量設定試験を実施した。Tg-rasH2 マウスの 26 週間投与がん原性試験では、最高 1500 mg/kg/month の投与量でがん原性を示すエビデンスは認められなかった。Sprague-Dawley ラットを用いた 2 年間投与がん原性試験が現在実施中であり、終了後に提出する予定である。

ラット及びウサギを用いた試験で、ギボシランが生殖能、胚・胎児及び生後発生に及ぼす毒性作用を総合的に評価した。ギボシランは雌雄の受胎能指標に影響を示さず、ギボシランを投与したラット出生児の成長及び発達に有害な作用を示さなかった。ウサギの胚・胎児発生に関する試験で着床前胚損失及び骨格変異が観察されたが、当該試験でギボシランを投与した全投与群で認められた顕著な母動物毒性に関連した二次的影響と考えられた。

ギボシランで実施した反復投与毒性試験、並びに *in vitro* 及び *in vivo* 免疫刺激試験で所見が認められなかったことから、ギボシランは免疫刺激作用又は免疫毒性作用を有さないと考えられた。

非臨床毒性試験の結果から全体的に、AHP 患者の治療のため MRHD の 2.5 mg/kg 月 1 回投与を担保する、ギボシランの良好な安全性プロファイルが確認されたと結論される。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

ギボシランの単回投与毒性試験は実施しなかった。ラットの 13 週間反復投与毒性試験の一部として、ギボシランの単回投与毒性を評価した。当該 GLP 適合試験（試験番号[AS1-NCD14-010]、[表 2.6.7.7-1]、2.6.6.3.2.2 項、参照）の単回投与毒性評価では、動物にギボシランを 0（0.9%食塩水、5 匹/雌雄）又は 100 mg/kg（10 匹/雌雄）の用量で単回投与し、8 日目に剖検した。ギボシランに関連した一般状態の変化、体重又は摂餌量の変化、投与部位の局所刺激性、あるいは血液凝固及び尿検査パラメータの変化は観察されなかった。ギボシランに関連した臨床病理学的変化は、軽度の ALP 上昇（対照群と比べて 16%～51%上昇）のみであった。ギボシランに関連した器官重量の変化はなかった。肝臓（軽微～軽度の肝細胞空胞化及び軽微な単細胞壊死）、副腎（軽微～軽度の皮質細胞空胞化）及び投与部位（軽微～軽度の空胞化マクロファージ）で、病理組織学的変化が認められた。これらの変化は有害所見とは考えられなかった。1 日目に最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）で最高血漿中濃度（C_{max}）が観察され、100 mg/kg における C_{max} 及び投与開始後 0 時間から投与間隔終了までの血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC_{0-t}）は、雌雄合算した平均値がそれぞれ 19.7 μg/mL 及び 82.6 μg·h/mL であった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

ギボシランの反復投与の影響を検討するため、マウス、ラット及びサルを用いて反復投与毒性試験を実施した。本試験で使用する反復投与可能な最高投与量を決定するため、必要に応じて予備試験を実施した。臨床におけるギボシランの長期投与を担保するため、ラットで最長 26 週間及びサルで最長 39 週間の皮下投与試験を実施した。意味のあるデータ評価が可能となるよう、各試験で十分な数の動物を使用した。探索的試験及び用量設定試験は、必ずしも厳格に GLP 手順に従って実施されたものではないが、データの完全性を確保するため、適切なプロトコール及び文書管理の下で実施した。毒性を評価する主要な試験はすべて GLP 基準に完全に適合して実施した。

これらの試験で使用したギボシランのバッチの一覧を、本概要の表 2.6.6-1 に示した。実施した反復投与毒性試験の一覧を、CTD 中の試験報告書の所在箇所及び GLP 適合状況と共に表 2.6.6-2 に示した。毒性本試験においてギボシランを反復投与した後に得られた、血漿中濃度の動物種間の比較を本概要の 2.6.6.9 項に示した。毒性試験で得られた反復投与 TK データについては、毒性試験概要表の[表 2.6.7.2-1]及び[表 2.6.7.3-1]を参照されたい。

表 2.6.6-2 反復投与毒性試験の概略

動物種	投与方法	投与スケジュール	投与量 [a] （mg/kg）	GLP	試験番号 （概要表） CTD 所在箇所
マウス	皮下	週 1 回、4 週間	0, 30, 100, 300	非適合	[AS1-NCD14-005] （[表 2.6.7.6-1]） CTD: 4.2.3.2-1
ラット	皮下	週 1 回、2 週間	0, 30, 100, 300	非適合	[AS1-NCD13-001] （[表 2.6.7.6-1]） CTD: 4.2.3.2-2
ラット	皮下	週 1 回、4 週間	0, 30, 100, 300	非適合	[AS1-NCD14-001] （[表 2.6.7.6-1]） CTD: 4.2.3.2-3
ラット	皮下	単回投与（1 日目、8 日目剖検） 週 1 回、13 週間	単回: 100 反復: 0, 3, 10, 30	適合	[AS1-NCD14-010] （[表 2.6.7.7-1]） CTD: 4.2.3.2-4
ラット	皮下	月 1 回、13 週間	0, 10, 50（雌）, 150（雄）	適合	[AS1-GLP16-022] （[表 2.6.7.7-2]） CTD: 4.2.3.2-5
ラット	皮下	週 1 回、26 週間	0, 3, 10, 30	適合	[AS1-GLP15-022] （[表 2.6.7.7-3]） CTD: 4.2.3.2-6
サル	皮下	週 1 回、4 週間	0, 30, 100, 300	非適合	[AS1-NCD14-002] （[表 2.6.7.6-1]） CTD: 4.2.3.2-7

表 2.6.6-2 反復投与毒性試験の概略（続き）

動物種	投与方法	投与スケジュール	投与量[a] (mg/kg)	GLP	試験番号 (概要表)
サル	皮下	週 1 回、13 週間	0, 15, 50, 150	適合	[AS1-NCD14-011] ([表 2.6.7.7-4]) CTD: 4.2.3.2-8
サル	皮下	週 1 回、39 週間	0, 10, 30, 100	適合	[AS1-GLP15-018] ([表 2.6.7.7-5]) CTD: 4.2.3.2-9

略号: GLP = 医薬品の非臨床試験の実施の基準

a: 下線を引いた投与量 = 無毒性量。非 GLP 適合の探索的試験及び用量設定試験では、無毒性量を決定しなかった（下線を引いた投与量なし）。

2.6.6.3.1 マウス

2.6.6.3.1.1 マウスの探索的反復投与毒性試験

（CTD: 4.2.3.2-1、試験番号[AS1-NCD14-005]）

探索的試験（非 GLP 適合）では、ギボシランを各群雌雄各 10 匹の CD-1 マウス（投与開始時に約 7 週齢）に 0（0.9%食塩水）、30、100 及び 300 mg/kg の用量で週 1 回、合計 5 回（1、8、15、22 及び 29 日目）皮下投与した（[表 2.6.7.6-1]参照）。この試験では、各ギボシラン投与群に雄 36 匹の TK 評価動物を組み入れた。TK 評価動物は、被験物質の濃度測定用血漿を採取するために、29 日目の投与後 0.083、0.5、1、2、4、8、24、168、336、504 及び 672 時間で終了した。主試験の動物は、死後検索のため 30 日目に剖検した。動物の生死・一般症状観察、体重測定、臨床病理検査（血清生化学的検査、血液学的検査及び凝固検査）、剖検時の肉眼的観察、器官重量測定（肝臓、脾臓及び腎臓）、特定の組織（脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、初回／最終投与部位、及び肉眼的病変）の病理組織学的検査により、被験物質に関連する影響を評価した。

マウスにギボシランを最高 300 mg/kg の用量で週 1 回（合計 5 回）投与した結果、忍容性が良好であり、一般状態、体重又は臨床病理パラメータの変化はみられなかった。非有害な病理組織学的変化として、100 mg/kg 以上で時に少数の混合炎症性細胞巣を含む、軽微～軽度の肝細胞肥大がみられたのみであった。検査した他の組織ではいずれも病理組織学的変化は認められず、明らかな性差はみられなかった。300 mg/kg における 29 日目の T_{max}、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$ は、それぞれ 0.5 時間、462 μg/mL 及び 1331 μg·h/mL であった。

2.6.6.3.2 ラット

2.6.6.3.2.1 ギボシランの Sprague-Dawley ラットにおける探索的用量設定毒性試験

（CTD: 4.2.3.2-2、試験番号[AS1-NCD13-001]）

（CTD: 4.2.3.2-3、試験番号[AS1-NCD14-001]）

Sprague-Dawley ラットを用いた探索的用量設定試験を 2 試験実施して、ギボシランの毒性を評価した。2 週間投与試験（対照群：雄 6 匹、被験物質投与群：雄 5 匹、投与開始時に約 8 週齢）では、ギ

ボシランを 0（0.9%食塩水）、30、100 及び 300 mg/kg の用量で週 1 回、合計 3 回皮下投与した（[表 2.6.7.6-1]参照）。4 週間投与試験（各群雌雄各 5 匹、TK 評価動物：各群雄 20 匹、投与開始時に約 7～8 週齢）では、ギボシランを 0（0.9%食塩水）、30、100 及び 300 mg/kg の用量で週 1 回、合計 5 回皮下投与した（[表 2.6.7.6-1]参照）。両試験とも最終投与後 24 時間（それぞれ 16 日目及び 30 日目）で動物を剖検した。動物の生死・一般症状観察、体重変化、臨床病理検査（血清生化学的検査、血液学的検査、及び凝固検査）、剖検時の肉眼的観察、器官重量測定、並びに組織及び肉眼的病変の病理組織学的検査により、被験物質に関連する影響を評価した。両試験で *ex vivo* の肝臓シトクロム P450（CYP1A、CYP2B、CYP2D、CYP2E 及び CYP3A）活性を測定し、4 週間投与試験のみ 29 日目（最終投与日）にギボシランの TK 特性を評価した。

2 週間投与試験（合計 3 回投与、16 日目剖検）では、300 mg/kg 以下の全投与量で早期死亡例や一般状態、体重及び肉眼的所見に変化はみられず、ギボシランは忍容性が良好であった。被験物質に関連する所見は、100 mg/kg 以上でフィブリノゲンの減少（14%～30%）及び軽度の ALP 上昇（対照群と比較して 76%～144%）、100 mg/kg 以上で腎重量（体重比相対重量）の軽度増加を伴う腎尿細管上皮の好塩基性色素沈着、並びに 30 mg/kg 以上で最終投与部位に軽微～軽度の単核細胞浸潤がみられたのみであった。ギボシランを 2 週間（合計 3 回）投与したラットで、肝臓に所見は認められなかった。ギボシランの 2 週間投与により、試験に用いた最高用量の 300 mg/kg まで用量制限毒性は認められなかった。

4 週間投与試験（合計 5 回投与）においても同様に、ギボシランは 300 mg/kg まで忍容性が良好であった。30 日目には、一般状態（改良ドレイズスコア法による投与部位の評価を含む）、体重、摂餌量又は血液凝固パラメータに被験物質に関連した影響はみられなかった。ギボシランに関連する臨床病理学的変化として、全投与量の雌雄でごく軽度～軽度の AST 上昇（対照群と比較して 16%～39%、雌のみ用量依存的）及び ALP 上昇（63%～127%）、全投与量の雄及び 100 mg/kg 以上の雌で総ビリルビン増加（29%～100%）、並びに 300 mg/kg の雌のみ血小板数の軽度減少（-27%）がみられた。いずれの臨床病理学的変化も重篤度が低く、大部分はラットの年齢、系統及び性別に応じた試験施設における背景値の範囲内であった。

肝臓、腎臓及び投与部位で病理組織学的変化が認められた。30 mg/kg 以上の雌雄いずれにおいても、用量依存的で軽微～顕著な肝細胞空胞化（微小空胞及び大空胞、肉眼所見の肝臓蒼白と相関）、軽微～軽度の単細胞壊死及び肝細胞の細胞分裂増加が認められた。100 mg/kg 以上で、軽微～軽度のクッパー細胞色素沈着（雄及び雌）、軽微～中等度の胆管過形成（雌）及び軽微な肝細胞巨大核（雌）が認められた。腎臓では、全投与量で腎尿細管上皮に軽微～軽度の色素沈着が認められ、100 mg/kg 以上で尿細管曲部に軽微な空胞化が観察された。300 mg/kg の雄及び 100 mg/kg 以上の雌で、尿細管の空胞化に伴って腎重量の増加が観察された。投与部位では、すべてのギボシラン投与群で混合細胞浸潤の発現頻度／重篤度が対照群と比べて軽微～軽度に増加した。

4 週間投与試験におけるギボシランの最大耐量は 300 mg/kg であった。300 mg/kg/dose における 29 日目の血漿中平均 T_{max}、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$ 値は、それぞれ 0.5～1 時間、119 μg/mL 及び 1134 μg·h/mL であった。標的 *Alas1* mRNA の最高 80%の減少が達成された。

両探索的試験において、生物学的意義のある *ex vivo* における肝 P450 活性の変化はなかった（[2.6.4.5]項「代謝［動物種間の比較］」参照）。

これらのげっ歯類を用いた探索的試験から、ラットがげっ歯類で最も感受性の高い動物種であることが確認された。肝臓及び腎臓で観察された影響から、100 mg/kg/week 又はそれ以上の用量の長期反復投与では、標的器官に過剰な毒性が発現することが懸念されるので、その後実施する週 1 回投与の GLP 適合反復投与一般毒性試験の最高用量として 30 mg/kg/week を設定した。

2.6.6.3.2.2 ラットにおける 13 週間皮下投与（週 1 回）毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験

（CTD: 4.2.3.2-4、試験番号[AS1-NCD14-010]）

本 GLP 適合試験では、毒性試験用動物として Sprague-Dawley ラット（投与開始時に約 8～10 週齢）15 匹/雌雄/群に、ギボシランを 0（0.9%食塩水）、3、10 及び 30 mg/kg/dose の用量（投与液量 5 mL/kg）で週 1 回 13 週間、合計 14 回皮下投与した（[表 2.6.7.7-1]参照）。主試験の動物（10 匹/雌雄/群）は 93 日目に剖検し、回復性試験用動物（5 匹/雌雄/群）は 186 日目に剖検した。2.6.6.2 項に示したように、ギボシランの急性毒性の特徴を明らかにするため、主試験の追加 2 群に 0.9%食塩水（雌雄各 5 匹）又はギボシラン 100 mg/kg（雌雄各 10 匹）を単回皮下投与し、8 日目に剖検した。TK 試験用動物として、対照群に雌雄各 3 匹、ギボシランの各反復投与群に雌雄各 36 匹、及びギボシランの単回投与群に雌雄各 26 匹を割り付けた。

一般症状、局所刺激性評価、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床病理検査（血液学的検査、凝固検査、生化学的検査及び尿検査）、初回及び最終投与後の TK パラメータ、肉眼的所見、器官重量及び病理組織学的所見に基づき、ギボシランに関連する影響を評価した。

ギボシランに関連した死亡例はなく、一般状態、体重、摂餌量、投与部位の局所刺激性評価、眼科学的検査、凝固検査及び尿検査パラメータにギボシランの影響を示す所見はなかった。

100 mg/kg 単回投与後のギボシランに関連した臨床病理学的変化は、軽度の ALP 上昇（対照群と比較して+16%～+51%）のみであった。肝臓（軽微～軽度の肝細胞空胞化及び軽微な単細胞壊死）、副腎（軽微～軽度の皮質空胞化）及び投与部位（軽微～軽度の空胞化マクロファージ）に病理組織学的変化が認められた。

ギボシランの 30 mg/kg/dose を 13 週間投与した結果、45 及び 93 日目に対照群と比較して、雌で可逆的かつ軽度の血小板数減少（-13%～-24%）、雌雄で軽度の ALP 上昇（+27%～+103%）、雌でごく軽度の AST 上昇（+28%～+44%）、並びに雄でごく軽度の総ビリルビン（+20%～+27%）及び直接ビリルビン（93 日目に 150%）の増加が認められた。雌で 93 日目にアルブミン／グロブリン比の低下を伴う、可逆的でごく軽度のアルブミン減少（-13%）が観察された。胆汁うっ滞の影響を示唆する組織学的所見はみられなかった。ギボシランの 30 mg/kg/dose 13 週間投与に伴う AST、総・直接ビリルビン及びアルブミンの変化は、小規模で試験施設における背景値の範囲内であったこと、及び／又は個々の動物のみ影響がみられたことから、有害所見ではないと考えられた。3 又は 10 mg/kg/dose の投与で、ギボシランに関連した臨床病理学的変化はみられなかった。

投与期間終了時の器官重量の変化として、雄の 10 mg/kg/dose 以上で肝臓重量の減少、雄の 3 及び 10 mg/kg/dose 及び雌の 10 mg/kg/dose 以上で副腎重量の減少傾向、雄の 30 mg/kg/dose で副腎重量の減少、並びに雌の 30 mg/kg/dose で腎臓重量の増加が認められた。これらの器官重量の変化と直接関連

する病理組織学的変化はみられなかった。13 週間の回復期間後に、ギボシランに関連した器官重量の変化は認められず、上述の器官重量変化の回復性が示された。

病理組織学的変化として腎臓、副腎及び投与部位に可逆的な所見がみられ、肝臓では一部回復が認められた。肝臓所見として、全投与量で肉眼的所見の蒼白化と相関した用量依存的で軽微～重度の肝細胞空胞化が観察されたが、回復期間後には重篤性が軽減した。空胞化肝細胞で細胞変性を示すエビデンスがなかったことから、有害所見ではないと考えられた。10 mg/kg/dose 以上で軽微～軽度の単細胞壊死、軽微～軽度の肝細胞有糸分裂の増加及び軽微～軽度のクッパー細胞色素沈着が認められ、10～30 mg/kg/dose で発現頻度が増加した。これらの病理組織学的所見は重篤な変化ではなく、雌の 30 mg/kg/dose のみで観察されたごく軽度の AST 上昇を除いて、関連する臨床病理学的変化がないことから、有害所見ではないと判断された。さらに、13 週間回復性試験では、肝細胞空胞化の一部回復、クッパー細胞色素沈着、単細胞壊死及び有糸分裂増加の完全な回復が示された。13 週間の回復期間後に肝臓で観察されたこれ以外の所見として、10 mg/kg/dose 以上で軽微～軽度の好酸性細胞変化巣、並びに 30 mg/kg/dose で二核肝細胞及び巨大核の軽微な増加が認められた。これらの変化はラットでしばしば発現する自然発生所見、又は肝臓で観察されたごく軽度の再生反応を反映している可能性が考えられる。

腎臓では 30 mg/kg/dose で軽微～軽度の好塩基性顆粒が観察されたが、関連する退行性変化がみられず、相関する血清生化学的検査又は尿検査パラメータの変化も伴わなかったことから、有害所見ではないと考えられた。3 mg/kg/dose 以上では、副腎で軽微～軽度の皮質空胞化、並びに投与部位で軽微～軽度の混合細胞浸潤及び軽微～中等度の出血が観察され（肉眼的に観察された暗色巣と関連）、これらの変化の発現頻度／重篤度がわずかに増加した。3 mg/kg/dose 以上では、軽微～軽度の空胞化マクロファージも認められた。これらの変化は 13 週間の回復期間後に回復した。13 週間の回復期間終了時に、回復性試験のいずれの動物においても副腎、腎臓又は投与部位にギボシランと関連した病理組織学的所見は認められなかった。以上のように、ギボシランを 3、10 又は 30 mg/kg/dose で投与した主試験の動物でこれらの組織にみられた変化に関して、完全な回復性が示された。

皮下投与によりギボシランは吸収され、T_{max} の値は 1 及び 92 日目に 0.5～1.0 時間の範囲であった。C_{max} 到達後はギボシランの濃度が減少し、消失半減期（$t_{1/2}$）は 1 日目に 1.1～1.9 時間、92 日目に 2.1～3.5 時間の範囲であった。ギボシランの曝露量は 1 日目に 3～100 mg/kg、92 日目に 3～30 mg/kg で増加した。曝露量の増加は 3～10 mg/kg でおおむね用量に比例し、1 日目の 10～100 mg/kg 及び 92 日目の 10～30 mg/kg では用量比を上回って増加した。ギボシランの C_{max}、$AUC_{0\text{-}2}$ 及び $AUC_{0\text{-}t}$ に関する性差は 2 倍以内であった。ラットにギボシランを 3、10 又は 30 mg/kg の用量で週 1 回反復投与後に、おおむね蓄積性はみられなかった。

以上より、ラットにギボシランを 100 mg/kg で単回投与、又は 3、10 及び 30 mg/kg の用量で週 1 回（合計 14 回）皮下投与した結果、肝臓に病理組織学的変化（3 mg/kg 以上で蒼白化と相関する肝細胞空胞化、10 mg/kg 以上で肝細胞の有糸分裂及び単細胞壊死の増加）が認められた。10 mg/kg 以上の動物では、肝細胞空胞化は低頻度・程度で持続するものの回復傾向を示し、これ以外のすべての肝臓所見は完全な回復が認められた。30 mg/kg で AST 及び ALP 上昇の臨床病理学的変化がみられたが、反復投与群の回復期間終了時には完全に低下した。これらの所見の程度が軽微～軽度であること、及び反復投与動物で観察された変化の回復性が認められたことに基づき、無毒性量は 30 mg/kg（雄

の C_{max}：5.55 µg/mL 及び $AUC_{0\text{-}t}$：27.0 µg·h/mL、並びに雌の C_{max}：7.08 µg/mL 及び $AUC_{0\text{-}t}$：23.4 µg·h/mL）と判断された。

2.6.6.3.2.3 ラットにおける 13 週間反復皮下投与（月 1 回）毒性試験

（CTD: 4.2.3.2-5、試験番号[AS1-GLP16-022]）

本 GLP 適合試験では、Sprague-Dawley ラット（投与開始時に約 10～11 週齢）に、ギボシランを 0（0.9%食塩水）、10、50 又は 150 mg/kg/month の用量で月 1 回 13 週間（1、29、57 及び 85 日目、合計 4 回）皮下投与した（[表 2.6.7.7-2]参照）。主試験の動物（10 匹/雌雄/群）は 92 日目に剖検した。また、1 及び 85 日目の TK 試験用動物として、ギボシラン投与群に 27 匹/雌雄/群を割り付けた。

一般症状、投与部位の局所刺激性評価、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床病理（血液学的検査、凝固検査、生化学的検査及び尿検査）パラメータ、TK、肉眼的所見、器官重量及び病理組織学的所見に基づいて、ギボシランに関連する影響を評価した。

本試験で 2 例の死亡例がみられ、1 例は 150 mg/kg を投与した主試験の雄動物（陰嚢の皮下組織に出血を伴った顕著な慢性炎症）で、他の 1 例は 10 mg/kg を投与した TK 試験用雄動物（右腎及び副腎に浸潤した腹部脂肪組織の組織塊）であった。肉眼的観察結果に基づき、これらの動物の死因はギボシラン投与と関連がないと判断された。

一般症状観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、凝固検査及び尿検査パラメータには、ギボシランに関連した影響は認められなかった。

非有害な血液学的検査及び生化学的検査パラメータの変化として、150 mg/kg の雌で血小板数（対照群の値と比べて-33%）、網状赤血球数（-53%）、総たん白質（-20%）、アルブミン（-21%）及びグロブリン（-16%）の軽微～軽度減少、150 mg/kg の雌で白血球数（+42%）、好中球数（+46%）及び単球数（+141%）の軽微な増加が観察された。肝・胆道系の変化が観察され、150 mg/kg の雌で肝・胆道系パラメータ（AST［+20%］、ALT［+41%］及び ALP［+162%］）の軽微な上昇、総ビリルビン（+1150%、測定した直接ビリルビン増加に伴う）の顕著な上昇、雄で総ビリルビンの軽度増加（+52%）、並びに雌雄でグルコースの軽微な減少（-17%～-25%）がみられた。

ギボシランに関連した器官重量の変化として、50 mg/kg 以上の雄で肝重量減少及び 150 mg/kg の雌で副腎重量減少がみられたが、病理組織学的に関連する変化は認められなかった。

肝臓、腎臓及び投与部位でギボシランに関連した病理組織学的変化が観察された。肝臓では、50 mg/kg 以上の雌雄で肉眼的所見の蒼白化と相関した軽微～重度の肝細胞空胞化が観察され、150 mg/kg の雌雄で軽微な単細胞壊死、軽微～軽度の色素沈着及び軽微～軽度の有糸分裂の増加が認められた。150 mg/kg では雌 1 例で軽微な好酸性細胞変化巣、雌で軽微～中等度の卵円形細胞過形成が認められた。腎臓では、50 mg/kg 以上の雄及び／又は雌で尿細管に軽微～軽度の好塩基性顆粒が観察され、150 mg/kg の雌で軽微な尿細管空胞化が認められた。投与部位では、50 mg/kg 以上の雄及び／又は雌で軽微～軽度の混合細胞浸潤が、150 mg/kg の雄で軽微な空胞化マクロファージの凝集が観察された。

ギボシランの C_{max} 及び血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）値に関する性差は 2 倍以内であった。C_{max} 及び AUC 値から評価したギボシランの曝露量は、10～150 mg/kg で投与量に応じて増加した。

C_{max} 及び AUC 値の増加は用量比を上回る増加を示した。ラットで反復投与後に蓄積性はみられなかった。肝臓及び腎臓のギボシラン曝露量に関しては、いずれのギボシラン投与群でも性差はみられなかった。ギボシランの肝臓曝露量は 10 及び 150 mg/kg の間で用量比例的で線形であった。ギボシランの腎臓曝露量は線形であったが、10～50 mg/kg では用量比を上回る増加を示し用量比例的ではなかった。肝臓と腎臓のギボシラン曝露量の比較では、ギボシランの各投与群で腎臓の曝露量が低い一方、ギボシランの腎臓 $t_{1/2}$ 値は肝臓の $t_{1/2}$ 値と比べて長かった。

以上より、ラットにギボシランを 10、50 及び 150 mg/kg の用量で月 1 回皮下投与した結果、忍容性が良好であった。150 mg/kg の雌で軽微～重度の肝細胞空胞化の発現頻度及び重篤度が増加したこと、及び臨床病理学的変化と相関した肝細胞の軽微な単細胞壊死が認められたことに基づいて、雌の無毒性量は 50 mg/kg/month と判断され、無毒性量における 85 日目の $AUC_{0\text{-}24}$ 及び C_{max} 値はそれぞれ 35.3 μg·h/mL 及び 7.25 μg/mL であった。雄の 150 mg/kg では軽微～中等度の肝細胞空胞化の発現頻度及び重篤度が低いこと、及び軽微な肝細胞の単細胞壊死に伴う血清肝酵素濃度の変化がなかったことに基づいて、雄の無毒性量は 150 mg/kg/month と判断され、無毒性量における 85 日目の $AUC_{0\text{-}24}$ 及び C_{max} 値はそれぞれ 323 μg·h/mL 及び 30.5 μg/mL であった。

2.6.6.3.2.4 ラットにおける 26 週間反復皮下投与（週 1 回）毒性、受胎能及び（着床までの）初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験

（CTD: 4.2.3.2-6、試験番号[AS1-GLP15-022]）

本 GLP 適合試験では、毒性試験用動物として Sprague-Dawley ラット（30 匹/雌雄/群、投与開始時に約 53～56 日齢）に、ギボシランを 0（0.9%食塩水）、3、10 又は 30 mg/kg/week の用量（投与液量 5 mL/kg）で、週 1 回 26 週間（合計 27 回）皮下投与した（[表 2.6.7.7-3]参照）。主試験の動物（20 匹/雌雄/群）は 184 日目に剖検し、回復性試験用動物（10 匹/雌雄/群）は 275 日目に剖検した。TK 試験用動物として対照群に雌雄各 3 匹、ギボシランの各投与群に雌雄各 24 匹を割り付けた。主試験（184 日目剖検）及び回復性試験（275 日目剖検）の動物から、各群雄 10 匹（合計雄 20 匹/群）を選抜し、交配試験に供した。無処置の未経産雌 Sprague-Dawley ラット（交配開始時に約 76 日齢）20 匹/群を、受胎能及び初期胚発生の評価に使用した。

一般症状、体重、摂餌量、局所刺激性評価、眼科学的検査、発情周期、生殖能、臨床病理（血液学的検査、凝固検査、生化学的検査及び尿検査）パラメータ、TK パラメータ、抗薬物抗体（ADA）検査、卵巣・子宮検査、肉眼的所見、器官重量、病理組織学的検査、並びに雄の生殖能評価（精子の運動性、濃度及び形態検査）、精巣及び精巣上体の病理組織学的検査に基づいて、ギボシランに関連する影響を評価した。

ギボシランに関連した死亡例はなかった。一般状態、体重又は体重増加、摂餌量、眼科学的検査、尿検査パラメータ、生殖能、卵巣・子宮検査パラメータ、並びに雄の生殖能評価で、ギボシランに関連した影響は認められなかった。

凝固検査でギボシランに関連した可逆的な影響が観察された。主試験の終了時には 30 mg/kg の雌で軽度の血小板数減少（対照群と比較して-20%）、及び雌雄でごく軽度の活性化部分トロンボプラスチン時間短縮（対照群と比較して、それぞれ-18%及び-12%）が認められた。血小板数の減少は差

が小さく、30 mg/kg の平均血小板数は試験施設におけるラットの背景値の範囲内であることから、有害所見ではないと考えられた。

ギボシランの反復投与により、投与期間終了時に数種の臨床病理パラメータで対照群と比べて影響が認められた。30 mg/kg の雌雄で、ALP（+46%～+132%）及び総ビリルビン（+81%～+128%）の軽度上昇がみられた。30 mg/kg の雌では、AST（+40%）及びトリグリセリド（+88%）の軽度上昇、並びにアルブミン／グロブリン比の低下を伴う総たん白質（-7%）及びアルブミン（-12%）の軽度減少も認められた。これらの変化は 13 週間の回復期間後に回復した。

ギボシランに関連した器官重量（絶対重量及び体重／脳相対重量）の変化として、10 mg/kg 以上の雄で肝重量の減少、30 mg/kg の雌雄で副腎重量の減少、及び 30 mg/kg の雌で腎重量の増加が観察された。これらの変化と相関する組織学的変化はなかった。13 週間の回復期間後の器官重量は対照群と同等であり、回復性を示した。肝臓、腎臓、膵臓及び投与部位で、ギボシランに関連した病理組織学的所見が観察された。肝臓では、肝細胞空胞化（軽微～重度）の発現頻度が用量依存的に増加し、概して雌で重度であり、肉眼的に観察された蒼白化及び肥大と関連がみられた。これ以外の肝臓所見として、全投与量の雌雄で軽微～軽度の肝細胞の単細胞壊死及び有糸分裂の増加、10 mg/kg 以上の雌で軽微な髄外造血の増加、10 mg/kg 以上（雌は 30 mg/kg のみ）で軽微～軽度のクッパー細胞内好塩基性顆粒、30 mg/kg でクッパー細胞色素沈着及び好酸性細胞変化巣の発現頻度増加、並びに 30 mg/kg の雌のみで軽微な肝細胞巨大核が観察された。腎臓では、10 mg/kg 以上の雌雄で近位尿細管曲部に軽微～軽度の好塩基性顆粒が、明瞭な用量相関で観察された。10 mg/kg 以上の雌雄で、膵臓のランゲルハンス島に軽微～軽度の血管拡張が観察された。投与部位では、全投与量の雌雄で空胞化マクロファージが軽微～軽度に存在し、30 mg/kg の雄で皮筋変性（軽微～中等度）の発現頻度及び程度が増加した。

投与期間終了時に肝臓で認められた肝細胞の単細胞壊死、有糸分裂及び髄外造血の増加は、13 週間回復期間終了時には完全に回復した。10 mg/kg 以上を投与した雌雄では肝細胞空胞化が完全には回復せず、30 mg/kg の雄でクッパー細胞内に好塩基性顆粒が認められ、30 mg/kg の雌雄でクッパー細胞色素沈着、並びに 10 mg/kg 以上の雄及び 30 mg/kg の雌で好酸性細胞変化巣が依然として存在した。これらの所見では、13 週間の回復期間終了時に完全な回復のエビデンスは認められなかった。腎臓では、30 mg/kg の雌雄で尿細管曲部に好塩基性顆粒が依然として存在したが、重篤性が低く、一部回復したと考えられた。10 mg/kg では、腎尿細管の好塩基性顆粒は完全に回復した。膵臓では、30 mg/kg の雌雄でランゲルハンス島の血管拡張が依然として存在したが、重篤性が低く投与期間終了時と比べて一層低頻度の発現であったことから、本所見の部分的な回復が示された。投与部位では、ギボシランに関連する変化は完全に回復した。

ギボシランの血漿中曝露量は、3～30 mg/kg で投与量の増加と共に増加した。1 日目には投与量が 3 mg/kg から 10 mg/kg に 3.3 倍増加した結果、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}2}$ はそれぞれ 5.0 及び 4.7 倍増加した。さらに、投与量が 10 mg/kg から 30 mg/kg に 3.0 倍増加した結果、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}2}$ はそれぞれ 4.0 及び 4.1 倍増加した。183 日目には投与量が 3 mg/kg から 10 mg/kg に 3.3 倍増加した結果、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}2}$ はそれぞれ 2.2 及び 2.7 倍増加した。さらに、投与量が 10 mg/kg から 30 mg/kg に 3.0 倍増加した結果、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}2}$ はそれぞれ 6.3 及び 6.1 倍増加した。

ギボシランを週 1 回 26 週間皮下投与後に C_{max} 及び AUC_{0-2} で比較した血漿蓄積率は、それぞれ 3 mg/kg で 1.19 及び 1.27、10 mg/kg で 0.538 及び 0.751、並びに 30 mg/kg で 0.844 及び 1.11 であった。試験したすべての試料で ADA が陰性であり、ギボシラン投与により免疫原性反応を生じないことが示唆された。

肝臓及び腎臓組織中のギボシラン濃度は、1 及び 183 日目に肝臓及び腎臓の両試料とも全投与量で報告可能であり、いずれの投与量でも性差は認められなかった。肝臓のギボシラン曝露量は、週 1 回反復投与後の定常状態で、若干の蓄積性（1.3～2.5 倍）を示した。3 及び 10 mg/kg 投与では、単回又は週 1 回反復投与後のいずれにおいても、肝臓の曝露量は腎臓より大きいか又は同程度であった。30 mg/kg 投与では、1 日目の肝臓曝露量は腎臓より大きかったが、183 日目には逆（腎臓>肝臓）であった。腎臓の曝露量は 3～10 mg/kg 投与の間では用量比に近い増加を示したが、10～30 mg/kg の間では用量比を上回る曝露量を示した。腎臓でのギボシランの半減期（>100 時間）は肝臓（25～50 時間）と比較して長いことと合致して、腎臓のギボシラン曝露量は肝臓と比べて減少が遅かった。184 日目に主試験の動物で測定したギボシラン濃度は、TK 用サテライト動物で 183 日目の投与後 24 時間に採取した試料と比べて大きな差はなく、定常状態に到達したことが確認された。275 日目には全投与量で腎臓内ギボシラン濃度が測定可能であった、一方、投与量 30 mg/kg のみ肝臓組織からギボシランが検出されたことから、腎臓の半減期は肝臓より長いことが確認された。

以上より、ラットにギボシランを 3、10 又は 30 mg/kg/week の用量で週 1 回 26 週間皮下投与した結果、忍容性が良好であった。30 mg/kg では肝臓に肝細胞の単細胞壊死及び空胞化等の病理組織学的変化が観察され、それに伴って血清 AST 及び ALP が上昇し、さらに 30 mg/kg で膵臓のランゲルハンス島に血管拡張が認められたことから、無毒性量は 10 mg/kg/week（1 及び 183 日目の雌雄合算した平均 C_{max} 値はそれぞれ 1.58 μg/mL 及び 0.85 μg/mL、並びに平均 AUC_{0-2} 値はそれぞれ 1.93 μg·h/mL 及び 1.45 μg·h/mL）と判断された。

2.6.6.3.3 サル

2.6.6.3.3.1 サルの探索的反復投与毒性試験

（CTD: 4.2.3.2-7、試験番号[AS1-NCD14-002]）

非 GLP 適合の本探索的試験では、各群雄 3 匹のカニクイザル（投与開始時に約 2～4 歳齢）に、ギボシランを 0（0.9%食塩水）、30、100 及び 300 mg/kg の用量で週 1 回、1、8、15、22 及び 29 日目に皮下投与した（投与液量 1.5 mL/kg、[表 2.6.7.6-1]参照）。動物を 32 日目に安楽死させた。

一般症状、体重、体重変化、摂食評価、局所刺激性評価、臨床病理パラメータ（血液学的検査、凝固検査及び生化学的検査）、サイトカイン、補体活性化、TK パラメータ（肝臓及び腎臓組織中のギボシラン濃度分析）、薬力学（PD、血清 mRNA 分析）、*ex vivo* における肝 P450 活性分析、肉眼的所見、器官重量及び病理組織学的所見に基づいて、ギボシランに関連した影響を評価した。

一般状態、体重、摂食評価、局所刺激性評価（投与部位）、血液凝固パラメータ又は *ex vivo* における肝 P450 活性に、ギボシランに関連した影響は認められなかった。1 又は 29 日目に、血漿中サイトカイン（G-CSF、GM-CSF、IFN-γ、IL-1RA、IL-2、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12/23 (p40)、IL-13、

IL-15、MCP-1、MIP-1β、MIP-1α、CD40 リガンド、TGF-α、TNF-α 及び VEGF）又は補体（C3a、Bb）活性に、ギボシランと関連する変化はみられなかった。

300 mg/kg でごく軽度の赤血球パラメータ（赤血球数、血色素量及びヘマトクリット）の低下（同時対照群と比較して-7%～-10%）が認められ、100 mg/kg 以上で ALP の軽度上昇（+69%以下）が発現した。

試験終了時に PD として実施した肝臓及び血清の mRNA 分析では、30 mg/kg 以上で肝臓組織中の *ALAS1* mRNA が平均 55%減少、及び循環中（血清エキソソーム）の *ALAS1* mRNA が 40%抑制の結果であった。

100 mg/kg 以上でギボシランに関連した病理組織学的変化が認められ、肝臓でクッパー細胞の肥大及び色素沈着、リンパ節（下顎、腸間膜及び気管・気管支）で空胞化マクロファージ、並びに投与部位で空胞化マクロファージとそれに伴う単核細胞浸潤の発現頻度／重篤度の増加が認められた。

1 日目の血漿中濃度-時間プロファイルでは、ギボシランは急速に吸収され単調な減少を示した。全体として、皮下投与におけるギボシランの血漿中平均 C_{max} 及び AUC_{0-t} 値は投与量と共に増加し、週 1 回合計 5 回投与後に蓄積性は観察されなかった。肝臓及び腎臓中のギボシランは 29 日目の投与後 24 時間で測定可能であり、30～300 mg/kg で投与量の増加と共にギボシランの肝臓及び腎臓中平均濃度が増加した。

以上より、サルにギボシランを 0、30、100 及び 300 mg/kg の用量で週 1 回合計 5 回皮下投与した結果、評価したいずれのパラメータにも有害所見は認められなかった。したがって、無毒性量は 300 mg/kg と判断された。無毒性量の 300 mg/kg における、29 日目の血漿中 C_{max} 及び AUC_{0-t} 値は、それぞれ 98.7 μg/mL 及び 904 μg·h/mL であった。

2.6.6.3.3.2 サルにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験

（CTD: 4.2.3.2-8、試験番号[AS1-NCD14-011]）

本 GLP 適合試験では、毒性試験用動物として各群雌雄各 6 匹のカニクイザル（投与開始時に約 2～3.5 歳齢）に、ギボシランを 0（0.9%食塩水）、15、50 又は 150 mg/kg の用量（投与液量 0.75 mL/kg）で週 1 回 13 週間、合計 14 回皮下投与した（[表 2.6.7.7-4]参照）。主試験の動物（3 匹/雌雄/群）は 93 日目に剖検し、回復試験用動物（3 匹/雌雄/群）は 188 日目に剖検した。ギボシランを 15、50 又は 150 mg/kg 単回投与後の TK プロファイルを検討するために、各ギボシラン投与群で雌雄各 3 匹のサテライト動物を使用した。毒性試験用動物においても、13 週間の投与期間後にギボシランの TK を評価した。

一般症状、体重、定性的摂食評価、獣医学的身体検査、局所刺激性評価、神経学的検査、眼科学的検査、臨床病理検査（血液学的検査、凝固検査、生化学的検査及び尿検査）、TK パラメータ、肉眼的所見、器官重量及び病理組織学的所見に基づいて、ギボシランに関連する影響を評価した。

カニクイザルにギボシランを 150 mg/kg までの用量で週 1 回皮下投与した結果、一般症状観察及び身体的検査で影響は観察されず、体重、摂食、局所刺激性、神経学的検査、眼科学的検査、血液学的検査、凝固検査、尿検査、器官重量及び肉眼的病理所見で、ギボシランに関連した影響は認められな

かった。主試験終了時に、150 mg/kg を投与した雄で軽度の ALP 上昇（対照群の値と比較して+33%）が認められた。150 mg/kg 群の雄 1 例で軽度の AST（個体の投与前値と比べて+126%）及び ALT（個体の投与前値と比べて+120%）の上昇がみられたが、この動物は回復性試験に割り付けられたため、関連する組織学的変化は判定できなかった。13 週間の回復期間終了後に、臨床病理パラメータは対照群の値と同程度であった。

ギボシランを投与した結果、投与期間終了時には 15 mg/kg 以上で投与部位に軽微～中等度の単核／混合細胞浸潤及び軽微～軽度の空胞化マクロファージ、並びに 15 mg/kg 以上でリンパ節（腋下及び腸間膜リンパ節で 15 mg/kg 以上、頚部及び下顎リンパ節は 50 mg/kg 以上）に軽微～軽度の空胞化マクロファージが観察された。これらの所見はマクロファージの正常な食細胞反応と合致し、炎症性反応を示す臨床病理パラメータの変化を伴わなかったことから、有害所見ではないと判断された。主試験の終了時には、50 mg/kg 以上でクッパー細胞に、150 mg/kg で肝細胞に軽微～中等度の好塩基性顆粒が観察され、150 mg/kg 群の雄 1 例で肝細胞空胞化及び大腿骨の滑膜に空胞化マクロファージ／単核細胞浸潤が観察された。関連する臨床病理学的変化がなく、重篤度は軽微であり、発現頻度も低いことから、これらの変化は有害所見ではないことが支持される。

13 週間の回復期間終了後には、15 mg/kg 以上でリンパ節（軽微～軽度の空胞化マクロファージ）及び肝臓（軽微な単細胞壊死）に、50 mg/kg 以上で肝臓（クッパー細胞及び肝細胞で軽微～軽度の好塩基性顆粒の集積）及び投与部位（軽微な単核細胞浸潤）に、ギボシランに関連した非有害な病理組織学的変化が依然として認められた。主試験の終了時に認められた、これ以外のギボシランに関連した病理組織学的変化（1 例で観察された肝細胞空胞化及び大腿骨滑膜の変化）は、回復性試験終了時にはみられず、回復性が示唆された。

ギボシランの曝露量は、15～150 mg/kg でおおむね用量増加と共に増加した。平均 C_{max}、$AUC_{0\text{-}t}$ 及び $AUC_{0\text{-}8}$ の増加はおおむね用量に比例的であった。ギボシランの平均 C_{max}、$AUC_{0\text{-}8}$ 及び $AUC_{0\text{-}t}$ 値の性差は 2 倍以内であった。サルにギボシランを 15、50 又は 150 mg/kg の用量で週 1 回反復投与後に、おおむね蓄積は観察されなかった。

サルにギボシランを 150 mg/kg までの用量で週 1 回皮下投与した結果、忍容性が良好であった。投与期間及び回復期間終了時に観察された、ギボシランに関連する臨床病理学的変化及び病理組織学的所見が本質的に非有害所見であることに基づき、無毒性量は 150 mg/kg と判断された。無毒性量（150 mg/kg）における、1 及び 92 日目の雌雄合算した平均 C_{max} 値はそれぞれ 19.5 及び 24.2 μg/mL、平均 $AUC_{0\text{-}t}$ 値はそれぞれ 204 及び 292 μg·h/mL であった。

2.6.6.3.3.3 幼若サルにおける 39 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験

（CTD: 4.2.3.2-9、試験番号[AS1-GLP15-018]）

本 GLP 適合試験では、各群雌雄各 6 匹のカニクイザル（投与開始時に約 13～17 ヵ月齢）にギボシランを 0（0.9%食塩水）、10、30 又は 100 mg/kg の用量（投与液量 1.0 mL/kg）で、週 1 回最長 39 週間（最高 40 回）皮下投与した（[表 2.6.7.7-5]参照）。主試験の動物（3 匹/雌雄/群）は 275 日目に剖検し、回復性試験用動物（3 匹/雌雄/群）は 365 日目に剖検した。

一般症状、体重、定性的摂食評価、局所刺激性評価、眼科学的検査、神経学的検査、臨床病理検査（血液学的検査、凝固検査、生化学的検査及び尿検査）、TK パラメータ、ADA 検査、肉眼的所見、器官重量及び病理組織学的所見に基づいて、ギボシランに関連する影響を評価した。

本試験でギボシランに関連した死亡例はなかった。一般状態、体重・体重増加量、食欲、投与部位の局所刺激性評価、眼科学的検査、神経学的検査、血液学的検査、凝固検査及び尿検査パラメータ、肉眼的所見又は器官重量に、ギボシランと関連した影響は認められなかった。

投与期間終了時に、ギボシランの反復投与と関連して数種の生化学的検査値に影響が認められた。30 mg/kg（対照群と比べて+27～+36%）及び 100 mg/kg（対照群と比べて+52～+62%）の雌雄で ALP の軽度上昇、並びに 100 mg/kg の雌雄で ALT（対照群と比べて+50～+94%）及びγ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT、対照群と比べて+25～+64%）の軽度上昇がみられた。100 mg/kg を投与した雄で、AST（対照群と比べて+55%）及びコレステロール（対照群と比べて+34～+45%）の軽度上昇もみられた。回復期間終了時には、100 mg/kg の雌で ALT（対照群と比べて+62%）及び ALP（対照群と比べて+66%）の軽微な上昇、並びに 100 mg/kg の雄でコレステロール（対照群と比べて+34%）の軽微な増加も依然として認められた。100 mg/kg を投与した雌雄で、軽微な GGT の上昇がみられた。AST の変化は認められず、完全な回復が示唆された。

ギボシランに関連した病理組織学的変化として投与部位に可逆的な変化が認められ、10 mg/kg 以上で軽微～中等度の単核細胞浸潤及び空胞化マクロファージ、10 mg/kg 以上でリンパ節に軽微～中等度の空胞化マクロファージ、30 mg/kg 以上でクッパー細胞及び肝細胞の細胞質内に軽微～中等度の好塩基性顆粒、並びに 100 mg/kg で肝臓に軽微な単細胞壊死が認められた。

主試験終了時に認められたギボシランに関連する投与部位の病理組織学的変化は、13 週間の回復期間終了時には完全に回復した。ギボシランに関連した肝臓の変化は依然として認められたが、概して頻度及び重篤度が低く、可逆的で回復が進行中であることが示唆された。ギボシランに関連するリンパ節の空胞化マクロファージは、13 週間の回復期間終了時に投与期間終了時と同程度の発現頻度／重篤度で依然として認められ、回復性の欠如が示唆された。

ギボシランを 10、30 又は 100 mg/kg の用量で週 1 回、合計 40 回皮下投与したカニクイザルの全個体（第 2～4 群）で、肝臓及び腎臓の試料からギボシランが検出された。275 日目（主試験）及び 365 日目（回復性試験）の肝臓及び腎臓のギボシラン濃度において、ギボシランの各投与群を通して明らかな性差は認められなかった。ギボシランの 10、30 及び 100 mg/kg 投与群を通して、275 日目（主試験）のギボシランの肝臓中濃度は腎臓と比較して 34～54 倍高く、365 日目（回復性試験）の肝臓中濃度は腎臓と比較して 179～1062 倍高かった。ギボシランは、腎臓と比較して遅い速度で肝臓から消失すると考えられる。概して、ギボシランを 10、30 又は 100 mg/kg の用量で週 1 回合計 40 回皮下投与後に、275 日目（主試験）のギボシランの肝臓及び腎臓中平均濃度は、用量依存的な増加が観察された。ギボシランの肝臓中平均濃度は、投与量 10～30 mg/kg 及び 30～100 mg/kg で、ほぼ用量比例的に増加した。ギボシランの腎臓中平均濃度は、投与量 10～30 mg/kg 及び 30～100 mg/kg で、ほぼ用量比例的に増加した。

雌雄合算の C_{max}、$AUC_{0\text{-}8}$ 及び $AUC_{0\text{-}24}$ 平均値から算定したギボシランの血漿中曝露量は、10～100 mg/kg で用量と共に増加した。平均 C_{max} はおおむね用量に比例して増加し、$AUC_{0\text{-}8}$ 及び $AUC_{0\text{-}24}$ の平均値は用量比をやや上回って増加した。サルにギボシランを反復投与後に、蓄積性は観察されな

かった。抗ギボシラン抗体が陽性であった 2 例の個々の TK パラメータは、抗ギボシラン抗体が陰性の動物と同程度であった。これらの動物では、抗ギボシラン抗体の存在はギボシランの血漿中曝露量に影響を及ぼさなかった。

以上より、幼若サルにギボシランを 10、30 及び 100 mg/kg/week の用量で週 1 回合計 40 回皮下投与した結果、投与部位及びリンパ節で投与と関連するが有害所見ではない病理組織学的変化（10 mg/kg 以上で軽微～中等度の単核細胞浸潤及び／又は空胞化マクロファージ）が認められた。投与部位の所見は 13 週間の回復期間終了時に完全な回復が認められた。一方、リンパ節の所見は回復性が欠如した。さらに、ギボシランに関連した肝臓の病理組織学的変化として、30 mg/kg 以上でクッパー細胞及び肝細胞の細胞質内に軽微～中等度の好塩基性顆粒、並びに、100 mg/kg で軽微な肝細胞の単細胞壊死が観察された。これらの変化は、13 週間の回復期間終了時に一部回復が認められた。100 mg/kg で単細胞壊死及びそれに関連した ALT、GGT、AST 及びコレステロールの上昇が認められたという事実に基づき、無毒性量は 30 mg/kg/week と判断された。無毒性量における、1 及び 274 日目の全体的に雌雄合算した平均 C_{max} 値はそれぞれ 4.73 µg/mL 及び 5.98 µg/mL、平均 $AUC_{0\text{-}8}$ 値はそれぞれ 25.1 µg·h/mL 及び 26.7 µg·h/mL、並びに平均 $AUC_{0\text{-}24}$ 値はそれぞれ 33.7 µg·h/mL 及び 34.3 µg·h/mL であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

ギボシランの遺伝毒性を GLP 適合の標準的な *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。標準的な復帰突然変異試験により、細菌を用いて *in vitro* で変異原性作用を検討した。ヒト末梢血リンパ球アッセイにより、哺乳類細胞を用いて *in vitro* でギボシランの遺伝毒性を評価した。試験は適切な溶媒及び陽性対照を使用して、ラット肝（post-mitochondrial）代謝活性化系（S9 mix）の存在下及び非存在下の両条件で実施した。ラットの皮下投与小核試験により、*in vivo* で染色体異常誘発作用も評価した。

表 2.6.6-3 に実施した全試験を示した。これらの試験で使用した被験物質のバッチに関する情報は、本項の表 2.6.6-1 に示した。確定試験はすべて GLP 基準に完全適合して実施した。すべての試験は、ICH の 3 極調和ガイドライン「医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス（S2A）」及び「遺伝毒性試験：医薬品の遺伝毒性試験の標準的組合せ（S2B）」に完全に準拠し、国際的にバリデートされ認証された手法を使用して実施した。

表 2.6.6-3 実施したギボシランの遺伝毒性試験の一覧

試験の種類	動物種／系統	投与方法	処理時間	用量／濃度	GLP	試験番号（概要表）CTD 所在箇所
細菌を用いる復帰突然変異試験	*S. typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA1537 及び *E. coli* WP2 *uvrA*	*In vitro*	66 時間	代謝活性化存在下及び非存在下 1.58, 5.0, 15.8, 50, 158, 500, 1581 及び 5000 µg/plate	適合	[AS1-NCD14-015]（[表 2.6.7.8-1]）CTD: 4.2.3.3.1-1
哺乳類細胞を用いる染色体異常試験	培養ヒト末梢血リンパ球	*In vitro*	4 時間（S9 存在／非存在）又は 21 時間（S9 非存在）	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 及び 500 µg/mL	適合	[AS1-NCD14-016]（[表 2.6.7.8-2]）CTD: 4.2.3.3.1-2
小核試験	ラット／Sprague-Dawley	皮下	単回投与、標本作製 24 時間（全投与量）又は 48 時間（2000 mg/kg）	0, 500, 1000 及び 2000 mg/kg	適合	[AS1-NCD14-017]（[表 2.6.7.9-1]）CTD: 4.2.3.3.2-1

略号: *E. coli* = 大腸菌；GLP = 医薬品の非臨床試験の実施の基準；S9 = 代謝活性化系；*S. typhimurium* = ネズミチフス菌

2.6.6.4.1 *In vitro*

2.6.6.4.1.1 ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験

（CTD: 4.2.3.3.1-1、試験番号[AS1-NCD14-015]）

本 GLP 適合試験では、哺乳類の外因性代謝活性化系（S9）存在又は非存在下で、数系統のネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*［*S. typhimurium*］）のヒスチジン遺伝子座、及び大腸菌（*Escherichia coli*［*E. coli*］）WP2 *uvrA* のトリプトファン遺伝子座において、ギボシラン及びその代謝物の復帰突然変異誘発能を評価した（[表 2.6.7.8-1]参照）。ギボシランを濃度 50 mg/mL で溶媒（生理食塩液）に溶解した貯蔵液を調製し、この貯蔵液を直接又は中間溶液から希釈することにより、すべての低濃度溶液を調製した。

細菌を用いる復帰突然変異試験では、プレート法を使用してラット肝画分（S9 mix）の存在下及び非存在下で、ネズミチフス菌株 TA1535、TA1537、TA98 及び TA100 並びに大腸菌株 WP2 *uvrA* を、被験物質の 1.58、5.0、15.8、50、158、500、1581 及び 5000 µg/plate（このアッセイの標準的な限界用量まで）で処理した。細菌を標準的な陽性対照物質と培養し、それに対する各菌株の反応で試験系の感受性及び S9 mix 活性を確認した。

ギボシランの曝露により、復帰突然変異のない背景細菌叢が不完全又は非存在、あるいは復帰突然変異コロニー数の大幅な減少はみられず、被験物質は試験に用いた濃度で細菌に毒性を示さなかった。このアッセイで沈殿は観察されなかった。

ギボシランの曝露により、S9 mix の存在又は非存在下で、すべての試験菌株のいずれの濃度においても復帰変異コロニー数の大幅な増加はみられない一方、標準的な陽性対照物質では予想された反応が観察された。このように、ギボシランは *in vitro* 試験で突然変異誘発作用が陰性であった。

以上より、ギボシランは *in vitro* 変異原性試験で遺伝毒性作用のエビデンスを示さないと結論された。

2.6.6.4.1.2 ヒト末梢血リンパ球を用いる哺乳類細胞 *in vitro* 染色体異常試験

（CTD: 4.2.3.3.1-2、試験番号[AS1-NCD14-016]）

本 GLP 適合試験では、哺乳類の外因性代謝活性化系（S9）存在下及び非存在下で、ギボシラン及びその代謝物が培養ヒト末梢血リンパ球に、構造的染色体異常を誘発する作用を評価した（[表 2.6.7.8-2]参照）。ギボシランを濃度 50 mg/mL で溶媒（生理食塩液）に溶解した貯蔵液を調製し、この貯蔵液を直接又は中間溶液から希釈することにより、すべての低濃度溶液を調製した。

培養リンパ球を S9 mix 存在下及び非存在下で 4 時間、S9 mix 非存在下で 21 時間処理した。各処理群には、適切な同時（溶媒）対照群及び陽性対照群を設置した。

代謝活性化存在下及び非存在下、1、2、4、8、16、32、64、128、256 及び 500 µg/mL の濃度で試験した。各処理で過剰な毒性は認められなかったことから、試験に用いた被験物質の最高濃度である 500 µg/mL で染色体異常を詳細に解析した。さらに、2 段階の低濃度（128 及び 256 µg/mL）も、溶媒対照群及び陽性対照群と共に、光学顕微鏡下で染色体異常の有無を検査した。

いずれの試験においても、ギボシランは背景値の範囲を上回る異常な分裂中期細胞の発現頻度増加を誘発しなかった。陽性対照物質のマイトマイシン C 及びシクロホスファミド（CP）は、染色体損傷を有する細胞の割合の大幅な増加（同時対照群と比べて少なくとも 2 倍）を誘発し、試験系の感度及び S9 mix の有効性が確認された。沈殿は観察されなかった。試験に用いた最高濃度 500 µg/mL は、ICH S2(R1)ガイドラインで推奨されるこのアッセイの最高濃度である。

ガイドラインに従って試験した結果、ギボシランは染色体損傷誘発を指標とする *in vitro* 試験で遺伝毒性作用のエビデンスを示さないと結論された。

2.6.6.4.2 *In vivo*

2.6.6.4.2.1 ラットの骨髄赤血球を用いる小核試験

（CTD: 4.2.3.3.2-1、試験番号[AS1-NCD14-017]）

本 GLP 適合試験では、Sprague-Dawley ラット（投与開始時に 57 日齢）の骨髄小核試験により、ギボシランを皮下投与した場合の遺伝毒性作用を評価した（[表 2.6.7.9-1]参照）。加えて、ギボシランの TK を測定した。

最大耐量を決定するために、主試験に先立って不可欠な用量設定試験を実施した。雌雄両性のラット（2 匹/雌雄）に、ギボシランを 1 回 500、1000 及び 2000 mg/kg の用量で単回投与した。動物の毒性症状及び／又は死亡を、投与開始後 2 日間にわたって観察した。500 mg/kg では、投与後に 1 例で半眼及び立毛が観察された以外に、臨床症状はみられなかった。1000 mg/kg では、一般状態の変化は観察されなかった。2000 mg/kg の投与後には、雄で活動性低下が認められ、雌雄で肩甲骨部に軽度の腫脹が観察された。投与 24 及び 48 時間後には、一般状態の変化は認められなかった。これらの所見に基づき、ギボシランは 2000 mg/kg まで忍容性があると判断され、この用量を主試験の最高用量とした。雌雄の間で一般症状に差がなかったため、主試験では片性（雄）のみの使用が妥当と判断した。

試験デザインは主試験用動物として各群雄 5 匹、及びバイオアナリシス（TK 測定）用動物として各群雄 6 匹を 500、1000 及び 2000 mg/kg の用量に割り付けた。投与 24 及び 48 時間後に各群雄 10 匹の評価が可能となるよう、すべての群で投与 24 時間後に動物を屠殺し、0 及び 2000 mg/kg 群は 48 時間後にも屠殺した。これ以外に陽性対照群（CP 20 mg/kg）を設定した。

主試験の投与液の濃度分析を実施した結果、被験物質が正確に調製されたことが確認された。1 日目の投与後 0.083、0.5、1、2、4、8、24 及び 48 時間に採血した血漿を使用して、ギボシランの TK 評価を実施した。ギボシランの曝露量は 500～2000 mg/kg で用量と共に増加した。C_{max} 及び AUC_{0-8} の増加は用量比を下回り、一方 AUC_{0-t} の増加は用量比を上回った。$AUC_{0-\infty}$は投与量にほぼ比例して増加した。

主試験では、いずれの投与量でもギボシランの投与後に一般状態の変化は観察されなかった。投与後 24 又は 48 時間で動物を屠殺し、各動物から両側の大腿骨を摘出して骨髄を採取した。骨髄塗抹標本を固定して、アクリジンオレンジで一時的に染色し、コード化して蛍光顕微鏡下で検査した。1 個体当り合計 2000 個の幼若赤血球（IE）について、染色体損傷を示す小核の有無を検査した。また、骨髄毒性の指標として、各動物について総赤血球（IE 及び成熟赤血球［ME］）中の IE の割合を算定した。

溶媒対照群のデータ（IE/(IE + ME)及び小核を有する幼若赤血球［MIE］の群平均%）は、試験施設で測定した背景データの範囲内であった。陽性対照物質の CP は、疑いなく明瞭に小核の増加を誘発した。このように、溶媒及び陽性対照物質の成績から本アッセイの有効性が確認された。

ギボシランを投与した動物では、投与後 24 及び 48 時間の採取時間で、染色体損傷を示す特記すべき MIE 発現頻度の増加は認められず、骨髄毒性を示す有意な IE 割合の減少も示さなかった。

以上より、ガイドラインに従って試験した結果、ギボシランは染色体損傷誘発を指標とする *in vivo* ラット骨髄小核試験で、標準的な限界用量の 2000 mg/kg（血漿中 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$ 値は、それぞれ 275 µg/mL 及び 3490 µg·h/mL）まで、遺伝毒性のエビデンスを示さなかった。

2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

トランスジェニック rasH2（Tg-rasH2、BALB/cBy × C57BL/6 F1）マウスの野生型（WT）を用いて、ギボシランの反復投与用量設定試験を 2 試験（試験番号[AS1-DSM16-003]、[表 2.6.7.10-1]参照、及び試験番号[AS1-GLP17-006]、[表 2.6.7.10-2]参照）実施し、がん原性試験の用量を設定するための情報を収集した。これらの用量設定試験は GLP 適合で実施していないが、適切なプロトコール及びデータの完全性を保証する文書管理手順に従って実施した。Tg-rasH2 マウスを用いた 26 週間皮下投与がん原性試験（試験番号[AS1-GLP17-004]、[表 2.6.7.10-3]参照）では、ギボシランを 0、150、500 又は 1500 mg/kg/month の用量で月 1 回皮下投与した結果、がん原性を示すエビデンスは認められなかった。Sprague-Dawley 系ラットを用いた 2 年間投与がん原性試験（0、25、50 及び 100 mg/kg/month）を現在実施しており、承認申請後の終了を予定している。本手順は ICH M3(R2)ガイドライン「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（薬食審査発 0219 第 4 号、平成 22 年 2 月 19 日）の記述、「がん原性試験が推奨される場合であっても、重篤な疾患の治療のために開発された医薬品については、成人患者／小児患者用を問わず、製造販売承認後にがん原性試験の結論を出すことができる」に適合するものである。

2.6.6.5.1 近交系ハイブリッドマウス（BALB/cBy × C57BL/6 F1）を用いたギボシランの 8 週間反復皮下投与毒性試験

（CTD: 4.2.3.4.2-1、試験番号[AS1-DSM16-003]）

非 GLP 試験において、各群雌雄各 5 匹の Tg-rasH2 野生型マウス（BALB/cBy × C57BL/6 F1、投与開始時に約 7～8 週齢）の 4 群（主試験第 1～4 群）に、ギボシランを 0（生理食塩液）、30、100 又は 300 mg/kg/week の用量で週 1 回 8 週間（合計 8 回）皮下投与した（[表 2.6.7.10-1]参照）。主試験のマウス（各群雌雄各 5 匹）は 51 日目に安楽死させた。別途 TK 測定用動物として、ギボシラン群（第 2 群及び第 3 群）に各群雌雄各 6 匹を割り付けた。すべての用量を投与液量 10 mL/kg で投与した。

ギボシランに関連する影響を、動物の生死、一般状態、投与部位所見、体重、臨床病理検査（血液学的検査及び生化学的検査）、剖検時の肉眼所見、器官重量（肝臓、腎臓及び脳）、病理組織学的検査、血漿中及び組織中の TK プロファイルに基づいて評価した。

試験期間中にギボシランに関連した死亡例はなく、ギボシランに関連する一般状態の変化は認められなかった。

雄でギボシランに関連する体重変化が認められ、36 日目までに 100 及び 300 mg/kg 群の平均体重が、対照群と比較してそれぞれ 8.8%及び 11.0%減少した。この傾向は 100 及び 300 mg/kg 群で 43 日目（両群とも 8.0%減少）、並びに 50 日目（それぞれ 10.4%及び 9.4%減少）まで継続した。100 及び 300 mg/kg 群の雄で認められた群平均体重の減少は、対照群と比較した体重増加が 36 日目（それぞれ-24.94%及び-45.06%）、43 日目（それぞれ-24.79%及び-43.60%）、並びに 50 日目（それぞれ-25.86%及び-43.02%）に低下したことと関連がみられた。雌では、対照群と比べて体重増加量の減少は認められなかった。

血液学的検査及び生化学的検査では、ギボシランに関連する所見はみられなかった。対照群と比較した平均器官重量では、ギボシラン投与群との間に特記すべき差異はなかった。

ギボシランに関連する肉眼所見は観察されなかった。ギボシランに関連した病理組織学的変化は最終投与部位での空胞化マクロファージのみであり、300 mg/kg を投与した雄（軽微）及び 30 mg/kg 以上を投与した雌（軽微～軽度）で認められた。これ以外にギボシランに関連した病理組織学的所見はなかった。

以上より、Tg-rasH2 野生型マウスに 30、100 及び 300 mg/kg/week の用量で週 1 回 8 週間（合計 8 回）皮下投与した結果、ギボシランの忍容性は良好であった。100 及び 300 mg/kg の投与で約 10%の有意な体重減少、並びにこれと相関する体重増加量の有意な減少が雄で 36 日目までに認められ、50 日目まで継続した。

2.6.6.5.2 001178-W Tg-rasH2（野生型）マウスを用いたギボシランの 8 週間反復皮下投与用量設定毒性試験及びトキシコキネティクス試験

（CTD: 4.2.3.4.2-2、試験番号[AS1-GLP17-006]）

非 GLP 試験において、各群雌雄各 10 匹の Tg-rasH2 野生型マウス（投与開始時に約 9 週齢）の 4 群（主試験の第 1～4 群）に、ギボシランを 0（生理食塩液）、500、1000 又は 1500 mg/kg/month の用量で月 1 回 8 週間（合計 3 回）皮下投与した（[表 2.6.7.10-2]参照）。主試験のマウス（各群雌雄各 10 匹）は 58 日目に安楽死させた。別途 TK 測定用動物として、対照群（第 1 群）に雌雄各 6 匹及びギボシラン群（第 2～4 群）に各群雌雄各 18 匹、ADA 測定用動物として各群に雌雄各 3 匹を割り付けた。すべての用量を投与液量 10 mL/kg で投与した。

ギボシランに関連する影響を、動物の生死、一般状態、体重、摂餌量、臨床病理パラメータ（血液学的検査及び生化学的検査）、TK パラメータ（最終投与後）、剖検時の肉眼的所見、器官重量、及び病理組織学的検査に基づいて評価した。

主試験で 1000 mg/kg 群の雄 1 例が試験期間中に死亡した。この動物では剖検時にギボシランに関連する肉眼的所見又は病理組織学的所見は認められず、死因は不明である。

一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査及び生化学的検査パラメータ、肉眼的所見及び器官重量に、ギボシランに関連した影響はみられなかった。

病理組織学的変化として、500 mg/kg 以上を投与した雌雄の投与部位、並びに 1000 mg/kg 以上の雄及び 1500 mg/kg 群の雌の腋窩リンパ節にわずかな空胞化マクロファージが認められた。

以上より、Tg-rasH2 野生型マウスに 500、1000、及び 1500 mg/kg/month の用量で月 1 回 8 週間（合計 3 回）皮下投与した結果、ギボシランの忍容性は良好であった。1500 mg/kg/month の最高用量でギボシランを投与したマウスに、Tg-rasH2 マウスを用いたがん原性試験で用量制限毒性となるような有害作用は認められなかった。

2.6.6.5.3 Tg-rasH2 マウスを用いた 26 週間皮下投与がん原性試験

（CTD: 4.2.3.4.2-3、試験番号[AS1-GLP17-004]）

本 GLP 試験では、Tg-rasH2 ヘミ接合型マウスにギボシランを 28 日間隔で 26 週間皮下投与（合計 7 回）し、がん原性を検討した（[表 2.6.7.10-3]参照）。また、ギボシランの TK 特性も検討した。

雌雄 Tg-rasH2（CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic）マウスに、ギボシランを 0（生理食塩液、対照群）、150、500 又は 1500 mg/kg/month（それぞれ第 1、2、3 及び 4 群）の用量で月 1 回、合計 7 回皮下投与した。陽性対照群（第 5 群）では、1 日目に 75 mg/kg の *N*-メチル-*N*-ニトロソウレア（MNU）を単回腹腔内投与した。各群雌雄各 25 匹とし、生後 9 週齢でマウスに投与を開始した。別途 TK 評価用のマウス（第 1 群に雌雄各 4 匹、第 2～4 群に各群雌雄各 20 匹）を割り付けた。溶媒対照の生理食塩液、ギボシラン及び MNU は、いずれも投与液量 10 mL/kg で投与した。

ギボシランに関連する影響を、動物の生死、一般症状（触診による腫瘤の観察を含む）、体重、摂餌量、血液学的パラメータ、TK、剖検時の肉眼所見及び病理組織学的検査に基づいて検討した。

ギボシランはいずれの投与量でも忍容性が良好であり、動物の生死、一般状態、摂餌量、血液学的パラメータ又は剖検時の肉眼所見にギボシラン投与の影響はなかった。

150 mg/kg 以上のギボシラン投与群の雄で、全体的に用量依存的かつ統計学的に有意な群平均体重の低下（生理食塩液対照群と比較して 2%～22%の減少）、及びこれに伴う体重増加量の減少（27%～59%）が認められた。

いずれの投与量においても、ギボシランに関連する腫瘍性変化はみられなかった。種々の器官・組織に腫瘍が認められたが、本系統・年齢のマウスではしばしば腫瘍が発生し、生理食塩液対照群とギボシラン投与群で発生頻度が同程度であり、用量相関性がみられなかったことから自然発生と考えられ、ギボシランの投与に関連しないと考えられた。ギボシランの投与に起因すると考えられる非腫瘍性所見としては、150 mg/kg 以上を投与した雌雄の投与部位にわずか又は少数の空胞化マクロファージ、1500 mg/kg を投与した雌雄の投与部位で混合細胞性炎症の程度が軽度上昇、500 mg/kg 以上の雄及び 1500 mg/kg の雌の腋窩リンパ節に少数の空胞化マクロファージが認められたのみであった。

陽性対照物質（MNU）を投与した Tg-rasH2 ヘミ接合型マウスでは、予想どおりに毒性変化が発現し、生理食塩液対照群と比べて生存率が低く、リンパ腫その他の腫瘍（皮膚及び胃の扁平上皮細胞乳頭腫／癌、並びに小腸の腺腫／腺癌）の発生頻度が高かった。

ギボシランの全身曝露を示す C_{max} 値及び $AUC_{0\text{-}t}$ 値は全般的に用量に比例して増加した。反復投与後の曝露量に、性差又は蓄積性はみられなかった。

以上より、ヘミ接合型 Tg-rasH2 マウスに、ギボシランを 1500 mg/kg/month までの用量で 28 日に 1 回 26 週間皮下投与した結果、がん原性を示さなかった。1500 mg/kg 投与群の雌雄合算した 169 日目の C_{max} 値及び $AUC_{0\text{-}t}$ 値は、それぞれ 242 μg/mL 及び 1420 μg·h/mL であった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

ギボシランを表 2.6.6-4 に示す一連の生殖発生毒性試験で評価した。ICH ガイドラインに従って試験をデザインし、主要な試験は GLP 適合で実施した。受胎能試験と胚・胎児発生に関する試験を組み合わせた試験を雌ラットで実施し、胚・胎児発生に特化した試験を雌ウサギを用いて実施した。ラットを用いて出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した。ギボシランはウサギに薬理活性を示さない。ギボシランの化学構造に起因する胚・胎児毒性を評価するために、第二の動物種としてウサギの試験を実施した。

さらに、6 ヵ月間反復投与毒性試験（試験番号[AS1-GLP15-022]、[表 2.6.7.7-3]参照）の成熟雄ラットを用いて、生殖能（精子運動性・濃度・形態及び精巣／精巣上体の病理組織学的検査）評価、並びに無処置雌との同居による受胎能及び初期胚発生の評価を包括的に実施した（2.6.6.3.2.4 項、参照)。

表 2.6.6-4 生殖発生毒性試験の概略

試験の種類	動物種／系統	投与経路	投与期間	投与量 [a] (mg/kg)	GLP	試験番号（概要表）CTD 所在箇所
受胎能及び初期胚発生に関する試験	ラット／Sprague-Dawley	皮下	交配前：週 1 回（4 回投与） 妊娠 6～17 日：1 日 1 回（12 回投与）	交配前： 0, 10, 30, 100 妊娠期間： 0, 1.5, 5, 16.5	非適合	[AS1-DSM15-041] （[表 2.6.7.11-1]） CTD: 4.2.3.5.1-1
受胎能及び初期胚発生に関する試験	ラット／Sprague-Dawley	皮下	交配前：週 1 回（4 回投与） 妊娠 6～17 日：1 日 1 回（12 回投与）	交配前： 0, 3, 10, 30 妊娠期間： 0, 0.5, 1.5, 5	適合	[AS1-GLP16-011] （[表 2.6.7.12-1]） CTD: 4.2.3.5.1-2
胚･胎児発生に関する試験	ウサギ／New Zealand white	皮下	妊娠 7～19 日：1 日 1 回（13 回投与）	0, 3, 10, 30	非適合	[AS1-DSM16-012] （[表 2.6.7.11-1]） CTD: 4.2.3.5.2-1
胚･胎児発生に関する試験	ウサギ／New Zealand white	皮下	妊娠 7～19 日：1 日 1 回（13 回又は 1 回［妊娠 7 日］投与）	妊娠 7～19 日： 0, 0.5, 1.5, 5 mg/kg 妊娠 7 日：20	適合	[AS1-GLP16-018] （[表 2.6.7.13-1]） CTD: 4.2.3.5.2-2

表 2.6.6-4 生殖発生毒性試験の概略（続き）

試験の種類	動物種／系統	投与経路	投与期間	投与量[a] (mg/kg)	GLP	試験番号（概要表）CTD 所在箇所
出生前及び出生後の発生に関する試験	ラット／Sprague-Dawley	皮下	F_0：妊娠 7 日～授乳 18 日：1 日 1 回（6 回投与）	0, 3, 10, 30	適合	[AS1-GLP17-009]（[表 2.6.7.14-1]）CTD: 4.2.3.5.3-1

略号: GLP = 医薬品の非臨床試験の実施の基準
a: 下線を引いた投与量は無毒性量を示す。

2.6.6.6.1 受胎能及び初期胚発生に関する試験

2.6.6.6.1.1 ラットの受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験

（CTD: 4.2.3.5.1-1、試験番号[AS1-DSM15-041]）

本用量設定試験は、ラットの胚・胎児発生に関する試験の用量選択に必要な情報を得ること、及びギボシランの受胎能、妊娠及び胚・胎児発生に及ぼす影響の予備的評価を行うことを目的として実施した（[表 2.6.7.11-1]参照）。本試験は、ICH ガイドラインの生殖発生過程のステージ A～D を評価するようデザインした。また、ギボシランの TK、PD 及び胎盤移行も測定した。

雌 Sprague-Dawley ラット（入荷時に約 66 日齢）の交配前 22、15、8 及び 1 日（試験 1、8、15 及び 22 日目）に、ギボシランを 0、10、30 及び 100 mg/kg の用量で週 1 回（合計 4 回）投与した。妊娠 6～17 日は 0、1.5、5 及び 16.5 mg/kg/day の用量で毎日動物に投与した。雌が 7 日以内に交配確認用の雄と交尾しなかった場合には、投与を追加した。投与液量を 5 mL/kg とし、最新の体重に基づいて調整して、毎日ほぼ同時刻に投与した。

全ラットについて、以下のパラメータ及び評価項目を検討した。動物の生死、一般症状、体重、体重増加量、摂餌量、交配及び受胎能、臨床病理検査（血液学的検査、生化学的検査及び凝固検査）、バイオアナリシス及び TK 測定、卵巣及び子宮検査、器官重量、胎盤検査、PD 評価及び濃度分析、剖検時の肉眼的観察、並びに胎児観察（性別、体重及び外表異常）。

主試験及び TK 試験の 100/16.5 mg/kg 群で、それぞれ 19 及び 12 日目に雌 1 例の死亡が発見され、TK 試験の 100/16.5 mg/kg 群で 12 日目に雌 1 例を安楽死させた。これらの死亡に先立って臨床症状や重度の体重減少が観察され、試験の最高用量で発生したことから、ギボシランに関連すると考えられた。これ以外の動物は予定剖検日まで生存した。

主試験の動物では、ギボシランに関連した一般状態の変化は観察されなかった。

100/16.5 mg/kg 群では、試験 1～8 日目に平均体重の減少（5.3 g の減少に対して、対照群は 5.7 g 増加）、並びに試験 1～22 日目（対照群と比べて 41%減少）及び妊娠 0～20 日（対照群と比べて 61%減少）に摂餌量の減少が認められた。

最高用量 100/16.5 mg/kg まで、発情周期、交配、受胎能あるいは卵巣・子宮観察パラメータなど、いずれの生殖能パラメータにもギボシランに関連した影響は認められなかった。剖検では、10/1.5、30/5 及び 100/16.5 mg/kg 群の各 1 例で、胃粘膜及び胃底腺表面に黒色領域が認められた。

いずれの投与量でも、ギボシランに関連した胚・胎児の生存性又は胎児体重への影響はみられず、ギボシランに関連した胎児の外表異常も観察されなかった。

いずれの投与量でも、ギボシランに関連した血液学的検査パラメータの変化は認められなかった。

妊娠 21 日には、100/16.5 mg/kg 群で対照群と比べてフィブリノゲンが低下した（対照群の 0.68 倍）。妊娠 21 日には、30/5 及び 100/16.5 mg/kg 群で AST（それぞれ対照群の 1.57 及び 2.07 倍）及び ALT（それぞれ対照群の 2.08 及び 2.63 倍）の上昇、並びに総たん白（それぞれ対照群の 0.74 及び 0.59 倍）及びアルブミン（それぞれ対照群の 0.71 及び 0.54 倍）の低下が認められた。また、100/16.5 mg/kg 群でトリグリセリドの増加（対照群の 1.86 倍）がみられた。

妊娠 17 日には、すべてのギボシラン投与群で母動物の血漿中ギボシラン濃度が測定可能であった。本試験の用量範囲を通して血漿 C_{max} 値は用量比例的に増加した。しかし、高用量群では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（$AUC_{0\text{-}t(last)}$）値が、用量比を上回る曝露量を示した。すべてのギボシラン投与群で、母動物の肝臓中ギボシラン濃度が測定可能であった。肝臓中濃度は、同時に採取した血漿中濃度と比較して極めて高かった（1000 倍超）。低用量の 2 群では、ギボシランの胎盤中濃度が測定できなかった。全投与群のいずれの胎児でも、ギボシラン濃度は測定できなかった。以上の結果から、ギボシランは胎児に移行しないと考えられた。

ギボシランを 10、30 及び 100 mg/kg の用量で週 1 回（合計 4 回）皮下投与した雌ラットで、肝臓内 *Alas1* mRNA が平均 82～90%減少し、試験に用いた各投与量で予想した最高レベルの抑制が達成された。

以上、雌ラットの交配前 22、15、8 及び 1 日目に、ギボシランを 0、10、30 及び 100 mg/kg の用量で週 1 回（合計 4 回）皮下投与した。妊娠 6～17 日まで 0、1.5、5 及び 16.5 mg/kg/day の用量で連日動物に投与した。ギボシランを投与した結果、100/16.5 mg/kg で死亡例及び一過性の体重・摂餌量減少が認められた。30/5 及び 100/16.5 mg/kg で生化学的検査値の変化が認められた。以上の結果より、受胎能及び胚・胎児発生に関する試験では、30/5 mg/kg 以下の投与量を使用することが推奨される。

2.6.6.6.1.2 ラットの受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験

（CTD: 4.2.3.5.1-2、試験番号[AS1-GLP16-011]）

本 GLP 適合試験は、交配前から交配、着床及び硬口蓋閉鎖を通して、Sprague-Dawley 系雌ラット（入荷時 65 日齢）におけるギボシランの影響を評価することを目的として実施した（[表 2.6.7.12-1] 参照）。本試験は、ICH ガイドラインの生殖発生過程のステージ A、B、C 及び D を評価し、雌ラットの発情周期、卵管輸送、着床及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検出できるようデザインした。加えて、ギボシランの TK 特性を検討した。

雌ラット（1 群 24 匹）の交配前 22、15、8 及び 1 日（試験 1、8、15 及び 22 日）に、ギボシランを 0、3、10 又は 30 mg/kg の用量で週 1 回（合計 4 回）皮下投与した。雌が 7 日以内に交配確認用の雄と交尾しなかった場合には、投与を追加した。妊娠 6～17 日の間は 0、0.5、1.5 又は 5 mg/kg/day

で毎日動物に投与した。投与液量を 5 mL/kg とした。サテライト動物（3 匹/対照群及び 9 匹/ギボシラン投与群）で、TK を評価した。最新の体重に基づいて投与液量を調整し、毎日ほぼ同時刻に投与した。主試験及び TK 試験に割り付けたラットを、それぞれ妊娠 21 日及び妊娠 18 日に安楽死させた。

以下の評価項目について検討した。動物の生死、一般症状、体重、体重変化、妊娠子宮重量、摂餌量、生殖能、臨床病理検査（血液学的検査、凝固検査、及び生化学的検査）、TK パラメータ、PD 評価（*Alas1* mRNA 測定）、剖検及び胎児検査。

ギボシランに関連した死亡例はみられなかった。対照群の 1 例で明らかな脚の損傷が認められたため、妊娠 18 日に安楽死させた。この動物は妊娠 18 日には左後肢が使用不能であった。体重及び摂餌量に特段の変化はみられず、剖検時に異常は認められなかった。この母動物は、子宮内に 6 匹の生存胎児が認められた。対照群の死亡例であることから、ギボシランとは関連がないと判断された。これ以外の動物はすべて予定剖検日まで生存した。

ギボシランに関連した一般状態の変化は観察されなかった。また、発情周期、交配・受胎能及び卵巣・子宮関連指標など、いずれの生殖能パラメータにもギボシランに関連した影響は認められなかった。剖検時にギボシランと関連する肉眼的所見はみられなかった。

いずれの投与量でも、胚・胎児生存率あるいは胎児体重にギボシランと関連する影響はみられず、ギボシランに関連した胎児の外表／内臓異常（奇形又は変異）は認められなかった。全群を通じて、胎児の化骨数平均値はすべて同程度であった。ギボシランに関連する影響は、恥骨骨化不全の骨格変異のみであり、30/5 mg/kg 群の母動物 3 例から得た胎児 3 例で観察された。この変異の胎児及び母動物当たりの発現頻度は、試験施設における背景値の範囲を上回った。

雌ラットの妊娠 21 日には、ギボシランに関連した臨床検査値への影響として、10/1.5 及び 30/5 mg/kg 群で、AST 上昇（それぞれ対照群と比べて+31.8%及び+66.1%）、トリグリセリドの増加（それぞれ対照群と比べて+94.1%及び+159.3%）、並びにカリウム濃度の増加（それぞれ対照群と比べて+8.0%及び+10.8%）が観察された。さらに、30/5 mg/kg では ALT、ALP 及びリン濃度（対照群と比べてそれぞれ+27.2%、+32.0%及び+12.0%）の上昇、並びにアルブミン及びアルブミン／グロブリン比（それぞれ対照群と比べて-17.9%及び-13.8%）の低下が認められた。血液学的検査及び凝固検査では、ギボシランに関連する影響はみられなかった。

5 mg/kg を 1 日 1 回皮下投与後の妊娠 17 日には、ギボシランの全身曝露が実証された。妊娠 17 日には、0.5 mg/kg でギボシランの血漿中濃度が全測定時点で定量下限未満であり、1.5 mg/kg ではおおむね定量下限を下回った。

以上、ギボシランに関連する影響として 10/1.5 mg/kg 以上で AST、トリグリセリド及びカリウム濃度の上昇、30/5 mg/kg で ALT、ALP 及びリン濃度の上昇並びにアルブミン濃度の低下が認められた。ギボシランを投与した結果、発情周期、交配あるいは受胎能には、なんら影響はみられなかった。以上より、臨床検査値に変化が認められたことに基づき、母動物の無毒性量は 3/0.5 mg/kg と判断された。ギボシランを投与した結果、胚・胎児生存率あるいは胎児体重には、なんら影響は認められなかった。ギボシランに関連した胎児の奇形はみられず、ギボシランに関連する唯一の胎児骨格異常として、30/5 mg/kg で恥骨の骨化不全が観察された。胚・胎児発生に関する無毒性量は 30/5 mg/kg と判断された。

2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1 ウサギの胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験

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

本用量設定試験は、ウサギの胚・胎児発生に関する試験の用量選択に必要な情報を得ること、並びにギボシランが妊娠及び胚・胎児発生に及ぼす影響の予備的評価を行うことを目的として実施した（[表 2.6.7.11-1]参照）。本試験では、ICH 3 極調和ガイドラインの生殖発生過程のステージ C～D を評価した。また、ギボシランの TK、PD 及び胎盤移行も測定した。

妊娠 New Zealand white ウサギ（1 群 5 匹、入荷時に約 5 ヵ月齢）に、対照物質又は被験物質の溶液を 0、3、10 及び 30 mg/kg/day の用量で、妊娠 7～19 日まで 1 日 1 回皮下投与した。投与液量を 5 mL/kg とした。

本試験では以下のパラメータ及び評価項目を検討した。一般症状、母動物の体重及び体重変化、摂餌量、TK パラメータ、PD パラメータ、臨床病理検査、卵巣及び子宮検査、胎児検査（体重及び外表検査）並びに剖検所見。

10 mg/kg 以下では、動物の生死にギボシランの影響はみられなかった。30 mg/kg 群の 1 例が妊娠 20 日に流産したため、安楽死させた。流産が試験の最高用量で発現したことから、ギボシランに起因する影響と考えられた。これ以外の動物はすべて予定剖検日まで生存した。

ギボシランに関連した一般状態の変化は観察されなかった。

30 mg/kg 群で妊娠 7～20 日に母動物の平均体重が減少した（対照群の 257.9 g 増加に対して 17.2 g 減少）。さらに、3 及び 10 mg/kg 群で妊娠 7～20 日に、母動物の平均体重増加量が対照群と比較して減少した（対照群と比べて、それぞれ-8.6%及び-70.44%）。全投与群で母動物の平均体重増加量もまた、妊娠 7～29 日の全測定期間で対照群と比べて減少した（対照群と比べて-56.8%～-97.6%）。

母動物の平均体重は 30 mg/kg 群で妊娠 13 日から減少が始まり妊娠 29 日まで継続（対照群と比べて-6.6%～-9.1%）、10 mg/kg 群で妊娠 23 日から減少が始まり妊娠 29 日まで継続した（対照群と比べて-5.9%～-6.9%）。

10 及び 30 mg/kg 群では、母動物の平均摂餌量が対照群と比べて妊娠 7～20 日（対照群と比べてそれぞれ-18.5%及び-25.2%）、並びに全測定期間の妊娠 7～28 日（対照群と比べてそれぞれ-19.8%及び-14.8%）に減少した。

母動物の剖検では、全投与量でギボシランに関連する所見が認められた。3、10 及び 30 mg/kg 群で、異常所見として肝臓の淡色化がそれぞれ 3、5 及び 3 例に観察された。

母動物当たりの平均早期吸収胚数は、対照群と比較して全投与群で増加した（早期吸収胚数／母動物が対照群の 1.0 に対して 3.6～5.3）。さらに、10 及び 30 mg/kg 群の各 1 例で全胚・胎児の死亡が観察された。その結果、対照群と比較して全投与群で平均総吸収胚数（吸収胚数／母動物が対照群の 1.0 に対して 3.6～5.7）、及び着床後胚損失率（対照群の 11.9%に対して 36.2%～62.5%）が上昇した。全投与群でこれに伴う平均同腹児数、母動物当たりの生存胎児数及び生存雄・雌胎児数の減少（生存胎児数／母動物が対照群の 9.2 に対して 2.3～6.8）が認められた。

いずれの投与量でも、ギボシランに関連した胎児の外表異常はみられなかった。

血液学的検査、凝固検査及び生化学的検査では、ギボシランに関連した影響は認められなかった。

ギボシランを 3、10 又は 30 mg/kg の用量で妊娠 7～19 日まで 1 日 1 回皮下投与後に、対照物質（0.9%注射用食塩水）と比較して、肝臓 *Alas1* mRNA の有意な減少は観察されなかった。

母動物の血漿中ギボシラン濃度は、妊娠 7 及び 19 日にすべてのギボシラン投与群で測定可能であった。ギボシランの連日投与により、血漿中濃度に明らかな蓄積は観察されなかった。ギボシランの血漿中曝露量は 3～10 mg/kg の間で用量比例的であったが、投与量が 10 mg/kg から 30 mg/kg に増加した場合には用量比を上回って増加した。すべてのギボシラン投与群で、母動物の肝臓内ギボシラン濃度が測定可能であった。妊娠 29 日のギボシランの肝臓中濃度は、妊娠 19 日の血漿中 C_{max} 値と比較して 350～1200 倍高く、肝臓中濃度は血漿中濃度より大幅に高値であった。母動物の肝臓中ギボシラン曝露量は、3～30 mg/kg の用量範囲で用量比を上回って増加した。低用量の 2 群（3 及び 10 mg/kg）では、ギボシランの胎盤中濃度が測定できなかった。30 mg/kg 投与群では、全胎盤の 30%のみでギボシラン濃度が測定可能であった。ギボシランの胎盤中濃度は、妊娠 19 日の血漿中 C_{max} 値と比べて低く（約 10%）、妊娠 29 日の母動物の肝臓中ギボシラン濃度と比較して極めて低かった（約 0.01%）。胎児組織中のギボシラン濃度は測定しなかった。

以上のように、雌ウサギの妊娠 7～19 日にギボシランを 3、10 及び 30 mg/kg/day の用量で皮下投与した。全投与量で母動物の体重／体重増加量の減少、10 mg/kg/day 以上で摂餌量の減少など、母動物にギボシランに関連する影響が認められた。さらに、全投与量で早期吸収胚数が増加し、それに伴って着床後胚損失率の上昇が認められた。

2.6.6.6.2.2 ウサギの胚・胎児発生に関する皮下投与試験

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

本 GLP 適合試験は、ギボシランを妊娠 New Zealand white ウサギ（入荷時に約 4～6 ヵ月齢）及びその胚・胎児に着床から硬口蓋閉鎖まで曝露し、胚・胎児発生に及ぼす影響を評価することを目的として実施した（[表 2.6.7.13-1]参照）。本試験は、ICH ガイドラインの生殖発生過程のステージ C～D を評価するようデザインした。また、ギボシランの TK 及び PD も検討した。

ウサギ（1 群 20 匹）の妊娠 7～19 日まで、ギボシランを 0、0.5、1.5 及び 5 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回（第 1～4 群）、又は妊娠 7 日に 20 mg/kg を 1 回（第 5 群）皮下投与した。投与液量を 5 mL/kg とした。サテライト群（第 1 群：2 匹/群、第 2～5 群：3 匹/群）を用いて TK を評価した。主試験及び TK 試験に割り付けたウサギを、それぞれ妊娠 29 及び 22 日に安楽死させた。

本試験では以下の評価項目を検討した。一般症状、母動物の体重／体重変化、摂餌量、臨床病理検査（血液学的検査、凝固検査、及び生化学的検査）、TK パラメータ、PD 評価及び組織内濃度分析、卵巣及び子宮検査、胎児検査（外表異常、性別、体重測定／個体識別、内臓検査及び骨格検査）並びに剖検所見。

0.5 及び 1.5 mg/kg 群では、ギボシランと関連のある死亡例はなかった。5 mg/kg 群の 1 例が妊娠 24 日、20 mg/kg 群の 2 例が妊娠 20 及び 24 日に流産したためいずれも安楽死させた。これらの流産はギボシランに関連すると考えられた。これ以外の動物は予定剖検日まで生存した。

ギボシランに関連した一般状態の変化は観察されなかった。

母動物の平均体重／体重増加量は、全投与群で投与期間の妊娠 7～20 日（対照群と比べて 0.5 及び 1.5 mg/kg 群はそれぞれ-73.2%及び-90.1%、対照群の 216.3 g 増加に対して 5 及び 20 mg/kg 投与群はそれぞれ 73.2 g 及び 46.2 g 減少）、並びに全測定期間の妊娠 7～28 日（対照群と比べて 0.5、1.5、5 及び 20 mg/kg 投与群はそれぞれ-50.8%、-57.6%、-95.2%及び-59.2%）に減少が認められた。

母動物の平均摂餌量は、全投与群で投与期間の妊娠 7～20 日（対照群と比べて-23.3%～-31.4%）、及び全測定期間の妊娠 7～28 日（対照群と比べて-15.9%～-23.3%）に減少した。

雌ウサギで観察されたギボシランに関連する血液学的検査値の変化として、0.5、1.5 及び 5 mg/kg で赤血球数（対照群と比べてそれぞれ-9.9%、-10.0%及び-15.0%）、血色素量（対照群と比べてそれぞれ-10.7%、-12.4%及び-16.6%）、並びにヘマトクリット（対照群と比べてそれぞれ-9.4%、-9.6%及び-14.5%）の減少が認められた。1.5 及び 5 mg/kg 投与群で単球数の増加（対照群と比べてそれぞれ+130.4%及び+144.3%）、並びに 5 mg/kg 群で血小板及び網状赤血球数の増加（それぞれ+68.4%及び+123.3%）が認められた。

ギボシランに関連する凝固検査及び生化学的検査値の変化として、5 mg/kg 群でフィブリノゲンの増加（対照群と比べて+85.6%）、並びに AST 及び ALT の上昇（対照群と比べてそれぞれ+132.9%及び+203.4%）が観察された。

ギボシランに関連する肉眼的所見では、1.5 及び 5 mg/kg 群で肝臓の多巣性淡色化の発現頻度上昇（対照群では観察されなかったのに対して、それぞれ 5 例及び 11 例で観察された）が認められた。

1.5 及び 5 mg/kg の投与量で、母動物当たりの平均早期吸収胚数が増加した（早期吸収胚数／母動物が、対照群の 0.22 に対してそれぞれ 1.53 及び 2.50）。さらに、1.5 及び 5 mg/kg 投与群のそれぞれ 2 及び 3 例で全胚・胎児死亡が観察された。その結果、1.5 及び 5 mg/kg の投与量で平均総吸収胚数（吸収胚数／母動物が対照群の 0.3 に対してそれぞれ 1.8 及び 2.9）、並びに着床後胚損失率（対照群の 3.9%に対してそれぞれ 16.2%及び 35.4%）が上昇した。1.5 mg/kg 投与群でこれに伴う母動物当たりの平均生存胎児数及び生存雄胎児数の減少（生存胎児数／母動物が対照群の 10.7 に対して 8.8）、並びに 5 mg/kg 投与群で平均同腹児数、母動物当たりの生存胎児数及び生存雄・雌胎児数の減少（生存胎児数／母動物が対照群の 10.7 に対して 6.8）が認められた。

20 mg/kg 群では、対照群と比較して母動物当たりの早期吸収胚数が減少した（早期吸収胚数／母動物が対照群の 0.2 に対して 3.7）。さらに、20 mg/kg 投与群の 3 例で全胚・胎児死亡が観察された。その結果、20 mg/kg 投与群では対照群と比較して平均総吸収胚数（吸収胚数／母動物が 4.0）、及び着床後胚損失率（対照群の 3.9%に対して 39.3%）が有意に上昇した。20 mg/kg 投与群では、これに伴う平均同腹児数、母動物当たりの生存胎児数及び生存雄・雌胎児数の減少（総胎児数／母動物が対照群の 10.7 に対して 7.6）が認められた。

胎児体重にはギボシランに関連した影響はみられなかった。

ギボシランと関連する胎児の外表／内臓異常は観察されなかった。20 mg/kg 投与群で低頻度の骨格変異が観察された。観察された骨格変異は、胸骨の非対称、変形及び化骨中心分離のみであった。母動物当たりの胎児平均化骨数は、全群で同程度であった。

雌ウサギにギボシランを 0.5、1.5 及び 5 mg/kg の用量で妊娠 7～19 日まで 1 日 1 回皮下投与、又は 20 mg/kg の用量で妊娠 7 日の単回皮下投与後に、対照物質と比較して肝臓 *Alas1* 転写物レベルの有意な減少は観察されなかった。

0.5 mg/kg 群では、妊娠 7 及び 19 日にすべての母動物で血漿中ギボシラン濃度が定量下限（<50.0 ng/mL）を下回った。C_{max}、AUC_{0-t} 及び AUC_{0-8} 値で測った曝露量は、妊娠 7 日に 1.5～20 mg/kg、妊娠 19 日に 1.5～5 mg/kg の用量範囲で用量比をやや上回る増加を示した。ギボシランを 1.5 又は 5 mg/kg の用量で連日反復投与後に、蓄積性は観察されなかった。母動物の肝臓中濃度は、0.5～5 mg/kg の用量範囲で用量比を上回って増加した。投与量が 0.5 mg/kg から 1.5 mg/kg に 3 倍増加すると、肝臓中濃度は約 9 倍増加した。同様に、投与量が 1.5 mg/kg から 5 mg/kg に 3.3 倍増加すると、肝臓中濃度は約 7～8 倍増加した。20 mg/kg の単回投与群では、ギボシランの肝臓中濃度は最も低かった。妊娠 22 日に採取したすべての胎盤及び胎児は、いずれの投与群でもギボシラン濃度が定量下限未満であった。

以上、ギボシランに関連した母動物に対する影響として、全投与群で母動物の体重／体重増加量及び摂餌量の減少、並びに 1.5 mg/kg 以上で肝臓の肉眼的所見が認められた。臨床病理検査では、ギボシランに関連した母動物への影響として、5 mg/kg で ALT、AST、フィブリノゲン、血小板数及び網状赤血球数の増加、並びに 0.5 mg/kg 以上で赤血球数、血色素量及びヘマトクリットの低下が認められた。これらのデータから、母動物の無毒性量は決定できなかった。5 mg/kg 及び 20 mg/kg 投与群で、それぞれ 1 例及び 2 例の流産が観察された。ギボシラン投与の結果、1.5 mg/kg 以上で早期吸収胚数の増加に起因する着床後胚損失率の上昇、及び 20 mg/kg で低頻度の骨格変異が観察された。したがって、胚・胎児発生に関する無毒性量は 0.5 mg/kg/day と判断された。

2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発生に関する試験

2.6.6.6.3.1 ラットの周産期及び出生後の発生並びに出生後の行動／機能評価に関する皮下投与生殖毒性試験

（CTD: 4.2.3.5.3-1、試験番号[AS1-GLP17-009]）

本 GLP 適合試験では、Sprague-Dawley ラット（入荷時に 62～76 日齢）の母動物にギボシランを着床から授乳期を通して離乳まで曝露し、その結果が出生児の発生に及ぼす影響を評価した（[表 2.6.7.14-1]参照）。本試験は ICH ガイドラインの生殖発生過程のステージ C～F を評価するようデザインした。しかし、帝王切開摘出胎児の検査（ステージ C 及び D）は追加試験で実施したことから、本試験では胎児の検査を実施しなかった。この期間に誘発される影響は遅延して発現する可能性があるため、F_1 世代のラットが性成熟するまで観察を継続した。さらに、母動物及び出生児の血漿中ギボシラン曝露量、並びに乳汁中ギボシラン濃度も測定した。

交配時期の明らかな雌ラット（1 群 22 匹）に、ギボシラン又は対照物質（注射用生理食塩液、USP）を 3、10 及び 30 mg/kg の用量で、ほぼ 6 日毎（妊娠 7、13 及び 19 日並びに授乳 6、12 及び 18 日）に合計 6 回皮下投与した。投与液量を 5 mL/kg とした。サテライト群（1 群 5 匹）でギボシランの血液及び乳汁中濃度を測定した。主試験及びサテライト群に割り付けたラットを、それぞれ授乳 21 及び 12 日に安楽死させた。

F_0 世代の雌は動物の生死、一般症状、体重、摂餌量、分娩、授乳及び母性行動について観察した。F_0 世代の雌を自然分娩させ離乳（授乳 21 日）まで観察し、離乳時に試験を継続する F_1 世代の出生児（雌雄各 1 匹／母動物）を選抜した。F_1 世代の全動物を生死、一般症状及び体重について離乳まで

観察した。試験継続のため選抜された F_1 世代の全動物について、離乳後の試験期間に動物の生死、一般症状、体重、摂餌量、性成熟、行動（受動的回避学習試験及び水迷路試験で検討）、剖検所見及び生殖器官重量を評価した。生殖能検査のため F_1 世代の雌雄成獣を同居させた。F_1 世代の雌は卵巣及び子宮の黄体及び着床痕、並びに生存／死亡胚の数及び分布を検査した。さらに、TK 試験に割り付けた F_0 世代の母動物から、授乳 12 日に血液及び乳汁試料を採取した。サテライト群に割り付けた雌ラットの F_1 世代出生児から、生後 12 日に母動物への投与約 2 時間後に心臓穿刺（安楽死後）により血液試料を採取した。血液及び乳汁試料中のギボシラン濃度を分析した。

F_0 世代の全動物が予定剖検日まで生存した。

妊娠及び授乳期間中に、ギボシランに関連した一般状態の変化、若しくは母動物の平均体重増加量及び平均摂餌量に対する影響はみられなかった。

F_0 世代の雌で剖検時に肉眼的所見は認められず、器官重量／体重比重量にギボシランと関連する影響はみられなかった。

出生児及び死産児数、4 日生存率（生後 4 日まで生存した出生児の割合）、哺育率（離乳まで生存した出生児の割合）、母動物当たりの生存児数、性比並びに出生児体重に、ギボシランの影響は認められなかった。

試験に用いたいずれの投与量でも、ギボシランに関連した授乳あるいは母性行動への影響はみられなかった。

F_1 世代の雌雄でギボシランに関連した死亡例はなかった。10 mg/kg 投与群の雄 1 例が生後 87 日目に死亡し、10 mg/kg 群の雌 1 例が妊娠 2 日に死亡した。これらの死亡例は用量依存的ではなかったことから、ギボシラン投与と関連がないと考えられた。これ以外の動物はすべて予定剖検日まで生存した。

F_1 世代の雌雄では、いずれの投与量でもギボシランに関連した一般状態の変化、平均体重／体重増加量及び摂餌量への影響はなかった。

性成熟及び行動検査に関して、ギボシランの影響は認められなかった。

F_1 世代の雌雄では、剖検時にギボシランに関連した肉眼的所見は観察されなかった。

F_1 世代では、精巣及び精巣上体重量にギボシランに関連した影響はなく、検討した卵巣及び子宮パラメータ（黄体数、着床数、生存／死亡胚、着床前・着床後胚損失率及び胎盤異常）に影響はみられなかった。

授乳 12 日の投与後 2 時間における母動物の血漿中ギボシラン濃度は、用量比を上回って増加した。30 mg/kg 群の母動物 1 例（動物番号 9808、乳汁中濃度 229 ng/mL）を例外として、ギボシランの乳汁中濃度は定量下限未満であった。生後 12 日の全出生児で、血漿中ギボシラン濃度は定量下限未満であった。

以上のように、雌ラットにギボシランを 3、10 及び 30 mg/kg の用量で 6 日毎（妊娠 7、13、19 日及び授乳 6、12、18 日）に皮下投与した。ギボシラン投与により被験物質に関連する死亡、一般状態の変化あるいは剖検所見は認められず、母動物の体重／体重増加量及び摂餌量への影響もみられなかった。試験に用いたいずれの投与量でも、妊娠、分娩、授乳及び母性行動に対する影響は認められなかった。したがって、母動物の一般毒性及び生殖に関するギボシランの無毒性量は、試験の最高用量 30 mg/kg と判断された。F_1 世代のラットでは出生児の死亡率、成長、性成熟、行動、交配及び受胎

能、並びに卵巣／子宮パラメータにギボシランと関連する影響は観察されなかった。これらのデータに基づき、出生児の生存性及び成長に関するギボシランの無毒性量は 30 mg/kg と判断された。

2.6.6.6.4 幼若動物を用いた試験

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

2.6.6.7 局所刺激性試験

局所刺激性に特化した試験は実施していない。げっ歯類及びサルを用いたすべての反復投与毒性試験において、投与部位を改良ドレイズスコア法及び病理組織学的検査によって皮膚刺激性を評価した。ラットの GLP 適合反復投与毒性試験では、ギボシランの週 1 回皮下投与により局所刺激性は観察されなかった。サルを用いた試験では、臨床使用を予定する医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準（GMP）製剤の貯蔵濃度に合わせて、最高用量（150 mg/kg）群の動物にギボシランの原液（200 mg/mL）を皮下投与した。サルでは、試験の最高用量で皮膚刺激性は観察されなかった。投与部位の病理組織学的所見として、ラット及びサルのいずれも全投与量で空胞化マクロファージ（軽微～軽度）、ラットで皮筋変性（軽微～中等度）の発現頻度及び程度の増加がみられた。回復群のラット及びサルでは、投与部位の病理組織学的変化は認められなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 抗原性試験

ギボシランの抗原性に特化した試験は実施していない。ラットの 26 週間反復投与毒性試験及び 13 週間回復性試験（試験番号[AS1-GLP15-022]、[表 2.6.7.7-3]参照）において、バリデートされた方法で抗薬物抗体（ADA、免疫グロブリン［IgG/IgM］）について検討した。投与後の 3 測定時点（57、113 及び 169 日目）で ADA を分析した 160 例（各群［0.9%食塩水、3、10 及び 30 mg/kg/day］40 例）中、ADA 陽性が確認された試料はなかった（発現頻度 0%）。ADA が陰性であったことから、薬物動態、PD、薬物中和作用及び安全性に及ぼす影響は評価しなかった。

サルの 39 週間反復投与毒性試験及び TK 試験、並びに 13 週間回復性試験（試験番号[AS1-GLP15-018]、[表 2.6.7.7-5]参照）において、バリデートされた方法によりサルの ADA（IgG/IgM)を測定した。ADA 検査はスクリーニング及び確認試験の後、抗体価を測定した。試験成績の概略を表 2.6.6-5 に示した。対照群、10、30 及び 100 mg/kg/week の各群 12 例の合計 48 例の動物を用いて、投与前及び投与後の 3 時点（85、169 及び 253 日目）で ADA を測定した。2 例で投与後に、低抗体価（50～100）の ADA 陽性が確認された（ギボシラン投与動物 36 例中 2 例、ADA 検出頻度 5.6%）。

これらの動物では、ADA に起因するギボシランの血漿中曝露量への影響及び毒性所見は認められなかった。サルを用いた本毒性試験では、PD 評価を実施しなかった。ADA の検出頻度が低く抗体価も低値であったことから、中和抗体の測定は実施しなかった。

表 2.6.6-5 抗薬物抗体の概略

群	動物数	投与前	85 日目	169 日目	253 日目
対照群	12	陰性	陰性	陰性	陰性
10 mg/kg	12	陰性	陰性	陰性	陰性
30 mg/kg	12	陰性	陰性	陽性、抗体価 50（動物番号 3506）	陰性
100 mg/kg	12	陰性	陽性、抗体価 50（動物番号 4001）	陽性、抗体価 100（動物番号 4001）	陽性、抗体価 100（動物番号 4001）

略号: NC = Not calculated
アッセイカットオフ値: スクリーニング（NC+0.020）、確認試験（22.8%阻害）、及び抗体価測定（NC+0.049）

2.6.6.8.2 免疫毒性試験

ギボシランの免疫毒性試験は実施していない。ギボシランの薬理作用である 5′-アミノレブリン酸合成酵素 1（ALAS1）産生の減少からは、免疫機能に影響を及ぼす可能性は示されないが、ギボシランの免疫毒性を明らかにするために、反復投与毒性試験で観察された所見を評価した。これらの試験では、感染症の発現頻度上昇はなく、白血球減少／増多、顆粒球減少／増多又はリンパ球減少／増多を示す血液学的検査値の変化はみられず、免疫系器官の重量や組織学的所見の変化も認められなかった。ラットでは、投与部位に空胞化マクロファージ及びクッパー細胞内好塩基性顆粒の病理組織学的所見が認められた。ギボシランを 150 mg/kg/month で 13 週間投与した雌ラットでは、肝毒性に伴う二次的変化として、白血球数、好中球数及び単球数の軽微な増加が観察された。サルでは、投与部位で単核細胞浸潤及び空胞化マクロファージ、並びにクッパー細胞内に好塩基性顆粒が観察された。これらの所見は免疫系の正常反応と一致し、免疫毒性のエビデンスではない。このエビデンスの重要性に基づく評価から、ギボシランの免疫毒性を検討する追加試験の必要はないと判断した。

ヒト全血を用いる *in vitro* 試験、マウスの探索的単回投与試験及びサルの探索的反復投与毒性試験（試験番号[AS1-NCD14-002]、[表 2.6.7.6-1]、2.6.6.3.3.1 項、参照）の一部として、ギボシランの免疫刺激作用を検討した。これらの試験で変化が認められなかったことから、ギボシランが免疫刺激作用を有するとは考えられない。

2.6.6.8.2.1 ヒト全血を用いた AD-60519 のサイトカイン誘導に関する *in vitro* 試験

（CTD: 4.2.3.7.2-2、試験番号[BIO14026]）

本非 GLP 試験は、ヒトの全血を用いた *in vitro* アッセイでサイトカイン産生反応を測定することにより、ギボシランの免疫刺激作用を明らかにすることを目的として実施した（[表 2.6.7.17-1]参照）。

ギボシランを、*N*-[1-(2,3-ジオレオイロキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム（DOTAP）試薬を使用して新鮮な全血試料にトランスフェクションし、37°C で 20～24 時間インキュベートした。インターロイキン（IL）-1β、IL-1 受容体アンタゴニスト（RA）、IL-6、IL-8、顆粒球コロニー刺激

因子（G-CSF）、インターフェロンγ誘導たん白質 10（IP-10）、マクロファージ炎症性たん白質（MIP）-1α 及び腫瘍壊死因子（TNF）-α の 8 種の血漿中サイトカイン／ケモカインのマルチプレックス分析により免疫刺激作用を測定した。DOTAP を使用してギボシランを濃度 300 nmol/L でヒト全血（ドナー4 名）にトランスフェクションした結果、測定したサイトカイン／ケモカインの明らかな誘導は認められなかった。

2.6.6.8.2.2 雄 CD-1 マウスにおけるギボシランの単回皮下投与免疫刺激探索試験

（CTD: 4.2.3.7.2-1、試験番号[AS1-NCD14-013]）

本非 GLP 探索試験は、ギボシランを雄 CD-1 マウス（投与開始時に約 7 週齢）に皮下投与し、免疫系に急性刺激を与えた場合の影響を評価することを目的として実施した（[表 2.6.7.17-1]参照）。

雄 CD-1 マウス（5 匹/群）にギボシランを 0（PBS）、30 又は 100 mg/kg の用量で、1 日目に単回皮下投与した。全群の動物で投与 4 時間後に採血した。6 種の血清中サイトカイン／ケモカイン（G-CSF、IL-6、IP-10、KC、MCP-1 及び TNF-α）のマルチプレックス分析により、免疫刺激作用を測定した。

雄 CD-1 マウスにギボシランを 100 mg/kg 以下の用量で単回皮下投与した結果、測定したサイトカインに明らかな急性の影響（投与 4 時間後）は認められなかった。

2.6.6.8.3 毒性発現の機序に関する試験

ギボシランの毒性発現の機序に関する試験は実施していない。ラット（試験番号[AS1-NCD13-001]、[AS1-NCD14-001]）及びサル（試験番号[AS1-NCD14-002]）の探索的用量設定試験、並びにウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験及び本試験（試験番号[AS1-DSM16-012]、[AS1-GLP16-018]）において、毒性発現の機序に関するエンドポイントを検討した。これらの試験では、ウサギ及びサルの薬効薬理（肝臓 *ALAS1* mRNA 濃度）評価、ギボシランの薬理作用が *ALAS1* mRNA に及ぼす機能的影響を明らかにするため、ラット及びサルで *ex-vivo* における肝 P-450（CYP）活性の測定、並びにサルでギボシランの免疫刺激作用の評価（血漿中のサイトカイン及び補体測定）を実施した。

2.6.6.8.4 依存性試験

ギボシランの依存性試験は実施していない。ギボシランは主に肝臓に取り込まれ、他の組織では分布が少ない。ギボシランの分子量は約 17,000 ダルトンであり、分子量の大きいギボシランが血液-脳関門を通して受動的に浸透することは予想されない。これは、雄ラットに 10 mg/kg の用量で単回皮下投与後に、ギボシランは血液-脳関門（大脳、小脳及び延髄）を通過しないとの試験結果により支持される（[2.6.4.4.2]項「ラットにおける分布」参照）。脳内の試験は実施していないが、ギボシランを能動的に神経細胞に取り込むトランスポーター、受容体あるいはイオンチャネルは知られていない。これらのメカニズムによって大型の分子が神経細胞に進入する可能性は低く、中枢神経系の神経細胞がギボシランに曝露される可能性は低いと考えられた。このため、神経伝達物質に関する試験は実施しなかった。

ラットの反復投与毒性試験における一般状態観察では、ギボシランと関連した中枢神経系作用を示す行動変化は観察されなかった。サルの 13 週間（試験番号[AS1-NCD14-011]、[表 2.6.7.7-4]参照）及び 39 週間（試験番号[AS1-GLP15-018]、[表 2.6.7.7-5]参照）反復投与毒性試験（週 1 回投与、GLP 適合）で神経学的検査を実施した。その結果、いずれの試験においてもギボシランと関連する神経行動学的観察所見は認められなかった。13 週間及び 39 週間反復投与毒性試験（GLP 適合）における神経学的影響の無影響量は、両試験で検討した最高用量のそれぞれ 150 mg/kg 及び 100 mg/kg であった。これらの理由から、薬物弁別試験、自己投与試験又は身体依存性試験など、追加の非臨床試験は実施しなかった。

2.6.6.8.5 代謝物の毒性試験

ギボシランの代謝物の毒性試験は実施していない。AS(N-1)3′ギボシランは、ヒトで皮下投与後に循環血中で検出される唯一の主要活性代謝物である（追加の詳細情報については、[2.6.4.5.2.1]項「アンチセンス鎖の代謝」参照）。ラット及びサルの血漿中代謝物プロファイルの類似性、並びにマウスの肝臓内代謝物プロファイルに基づき、ギボシランの代謝プロファイルは試験に用いた全動物種を通して類似すると結論される。すべての毒性試験で特に測定はしていないが、ラット及びサルの血漿中ギボシラン濃度とヒトで形成される代謝物の既知の相対割合に基づき、反復投与毒性試験においてヒト曝露量の数倍で AS(N-1)3′ギボシランの血漿中曝露量を検討した。さらに、肝 S9 画分を用いて実施した代謝プロファイリングで、主要代謝物として AS(N-1)3′ギボシランの形成が確認され（[2.6.4.5.2.1]項「アンチセンス鎖の代謝」参照）、存在した代謝物が *in vitro* 遺伝毒性試験で評価されたことを示している。

2.6.6.8.6 不純物の毒性試験

ギボシランの不純物の毒性試験は実施していない。非臨床毒性試験で使用した原薬バッチの不純物プロファイルは、臨床試験及び予定市販製剤で使用する物質の不純物プロファイルと同等であった。各不純物の安全性を確認する追加試験は必要ないと考えられる。ギボシランの不純物プロファイルについては、ギボシラン原薬の規格に詳述する（[3.2.S.3.2]項「不純物」及び[表 2.6.7.4-1]参照）。毒性試験で使用した製剤及び原薬のバッチ番号を、必要に応じて本項の表 2.6.6-1 に示した。

2.6.6.8.7 その他の試験

2.6.6.8.7.1 光毒性試験

ギボシランの光毒性試験は実施していない。ICH ガイドライン S10「医薬品の光安全性評価ガイドライン」の 1.3 項に述べられているように、一般的に当該ガイドラインはオリゴヌクレオチドに適用されない。

ギボシランは GalNAc と共有結合する二本鎖オリゴヌクレオチドであり、ピーク吸収波長が 260 nm で、UV-B の短波長領域に広がる典型的な核酸のスペクトルパターンを示す。UV-A 領域では、吸収はない。UV-B の短波長領域で吸収が観察されるが、ギボシランのこの特性は、オリゴヌクレオチド

の化学的性質として既知の吸収スペクトルと一致している。さらに、ラットの定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験では、単回皮下投与により ^{3}H-ギボシランは皮膚及び眼には広く分布しなかった（試験番号[AS1-DSM17-018]、[表 2.6.5.5C]及び[2.6.4.4.3]項「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」参照）。

2.6.6.9 考察及び結論

ギボシランを MRHD 2.5 mg/kg の月 1 回皮下投与で AHP 患者の治療に使用することを担保するため、包括的な非臨床毒性試験パッケージとして *in vitro* 試験、並びにマウス、ラット、ウサギ及びサルを用いた *in vivo* 試験を実施した。

2.6.6.9.1 ギボシランの一般毒性試験

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

2.6.6.9.2 毒性標的器官

マウス、ラット及びサルを用いて実施した反復投与毒性試験において、肝臓にギボシランと関連する標的器官毒性が観察された。これ以外のギボシラン投与と関連する非有害又は二次的所見として、副腎、腎臓、膵臓、投与部位及びリンパ節に影響が認められた。

2.6.6.9.2.1 肝臓

ギボシランは、糖鎖リガンド（GalNAc）と siRNA が共有結合しており、主に肝細胞の表面に発現する ASGPR を介した肝細胞特異的な siRNA の直接的取り込みによって、肝臓に送達されるよう特別にデザインされている。このデザインに合致して、ギボシランは主に肝臓に分布する（[2.6.4.4]項「分布」参照）。マウス、ラット及びサルを用いて実施した反復投与毒性試験において、ギボシランに関連した肝毒性のエビデンスが認められ、非臨床試験の動物種としてラットが最も感受性が高いことが明らかとなった。

CD-1 マウスでは、ギボシランを 100 mg/kg 以上の用量で週 1 回（合計 5 回）投与後に、肝臓の病理組織学的変化として軽微～軽度の肝細胞肥大が観察されたのみであった（100 mg/kg における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$ は、それぞれ 227 µg/mL 及び 339 µg·h/mL）。この所見に伴う肝重量の変化、又は何らかの臨床病理パラメータの変化は認められなかった。野生型又は Tg-rasH2 マウスでは、ギボシランを

最高 1500 mg/kg までの用量で月 1 回 8 週間（合計 3 回）皮下投与後に、肝臓所見は観察されなかった。

ラットでは、ギボシランの 100 mg/kg を単回皮下投与 8 日後に、ギボシランと関連した肝臓に対する影響のエビデンスが観察された（試験番号[AS1-NCD14-010]、[表 2.6.7.7-1]参照）。肝臓の病理組織学的所見として、雌雄で軽微～軽度の肝細胞空胞化、及び雌 10 例中 2 例で肝臓に軽微な単細胞壊死が認められた。肝細胞の空胞化は、細胞質内に多数の明澄な小型空胞（微小空胞）及び明澄な中～大型の空胞（大空胞）が共に存在するのを特徴とした。この所見に伴う肝重量の変化はなかったが、血清 ALP の軽度上昇を伴った。ラットにギボシランを週 1 回反復投与後に、10 mg/kg 以上の用量で絶対及び相対肝重量の減少が観察された。病理組織学的検査では、雄の 10 mg/kg 以上及び雌の 30 mg/kg で軽微～軽度のクッパー細胞内好塩基性顆粒が観察された。また、雄の 10 mg/kg 以上及び雌の 30 mg/kg で細胞質内に認めた黄褐色色素を特徴とする、クッパー細胞色素沈着の発現頻度及び程度の増加がみられた。3 mg/kg 以上の用量で、軽微～重度の肝細胞空胞化の発現頻度及び程度が増加した。この所見は明瞭な用量－反応関係を示し、概して雄より雌が重度であった。この所見は肉眼的所見の蒼白化と相関し、前述のように微小空胞と大空胞が共に存在するのを特徴とした（脂肪変性の所見と一致）。ラットにギボシランを 100 mg/kg/week 以上の用量で 4 週間皮下投与した結果（試験番号[AS1-NCD14-001]、[表 2.6.7.6-1]参照）、雌で軽微～中等度の胆管過形成が観察された。ギボシランの月 1 回投与（試験番号[AS1-GLP16-022]、[表 2.6.7.7-2]参照）では、おおむね 100 mg/kg 以下を投与したラットで非有害所見がみられた。しかし、150 mg/kg を投与した雌で軽微～中等度の卵円形細胞過形成が観察された。全般的にこれらの所見に伴って、軽微～軽度のアルブミン減少、軽微～中等度の ALP 上昇、軽微～軽度の AST 上昇、並びに総ビリルビン及び直接ビリルビンの軽度上昇など、血清生化学的検査値の変化が認められた。これ以外に肝臓で認められた病理組織学的変化として、雌雄の 3 mg/kg 以上で軽微～軽度の単細胞壊死及び／又は主に空胞化領域で観察される有糸分裂の増加、雌の 30 mg/kg 以上の用量で軽微な肝細胞巨大核、並びに雄の 30 mg/kg 及び雌の 10 mg/kg 以上で低頻度の好酸性細胞変化巣が観察された。13 週間の回復期間終了時には、ラットの肝臓でみられた肝細胞の単細胞壊死、有糸分裂及び髄外造血の増加は完全な回復性が認められた。一方、肝細胞の空胞化、色素沈着及び好酸性細胞変化巣の回復は部分的であった。ラットの 26 週間反復投与毒性試験（試験番号[AS1-GLP15-022]、[表 2.6.7.7-3]参照）において、30 mg/kg で血清 AST 及び ALP の上昇と相関した肝細胞の単細胞壊死及び空胞化など、肝臓の病理組織学的変化が認められたことから、ギボシランの肝臓に対する影響の無毒性量は 10 mg/kg/week と判断された（183 日目の雌雄合算した C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$ 平均値は、それぞれ 0.85 μg/mL 及び 3.69 μg·h/mL）。二次的変化として、30 mg/kg で膵臓のランゲルハンス島に血管拡張が発現した。

サルでは、ギボシランの週 1 回投与で実施した反復投与試験で肝重量の変化は観察されなかった。39 週間反復投与毒性試験（試験番号[AS1-GLP15-018]、[表 2.6.7.7-5]参照）で観察された肝臓の病理組織学的変化として、30 mg/kg 以上でクッパー細胞及び肝細胞内に好塩基性顆粒、並びに 100 mg/kg で肝細胞に単細胞壊死が認められたのみであった。好塩基性顆粒は、クッパー細胞の細胞質内に認める微細な好塩基性斑点、及び肝細胞の細胞質内に認める大きさの一定しない顆粒の集積が特徴であった。この所見は 30 mg/kg 以上で認められた ALP の軽度上昇、100 mg/kg を投与した動物で観察された ALT 及び GGT の軽度上昇、並びに 100 mg/kg を投与した雄で認められた AST 及びコレステロー

ルの軽度増加など、血清生化学的検査値の変化と関連がみられた。13 週間の回復期間後には、ギボシランの 100 mg/kg を投与した動物で ALP、ALT、GGT 及びコレステロールの軽微な変化が観察された。主試験終了時と比較して回復期間終了時には、肝臓の病理組織学的変化の発現頻度及び程度が低く、病理組織学的変化の回復が進行中であることが示唆された。肝細胞の単細胞壊死は 100 mg/kg の雌 2 例にのみ認められ、この変化の回復性が示唆された。回復性試験の動物で単細胞壊死が認められたこと、及び血清生化学的変化の回復が部分的であったことを考え合わせると、100 mg/kg で認められた変化は有害所見と解釈される。したがって、無毒性量は 30 mg/kg/week と判断された（274 日目の雌雄合算した C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$ 平均値は、それぞれ 5.98 µg/mL 及び 28.2 µg·h/mL）。

以上を総合すると、マウス、ラット及びサルで観察されたギボシランに関連した肝臓所見は、細胞内へのギボシランの蓄積に起因する、代謝の変化が関与した細胞順応と解釈される [2]。この適合性変化に関連する炎症又は線維化のエビデンスはなんら認められなかったが、単細胞壊死のエビデンスが認められた。ギボシランの *ALAS1* mRNA に対する薬理作用及びその結果生じるヘム中間体生成の減少は、ラットで観察された肝重量減少の潜在的なメカニズムの説明として無視することはできない。ラットで観察された微小及び大空胞性脂肪変性は種特異的と考えられ、ヒトとの関連性は不明である。

2.6.6.9.3 ギボシランに関連したその他の非有害所見

副腎、腎臓、膵臓、投与部位及びリンパ節で、ギボシランと関連する非有害所見あるいは二次的所見が発現した。

2.6.6.9.3.1 副腎

ラットにおける 13 週間反復投与毒性試験（試験番号[AS1-NCD14-010]、[表 2.6.7.7-1]参照）の単回投与評価では、ギボシランの 100 mg/kg を単回皮下投与後に病理組織学的変化として、副腎索状帯で軽微～軽度の皮質空胞化が認められた。ラットで雄に 3 mg/kg/week 以上又は雌に 10 mg/kg/week 以上を反復投与した場合には、ギボシランと関連した絶対及び相対副腎重量の減少も観察された。反復投与試験でこの所見と関連する病理組織学的変化はみられず、13 週間の回復期間後には対照群と比較して副腎重量の差異は認められなかった。非臨床試験でギボシランを投与した他の動物種では、副腎所見は観察されなかった。副腎所見はギボシランの投与に対する間接的な反応と解釈され [3]、有害所見とは判断しなかった。この解釈はラットの QWBA 試験（試験番号[AS1-DSM17-018]、[表 2.6.5.5C]及び[2.6.4.4.3]項「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」参照）において、副腎に ^{3}H-ギボシランの顕著な分布がみられないことから一層支持される。ラットで認められた副腎所見のヒトとの関連性は不明である。

2.6.6.9.3.2 腎臓

ラットでは、すべての反復投与毒性試験の 10 mg/kg 以上の用量で、病理組織学的所見として腎臓で近位尿細管上皮の細胞質に好塩基性顆粒が観察された。この所見に伴って、ギボシランと関連する絶対及び相対腎臓重量の増加が観察された。ラットの 4 週間投与用量設定試験（試験番号

[AS1-NCD14-001]、[表 2.6.7.6-1]参照）では、ギボシランの 100 mg/kg 以上を週 1 回投与した雌及び 300 mg/kg を週 1 回投与した雄で、病理組織学的変化として腎皮質で好塩基性顆粒に伴う尿細管空胞化も観察された。尿細管上皮の空胞化は、13 週間反復投与毒性試験（試験番号[AS1-GLP16-022]、[表 2.6.7.7-2]参照）で 150 mg/kg を月 1 回投与した雌ラットでも観察された。腎臓の病理組織学的変化は、毒性試験で検討した動物種の中で、ラットの反復投与後にのみ観察された。26 週間反復投与毒性試験（試験番号[AS1-GLP15-022]、[表 2.6.7.7-3]参照）の回復性試験群で、10 mg/kg を週 1 回投与したラットの腎臓に好塩基性顆粒が存在せず、30 mg/kg を週 1 回投与したラットでは所見の重篤性が低かったことから部分的な回復が示唆され、尿細管上皮細胞は細胞質から好塩基性顆粒を除去できることが示された。ラットの腎臓所見は一部回復性が認められること、腎尿細管の炎症又は変性に伴う病理組織学的変化が存在しないこと、並びに腎機能の変化に伴う生化学的検査及び尿検査パラメータにギボシランと関連した変化が認められないとのエビデンスに基づき、ラットで観察された腎臓所見は、腎臓を通して排泄される高濃度のギボシランに対する適応反応と解釈され、有害所見とは判断しなかった。ギボシランは腎臓から排泄され、ラットに 3、10 又は 30 mg/kg の用量で週 1 回 26 週間（27 回）反復皮下投与後には、ギボシランの肝臓中濃度はほぼ用量比例的に増加した。一方、腎臓の曝露量は用量比を上回って増加した（[2.6.4.6]項「排泄」参照）。ギボシランのような RNAi 治療薬は糸球体でろ過され、一部は近位尿細管上皮から再吸収される[4]。近位尿細管の細胞質で観察された好塩基性顆粒は、エンドリソソーム内でコンパートメント化され、ヘマトキシリン染色されたギボシランを示すと考えられる。この所見が本来的に有害所見ではないこと、及び非臨床試験に用いた他の動物種で類似の所見が認められないことを考慮すると、本所見のヒトとの関連性は不明である。

2.6.6.9.3.3 膵臓

ラットの 26 週間反復投与毒性試験（試験番号[AS1-GLP15-022]、[表 2.6.7.7-3]参照）では、病理組織学的所見として、10 mg/kg/week 以上を投与した雌雄で膵臓のランゲルハンス島に軽微～軽度の血管拡張が観察された。ランゲルハンス島の周囲又は内部で観察される血管構造の拡張が、血管拡張の特徴であった。膵臓内の局部的又は全体的な炎症、変性あるいは出血を示す病理組織学的所見は認められなかった。また、この所見と相関する臨床病理検査値の変化及び肉眼的観察所見はみられず、有害性を示唆する変化は認められなかった。回復性試験の動物では、30 mg/kg の雄 2 例及び雌 2 例にのみランゲルハンス島で軽微な血管拡張が観察され、10 mg/kg では血管拡張はみられず、発現頻度及びその程度から部分的な回復が示された。血管拡張は当該試験のみで観察され、他のラットを用いた毒性試験のいずれの投与量、あるいはギボシランを投与したどの動物種でも観察されなかった。全体的には、膵臓における血管拡張の用量依存性からギボシラン投与との関連が示唆される。しかし、本所見は膵臓の外分泌領域になんらの所見も認めない変化であり、出血、変性又は炎症性の変化も認められないことから、本所見は観察された肝毒性に伴う非有害な二次的変化であることが示唆された。この解釈はラットの QWBA 試験（試験番号[AS1-DSM17-018]、[表 2.6.5.5C]及び[2.6.4.4.3]項「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」参照）において、膵臓に ^{3}H-ギボシランの顕著な分布がみられないことから一層支持される。ラットの膵臓で観察された血管拡張が

種特異的であること、及び二次的変化である特性に基づき、本所見はヒトに対するリスク評価として無視し得る、あるいは関連性はないと判断された。

2.6.6.9.3.4 投与部位及びリンパ節

ラット及びサルのすべての反復投与毒性試験において、ギボシランの投与量がラットで 3 mg/kg/week 以上及びサルで 10 mg/kg/week 以上の皮下投与により、病理組織学的変化として投与部位に混合細胞浸潤及び空胞化マクロファージが観察された。26 週間反復投与毒性試験（試験番号[AS1-GLP15-022]、[表 2.6.7.7-3]参照）において、10 又は 30 mg/kg を投与したラットで投与後 4 及び 24 時間に認められたごく軽度（ドレイズスコアのグレード 1）の発赤の発現頻度が増加したことは別として、この所見は概して局所刺激性評価とは関連がなかった。さらに、サルにギボシランを 10 mg/kg/week 以上の用量で反復投与後に、小型の細胞質空胞及び微細な好塩基性斑点を有する空胞化マクロファージが観察された。リンパ球の増加は認められなかった。これらの変化は有害所見ではなく、むしろ正常な食細胞反応を示すと考えられた。

2.6.6.9.4 ギボシランの遺伝毒性及びがん原性

GLP に適合したギボシランの遺伝毒性試験、すなわち細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号[AS1-NCD14-015]、[表 2.6.7.8-1]参照）、ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験（試験番号[AS1-NCD14-016]、[表 2.6.7.8-2]参照）、及びラット骨髄小核試験（試験番号[AS1-NCD14-017]、[表 2.6.7.9-1]参照）を実施した。遺伝毒性試験では、ICH S2(R1)ガイドラインに示すギボシランの限界用量／濃度まで試験した結果、すべて陰性であった。これらの試験結果から、ギボシランは突然変異誘発能及び染色体異常誘発能をいずれも有さないことが示された。

Tg-rasH2 マウスを用いた 26 週間投与がん原性試験（試験番号[AS1-GLP17-004]、[表 2.6.7.10-3]参照）では、最高 1500 mg/kg/month の投与量までがん原性のエビデンスを示さなかった。Sprague-Dawley ラットを用いた 2 年間投与がん原性試験を現在実施中であり、試験終了後提出する予定である。

2.6.6.9.5 ギボシランの生殖発生毒性

ギボシランを雄ラットに 0、3、10 及び 30 mg/kg の用量で週 1 回皮下投与（試験番号[AS1-GLP15-022]、[表 2.6.7.7-3]参照）、並びに雌ラットの交配前及び交配期間中から器官形成期を通して投与を継続した（試験番号[AS1-GLP16-011]、[表 2.6.7.12-1]参照）結果、評価した雌雄の受胎能エンドポイントに有害な影響は認められなかった。

ラットの用量設定試験（試験番号[AS1-DSM15-041]、[表 2.6.7.11-1]参照）では、ギボシランを 0、10、30 及び 100 mg/kg の用量で交配前（交配前 22、15、8 及び 1 日）に 4 回（週 1 回）皮下投与した。妊娠 6～17 日は 0、1.5、5 及び 16.5 mg/kg/day の用量で連日動物に投与した。臨床で予定する月 1 回の投与頻度とは対照的に、妊娠した雌及び胚・胎児の発生に及ぼす有害作用の評価に十分な曝露量を確保するため連日投与を実施した。ギボシランを 100/16.5 mg/kg（交配前/妊娠 6～17 日）の用量で投与した結果、母動物の死亡及び一過性の体重・摂餌量減少が認められ、この用量は最大耐量を上

回ることが示された。ラットの受胎能及び胚・胎児発生に関する試験（試験番号[AS1-GLP16-011]、[表 2.6.7.12-1]参照）では、雌ラットにギボシランを 0、3、10 又は 30 mg/kg の用量で、交配前（交配前 22、15、8 及び 1 日）に 4 回（週 1 回）皮下投与した。妊娠 6～17 日の間は 0、0.5、1.5 又は 5 mg/kg/day の用量で毎日動物に投与した。ギボシランに関連した母動物に対する影響として、10/1.5 mg/kg 以上で AST、トリグリセリド及びカリウム濃度の上昇、さらに 30/5 mg/kg で ALT、ALP 及びリン濃度の上昇、並びにアルブミン濃度及びアルブミン／グロブリン（A/G）比の低下が認められた。これらの所見に基づき、母動物の無毒性量は 3/0.5 mg/kg と判断された。ギボシラン投与の結果、発情周期、交配、受胎能、胚・胎児生存率又は胎児体重に影響は認められなかった。ギボシランに関連した胎児の奇形はみられなかった。ギボシランに関連する唯一の胎児骨格異常として 30/5 mg/kg で恥骨の骨化不全が認められ、母動物で観察された肝毒性に伴うストレスが関係すると考えられた[5]。ラットの胚・胎児発生に関するギボシランの無毒性量は 30/5 mg/kg であった。当該試験の胚・胎児発生期での投与頻度が連日である一方、臨床で予定する投与頻度は月 1 回であることを考慮する必要がある。以上を考慮して、ラットの投与量をヒト等価用量（HED、mg/kg 単位）に変換して MRHD を 1 日投与量に標準化（28 で除す）すると、胚・胎児発生に関する無毒性量でのギボシランの投与量は MRHD の 9.1 倍に相当する。

ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験（試験番号[AS1-DSM16-012]、[表 2.6.7.11-1]参照）では、ギボシランを 0、3、10 及び 30 mg/kg/day の用量で妊娠 7～19 日まで 1 日 1 回皮下投与した。ラットと同様に、妊娠した雌及び胚・胎児の発生に及ぼす有害作用の評価に十分な曝露量を確保するため、連日投与を実施した。ギボシラン投与の結果、全投与量で母動物の体重／体重増加量減少、及び 10 mg/kg/day 以上で摂餌量減少など、母動物に対する影響が認められた。さらに、全投与量で早期吸収胚数の増加、及びそれと一致した着床後胚損失率の上昇がみられた。ウサギの胚・胎児発生に関する試験（試験番号[AS1-GLP16-018]、[表 2.6.7.13-1]参照）では、ギボシランを 0、0.5、1.5 及び 5 mg/kg/day の用量で妊娠 7～19 日まで 1 日 1 回、又は妊娠 7 日に 20 mg/kg を 1 回皮下投与した。ギボシランに関連した母動物に対する影響として、全投与群で母動物の顕著な平均体重／体重増加量及び摂餌量の減少、並びに 1.5 mg/kg/day 以上で肝臓の肉眼的病理所見が認められた。臨床病理検査でギボシランに関連した母動物に対する影響として、5 mg/kg/day で ALT、AST、フィブリノゲン、血小板数及び網状赤血球数の増加、並びに 0.5 mg/kg/day 以上の反復投与で赤血球数、血色素量及びヘマトクリット値の低下が観察された。これらのデータから、母動物の無毒性量は決定できなかった。5 mg/kg/day 及び 20 mg/kg 投与群で、それぞれ 1 及び 2 例の流産が認められた。ギボシラン投与の結果、1.5 mg/kg/day 以上で着床後胚損失率の上昇、20 mg/kg で低頻度の骨格変異が観察された。ウサギの胚・胎児発生に関するギボシランの無毒性量は 0.5 mg/kg/day であり、これを HED（mg/kg 単位）に変換し、MRHD を 1 日投与量に標準化して比較すると、ウサギの無毒性量は MRHD の 1.8 倍に相当する。肝臓 *Alas1* mRNA 濃度の薬力学的解析では、ギボシランはウサギに薬理学的活性を示さなかった。ウサギで観察された母動物毒性及び顕著な体重減少は、マウス、ラット又はサルで観察された所見と一致せず、これらの所見の臨床的意義は不明である。当該試験で観察された着床後胚損失率の上昇及び骨格変異の増加は、食餌制限ウサギでの顕著な母動物の体重減少に伴って観察された所見と一致する[5,6,7,8]ことから、母動物毒性に伴う間接的影響と解釈される。胎盤及び胎児組織でギボシランが検出されないことから、この結論が一層支持される。

出生後の発生に関する試験（試験番号[AS1-GLP17-009]、[表 2.6.7.14-1]参照）では、妊娠雌ラットにギボシランを最高 30 mg/kg の用量で妊娠 7、13 及び 19 日並びに授乳 6、12 及び 18 日に離乳まで皮下投与した。出生児の成長及び発達に影響はみられなかった。

2.6.6.9.6 その他の毒性試験

ラット及びサルの 13 週間反復投与試験で、改良ドレイズスコア法により試験の最高用量まで局所刺激性を評価した。濃度 200 mg/mL まで局所刺激性所見はみられなかった。

ギボシランは低い免疫原性を有する。ラット及びサルにそれぞれ 26 及び 39 週間、ギボシランを週 1 回投与した血漿で ADA を測定した。ギボシランを投与したサルに低頻度（36 例中 2 例）で、低抗体価の抗ギボシラン抗体が確認された。ギボシランの血漿中曝露量に対する影響はなく、これらの動物で ADA の存在に起因する毒性所見は認められなかった。ギボシランを投与したラットでは、ADA は検出されなかった。ギボシランで実施した反復投与毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo* 免疫刺激試験で所見が認められないことから、ギボシランは免疫刺激作用あるいは免疫毒性作用を有さないと考えられる。

ギボシランの物理・化学的特性及び反復投与毒性試験で動物の行動に関連する所見が認められないことから、ギボシランに依存性の懸念はないことが示された。

代謝物及び不純物の安全性については、ギボシランで実施した包括的な非臨床毒性試験パッケージで十分に検討された。

2.6.6.9.7 ギボシランの安全域

ギボシランのラット及びサルを用いた長期毒性試験の TK データ（AUC 及び C_{max}）を表 2.6.6-6 に示した。非臨床試験で得られた無毒性量における曝露量（AUC 及び C_{max}）と、ギボシランを月 1 回 2.5 mg/kg 投与した発作が再発する急性間欠性ポルフィリン症（AIP）患者における定常状態の血漿中曝露量［ギボシラン（ALN-AS1）の急性間欠性ポルフィリン症（AIP）患者における第 1 相試験、[ALN-AS1-001]試験パート C、ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02452372］との比較に基づいて安全域を算出した。なお、週 1 回投与の動物と月 1 回投与のヒト（AIP 患者）で投与間隔が異なることから、累積の全身及び肝臓曝露量の違いを補うため標準化した AUC 値を基に安全域を算出した。

最小毒性量及び無毒性量に対する安全域に基づき、ギボシランの良好な安全性プロファイルが担保される。

表 2.6.6-6 ラット及びサルの長期毒性試験での全身曝露量に対する、臨床投与量 2.5 mg/kg/month の安全域

試験	投与量 (mg/kg/week)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-t} [f] (μg·h/mL)	曝露量比 臨床投与量 2.5 mg/kg/month		
				C_{max} に対して (μg/mL)	$AUC_{0-t(last)}$ に対して (μg·h/mL) [g]	HED に対して (mg/kg) [h]
				0.321 [e]	**4.130** [e]	**2.5**
ラット（26 週間反復投与）[a, c]	3	0.378	0.803	1.2 倍	0.8 倍	0.8 倍
	10（無毒性量）	**0.849**	**3.69**	**2.6 倍**	**3.6 倍**	**2.6 倍**
	30	5.35	24.5	16.7 倍	23.7 倍	7.7 倍
カニクイザル（39 週間反復投与）[b, d]	10	1.91	6.86	6.0 倍	6.6 倍	5.2 倍
	30（無毒性量）	**5.98**	**28.2**	**18.6 倍**	**27.3 倍**	**15.5 倍**
	100	19.2	187	59.8 倍	181.1 倍	51.6 倍

略号: AUC_{0-t} = 投与開始後 0 時間から投与間隔終了までの血漿中濃度-時間曲線下面積；$AUC_{0-t(last)}$ = 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；HED = ヒト等価用量

a: 試験番号[AS1-GLP15-022]、アルビノラットにおける 26 週間反復投与毒性、受胎能及び（着床までの）初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験

b: 試験番号[AS1-GLP15-018]、幼若カニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験

c: 183 日目、週 1 回投与（27 回投与後）

d: 274 日目、週 1 回投与（40 回投与後）

e: [ALN-AS1-001]試験パート C、84 日目、2.5 mg/kg 月 1 回投与（3 回投与後）

f: 台形法により推定した AUC_{0-t}

g: 非臨床試験の投与頻度週 1 回に 4 を乗ずることにより、投与間隔をヒトの投与頻度月 1 回に調整した AUC 値

h: 標準化（週 1 回投与を月 1 回に変換するため 4 を乗算）した非臨床試験の投与量を用い、FDA ガイダンス”Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers (FDA, July 2005)”に示される、動物種に適切な相対変換係数を乗算して HED を算出した。

2.6.6.9.8 全体的まとめ

ギボシランの臨床適用を担保するため、マウス、ラット、ウサギ及びサルを使用した *in vitro* 及び *in vivo* で包括的なギボシランの非臨床毒性試験パッケージを実施した。ラット及びサルを用いて実施した反復投与毒性試験では、ギボシランに起因する影響に対してラットが最も感受性の高い動物種であり、ラット及びサルの両動物種で肝臓が主要な毒性標的器官であることが明らかとなった。ギボシランは変異原性や染色体異常誘発性を示さず、免疫刺激作用あるいは免疫毒性作用を有さないと考えられる。生殖能、胚・胎児発生及び生後発生に及ぼす影響の評価では、ギボシランの曝露に伴う直接的な影響は認められなかった。

結論として、これまでに実施した非臨床毒性試験の結果は、AHP 患者の治療に推奨する投与レジメン 2.5 mg/kg 月 1 回皮下投与で、ギボシランの臨床投与を担保する良好な安全性プロファイルを示した。

2.6.6.10 図表

図表は本文中に示した。

2.6.6.11 参考文献

1. Kimmel C, Buelke-Sam J. Reproductive and developmental toxicology. In: Bingham E, Cohrssen B, Powell CH, editors. Patty's toxicology, 5th ed vol I. Wiley-Blackwell. 2001. p. 53-115.
2. Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. Toxicol Pathol. 2010;38(7 Suppl): 5S-81S.
3. Frith CH, Botts S, Jokinen MP, Eighmy JJ, Hailey JR, Morgan SJ, et al. Non-proliferative lesions of the endocrine system in rats. E-1. In: Guides for Toxicologic Pathology. Washington DC: Society of Toxicologic Pathology; 2000.
4. Lenz B, Braendli-Baiocco A, Engelhardt J, Fant P, Fischer H, Francke S, et al. Characterizing adversity of lysosomal accumulation in nonclinical toxicity studies: Results from the 5th ESTP international expert workshop. Toxicol Pathol. 2018;46(2):224-46.
5. Danielsson BR. Maternal toxicity. Chapter 24, In: Teratogenicity Testing, Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Barrow PC, editor. Springer; 2013. 947:p. 311-25.
6. Cappon GD, Fleeman TL, Chapin RE, Hurtt ME. Effects of feed restriction during organogenesis on embryo-fetal development in rabbit. Birth Defects Res (Part B). 2005;74(5):424-30.
7. Clark RL, Robertson RT, Peter CP, Bland JA, Nolan TE, Oppenheimer L, et al. Association between adverse maternal and embryo-fetal effects in norfloxacin-treated and food-deprived rabbits. Fundam Appl Toxicol. 1986;7(2):272-86.
8. Matsuzawa T, Nakata M, Goto I, Tsushima M. Dietary deprivation induces fetal loss and abortion in rabbits. Toxicology. 1981;22(3):255-9.

目次

2.6.7 毒性試験概要表 2
2.6.7.1 毒性試験一覧表 2
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表 5
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧 7
2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧 9
2.6.7.5 単回投与毒性試験 11
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 12
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 15
2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験 53
2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験 57
2.6.7.10 がん原性試験 59
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 69
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 71
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 75
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 80
2.6.7.15 新生児を用いた試験 84
2.6.7.16 局所刺激性試験 85
2.6.7.17 その他の毒性試験 86

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験一覧表

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表

Overview					Test Article: Givosiran	
Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg)** [a]	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study Number CTD Location**
Single-Dose Toxicity						
No studies conducted.						
Repeat-Dose Toxicity – Nonpivotal						
Mice, CD-1	SC	4 weeks	0, 30, 100, 300 QW	No	Alnylam	[AS1-NCD14-005] CTD: 4.2.3.2-1
Rats, Sprague Dawley	SC	2 weeks	0, 30, 100, 300 QW	No	Alnylam	[AS1-NCD13-001] CTD: 4.2.3.2-2
Rats, Sprague Dawley	SC	4 weeks	0, 10 [b], 30, 100, 300 QW	No	[redacted]	[AS1-NCD14-001] CTD: 4.2.3.2-3
Cynomolgus monkeys	SC	4 weeks	0, 30, 100, 300 QW	No	[redacted]	[AS1-NCD14-002] CTD: 4.2.3.2-7
Repeat-Dose Toxicity – Pivotal						
Rats, Sprague Dawley	SC	13 weeks	0, 3, 10, 30 QW	Yes	[redacted]	[AS1-NCD14-010] CTD: 4.2.3.2-4
Rats, Sprague Dawley	SC	13 weeks	0, 10, 50, 150 QM [c]	Yes	[redacted]	[AS1-GLP16-022] CTD: 4.2.3.2-5
Rats, Sprague Dawley	SC	26 weeks	0, 3, 10, 30 QW	Yes	[redacted]	[AS1-GLP15-022] CTD: 4.2.3.2-6
Cynomolgus monkeys	SC	13 weeks	0, 15, 50, 150 QW	Yes	[redacted]	[AS1-NCD14-011] CTD: 4.2.3.2-8
Cynomolgus monkeys	SC	39 weeks	0, 10, 30, 100 QW	Yes	[redacted]	[AS1-GLP15-018] CTD: 4.2.3.2-9

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表（続き）

Overview					Test Article: Givosiran	
Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg)[a]**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study Number CTD Location**
Genotoxicity – *In vitro*						
Reverse bacterial mutation assay in *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA1537 and *Escherichia coli* WP2 *uvrA*	*In vitro* (plate incorporation method)	Incubation at 37°C for 66 h and 21 min	With and without S9 metabolic activation: 1.58, 5.0, 15.8, 50, 158, 500, 1581, 5000 µg/plate	Yes	[redacted]	[AS1-NCD14-015] CTD: 4.2.3.3.1-1
Mammalian chromosomal aberration assay in cultured HPBLs	*In vitro*	Cells treated 4 h±S9; 21 h -S9	With and without S9 metabolic activation: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 500 µg/mL	Yes	[redacted]	[AS1-NCD14-016] CTD: 4.2.3.3.1-2
Genotoxicity – *In vivo*						
Bone marrow erythrocyte micronucleus assay in Sprague Dawley rats	SC	Single dose; harvest at 24 h (all doses) or 48 h (2000 mg/kg)	0, 500, 1000, 2000	Yes	[redacted]	[AS1-NCD14-017] CTD: 4.2.3.3.2-1
Carcinogenicity						
Mice, BALB/cBy × C57BL/6 F1	SC	8 weeks	0, 30, 100, 300 QW	No	Alnylam	[AS1-DSM16-003] CTD: 4.2.3.4.2-1
Mice, Tg-rasH2 wild-type	SC	8 weeks	0, 500, 1000, 1500 QM	No	[redacted]	[AS1-GLP17-006] CTD: 4.2.3.4.2-2
Mice, Tg-rasH2	SC	26 weeks	0, 150, 500, 1500 QM	Yes	[redacted]	[AS1-GLP17-004] CTD: 4.2.3.4.2-3
Reproductive and Developmental Toxicity (Nonpivotal Studies)						
Rats, Sprague Dawley	SC	PG: 4 doses; DG: 12 doses	PG: 0, 10, 30, 100 QW; DG: 0, 1.5, 5, 16.5 QD	No	[redacted]	[AS1-DSM15-041] CTD: 4.2.3.5.1-1
Rabbits, New Zealand white	SC	DG 7 – DG 19	0, 3, 10, 30 QD	No	[redacted]	[AS1-DSM16-012] CTD: 4.2.3.5.2-1
Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development (Pivotal)						
Rats, Sprague Dawley	SC	PG: once weekly (4 doses); DG: once daily (12 doses)	PG: 0, 3, 10, 30 QW; DG: 0, 0.5, 1.5, 5 QD	Yes	[redacted]	[AS1-GLP16-011] CTD: 4.2.3.5.1-2

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表（続き）

Overview					Test Article: Givosiran	
Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg)[a]**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study Number CTD Location**
Effects on Embryo-Fetal Development (Pivotal)						
Rabbits, New Zealand white	SC	DG 7 – DG 19; DG 7	0, 0.5, 1.5, 5 QD; 20 (single dose) on DG 7	Yes	[redacted]	[AS1-GLP16-018] CTD: 4.2.3.5.2-2
Effects on Perinatal and Postnatal Development (Pivotal)						
Rats, Sprague Dawley	SC	F_0: DG 7, 13, 19 and LD 6, 12, 18	0, 3, 10, 30 QD (6 doses)	Yes	[redacted]	[AS1-GLP17-009] CTD: 4.2.3.5.3-1
Studies in Juvenile Animals						
No dedicated studies conducted.						
Local Tolerance						
No dedicated studies conducted.						
Other Toxicity Studies						
Immunotoxicity						
Human whole blood	*In vitro*	Incubation for 20 to 24 hours	300 nmol/L	No	Alnylam	[BIO14026] CTD: 4.2.3.7.2-2
Mice, CD-1 (Male)	SC	Single dose	0, 30, 100	No	Alnylam	[AS1-NCD14-013] CTD: 4.2.3.7.2-1

Abbreviations: Alnylam = Alnylam Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, MA); [redacted] Canada); DG = day of presumed gestation; F_0 = familial 0 (parent) generation; GLP = Good Laboratory Practice; HPBL = human peripheral blood lymphocyte; LD = day(s) of lactation; NOAEL = no observed adverse effect level; PG = day(s) before presumed gestation; SC = subcutaneous; QD = once daily; QM = once monthly; QW = once weekly; TK = toxicokinetic.

a: Unless otherwise specified, the underlined dose represents the NOAEL.

b: This dose group comprised TK animals only (no main study animals).

c: In this study, the NOAEL was deemed to be 50 mg/kg/month for females and 150 mg/kg/month for males.

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2-1 トキシコキネティクス試験の一覧表

Overview of Toxicokinetics Studies				**Test Article:** Givosiran	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)**	**GLP Compliance**	**Study Number CTD Location**
Repeat-Dose Toxicity	Mouse	SC (4 weeks)	0, 30, 100, 300 QW	No	[AS1-NCD14-005] CTD: 4.2.3.2-1
	Rat	SC (4 weeks)	0, 10 [a], 30, 100, 300 QW	No	[AS1-NCD14-001] CTD: 4.2.3.2-3
	Rat	SC (13 weeks)	0, 3, 10, 30 QW	Yes	[AS1-NCD14-010] CTD: 4.2.3.2-4
	Rat	SC (13 weeks)	0, 10, 50, 150 QM	Yes	[AS1-GLP16-022] CTD: 4.2.3.2-5
	Rat	SC (26 weeks)	0, 3, 10, 30 QW	Yes	[AS1-GLP15-022] CTD: 4.2.3.2-6
	Monkey	SC (4 weeks)	0, 30, 100, 300 QW	No	[AS1-NCD14-002] CTD: 4.2.3.2-7
	Monkey	SC (13 weeks)	0, 15, 50, 150 QW	Yes	[AS1-NCD14-011] CTD: 4.2.3.2-8
	Monkey	SC (39 weeks)	0, 10, 30, 100 QW	Yes	[AS1-GLP15-018] CTD: 4.2.3.2-9
Genotoxicity (Rat Micronucleus)	Rat	SC	0, 500, 1000, and 2000 mg/kg	Yes	[AS1-NCD14-017] CTD: 4.2.3.3.2-1
Carcinogenicity	Mouse	SC (8 weeks)	0, 30, 100, 300 [b] QW	No	[AS1-DSM16-003] CTD: 4.2.3.4.2-1
	Mouse	SC (8 weeks)	0, 500, 1000, 1500 QM	No	[AS1-GLP17-006] CTD: 4.2.3.4.2-2
	Mouse	SC (26 weeks)	0, 150, 500, 1500 QM	Yes	[AS1-GLP17-004] CTD: 4.2.3.4.2-3

表 2.6.7.2-1 トキシコキネティクス試験の一覧表（続き）

Overview of Toxicokinetics Studies				**Test Article:** Givosiran	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)**	**GLP Compliance**	**Study Number CTD Location**
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat	SC; PG: 4 doses; DG: 12 doses	PG: 0, 10, 30, 100 QW; DG: 0, 1.5, 5, 16.5 QD	No	[AS1-DSM15-041] CTD: 4.2.3.5.1-1
	Rat	SC; PG: once weekly (4 doses); DG: once daily (12 doses)	PG: 0, 3, 10, 30 QW; DG: 0, 0.5, 1.5, 5[c] QD	Yes	[AS1-GLP16-011] CTD: 4.2.3.5.1-2
	Rabbit	SC; DG 7 – DG 19	0, 3, 10, 30 QD	No	[AS1-DSM16-012] CTD: 4.2.3.5.2-1
	Rabbit	SC; DG 7 – DG 19 DG 7	0, 0.5, 1.5, 5 QD; 20 (single dose)	Yes	[AS1-GLP16-018] CTD: 4.2.3.5.2-2

Abbreviations: DG = day(s) after presumed gestation; GLP= Good Laboratory Practice; PG = day(s) before presumed gestation; QD = once daily; QM = once monthly; QW = once weekly; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetic.

a: This group comprised TK animals only.

b: Toxicokinetic analysis was only conducted for the 30- and 100-mg/kg dose levels.

c: Toxicokinetic analysis was only performed at the DG dose level of 5 mg/kg.

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧

Mean Plasma C_{max} (µg/mL) and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)								
Dose (mg/kg)	**Mouse**		**Rat**		**Rabbit**		**Monkey**	
	C_{max}	**$AUC_{0\text{-}t(last)}$**	**C_{max}**	**$AUC_{0\text{-}t(last)}$**	**C_{max}**	**$AUC_{0\text{-}t(last)}$**	**C_{max}**	**$AUC_{0\text{-}t(last)}$**
0.5	-	-	-	-	-	-	-	-
1.5	-	-	0.0587 [a]	0.306 [a]	0.0940 [b]	-	-	-
3	-	-	0.489 [c] 0.378 [d]	0.794 [c] 0.803 [d]	0.207 [e] 0.172 [e]	1.03 [e] 0.864 [e]	-	-
5	-	-	0.340 [f]	1.64 [f]	0.443 [b]	2.20 [b]	-	-
10	-	-	1.24 [c] 0.849 [d] 1.40 [g] 0.711 [h]	3.72 [c] 3.69 [d] 7.36 [g] 2.83 [h]	0.791 [e] 0.515 [e]	4.04 [e] 3.42 [e]	1.91 [i]	6.86 [i]
15	-	-	-	-	-	-	3.75 [j]	16.3 [j]
20	-	-	-	-	-	-	-	-
30	48.0 [k] 7.58 [l]	79.9 [k]	6.31 [c] 0.183 [a] 5.35 [d] 8.87 [g]	25.3 [c] 1.460 [a] 24.5 [d] 36.4 [g]	4.85 [e] 4.52 [e]	27.4 [e] 29.6 [e]	5.98 [i] 6.37 [m]	28.2 [i] 39.0 [m]
50	-	-	8.56 [h]	52.3 [h]	-	-	8.06 [j]	72.5 [j]
100	227 [i] 28.7 [j]	339 [i] 69.0 [j]	0.770 [a] 39.8 [g]	10.003 [a] 320 [g]	-	-	19.2 [i] 27.3 [m]	187 [i] 273 [m]
150	45.4 [n]	110 [n]	30.4 [h]	295 [h]	-	-	24.2 [j]	292 [j]
300	462 [i]	1331 [i]	119 [g]	1134 [g]	-	-	98.7 [m]	904 [m]
500	155 [o] 117 [n]	594 [o] 383 [n]	103 [p]	522 [p]	-	-	-	-
1000	231 [o]	1110 [o]	169 [p]	1740 [p]	-	-	-	-

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧（続き）

Mean Plasma C_{max} (µg/mL) and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)								
Dose (mg/kg)	**Mouse**		**Rat**		**Rabbit**		**Monkey**	
	C_{max}	**$AUC_{0\text{-}t(last)}$**	**C_{max}**	**$AUC_{0\text{-}t(last)}$**	**C_{max}**	**$AUC_{0\text{-}t(last)}$**	**C_{max}**	**$AUC_{0\text{-}t(last)}$**
1500	311 [o] 242 [n]	1800 [o] 1420 [n]	-	-	-	-	-	-
2000	-	-	275 [p]	3490 [p]	-	-	-	-

Abbreviations: AUC = area under the concentration-time curve; $AUC_{0\text{-}24}$ = area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose;
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ = area under the concentration-time curve from time 0 to the last quantifiable time point; C_{max} = maximum observed concentration; DG = day of presumed gestation.

a: Data represent DG 6 through DG 17 mean C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values from pregnant Sprague Dawley Rats ([AS1-DSM15-041]).

b: Data represent DG 19 mean C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values from pregnant New Zealand white rabbits in the embryo-fetal development study ([AS1-GLP16-018]); $AUC_{0\text{-}t(last)}$ could not be calculated at the 1.5-mg/kg dose level.

c: Values represent Day 92 overall (combined male and female) C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values from Sprague Dawley rats in Study [AS1-NCD14-010].

d: Data represent Day 183 overall (combined male and female) C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values from Sprague Dawley rats in Study [AS1-GLP15-022].

e: Data represent DG 19 mean C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values from pregnant New Zealand white rabbits in the dose range-finding embryo-fetal development study ([AS1-DSM16-012]).

f: Values represent DG 17 mean C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values from pregnant Sprague Dawley rats in the fertility and embryo-fetal development study ([AS1-GLP16-011]).

g: Data represent Day 29 mean C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values from male Sprague Dawley rats in Study [AS1-NCD14-001].

h: Data represent Day 85 overall (combined male and female) C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values from Sprague Dawley rats in Study [AS1-GLP16-022].

i: Data represent Day 274 overall (combined male and female) C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values from cynomolgus monkeys in Study [AS1-GLP15-018].

j: Values represent Day 92 overall (combined male and female) C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values from cynomolgus monkeys in Study [AS1-NCD14-011].

k: Data represent Day 29 mean C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values from male CD-1 mice in Study [AS1-NCD14-005].

l: Data represent Day 50 mean C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ t values in male inbred hybrid mice (BALB/cBy × C57BL/6 F1) from Study [AS1-DSM16-003]; there was insufficient data to calculate $AUC_{0\text{-}t(last)}$ in the 30-mg/kg group.

m: Data represent Day 29 mean C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values from male cynomolgus monkeys in Study [AS1-NCD14-002].

n: Data represent Day 169 overall (combined male and female) C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ from Tg-rasH2 mice in Study [AS1-GLP17-004].

o: Data represent Day 57 overall (combined male and female) C_{max} and $AUC_{0\text{-}24}$ values from wild-type Tg-rasH2 mice in Study [AS1-GLP17-006].

p: Values represent Day 1 mean C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ values in male Sprague Dawley rats after a single dose in the genotoxicity (bone marrow micronucleus) study ([AS1-NCD14-017]).

2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧

表 2.6.7.4-1 被験物質一覧

Drug Substance					Test Article: Givosiran
Batch/Lot Number	Analytical Method	Purity (%)	Specified Impurities[a] (%)	Study Number	Type of Study
[redacted][b]	NA	NA	N/A	[BIO14026]	*In vitro* immunostimulation in human whole blood
[redacted]	[redacted] 方法A* HPLC	94	N/A	[AS1-NCD13-001]	2-week exploratory repeat-dose toxicity study in male rats
[redacted]	[redacted] 方法A* HPLC	99.4	N/A	[AS1-NCD14-005]	4-week repeat-dose toxicity study in CD-1 mice
				[AS1-NCD14-001]	4-week repeat-dose toxicity study in rats
				[AS1-NCD14-002]	4-week repeat-dose toxicity study in male monkeys
[redacted]	[redacted] 方法A* HPLC	99.4	N/A	[AS1-NCD14-010]	13-week repeat-dose toxicity in rats with recovery (GLP)
				[AS1-NCD14-011]	13-week repeat-dose toxicity in cynomolgus monkeys with recovery (GLP)
				[AS1-NCD14-013]	Exploratory immunostimulation in male CD-1 mice
				[AS1-NCD14-015]	Bacterial reverse mutation test in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (GLP)
				[AS1-NCD14-016]	Mammalian chromosomal aberration (GLP)
				[AS1-NCD14-017]	Mammalian erythrocyte micronucleus test in rat bone marrow (GLP)
[redacted]	[redacted] LC-UV	99.2	N/A	[AS1-GLP16-022]	13-week repeat-dose toxicity in rats (GLP)
				[AS1-DSM15-041]	Dose-range finding fertility and embryo-fetal development toxicity study in rats
				[AS1-DSM16-012]	Dose-range finding repeat-dose embryo-fetal development toxicity study in rabbits
				[AS1-GLP16-018]	Repeat-dose embryo-fetal development in rabbits (GLP)

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7.4-1 被験物質一覧（続き）

Drug Substance					**Test Article**: Givosiran
Batch/Lot Number	**Analytical Method**	**Purity (%)**	**Specified Impurities (%)**	**Study Number**	**Type of Study**
[redacted]	[redacted] LC-UV	99.0	N/A	[AS1-GLP15-018]	39-week repeat-dose toxicity in cynomolgus monkeys with recovery (GLP)
				[AS1-GLP15-022]	26-week repeat-dose toxicity, fertility and early embryonic development in rats with recovery (GLP)
				[AS1-DSM16-003]	8-week exploratory repeat-dose carcinogenicity study in inbred hybrid mice
				[AS1-GLP17-006]	8-week exploratory repeat-dose carcinogenicity study in Tg-rasH2 wild-type mice
				[AS1-GLP16-011]	Repeat-dose fertility and embryo-fetal development in rats (GLP)
				[AS1-GLP17-009]	Repeat-dose developmental and prenatal and postnatal development in rats (GLP)
[redacted]	[redacted] 方法A* HPLC	99.2	0.5%	[AS1-GLP17-004]	26-week subcutaneous injection carcinogenicity study in Tg-rasH2 mice

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; 方法A* HPLC = [redacted] high-performance liquid chromatography; LC-UV = liquid chromatography/ultraviolet; N/A = not applicable.

a: No specified impurity identified.

b: A Certificate of Testing for this lot was not available at the time the study was reported.

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.7.5 単回投与毒性試験

ギボシランの単回投与毒性試験は実施しなかった。試験番号[AS1-NCD14-010]、表 2.6.7.7-1 参照。

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Nonpivotal Studies						**Test Article:** Givosiran
Species/Strain	**Method of Administration (Vehicle)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Sex/No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Mice, CD-1	SC (Vehicle/Control 0.9% NaCl)	4 weeks	0, 30, 100, 300 QW	10M/10F (36 M/TK group)	**≥100 mg/kg:** minimal to slight hepatocellular hypertrophy that occasionally included a few foci of mixed inflammatory cells **TK on Day 29 at 30, 100, 300 mg/kg QW, respectively:** Plasma T_{max} = 0.5, 0.5, 1.0 h C_{max} = 48.0, 227, 462 µg/mL $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 79.9, 339, 1331 µg·h/mL $t_{1/2}$ = 0.69, 0.75, 0.54 h Liver T_{max} = 8.0, 24.0, 24.0 h C_{max} = 202, 285, 595 µg/g $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 15,879; 33,394; 64,800 µg·h/g $t_{1/2}$ = 37.0, 43.2, 61.0 h Kidney T_{max} = 2.0, 0.5, 1.0 h C_{max} = 18.8, 143, 1039 µg/g $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 1402; 9658; 39,126 µg·h/g $t_{1/2}$ = 125, NR, 347 h	[AS1-NCD14-005]
Rats, Sprague Dawley	SC (Vehicle/Control 0.9% NaCl)	2 weeks	0, 30, 100, 300 QW	5M test article group; 6M control group	**300 mg/kg:** ↓ CYP3A activity (0.3× control) **≥100 mg/kg:** ↑ ALP; minor ↑ kidney weights; -mild ↓ fibrinogen; basophilic pigment in renal tubules **≥30 mg/kg:** slight mononuclear cell infiltration, last injection site No dose-limiting toxicities were identified with givosiran at ≤ 300 mg/kg (the highest dose tested).	[AS1-NCD13-001]

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Nonpivotal Studies						**Test Article:** Givosiran
Species/Strain	**Method of Administration (Vehicle)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Sex/No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rats, Sprague Dawley	SC (Vehicle/Control 0.9% NaCl)	4 weeks	0, 30, 100, 300 QW; 10 [a] (TK group)	5M/5F 3 control and 20 per dose group for TK (all males)	**300 mg/kg:** slight ↓ platelets (F only); mild ↓ adrenal weights and ↑ kidney weights (M) **≥100 mg/kg:** ↑ total, direct, and indirect bilirubin (F); mild ↑ kidney weights (F); minimal to mild Kupffer cell pigmentation (M/F); minimal hepatocyte karyomegaly (F); minimal to moderate bile duct hyperplasia (F); minimal to mild kidney tubule vacuolation (M/F); moderate ↓CYP2D (M; not of sufficient magnitude to be considered biologically significant). **≥30 mg/kg:** slight to mild ↑ AST and ALP; ↑ total and direct bilirubin (M); pale liver; mild ↓ adrenal gland weights (F); minimal to marked hepatocellular vacuolation; dose dependent; minimal to mild single-cell necrosis/increased mitosis; minimal to mild macrophage infiltration at injection site; minimal to mild pigmentation, kidney tubule epithelium; mild to moderate ↓ CYP1A, CYP2B, and CYP3A activity (M/F; not of sufficient magnitude to be considered biologically significant); no changes in CYP2E activity. **TK on Day 29 at 10, 30, 100, 300 mg/kg QW, respectively:** <u>Plasma</u> T_{max} = 0.5, 1.0, 1.0, 0.5 h C_{max} = 1.40, 8.78, 39.8, 119 µg/mL $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 7.36, 36.4, 320, 1134 µg·h/mL $t_{1/2}$ = 1.58, 1.73, 4.01, 2.54 h <u>Liver</u> T_{max} = 24, 24, 24, 24 h C_{max} = 93.9, 362, 597, 1553 µg/g $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 8752; 37,014; 77,117; 211,075 µg·h/g $t_{1/2}$ = 66.3, 70.3, 73.8, 107 h <u>Kidney</u> T_{max} = 24, 24, 24, 24 h C_{max} = 14.7, 72.5, 443, 1082 µg/g $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 2837; 11,100; 58,959; 248,196 µg·h/g $t_{1/2}$= 204, 162, 81.9 h, NR	[AS1-NCD14-001]

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Nonpivotal Studies						**Test Article:** Givosiran
Species/Strain	**Method of Administration (Vehicle)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Sex/No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Cynomolgus monkeys	SC (Vehicle/Control 0.9% NaCl)	4 weeks	0, 30, 100, 300 QW	3M	**300 mg/kg:** slight ↓ in RBC, hemoglobin, and hematocrit **≥100 mg/kg** mild ↑ ALP; Kupffer cell hypertrophy and pigmentation in the liver; macrophage vacuolation in the lymph nodes (mandibular, mesenteric, and tracheobronchial); macrophage vacuolation and mononuclear cell infiltration at the injection site **≥30 mg/kg:** on target ↓ (~55%) in liver and serum *ALAS1* mRNA; on target ↓ (~40%) in circulating exosome *ALAS1* mRNA ***Ex vivo* evaluation of CYP1A, 2B, 3A, 2D, and 2E activity in microsomes:** No decrease in CYP1A, 2B, 2D, 2E, or 3A activity; statistically significant ↑ CYP2E activity at ≥100 mg/kg (within 3-fold of control and not considered biologically significant) **TK on Day 29 at 30, 100, 300 mg/kg QW, respectively:** Plasma T_{max} = 1, 2, 1.67 h C_{max} = 6.37, 27.3, 98.7 µg/mL $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 39.0, 273, 904 µg·h/mL $t_{1/2}$ = 4.05, 4.46, 4.81 h Mean liver concentration 1942.8, 3504.0, 5698.8 µg/g Mean kidney concentration 25.3, 139.6, 241.8 µg/g	[AS1-NCD14-002]

Abbreviations: *ALAS1* = 5'-aminolevulinate synthase 1; ALP = alkaline phosphatase; AST = aspartate aminotransferase; $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 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}; CYP = cytochrome P450; F = female; M = male; mRNA = messenger RNA; MTD = maximum tolerated dose; NOAEL = no observed adverse effect level; NR = not reportable; QW = once weekly; RBC = red blood cells; SC = subcutaneous; $t_{1/2}$ = elimination half-life; TK = toxicokinetics; T_{max} = time to reach maximal concentration.

Note: The MTD or NOAEL was not established for these studies as they were dose range-finding studies with limited histopathology.

a: This dose group comprised TK animals only (no main study animals).

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

表 2.6.7.7-1 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period									**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley			**Duration of Dosing:** 13 weeks						**Study No:** [AS1-NCD14-010] **CTD Location:** 4.2.3.2-4			
Initial Age: 8–10 weeks			**Duration of Postdose:** 13 weeks						**GLP Compliance:** Yes			
Date of First Dose: 09 June 2014			**Method of Administration:** SC injection									
Special Features: None			**Vehicle/Formulation:** 0.9% NaCl for Injection, USP									
No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg												
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**		**0 (Control)** [a]		**100** [a]	
Number of Animals:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Main	10	10	10	10	10	10	10	10	5	5	10	10
Recovery	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-	-
Toxicokinetics	3	3	36	36	36	36	36	36	-	-	26	26
Plasma Toxicokinetics [b]												
T_{max} (h)												
Day 1	NA		0.5		0.5		1.0		NA		1.0	
Day 92	NA		1.0		1.0		1.0		NA		NA	
C_{max} (µg/mL)												
Day 1	NA		0.330		0.913		5.79		NA		19.7	
Day 92	NA		0.489		1.24		6.31		NA		NA	
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)												
Day 1	NA		0.681		1.97		11.9		NA		82.6	
Day 92	NA		0.794		3.72		25.2		NA		NA	
$t_{1/2}$ (h)												
Day 1	NA		1.1		1.4		NC		NA		1.4	
Day 92	NA		NC		2.9		2.8		NA		NA	

表 2.6.7.7-1 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period									**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley			**Duration of Dosing:** 13 weeks						**Study No:** [AS1-NCD14-010] **CTD Location:** 4.2.3.2-4			
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**		**0 (Control)** [a]		**100** [a]	
	M	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Tissue Exposure: Liver (Day 92)												
Time (h)	Givosiran (μg/g)											
0.25	NA	NA	2.75	1.13	6.58	7.89	194	154	NA	NA	NA	NA
2	NA	NA	42.3	49.8	177	164	169	222	NA	NA	NA	NA
4	NA	NA	64.6	79.6	179	157	297	416	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	60.6	47.3	228	224	237	117	NA	NA	NA	NA
24	NA	NA	39.7	22.3	242	189	71.3	47.3	NA	NA	NA	NA
168	NA	NA	0.933	0.198	3.45	2.76	23.6	61.6	NA	NA	NA	NA
336	NA	NA	BLQ	BLQ	2.50	2.50	10.1	14.5	NA	NA	NA	NA
504	NA	NA	BLQ	BLQ	2.33	3.69	3.65	5.34	NA	NA	NA	NA
672	NA	NA	BLQ	BLQ	2.13	3.51	2.86	3.97	NA	NA	NA	NA
1008	NA	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1.87	2.09	NA	NA	NA	NA
1344	NA	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NA	NA	NA	NA

表 2.6.7.7-1 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period									**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley			**Duration of Dosing:** 13 weeks						**Study No:** [AS1-NCD14-010] **CTD Location:** 4.2.3.2-4			
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**		**0 (Control)** [a]		**100** [a]	
	M	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Tissue Exposure: Kidney (Day 92)												
Time (h)	Givosiran (μg/g)											
0.25	NA	NA	19.2	12.1	21.8	20.3	27.3	20.2	NA	NA	NA	NA
2	NA	NA	19.0	19.7	21.4	20.2	79.9	97.7	NA	NA	NA	NA
4	NA	NA	17.0	19.7	27.0	20.7	131	122	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	19.2	19.8	25.2	23.5	108	86.2	NA	NA	NA	NA
24	NA	NA	17.8	13.1	23.8	22.6	106	117	NA	NA	NA	NA
168	NA	NA	13.9	12.8	19.7	17.2	77.8	58.0	NA	NA	NA	NA
336	NA	NA	8.18	5.29	15.5	11.9	78.8	75.3	NA	NA	NA	NA
504	NA	NA	6.75	6.39	16.5	13.3	10.9	14.5	NA	NA	NA	NA
672	NA	NA	4.85	3.13	5.32	13.8	9.58	10.5	NA	NA	NA	NA
1008	NA	NA	1.25	0.853	4.98	14.5	3.92	4.58	NA	NA	NA	NA
1344	NA	NA	BLQ	0.882	3.66	1.67	4.16	4.48	NA	NA	NA	NA
Noteworthy Findings:												
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weights	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7.7-1 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period									**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley			**Duration of Dosing:** 13 weeks						**Study No:** [AS1-NCD14-010] **CTD Location:** 4.2.3.2-4			
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**		**0 (Control)** [a]		**100** [a]	
	M	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Local Irritation Assessment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology												
Platelet count (10^3/μL)												
Day 45	-	1066	-	-	-	-	923*	930*	NA	NA	NA	NA
Day 93	-	1132	-	-	-	-	-	859***	NA	NA	NA	NA
Clinical Chemistry [c]												
Alkaline Phosphatase (U/L)												
Day 45	134	74	-	-	-	101**	189**	131***	NA	NA	NA	NA
Day 93	75	36	-	-	-	53*	95*	73***	NA	NA	NA	NA
Aspartate Aminotransferase (U/L)												
Day 45	106	123	-	-	-	-	125**	157**	NA	NA	NA	NA
Day 93	-	105	-	-	-	-	-	151	NA	NA	NA	NA
Total Bilirubin (mg/dL)												
Day 45	0.11	-	-	-	-	-	0.14***	-	NA	NA	NA	NA
Day 93	0.10	-	-	-	0.08*	-	0.12*	-	NA	NA	NA	NA
Direct Bilirubin (mg/dL)												
Day 45 (mean value)	0.00	-	-	-	-	-	0.06***	-	NA	NA	NA	NA
Day 93	0.02	-	-	-	-	-	0.05**	-	NA	NA	NA	NA
Albumin (g/dL)												
Day 93	3.9	4.7	-	-	-	-	4.1*	4.1***	NA	NA	NA	NA
Albumin/Globulin Ratio												
Day 93	-	2.5	-	-	-	2.2**	-	2.0***	NA	NA	NA	NA

表 2.6.7.7-1 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period									**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley			**Duration of Dosing:** 13 weeks						**Study No:** [AS1-NCD14-010] **CTD Location:** 4.2.3.2-4			
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**		**0 (Control)** [a]		**100** [a]	
	M	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Gross Pathology – Main (Day 93) - Incidence												
Liver Discoloration; pale	0	0	1	0	3	4	5	8	NA	NA	NA	NA
Injection site Focus; dark	3	2	2	2	3	5	7	4	NA	NA	NA	NA
Organ Weights (Day 93) [c]												
Adrenal gland (g)												
Absolute value	0.07	0.07	-13.2	-2.04	-6.87	-12.9	-19.9**	-14.4	NA	NA	NA	NA
% of body weight	0.01	0.02	-13.1	-2.53	-6.05	-15.0	-19.6*	-11.1	NA	NA	NA	NA
% of brain weight	2.95	3.47	-10.5	-3.03	-5.00	-11.6	-17.8*	-13.5	NA	NA	NA	NA
Kidney (g)												
Absolute value	3.58	2.00	-2.52	+9.38	+2.24	+6.49	+3.50	+15.0	NA	NA	NA	NA
% of body weight	0.55	0.56	-3.36	+9.34	+2.71	+3.48	+2.87	+19.9*	NA	NA	NA	NA
% of brain weight	152	94.7	-0.23	+7.97	+3.64	+7.90	+5.81	+16.0	NA	NA	NA	NA
Liver (g)												
Absolute value	15.3	8.06	-3.99	+3.61	-11.8	+0.88	-22.4***	-2.92	NA	NA	NA	NA
% of body weight	2.35	2.23	-4.61	+3.86	-11.4***	-1.23	-23.2***	+1.36	NA	NA	NA	NA
% of brain weight	650	381	-1.76	+2.06	-10.7	+2.04	-20.7**	-2.24	NA	NA	NA	NA

表 2.6.7.7-1 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period									**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley			**Duration of Dosing:** 13 weeks						**Study No:** [AS1-NCD14-010] **CTD Location:** 4.2.3.2-4			
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**		**0 (Control)** [a]		**100** [a]	
	M	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Histopathology – Day 8												
Adrenal gland												
Vacuolation; cortical												
Minimal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0	2	0
Mild	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	1	0
Liver												
Vacuolation; hepatocellular												
Minimal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	3	5
Mild	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	2	2
Single-cell necrosis												
Minimal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	2
Injection Site												
Vacuolation; macrophage												
Minimal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	5	9
Mild	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	3	0
Histopathology – Day 93												
Adrenal gland												
Vacuolation; cortical												
Minimal	6	0	6	0	6	1	5	3	NA	NA	NA	NA
Mild	0	0	1	0	4	0	4	1	NA	NA	NA	NA
Kidney												
Basophilic granules; tubular												
Minimal	0	0	0	0	0	0	7	8	NA	NA	NA	NA
Mild	0	0	0	0	0	0	2	0	NA	NA	NA	NA

表 2.6.7.7-1 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period									**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley			**Duration of Dosing:** 13 weeks						**Study No:** [AS1-NCD14-010] **CTD Location:** 4.2.3.2-4			
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**		**0 (Control)** [a]		**100** [a]	
	M	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Liver												
Vacuolation; hepatocellular												
Minimal	3	0	5	6	4	3	0	0	NA	NA	NA	NA
Mild	0	0	1	2	5	3	6	2	NA	NA	NA	NA
Moderate	0	0	0	0	1	4	4	2	NA	NA	NA	NA
Marked	0	0	0	0	0	0	0	6	NA	NA	NA	NA
Single-cell necrosis												
Minimal	0	0	0	0	2	4	6	3	NA	NA	NA	NA
Mild	0	0	0	0	0	0	4	7	NA	NA	NA	NA
Increased mitoses												
Minimal	0	0	0	0	1	4	5	8	NA	NA	NA	NA
Mild	0	0	0	0	0	0	3	1	NA	NA	NA	NA
Pigmentation; Kupffer cell												
Minimal	0	0	0	0	2	0	5	6	NA	NA	NA	NA
Mild	0	0	0	0	0	0	5	3	NA	NA	NA	NA
Injection site												
Hemorrhage												
Minimal	4	1	2	2	1	0	4	4	NA	NA	NA	NA
Mild	0	0	1	1	2	2	2	0	NA	NA	NA	NA
Moderate	0	1	0	0	0	2	1	2	NA	NA	NA	NA
Infiltration; mixed cell												
Minimal	6	7	10	8	8	7	7	8	NA	NA	NA	NA
Mild	0	0	0	1	1	0	3	1	NA	NA	NA	NA
Vacuolation; macrophage												
Minimal	0	0	7	8	9	5	6	8	NA	NA	NA	NA
Mild	0	0	0	0	1	0	4	1	NA	NA	NA	NA

表 2.6.7.7-1 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period									**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley			**Duration of Dosing:** 13 weeks						**Study No:** [AS1-NCD14-010] **CTD Location:** 4.2.3.2-4			
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**		**0 (Control)** [a]		**100** [a]	
Postdose Evaluation: Number Evaluated	**M** 5	**F** 5	**M** 5	**F** 5	**M** 5	**F** 5	**M** 5	**F** 5	**NA**	**NA**	**NA**	**NA**
Liver												
Vacuolation; hepatocellular												
Minimal	2	0	2	0	3	0	2	2	NA	NA	NA	NA
Mild	0	0	0	0	1	1	3	2	NA	NA	NA	NA
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	NA	NA	NA	NA
Focus of cellular alteration; eosinophilic												
Minimal	0	0	0	0	2	1	2	0	NA	NA	NA	NA
Mild	0	0	0	0	0	0	1	1	NA	NA	NA	NA
Increased binucleated hepatocytes												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	3	NA	NA	NA	NA
Karyomegaly												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2	NA	NA	NA	NA

Abbreviations: - = no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BLQ = below the lower limit of quantitation; C_{max} = maximum observed concentration occurring at T_{max}; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NA = not applicable; NC = not calculated; SC = subcutaneous; $t_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to reach maximal concentration; TK = toxicokinetic.

Note: Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). Significantly different from control group (Group 1) value: * = p≤0.05, ** = p≤0.01, *** = p≤0.001 (Dunn or Dunnett).

a: Single-dose administration of givosiran.

b: TK values were calculated using overall (male + female) means.

c: Group mean % difference from mean control value.

表 2.6.7.7-2 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性試験

Report Title: A 13-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity Study in Sprague Dawley Rats		**Test Article:** Givosiran
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** 13 weeks	**Study No:** [AS1-GLP16-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-5
Initial Age: 10-11 weeks	**Duration of Postdose:** Not applicable	**GLP Compliance:** Yes (with the exception of tissue bioanalysis and interpretation)
Date of First Dose: 14 Dec 2016	**Method of Administration:** SC injection, QM	
Special Features: None	**Vehicle/Formulation:** 0.9% NaCl for Injection, USP	

No Observed Adverse Effect Level: 150 mg/kg/month (males); 50 mg/kg/month (females)

Monthly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**50**		**150**	
Number of Animals: **Main** **Toxicokinetics**	**10 M** **0 M**	**10 F** **0 F**	**10 M** **27 M**	**10 F** **27 F**	**10 M** **27 M**	**10 F** **27 F**	**10 M** **27 M**	**10 F** **27 F**
Toxicokinetics – Plasma								
T_{max} (h)								
Day 1	NA	NA	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Day 85	NA	NA	1.0	1.0	2.0	2.0	0.5	1.0
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	NA	NA	1.00	1.27	12.8	11.8	42.6	49.9
Day 85	NA	NA	0.609	0.779	9.87	7.25	30.5	36.0
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)								
Day 1	NA	NA	2.85	2.69	46.2	34.8	232	158
Day 85	NA	NA	3.11	1.78	69.3	35.3	346	244
$t_{1/2}$ (h)								
Day 1	NA	NA	NC	NC	1.1	1.1	2.9	1.1
Day 85	NA	NA	2.7	NC	4.1	NC	70.2	NC
Toxicokinetics – Liver (Day 85)								
T_{max} (h)	NA	NA	8	8	24	24	24	24
$AUC_{0\text{-}24}$ (µg·h/g)	NA	NA	5796	5852	19,513	26,860	53,986	65,109
C_{max} (µg/g)	NA	NA	296	299	937	1314	3874	3992
$t_{1/2}$ (h)	NA	NA	32.3	24.7	NC	NC	NC	NC

表 2.6.7.7-2 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity Study in Sprague Dawley Rats							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley		**Duration of Dosing:** 13 weeks					**Study No:** [AS1-GLP16-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-5	
Monthly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**50**		**150**	
Number of Animals: **Main** **Toxicokinetics**	**10 M** **0 M**	**10 F** **0 F**	**10 M** **27 M**	**10 F** **27 F**	**10 M** **27 M**	**10 F** **27 F**	**10 M** **27 M**	**10 F** **27 F**
Toxicokinetics – Kidney (Day 85)								
T_{max} (h)	NA	NA	24	24	8	8	24	8
AUC_{0-24} (µg·h/g)	NA	NA	558	487	7872	6348	26,137	24,141
C_{max} (µg/g)	NA	NA	27.8	21.9	401	303	1319	1213
$t_{1/2}$ (h)	NA	NA	NC	NC	119	161	NC	325
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund [a]	0	0	1	0	0	0	1	0
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Local Irritation Assessment	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology (Day 92)								
Platelet count (10^3/µL)	-	1046.9	-	1000.1	-	946.6	-	703.0***
Reticulocyte count (10^9/L)	-	160.03	-	156.25	-	142.97	-	75.68***
White blood cell count (10^3/µL)	-	4.468	-	5.745	-	4.092	-	6.366*
Neutrophil count (10^3/µL)	-	0.647	-	0.697	-	0.491	-	0.943
Monocyte count (10^3/µL)	-	0.113	-	0.186	-	0.136	-	0.273**

表 2.6.7.7-2 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity Study in Sprague Dawley Rats							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley		**Duration of Dosing:** 13 weeks					**Study No:** [AS1-GLP16-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-5	
Monthly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**50**		**150**	
Number of Animals: **Main** **Toxicokinetics**	**10 M** **0 M**	**10 F** **0 F**	**10 M** **27 M**	**10 F** **27 F**	**10 M** **27 M**	**10 F** **27 F**	**10 M** **27 M**	**10 F** **27 F**
Clinical Chemistry (Day 92)								
Total protein (g/dL)	-	6.90	-	6.78	-	6.76	-	5.55**
Albumin (g/dL)	-	4.96	-	4.78	-	4.70	-	3.93***
Globulin (g/dL)	-	1.94	-	2.00	-	2.06	-	1.62**
Aspartate aminotransferase (U/L)	-	152.6	-	115.2	-	92.9	-	183.2
Alanine aminotransferase (U/L)	-	48.9	-	41.5	-	34.0	-	68.9
Alkaline phosphatase (U/L)	-	29.2	-	29.7	-	33.3	-	76.5***
Total bilirubin (mg/dL)	0.055	0.062	0.067	0.063	0.060	0.057	0.083*	0.775**
Glucose (mg/dL)	184.1	164.4	165.3	170.6	158.9	151.3	153.1	122.9**
Organ Weight [b] **– Day 92 (No. Examined)**	10	10	10	10	10	10	9	10
Liver (g)	18.2618 g	-	-14	-	-20**	-	-22**	-
Adrenal gland (g)	-	0.07544 g	-	-8	-	-13	-	-25***

表 2.6.7.7-2 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity Study in Sprague Dawley Rats						**Test Article:** Givosiran		
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley		**Duration of Dosing:** 13 weeks				**Study No:** [AS1-GLP16-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-5		
Monthly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**50**		**150**	
Number of Animals: **Main** **Toxicokinetics**	**10 M** **0 M**	**10 F** **0 F**	**10 M** **27 M**	**10 F** **27 F**	**10 M** **27 M**	**10 F** **27 F**	**10 M** **27 M**	**10 F** **27 F**
Gross Pathology								
Liver (No. of Animals Examined)	10	10	10	10	10	10	9	10
Discoloration; pale	0	0	3	0	7	3	8	9
Histopathology [c]								
Liver (No. of Animals Examined)	10	10	10	10	10	10	9	10
Single-cell necrosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	7
Hepatocellular vacuolation								
Minimal	1	0	1	1	3	3	4	0
Mild	0	0	1	1	1	0	2	2
Moderate	0	0	0	0	0	1	1	7
Marked	0	0	0	0	0	0	0	1
Pigment								
Minimal	0	0	0	0	0	0	5	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Increased mitosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	4
Mild	0	0	0	0	0	0	0	3
Oval cell hyperplasia								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	2
Eosinophilic focus of cellular alteration								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1

表 2.6.7.7-2 ラットにおける 13 週間皮下投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity Study in Sprague Dawley Rats						**Test Article:** Givosiran		
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley		**Duration of Dosing:** 13 weeks				**Study No:** [AS1-GLP16-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-5		
Monthly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**50**		**150**	
Kidney (No. of Animals Examined)	10	10	10	10	10	10	9	10
Tubular basophilic granules								
Minimal	0	0	0	0	1	0	6	4
Mild	0	0	0	0	0	0	0	3
Tubular vacuolation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	4
Injection Site (No. of Animals Examined)	10	10	10	10	10	10	9	10
Mixed cell infiltration								
Minimal	0	1	0	1	3	3	4	5
Mild	0	0	0	0	2	0	1	0
Macrophage aggregation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0

Abbreviations: - = no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; $AUC_{0\text{-}24}$ = area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max} = maximum observed concentration occurring at T_{max}; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NA = not applicable; NC = not calculated; QM = once monthly; SC = subcutaneous; $t_{1/2}$ = apparent terminal elimination half-life; TK = toxicokinetics; T_{max} = time to reach maximal concentration.

Note: Significantly different from control group (Group 1) value: * = p≤0.05; ** = p≤0.01; *** = p≤0.001 (Dunn/Dunnett).

a: One main study male (Animal No. 4009) given 150 mg/kg/month was found dead on Day 49. Marked chronic inflammation with hemorrhage in the subcutis of the scrotal area was likely an important contributing factor to the demise of the animal. The cause of death of this rat was unlikely related to administration of givosiran. One TK male (Animal No. 2020) given 10 mg/kg/month was found dead on Day 71. Grossly, a mass was seen in the abdominal adipose tissue invading into right kidney and adrenal; a clot was noted on cut surface. This mass was considered a major contributing factor to the demise of the animal and unrelated to administration of givosiran.

b: Number indicates absolute organ weights. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated.

c: Incidence is presented.

表 2.6.7.7-3 ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験

Report Title: A 26-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity, Fertility and Early Embryonic Development (to Implantation) Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period					**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** 26 weeks				**Study No:** [AS1-GLP15-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-6			
Initial Age: 53-56 days (males at initiation of treatment); 76 days (females at the beginning of mating period)	**Duration of Postdose:** 13 weeks Method of Administration: SC injection, QW				**GLP Compliance:** Yes			
Date of First Dose: 14 Jul 2015	**Vehicle/Formulation:** 0.9% NaCl for Injection, USP							
Special Features: Reproductive performance, ovarian, and uterine examinations; male reproductive assessment (including sperm motility, concentration, and morphology); ADA analysis								
No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg/week								
Weekly Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals [a]:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Main Study (Day 184)	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Recovery (Day 275)	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Toxicokinetic	**3**	**3**	**24**	**24**	**24**	**24**	**24**	**24**
Toxicokinetics: Givosiran Plasma Exposure [b]								
T_{max} (h)								
Day 1	NR		0.5		1.0		1.0	
Day 183	NR		0.5		0.5		1.0	
C_{max} (μg/mL)								
Day 1	NR		0.318		1.58		6.34	
Day 183	NR		0.378		0.849		5.35	

表 2.6.7.7-3 ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 26-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity, Fertility and Early Embryonic Development (to Implantation) Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period		**Test Article:** Givosiran		
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** 26 weeks		**Study No:** [AS1-GLP15-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-6	
Weekly Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Toxicokinetics: Givosiran Plasma Exposure [b]				
AUC_{0-2} (µg·h/mL)				
Day 1	NR	0.413	1.93	7.98
Day 183	NR	0.526	1.45	8.84
$t_{1/2}$ (h)				
Day 1	NR	NR	NR	NR
Day 183	NR	2.1	3.1	3.1
t_{last} (h)				
Day 1	NR	2	4	4
Day 183	NR	4	8	8
Toxicokinetics: Givosiran Liver Exposure (TK subset) [b]				
T_{max} (h)				
Day 1	NR	8	6	8
Day 183	NR	8	8	16
C_{max} (µg/g)				
Day 1	NR	31.6	108	326
Day 183	NR	41.4	208	489
AUC_{0-24} (µg·h/g)				
Day 1	NR	573	1997	6157
Day 183	NR	777	4141	9503

表 2.6.7.7-3 ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 26-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity, Fertility and Early Embryonic Development (to Implantation) Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley		**Duration of Dosing:** 26 weeks					**Study No:** [AS1-GLP15-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-6	
Weekly Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
$t_{1/2}$ (h)								
Day 1	NR		NR		NR		NR	
Day 183	NR		25.9		26.8		58.0 [c]	
Toxicokinetics: Givosiran Kidney Exposure (TK subset) [b]								
T_{max} (h)								
Day 1	NR		4		2		8	
Day 183	NR		24		5		24	
C_{max} (µg/g)								
Day 1	NR		5.02		26.4		144	
Day 183	NR		28.7		91.6		931	
AUC_{0-24} (µg·h/g)								
Day 1	NR		96.9		462		3157	
Day 183	NR		516		1908		15,887	
$t_{1/2}$ (h)								
Day 1	NR		NR		82.5 [d]		NR	
Day 183	NR		NR		121		NR	
Tissue Elimination Concentration Analysis (µg/g)								
Main Study Givosiran Concentration (No. Evaluated) – Day 184	3	3	18	20	19	20	20	20
Liver	NR	NR	40.4	27.5	198	177	550	493
Kidney	NR	NR	25.6	25.7	95.6	110	755	686

表 2.6.7.7-3 ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 26-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity, Fertility and Early Embryonic Development (to Implantation) Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley		**Duration of Dosing:** 26 weeks					**Study No:** [AS1-GLP15-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-6	
Weekly Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Recovery Givosiran Concentration (No. Evaluated) – Day 275 [e]	3	3	0/6	0/5	0/5	0/8	7/10	9/10
Liver	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0.38	0.55
Kidney	NR	NR	0.75	1.33	0.49	0.95	5.15	5.21
Anti-Drug Antibodies (ADA)	All samples tested were determined to be negative for the presence of ADA.							
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Local Irritation Assessment Erythema, Very Slight Day 85, 4 hours postdose Day 85, 24 hours postdose Day 176, 4 hours postdose Day 176, 24 hours postdose	 1 1 0 0	 1 1 1 0	 3 1 0 0	 4 2 1 1	 3 2 2 0	 3 7 4 1	 4 1 3 1	 2 12 [f] 3 1
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation – Day 184								
Activated partial thromboplastin time (sec)	19.3	17.8	20.6	18.2	18.1	17.3	15.9***	15.7***
Hematology – Day 184								
Platelet ($10^3/\mu L$)	-	1038	-	1030	-	965	-	828***
Clinical Chemistry – Day 184								
Aspartate aminotransferase (U/L)	-	112	-	139	-	145	-	157

表 2.6.7.7-3 ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 26-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity, Fertility and Early Embryonic Development (to Implantation) Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley		**Duration of Dosing:** 26 weeks					**Study No:** [AS1-GLP15-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-6	
Weekly Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Alkaline phosphatase (U/L)	56	22	53	23	63	29	82***	52***
Triglycerides (mg/dL)	-	75	-	76	-	83	-	140***
Total protein (g/dL)	-	6.9	-	7.0	-	6.6*	-	6.4***
Albumin (g/dL)	-	4.8	-	4.8	-	4.4***	-	4.2***
Albumin/Globulin ratio	-	2.3	-	2.3	-	2.0***	-	1.9***
Total bilirubin (mg/dL)	0.05	0.07	0.04	0.09	0.07*	0.08	0.11***	0.13***
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Male Reproductive Assessment								
Cauda epididymis weight	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Spermatozoa count/g (millions)	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Percent motility	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Weekly Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals [a]:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Main Day 184	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Recovery Day 275	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Toxicokinetic	**3**	**3**	**24**	**24**	**24**	**24**	**24**	**24**
Parental Performance – Male								
No. evaluated	20	NA	20	NA	20	NA	20	NA
No. of males that mated	18	NA	20	NA	20	NA	18	NA
No. of fertile males	18	NA	20	NA	20	NA	18	NA
Mean no. days prior to mating	2.4	NA	2.5	NA	2.6	NA	3.4	NA

表 2.6.7.7-3 ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 26-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity, Fertility and Early Embryonic Development (to Implantation) Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period						**Test Article:** Givosiran		
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** 26 weeks					**Study No:** [AS1-GLP15-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-6		
Ovarian and Uterine Parameters – Naïve Female								
No. evaluated	NA	20	NA	20	NA	20	NA	20
No. of females that mated	NA	18	NA	20	NA	20	NA	18
No. of pregnant females	NA	18	NA	20	NA	20	NA	18
Mean no. days prior to mating	NA	2.4	NA	2.5	NA	2.6	NA	3.4
No. of early resorptions	NA	1.2	NA	1.0	NA	1.5	NA	0.9
Mean no. corpora lutea	NA	18.7	NA	18.0	NA	18.2	NA	18.3
Mean no. implantations	NA	17.2	NA	16.7	NA	17.3	NA	17.3
Weekly Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals [a]:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Main Day 184	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Recovery Day 275	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Toxicokinetic	**3**	**3**	**24**	**24**	**24**	**24**	**24**	**24**
Ovarian and Uterine Parameters – Naïve Female								
Mean % preimplantation loss	NA	7.49	NA	7.34	NA	4.81	NA	5.04
Mean no. live embryos	NA	16.0	NA	15.8	NA	15.7	NA	16.4
Mean no. resorptions	NA	1.2	NA	1.0	NA	1.5	NA	0.9
No. dead embryos	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0
Mean % postimplantation loss	NA	6.98	NA	6.03	NA	8.69	NA	5.18
Organ Weights – Day 184 [g]								
Adrenal (g)	0.0650 g	0.0648 g	-3	+9	-6	+2	-17**	-15*
Liver (g)	18.482 g	-	-1	-	-14**	-	-27***	-

表 2.6.7.7-3 ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 26-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity, Fertility and Early Embryonic Development (to Implantation) Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period								**Test Article:** Givosiran
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley		**Duration of Dosing:** 26 weeks						**Study No:** [AS1-GLP15-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-6
Weekly Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Kidney (g)	-	2.209 g	-	+8	-	+15	-	+29***
Gross Pathology – Day 184 [h]								
Number of Animals Examined	20	20	18	20	19	20	20	20
Liver								
Discoloration, pale	1	0	3	1	13	9	14	18
Enlargement	0	0	0	0	0	1	0	3
Histopathology – Day 184 [h]								
Number of Animals Examined	20	20	18	20	19	20	20	20
Kidney								
Basophilic granules, tubular	(0)	(0)	(0)	(0)	(19)	(19)	(20)	(20)
Minimal	0	0	0	0	19	19	0	8
Mild	0	0	0	0	0	0	20	12
Liver								
Vacuolation, hepatocellular	(9)	(6)	(13)	(15)	(19)	(20)	(20)	(20)
Minimal	8	4	12	13	9	1	0	0
Mild	1	2	1	2	6	10	20	0
Moderate	0	0	0	0	4	9	0	0
Marked	0	0	0	0	0	0	0	20
Single-cell necrosis	(0)	(0)	(1)	(0)	(6)	(2)	(20)	(20)
Minimal	0	0	1	0	5	2	9	6
Mild	0	0	0	0	1	0	11	14

表 2.6.7.7-3 ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 26-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity, Fertility and Early Embryonic Development (to Implantation) Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley		**Duration of Dosing:** 26 weeks					**Study No:** [AS1-GLP15-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-6	
Weekly Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Increased mitoses	(0)	(0)	(0)	(2)	(5)	(5)	(20)	(20)
Minimal	0	0	0	2	5	5	3	4
Mild	0	0	0	0	0	0	17	16
Basophilic granules, Kupffer cells	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(0)	(20)	(20)
Minimal	0	0	0	0	2	0	4	15
Mild	0	0	0	0	0	0	16	5
Histopathology – Day 184 [h]								
Number of Animals Examined	20	20	18	20	19	20	20	20
Liver								
Pigmentation, Kupffer cells	(1)	(0)	(0)	(1)	(2)	(1)	(18)	(20)
Minimal	1	0	0	1	2	1	6	16
Mild	0	0	0	0	0	0	12	4
Karyomegaly, hepatocellular	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(16)
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	16
Increased hematopoiesis	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	(0)	(4)
Minimal	0	0	0	0	0	4	0	4
Focus of cellular alteration, eosinophilic	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(4)	(4)
Minimal	0	0	0	0	0	1	2	4
Mild	0	0	0	0	0	0	2	0

表 2.6.7.7-3 ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 26-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity, Fertility and Early Embryonic Development (to Implantation) Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period					**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley		**Duration of Dosing:** 26 weeks			**Study No:** [AS1-GLP15-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-6			
Weekly Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Pancreas								
Angiectasis, islet of Langerhans	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(6)	(13)	(19)
Minimal	0	0	0	0	2	6	12	8
Mild	0	0	0	0	0	0	1	11
Histopathology – Day 184 [h]								
Number of Animals Examined	20	20	18	20	19	20	20	20
Injection Site								
Vacuolation, macrophage	(0)	(0)	(9)	(3)	(9)	(11)	(18)	(19)
Minimal	0	0	9	3	8	10	6	11
Mild	0	0	0	0	1	1	12	8
Degeneration, cutaneous muscle	(3)	(3)	(4)	(0)	(4)	(5)	(18)	(7)
Minimal	3	3	4	0	3	5	7	7
Mild	0	0	0	0	1	0	10	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Postdose Evaluation: Histopathology – Day 275 [h]								
Number of Animals Examined	9	9	8	10	10	10	10	10
Kidney								
Basophilic granules, tubular	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(9)	(9)
Minimal	0	0	0	0	0	0	9	9

表 2.6.7.7-3 ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 26-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity, Fertility and Early Embryonic Development (to Implantation) Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period						**Test Article:** Givosiran		
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley		**Duration of Dosing:** 26 weeks				**Study No:** [AS1-GLP15-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-6		
Weekly Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Postdose Evaluation: Histopathology – Day 275 [h]								
Number of Animals Examined	9	9	8	10	10	10	10	10
Liver								
Vacuolation, hepatocellular	(6)	(5)	(3)	(5)	(8)	(6)	(10)	(10)
Minimal	4	5	3	4	1	5	5	0
Mild	2	0	0	1	5	1	4	4
Moderate	0	0	0	0	1	0	1	6
Marked	0	0	0	0	1	0	0	0
Basophilic granules, Kupffer cells	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(0)
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	0
Pigmentation, Kupffer cells	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(0)	(7)	(4)
Minimal	2	0	0	0	2	0	6	4
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Karyomegaly, hepatocellular	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	4
Focus of cellular alteration, eosinophilic	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(7)	(2)
Minimal	1	0	0	0	1	0	5	1
Mild	0	0	0	0	0	0	2	1

表 2.6.7.7-3 ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 26-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity, Fertility and Early Embryonic Development (to Implantation) Study in the Albino Rat Followed by a 13-Week Recovery Period						**Test Article:** Givosiran		
Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD), Sprague Dawley		**Duration of Dosing:** 26 weeks				**Study No:** [AS1-GLP15-022] **CTD Location:** 4.2.3.2-6		
Weekly Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**3**		**10**		**30**	
Postdose Evaluation: Histopathology – Day 275 [h]								
Number of Animals Examined	9	9	8	10	10	10	10	10
Pancreas								
Angiectasis, islet of Langerhans	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	2

Abbreviations: - = no noteworthy findings; ADA = anti-drug antibodies; AUC_{0-2} = area under the concentration-time curve from time 0 to 2 hours postdose, estimated by the linear trapezoidal rule; AUC_{0-24} = area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max} = maximum observed concentration occurring at T_{max}; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NA = not applicable; NR = not reported – insufficient values to calculate parameter; QW = once weekly; SC = subcutaneous; $t_{1/2}$ = elimination half-life; t_{last} = time to reach last measurable concentration; T_{max} = time to reach maximal concentration.

Note: Significantly different from control group (Group 1) value: * = p≤0.05; ** = p≤0.01; *** = p≤0.001 (Dunnett/Dunn).

a: Twenty males/group from the Main Study and Recovery populations (target of 10 males/group from each population) were selected for the cohabitation phase of the study. Twenty naïve females/group were used for the fertility and early embryonic development phase.

b: Sex-related differences in givosiran C_{max} and AUC values were less than 2-fold; therefore, results were based on combined (male + female) data.

c: Represents value for males only; unable to determine half-life in females.

d: Represents value for females only; unable to determine half-life in males.

e: Samples from all animals were measured; n represents those samples with liver/kidney concentrations above the lower limit of quantitation.

f: One animal of this total incidence was scored with well-defined erythema (one score higher in severity than very slight erythema noted for all other animals on study).

g: Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates absolute organ weights. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

h: Incidence is presented. Numbers in parentheses represent the number of animals with the finding.

表 2.6.7.7-4 サルにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period						**Test Article:** Givosiran		
Species/Strain: Cynomolgus monkey		**Duration of Dosing:** 13 weeks				**Study No:** [AS1-NCD14-011] **CTD Location:** 4.2.3.2-8		
Initial Age: 2–3.5 years		**Duration of Postdose:** 13 weeks				**GLP Compliance:** Yes		
Date of First Dose: 25 June 2014		**Method of Administration:** SC injection, QW						
Special Features: None		**Vehicle/Formulation:** 0.9% NaCl for Injection, USP						
No Observed Adverse Effect Level: 150 mg/kg								
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Number of Animals (Main+Recovery)	**M = 6**	**F = 6**	**M = 6**	**F = 6**	**M = 6**	**F = 6**	**M = 6**	**F = 6**
Number of TK Animals	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**
Toxicokinetics – Plasma [a]								
T_{max} (h)								
Day 1	NA		1.2		1.3		1.7	
Day 92	NA		1.8		2.5		3.2	
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	NA		2.89		7.92		19.5	
Day 92	NA		3.75		8.06		24.2	
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)								
Day 1	NA		12.0		50.4		204	
Day 92	NA		16.3		72.5		292	
$t_{1/2}$ (h)								
Day 1	NA		2.7		4.9		6.1	
Day 92	NA		1.9		3.8		4.7	
Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Evaluation	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7.7-4 サルにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period								**Test Article:** Givosiran
Species/Strain: Cynomolgus monkey			**Duration of Dosing:** 13 weeks					**Study No:** [AS1-NCD14-011] **CTD Location:** 4.2.3.2-8
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Number of Animals (Main+Recovery)	**M = 6**	**F = 6**	**M = 6**	**F = 6**	**M = 6**	**F = 6**	**M = 6**	**F = 6**
Number of TK Animals	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**
Local Irritation Assessment	-	-	-	-	-	-	-	-
Neurological Assessment	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry (Day 93) [b]								
Alkaline phosphatase (U/L)	587	277	528	316	642	434*	783*	476*
Aspartate aminotransferase (U/L)	73 [c]	-	-	-	-	-	126 (1/6) [d]	-
Alanine aminotransferase (U/L)	54 [c]	-	-	-	-	-	120 (1/6) [d]	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7.7-4 サルにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Cynomolgus monkey			**Duration of Dosing:** 13 weeks				**Study No:** [AS1-NCD14-011] **CTD Location:** 4.2.3.2-8	
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Histopathology (Day 93)								
No. of Animals Examined	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**
Liver								
Basophilic granules, Kupffer cell								
Minimal	0	0	0	0	2	0	0	0
Mild	0	0	0	0	1	3	2	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	1
Basophilic granules, hepatocyte								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	1
Vacuolation, hepatocyte								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Injection Site								
Infiltration mononuclear cell								
Minimal	0	0	1	1	0	2	0	2
Mild	0	0	0	0	1	1	1	0
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Infiltration mixed cell								
Minimal	0	1	0	1	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	1	0	1	1
Macrophage vacuolation								
Minimal	0	0	0	2	1	2	0	1
Mild	0	0	0	0	2	1	3	2
Lymph Node, Axillary								
Vacuolation, macrophage								
Minimal	0	0	1	2	2	2	0	0
Mild	0	0	0	0	1	1	3	3

表 2.6.7.7-4 サルにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Cynomolgus monkey			**Duration of Dosing:** 13 weeks				**Study No:** [AS1-NCD14-011] **CTD Location:** 4.2.3.2-8	
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Histopathology (Day 93)								
No. of Animals Examined	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**
Lymph Node, Cervical								
Macrophage vacuolation								
Minimal	0	0	0	0	1	1	0	0
Mild	0	0	0	0	2	1	3	3
Lymph Node, Mandibular								
Macrophage vacuolation								
Minimal	0	0	0	0	2	0	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	2	3
Lymph Node, Mesenteric								
Macrophage vacuolation								
Minimal	0	0	2	0	1	0	0	0
Mild	0	0	0	0	2	1	3	3
Bone Femur (Synovium)								
Infiltration mononuclear cell								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Macrophage vacuolation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0

表 2.6.7.7-4 サルにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Cynomolgus monkey			**Duration of Dosing:** 13 weeks				**Study No:** [AS1-NCD14-011] **CTD Location:** 4.2.3.2-8	
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Histopathology (Postdose Evaluation)								
No. of Animals Examined	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**
Liver								
Basophilic granules (Kupffer cell)								
Minimal	0	0	0	0	2	2	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	2	3
Basophilic granules, hepatocytes								
Minimal	0	0	0	0	1	1	3	3
Single-cell necrosis								
Minimal	0	0	2	0	0	1	0	0
Injection Site								
Infiltration mononuclear cell								
Minimal	0	0	0	0	1	0	1	0
Lymph Node, Mesenteric								
Macrophage vacuolation								
Minimal	0	0	2	0	3	3	2	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	3
Lymph Node, Axillary								
Macrophage vacuolation								
Minimal	0	0	1	0	0	2	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	2	3

表 2.6.7.7-4 サルにおける 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 13-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Cynomolgus monkey		**Duration of Dosing:** 13 weeks					**Study No:** [AS1-NCD14-011] **CTD Location:** 4.2.3.2-8	
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Histopathology (Postdose Evaluation)								
No. of Animals Examined	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**	**M = 3**	**F = 3**
Lymph Node, Cervical								
Macrophage vacuolation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymph Node, Mandibular								
Macrophage vacuolation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	2
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1

Abbreviations: - = no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 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; GLP=Good Laboratory Practice; M = male; NA = not applicable; QW = once weekly; SC = subcutaneous; $t_{1/2}$ = elimination half-life; TK = toxicokinetic; T_{max} = time to reach maximal concentration.

Note: Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). Significantly different from control group (Group 1) value: * = $p \leq 0.05$ (Dunn or Dunnett).

a: TK values were calculated as overall (combined male + female) means.

b: Values represent group mean % difference from mean control value.

c: Pretreatment value.

d: Value from a single male; percent differences compared to individual pretreatment value are shown. Day 93 value.

表 2.6.7.7-5 幼若サルにおける 39 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験

Report Title: A 39-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Juvenile Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period						**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Cynomolgus Monkey	**Duration of Dosing:** 39 weeks					**Study No.:** [AS1-GLP15-018] **CTD Location:** 4.2.3.2-9	
Initial Age: 13–17 months	**Duration of Postdose:** 13 weeks					**GLP Compliance:** Yes	
Date of First Dose: 15 Jul 2015	**Method of Administration:** SC injection, QW						
Special Features: ADA analysis	**Vehicle/Formulation:** 0.9% NaCl for Injection, USP						
No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg/week							
Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals: **Main Study (Day 275)** **Recovery (Day 365)**	**M** **3** **3**	**F** **3** **3**	**M** **3** **3**	**F** **3** **3**	**M** **3** **3**	**F** **3** **3**	**M** **3** **3**	**F** **3** **3**
Toxicokinetics: Givosiran Plasma Exposure [a]								
T_{max} (h)								
Day 1	NA		1.7		1.9		1.7	
Day 274	NA		1.1		1.3		1.3	
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	NA		1.09		4.73		14.6	
Day 274	NA		1.91		5.98		19.2	
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)								
Day 1	NA		4.8		27.7		137	
Day 274	NA		6.86		28.2		187	
$AUC_{0\text{-}8}$ (µg·h/mL)								
Day 1	NA		5.08		25.1		88.1	
Day 274	NA		6.86		26.7		107	

表 2.6.7.7-5 幼若サルにおける 39 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 39-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Juvenile Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period								**Test Article:** Givosiran
Species/Strain: Cynomolgus Monkey	**Duration of Dosing:** 39 weeks							**Study No.:** [AS1-GLP15-018] **CTD Location:** 4.2.3.2-9
Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals: **Main Study (Day 275)** **Recovery (Day 365)**	**M** **3** **3**	**F** **3** **3**	**M** **3** **3**	**F** **3** **3**	**M** **3** **3**	**F** **3** **3**	**M** **3** **3**	**F** **3** **3**
Toxicokinetics: Givosiran Plasma Exposure [a]								
AUC_{0-24} (µg·h/mL)								
Day 1	NA		5.44		33.7		153	
Day 274	NA		7.30		34.3		187	
$t_{1/2}$ (h)								
Day 1	NA		2.4		2.6		3.7	
Day 274	NA		1.8		3.3		3.4	
Toxicokinetics: Givosiran Tissue Exposure [a]								
Mean Liver Concentration (µg/g)								
Day 275	NA		497		2658		4769	
Day 365	NA		53.2		548		808	
Mean Kidney Concentration (µg/g)								
Day 275	NA		9.79		49.3		141	
Day 365	NA		0.297		0.516		1.53	
Mean Liver:Kidney Concentration [a]								
Day 275	NA		50.8		54.0		33.9	
Day 365	NA		179		1062		527	

表 2.6.7.7-5 幼若サルにおける 39 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 39-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Juvenile Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Cynomolgus Monkey	**Duration of Dosing:** 39 weeks						**Study No.:** [AS1-GLP15-018] **CTD Location:** 4.2.3.2-9	
Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Anti-Drug Antibodies	The individual TK parameters in the 2 animals that were positive for anti-givosiran antibodies were similar to those animals that were negative for anti-givosiran antibodies. Plasma exposure to givosiran was not impacted by the presence of anti-givosiran antibodies in these animals.							
Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Local Irritation Assessment	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Neurological Evaluation	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry (Day 275)								
Alkaline phosphatase (U/L)	582	462	640	563	790	601	943	702
Alanine aminotransferase (U/L)	60	55	72	64	75	65	99	83
Aspartate aminotransferase (U/L)	58	-	83	-	68	-	90	-
Gamma glutamyl transferase (U/L)	92	71	89	95	113	78	148**	116**
Cholesterol	130	-	164	-	130	-	188**	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7.7-5 幼若サルにおける 39 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 39-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Juvenile Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Cynomolgus Monkey	**Duration of Dosing:** 39 weeks						**Study No.:** [AS1-GLP15-018] **CTD Location:** 4.2.3.2-9	
Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Histopathology – Main (Day 275) [b]								
Lymph Node, Axillary (No. Examined)	3	3	3	3	3	3	3	3
Macrophage vacuolation	(0)	(0)	(2)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)
Minimal	0	0	2	1	0	0	1	0
Mild	0	0	0	2	2	1	1	1
Moderate	0	0	0	0	1	2	1	2
Lymph Node, Cervical (No. Examined)	1	3	3	3	3	3	2	3
Macrophage vacuolation	(0)	(0)	(1)	(1)	(2)	(3)	(2)	(3)
Minimal	0	0	0	0	1	2	0	0
Mild	0	0	1	1	1	1	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	2
Lymph Node, Mesenteric (No. Examined)	3	3	3	3	3	3	3	3
Macrophage vacuolation	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)	(3)	(3)
Minimal	0	0	0	0	2	2	0	0
Mild	0	0	0	0	1	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	1	2	2

表 2.6.7.7-5 幼若サルにおける 39 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 39-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Juvenile Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Cynomolgus Monkey	**Duration of Dosing:** 39 weeks						**Study No.:** [AS1-GLP15-018] **CTD Location:** 4.2.3.2-9	
Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Histopathology [b]								
Lymph Node, Mandibular (No. Examined)	3	3	3	3	3	3	3	3
Macrophage vacuolation	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)	(3)	(3)
Minimal	0	0	0	0	1	3	3	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Injection Site (No. Examined)	3	3	3	3	3	3	3	3
Macrophage vacuolation	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)	(2)	(3)	(2)
Minimal	0	0	0	3	3	1	1	1
Mild	0	0	0	0	0	1	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Infiltration mononuclear cell	(1)	(0)	(1)	(1)	(2)	(1)	(2)	(2)
Minimal	1	0	1	1	1	0	1	0
Mild	0	0	0	0	1	1	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	1
Liver (No. Examined)	3	3	3	3	3	3	3	3
Basophilic granules, Kupffer cell	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)	(3)	(3)
Minimal	0	0	0	0	1	2	0	0
Mild	0	0	0	0	2	1	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	3

表 2.6.7.7-5 幼若サルにおける 39 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 39-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Juvenile Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period								**Test Article:** Givosiran
Species/Strain: Cynomolgus Monkey	**Duration of Dosing:** 39 weeks							**Study No.:** [AS1-GLP15-018] **CTD Location:** 4.2.3.2-9
Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Basophilic granules, hepatocellular	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(3)	(3)	(3)
Minimal	0	0	0	0	2	2	0	0
Mild	0	0	0	0	0	1	3	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Single-cell necrosis, hepatocellular	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(1)
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	1
Postdose Evaluation								
Clinical Chemistry – (Day 360) [c]								
Alkaline phosphatase (U/L)	-	435	-	818 [d]	-	427	-	722
Alanine aminotransferase (U/L)								
Day 360	-	41	-	42 [d]	-	53	-	66
Gamma glutamyl transferase (U/L)								
Day 360	88	65	83	91 [d]	98	69	119	110
Histopathology – Recovery (Day 365) [b]								
Lymph Node, Axillary (No. Examined)	3	3	3	2	3	3	3	3
Macrophage vacuolation	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(1)	(2)	(3)
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	2	1	1	3

表 2.6.7.7-5 幼若サルにおける 39 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 39-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Juvenile Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period							**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Cynomolgus Monkey	**Duration of Dosing:** 39 weeks						**Study No.:** [AS1-GLP15-018] **CTD Location:** 4.2.3.2-9	
Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Lymph Node, Cervical (No. Examined)	3	3	3	2	3	3	3	3
Macrophage vacuolation	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(1)	(3)
Minimal	0	0	0	0	1	0	1	2
Mild	0	0	0	0	0	1	0	1
Lymph Node, Mesenteric (No. Examined)	3	3	3	2	3	3	3	3
Macrophage vacuolation	(0)	(0)	(1)	(0)	(3)	(2)	(3)	(3)
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	1
Mild	0	0	1	0	2	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	1	1	2	1
Lymph Node, Mandibular (No. Examined)	3	3	3	2	3	3	3	3
Macrophage vacuolation	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(2)
Minimal	0	0	0	0	1	0	1	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Histopathology – Recovery (Day 365) [b]								
Liver (No. Examined)	3	3	3	2	3	3	3	3
Basophilic granules, Kupffer cell	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(3)	(3)
Minimal	0	0	0	0	1	0	3	2
Mild	0	0	0	0	0	1	0	1

表 2.6.7.7-5 幼若サルにおける 39 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験、並びに 13 週間回復性試験（続き）

Report Title: A 39-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study in the Juvenile Cynomolgus Monkey Followed by a 13-Week Recovery Period								**Test Article:** Givosiran
Species/Strain: Cynomolgus Monkey	**Duration of Dosing:** 39 weeks							**Study No.:** [AS1-GLP15-018] **CTD Location:** 4.2.3.2-9
Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Basophilic granules, hepatocellular	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(3)	(3)	(3)
Minimal	0	0	0	0	2	2	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	3	2
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	1
Single-cell necrosis, hepatocellular	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2

Abbreviations: - = no noteworthy findings; ADA = anti-drug antibodies; AUC_{0-8} = area under the concentration-time curve from time 0 to 8 hours postdose, estimated by the linear trapezoidal rule; AUC_{0-24} = area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose, estimated by the linear trapezoidal rule; $AUC_{0-t(last)}$ = 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; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NA = not applicable; QW = once weekly; SC = subcutaneous; $t_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to reach maximal concentration; TK = toxicokinetic.

Note: Significantly different from control group (Group 1) value: ** = $p \leq 0.01$ (Dunnett/Dunn).

a: Sex-related differences in givosiran C_{max} and AUC values were less than 2-fold; therefore, results were based on overall (combined male and female) data.

b: Incidence is presented. Numbers in parentheses represent the number of animals with the findings.

c: Clinical chemistry in female groups was performed on Day 359.

d: Group excluded from statistical analysis.

2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験

表 2.6.7.8-1 ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験

Report Title: ALN-AS1: Bacterial Reverse Mutation Test in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*		**Test Article:** Givosiran
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**Strains:** *S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and *E. coli* (WP2 *uvrA*)	**Study No.:** [AS1-NCD14-015] **CTD Location:** 4.2.3.3.1-1
No. of Independent Assays: 1	**No. of Replicate Cultures:** 3	**No. of Cells Analyzed/Culture:** NA
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9		**GLP Compliance:** Yes
Vehicles: Saline (for givosiran); water (for NaAz); DMSO (for all other positive controls)		
Treatment: Plate incorporation method, with final incubation of 66 hours and 21 minutes at 37°C		**Date of Treatment:** 04 Jul 2014
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Revertants/plate (Mean±SD)**				
			TA1535	**TA1537**	**TA98**	**TA100**	**WP2 *uvrA***
Without S9 activation	Saline	NA	16±3	12±3	34±3	128±9	49±8
	Givosiran	50	12±3	11±5	38±3	116±11	38±15
		158	15±3	11±7	35±3	117±17	45±6
		500	14±3	9±3	38±3	119±9	49±8
		1581	18±3	12±2	36±10	122±14	58±8
		5000	23±9	13±6	31±9	127±11	44±3
	NaAz	0.5	378±16	NA	NA	463±6	NA
	9AC	50	NA	983±200	NA	NA	NA
	2NF	1	NA	NA	158±6	NA	NA
	NQO	0.5	NA	NA	NA	NA	153±13

表 2.6.7.8-1 ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: Bacterial Reverse Mutation Test in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*			**Test Article:** Givosiran				
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells		**Strains:** *S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and *E. coli* (WP2 *uvrA*)	**Study No.:** [AS1-NCD14-015] **CTD Location:** 4.2.3.3.1-1				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Revertants/plate (Mean±SD)**				
			TA1535	**TA1537**	**TA98**	**TA100**	**WP2 *uvrA***
With S9 activation	Saline	NA	13±8	14±2	54±12	153±26	63±13
	Givosiran	50	17±2	15±6	45±4	125±18	46±13
		158	18±3	19±4	61±10	130±18	52±11
		500	11±6	15±3	43±4	117±6	51±4
		1581	12±3	13±5	44±12	136±7	56±4
		5000	14±3	16±1	45±7	125±12	55±4
	2AA	5	217±24	NA	NA	NA	NA
	2AA	20	NA	NA	NA	NA	304±16
	BaP	5	NA	115±18	459±37	1003±42	NA

Abbreviations: 2AA = 2-aminoanthracene; 2NF = 2-nitrofluorene; 9AC = 9-aminoacridine hemihydrate; BaP =benzo[a]pyrene; DMSO = dimethyl sulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; NA = not applicable; NaAz = sodium azide; NQO = 4-nitroquinoline N-oxide; Saline = 0.9% Sodium chloride for injection, USP; SD = standard deviation; Water = sterile purified water.

表 2.6.7.8-2 ヒト末梢血リンパ球を用いる哺乳類細胞 *in vitro* 染色体異常試験

Report Title: ALN-AS1: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test in Human Peripheral Blood Lymphocytes		**Test Article:** Givosiran
Test for Induction of: Chromosome Aberration	**Strain:** Peripheral human blood lymphocytes	**Study No.:** [AS1-NCD14-016] **CTD Location:** 4.2.3.3.1-2
No. of Independent Assays: 1	**No. of Replicate Cultures:** 2	**GLP Compliance:** Yes
Metabolizing System: Phenobarbital/ 5,6-Benzoflavone-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture:** 100	
Vehicles: Saline (for givosiran), water (for positive controls)		
Treatment: 4-hour incubation with and without S9 activation (initial); 21-hour incubation without S9 activation (confirmatory)		**Date of Treatment:** 02 July 2014
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL) [a]	Cytotoxicity (% of Control) [b]	Aberrant Cells (Mean %) [c]	Aberrations per Cell [c]	Total Polyploid Cells	Total Endoreduplicated Cells
Without S9 Activation	Saline	NA	100	1.0	0.010	0	0
	Givosiran	128	103	0.0	0.000	0	0
		256	77	0.0	0.000	0	0
		500	97	1.0	0.010	0	0
	MMC	0.10	104	9.0*	0.090	0	0
With S9 Activation	Saline	NA	100	2.0	0.020	0	0
	Givosiran	128	104	0.0	0.000	0	0
		256	103	0.0	0.000	0	0
		500	96	1.0	0.010	0	0
	CP	4.0	77	21.0*	0.210	0	0

表 2.6.7.8-2 ヒト末梢血リンパ球を用いる哺乳類細胞 *in vitro* 染色体異常試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test in Human Peripheral Blood Lymphocytes		**Test Article:** Givosiran
Test for Induction of: Chromosome Aberration	**Strain:** Peripheral human blood lymphocytes	**Study No.:** [AS1-NCD14-016] **CTD Location:** 4.2.3.3.1-2
No. of Independent Assays: 1	**No. of Replicate Cultures:** 2	**GLP Compliance:** Yes
Metabolizing System: Phenobarbital/ 5,6-Benzoflavone-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture:** 100	
Vehicles: saline (for givosiran), water (for positive controls)		
Treatment: 4-hour incubation with and without S9 activation (initial); 21-hour incubation without S9 activation (confirmatory)		**Date of Treatment:** 02 July 2014
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL) [a]	Cytotoxicity (% of Control) [b]	Aberrant Cells (Mean %) [c]	Aberrations per Cell [c]	Total Polyploid Cells	Total Endoreduplicated Cells
Confirmatory Assay							
Without S9 Activation	Saline	-	100	2.5	0.025	0	0
	Givosiran	128	115	0.5	0.005	0	0
		256	96	0.5	0.005	0	0
		500	125	1.0	0.010	0	0
	MMC	0.05	93	10.0*	0.100	0	0

Abbreviations: * = substantial increase compared to concurrent vehicle control; CP = cyclophosphamide monohydrate; GLP = Good Laboratory Practice; MMC = mitomycin C; NA = not applicable; Saline = 0.9% sodium chloride for injection, USP; Water = sterile purified water.

a: All givosiran concentrations are expressed in terms of material as supplied.

b: Based on mitotic index.

c: Does not include cells with only gap, polyploidy, or endoreduplication.

2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験

表 2.6.7.9-1 ラットの骨髄赤血球を用いる小核試験

Report Title: ALN-AS1: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test in Rat Bone Marrow		**Test Article:** Givosiran	
Test for Induction of: Micronuclei in Bone Marrow Immature Erythrocytes		**Species/Strain:** Rat/ Crl:CD(SD) Sprague Dawley	**Study No.:** [AS1-NCD14-017] **CTD Location:** 4.2.3.3.2-1
Treatment Schedule: Single dose		**Sampling Time:** 24 or 48 hours postdose	**GLP Compliance:** Yes
Age: 57 days		**Method of Administration:** SC	
Cells Evaluated: Immature erythrocytes		**Vehicle/Formulation:** 0.9% NaCl for Injection, USP	**Date of Dosing:** 13 August 2014
No. of Cells Analyzed/Animal: 2000			
Special Features: Plasma TK			
Dose (mg/kg):	500	1000	2000
Sex/No. of TK Animals:	M/6	M/6	M/6
Plasma TK Parameters		Mean	
T_{max} (h)	0.5	0.5	0.5
C_{max} (µg/mL)	103	169	275
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	522	1740	3490
Apparent $t_{1/2}$ (h)	6.3	1.8	6.0

表 2.6.7.9-1 ラットの骨髄赤血球を用いる小核試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test in Rat Bone Marrow		**Test Article:** Givosiran			
Test for Induction of: Micronuclei in Bone Marrow Immature Erythrocytes		**Species/Strain:** Rat/ Crl:CD(SD) Sprague Dawley		**Study No.:** [AS1-NCD14-017] **CTD Location:** 4.2.3.3.2-1	
Toxic/Cytotoxic Effects: None					
Genotoxic Effects: None					
Evidence of Exposure: ALN-60519 was quantifiable throughout the 48-hour sampling period for all test article dose groups.					
Test Article	**Dose Level (mg/kg)**	**No. of Main Study Animals (Males)**	**Sampling Time Postdose (hours)**	**Mean % IE/(IE+ME)**	**Incidence MIE**
Vehicle	0	5	24	43.1	4.0
Givosiran	500	5	24	42.8	1.4
Givosiran	1000	5	24	45.2	2.2
Givosiran	2000	5	24	43.8	3.0
Cyclophosphamide	20 [a]	3	24	36.3	70.0
Vehicle	0	5	48	44.3	3.2
Givosiran	2000	5	48	40.3	2.4

Abbreviations: %IE/(IE+ME) = proportion of immature erythrocytes; $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 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}; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; MIE = number of micronucleated cells observed per 2000 immature erythrocytes examined; SC = subcutaneous; $t_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to reach maximal concentration; TK = toxicokinetic.

a: Positive control (20 mg/kg of cyclophosphamide monohydrate) dosed by oral gavage 24 hours prior to sampling.

2.6.7.10 がん原性試験

表 2.6.7.10-1 近交系ハイブリッドマウス（BALB/cBy × C57BL/6 F1）を用いたギボシランの 8 週間反復皮下投与毒性試験

Report Title: An 8-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity Study of ALN-AS1 in the Inbred Hybrid Mouse (BALB/cBy × C57BL/6 F1)					**Test Article:** Givosiran		
Species/Strain: BALB/cBy × C57BL/6 F1		**Duration of Dosing**: Once weekly (total of 8 doses)			**Study No.:** [AS1-DSM16-003] **CTD Location:** 4.2.3.4.2-1		
Initial Age: 7–8 weeks		**Method of Administration:** SC			**GLP Compliance:** No		
Date of First Dose: 14 January 2016		**Vehicle/Formulation:** 0.9% NaCl					
		Treatment of Controls: 0.9% NaCl					
Basis for High-Dose Selection: maximum tolerated dose							
Special Features: None							
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals: **Main** **Toxicokinetics**	 5 -	 5 -	 5 6	 5 -	 5 12	 5 -	 5 -	 5 -
Toxicokinetics: Plasma (Males Only; Day 50) [a]								
T_{max} (h)	NA	NA	0.5	NA	0.5	NA	NA	NA
C_{max} (µg/mL)	NA	NA	7.576	NA	28.746	NA	NA	NA
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	NA	NA	NC	NA	68.984	NA	NA	NA
$t_{1/2}$ (h)	NA	NA	NC	NA	NC	NA	NA	NA
Toxicokinetics: Liver Exposure (Males Only; Day 50) [a]								
T_{max} (h)	NA	NA	NC	NA	6.0	NA	NA	NA
C_{max} (µg/g)	NA	NA	NC	NA	283	NA	NA	NA
AUC_{0-t} (µg·h/g)	NA	NA	NC	NA	5530	NA	NA	NA
$t_{1/2}$ (h)	NA	NA	NC	NA	22.4	NA	NA	NA

表 2.6.7.10-1 近交系ハイブリッドマウス（BALB/cBy × C57BL/6 F1）を用いたギボシランの 8 週間反復皮下投与毒性試験（続き）

Report Title: An 8-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity Study of ALN-AS1 in the Inbred Hybrid Mouse (BALB/cBy × C57BL/6 F1)					**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: BALB/cBy × C57BL/6 F1		**Duration of Dosing**: Once weekly (total of 8 doses)			**Study No.:** [AS1-DSM16-003] **CTD Location:** 4.2.3.4.2-1			
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals:								
Main	5	5	5	5	5	5	5	5
Toxicokinetics	NA	NA	6	NA	12	NA	NA	NA
Toxicokinetics: Kidney Exposure (Males Only; Day 50) [a]								
T_{max} (h)	NA	NA	0.5	NA	0.5	NA	NA	NA
C_{max} (µg/g)	NA	NA	16.1	NA	116	NA	NA	NA
$AUC_{0\text{-}t}$ (µg·h/g)	NA	NA	NC	NA	1310	NA	NA	NA
$t_{1/2}$ (h)	NA	NA	NC	NA	22.4	NA	NA	NA
Number of Animals [b]								
At Start	5	5	11	5	17	5	5	5
Died/Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-	-	-	-
Terminal Sacrifice	5	5	11	5	17	5	5	5
Survival (100%)	100	100	100	100	100	100	100	100
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)	35.4 g	22.29 g	-4.4	-1.2	10.4	-5.4	-9.4	+0.6
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7.10-1 近交系ハイブリッドマウス（BALB/cBy × C57BL/6 F1）を用いたギボシランの 8 週間反復皮下投与毒性試験（続き）

Report Title: An 8-Week Repeat Dose Subcutaneous Injection Toxicity Study of ALN-AS1 in the Inbred Hybrid Mouse (BALB/cBy × C57BL/6 F1)						**Test Article:** Givosiran		
Species/Strain: BALB/cBy × C57BL/6 F1		**Duration of Dosing**: Once weekly (total of 8 doses)				**Study No.:** [AS1-DSM16-003] **CTD Location:** 4.2.3.4.2-1		
Noteworthy Findings:								
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology [c]								
Injection Site, Last:								
Vacuolated Macrophage								
Minimal	0	0	0	1	0	4	3	5
Mild	0	0	0	0	0	1	0	0

Abbreviations: - = no noteworthy findings; AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration estimated; C_{max} = maximum observed concentration occurring at T_{max}; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NA = not applicable; NC = not calculated; SC = subcutaneous; $t_{1/2}$ = elimination half-life; TK = toxicokinetic; T_{max} = time to reach maximal concentration.

a: TK samples were only collected from males at 30 and 100 mg/kg.

b: Reflects total number of animals (main study+toxicokinetic) per sex per group.

c: Numbers presented as number of animals in each group with findings.

表 2.6.7.10-2 001178-W Tg-rasH2（野生型）マウスを用いたギボシランの 8 週間皮下投与用量設定毒性試験及びトキシコキネティクス試験

Report Title: ALN-AS1: An 8-Week Dose Range-Finding Subcutaneous Administration Toxicity and Toxicokinetic Study in 001178-W (Wild Type) rasH2 Mice					**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: 001178-W Tg-rasH2 Wild-Type Mice		**Duration of Dosing**: Once monthly for 8 weeks (total of 3 doses)			**Study No.:** [AS1-GLP17-006] **CTD Location:** 4.2.3.4.2-2			
Initial Age: 9 weeks		**Method of Administration:** SC			**GLP Compliance:** No			
Date of First Dose: 27 September 2017		**Vehicle/Formulation:** 0.9% NaCl						
		Treatment of Controls: 0.9% NaCl						
Basis for High-Dose Selection: limit dose for rodent carcinogenicity studies per ICH S1C(R2)								
Special Features: None								
Monthly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**500**		**1000**		**1500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals:								
Main	10	10	10	10	10	10	10	10
Toxicokinetics	6	6	18	18	18	18	18	18
ADA [a]	3	3	3	3	3	3	3	3
Toxicokinetics: Plasma (Day 57) [b]								
T_{max} (h)	NA		1.0		1.0		1.0	
C_{max} (µg/mL)	NA		155		231		311	
$AUC_{0\text{-}24}$ (µg·h/mL)	NA		594		1110		1800	
$t_{1/2}$ (h)	NA		2.0		2.1		2.4	
Liver Exposure (Day 58) [b] **(No. Animals Examined)**	NA		(3M+3F)/6		(3M+3F)/6		(3M+3F)/6	
Overall Combined (M+F) Mean (±SD) Givosiran (ALN-60519) Concentrations (µg/g)	NA		278		391		521	
Overall Combined Mean (±SD) AD-62763 Concentrations (µg/g)	NA		94.1		113		138	

表 2.6.7.10-2 001178-W Tg-rasH2（野生型）マウスを用いたギボシランの 8 週間皮下投与用量設定毒性試験及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: An 8-Week Dose Range-Finding Subcutaneous Administration Toxicity and Toxicokinetic Study in 001178-W (Wild Type) rasH2 Mice						**Test Article:** Givosiran		
Species/Strain: 001178-W Tg-rasH2 Wild-Type Mice		**Duration of Dosing**: Once monthly for 8 weeks (total of 3 doses)				**Study No.:** [AS1-GLP17-006] **CTD Location:** 4.2.3.4.2-2		
Monthly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**500**		**1000**		**1500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals [c]								
At Start	19	19	31	31	31	31	31	31
Died/Sacrificed Moribund	-	-	-	-	1 [d]	-	-	-
Terminal Sacrifice	19	19	31	31	31	31	31	31
Survival (%)	100	100	100	100	96.8	100	100	100
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7.10-2 001178-W Tg-rasH2（野生型）マウスを用いたギボシランの 8 週間皮下投与用量設定毒性試験及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: An 8-Week Dose Range-Finding Subcutaneous Administration Toxicity and Toxicokinetic Study in 001178-W (Wild Type) rasH2 Mice					**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: 001178-W Tg-rasH2 Wild-Type Mice		**Duration of Dosing**: Once monthly for 8 weeks (total of 3 doses)			**Study No.:** [AS1-GLP17-006] **CTD Location:** 4.2.3.4.2-2			
Monthly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**500**		**1000**		**1500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals:								
Main	10	10	10	10	10	10	10	10
Toxicokinetics	6	6	18	18	18	18	18	18
ADA [a]	3	3	3	3	3	3	3	3
Noteworthy Findings:								
Histopathology – Non-Neoplastic Lesions (No. Examined) [e]	10	10	10	10	9	10	10	10
Injection Site:								
Vacuolated Macrophage								
Minimal	-	-	6	7	5	8	10	10
Lymph Node, Axillary:								
Vacuolated Macrophage								
Minimal	-	-	0	0	4	0	7	4

Abbreviations: - = no noteworthy findings; ADA = anti-drug antibody; AUC_{0-24} = area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max} = maximum observed concentration occurring at T_{max}; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NA = not applicable; SC = subcutaneous; $t_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to reach maximal concentration.

a: Serum samples collected for possible ADA analysis from ADA-designated animals were discarded, as ADA analysis was not performed.

b: Values represent overall (combined male+female) means.

c: Reflects total number of animals (main study+toxicokinetic+ADA) per sex per group.

d: One main study male was found dead on Day 29. Clinical signs noted prior to the animal's death included decreased activity and sustained convulsions. There were no givosiran-related gross necropsy or histopathology findings noted in this animal and the cause of death remained undetermined.

e: Numbers presented as number of animals in each group with findings.

表 2.6.7.10-3 Tg-rasH2 マウスを用いた 26 週間皮下投与がん原性試験

Report Title: ALN-AS1: A 26-Week Subcutaneous Injection Carcinogenicity Study in Tg-rasH2 Mice							**Test Article:** Givosiran		
Species/Strain: Mouse / Hemizygous rasH2 [CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic Hemizygous]		**Duration of Dosing:** Groups 1 to 4: Every 28 days for 26 weeks (total of 7 doses) Group 5: Single dose on Day 1					**Study No.:** [AS1-GLP17-004] **CTD Location:** 4.2.3.4.2-3		
Initial Age: 9 weeks		**Method of Administration:** Groups 1 to 4: Subcutaneous injection Group 5: Intraperitoneal injection					**GLP Compliance:** Yes		
Date of First Dose: 30 July 2018		**Vehicle/Formulation:** 0.9% NaCl							
		Treatment of Controls: 0.9% NaCl							
		Positive Control (Group 5): *N*-Methyl-*N*-Nitrosourea (MNU) in citrate buffer saline, pH 4.5 (59 mmol/L sodium citrate tribasic dihydrate, 41 mmol/L citric acid, 154 mmol/L sodium chloride)							
Basis for High-Dose Selection: limit dose for rodent carcinogenicity studies per ICH S1C(R2)									
Non-Carcinogenic Level: ≤ 1500 mg/kg/month									
Special Features: None									
Monthly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**150**		**500**		**1500**		**75 (MNU)**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals: **Main** **Toxicokinetics**	 25 4	 25 4	 25 20	 25 20	 25 20	 25 20	 25 20	 25 20	 25 N/A	 25 N/A
Toxicokinetics: Plasma (Day 1) [a]										
T_{max} (h)	N/A		1.0		1.0		1.0		N/A	
C_{max} (µg/mL)	N/A		41.3		115		362		N/A	
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	N/A		112		418		1680		N/A	
Toxicokinetics: Plasma (Day 169) [a]										
T_{max} (h)	N/A		1.0		1.0		1.0		N/A	
C_{max} (µg/mL)	N/A		45.4		117		242		N/A	
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	N/A		110		383		1420		N/A	

表 2.6.7.10-3 Tg-rasH2 マウスを用いた 26 週間皮下投与がん原性試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: A 26-Week Subcutaneous Injection Carcinogenicity Study in Tg-rasH2 Mice							**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Mouse / Hemizygous rasH2 [CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic Hemizygous]		**Duration of Dosing:** Groups 1 to 4: Every 28 days for 26 weeks (total of 7 doses) Group 5: Single dose on Day 1					**Study No.:** [AS1-GLP17-004] **CTD Location:** 4.2.3.4.2-3			
Monthly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**150**		**500**		**1500**		**74 (MNU)**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Noteworthy Findings										
Died or Euthanized Moribund	2	1	1	2	0	0	1	2	21	25
Survival Rate (%)	92	96	96	92	100	100	96	92	16	0
Body Weight (%) [a] **Day 182**	41.83 g	-	-11 A	-	-14 A	-	-22 A	-	-29 A	N/A
Body Weight Gains (g) [b] Day -1 to 182	15.64 g	-	-27 A	-	-33 A	-	-59 A	-	-80 A	N/A
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No. of Mice with Palpable Masses	0	0	1	0	0	0	0	0	3	2
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology [c]										
Givosiran-related, non-neoplastic										
Injection site (No. Examined)	25	25	25	25	25	25	25	25	0	0
Vacuolation; macrophage										
Minimal	0	0	12	10	19	17	19	20	N/A	N/A
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0	N/A	N/A
Lymph node, axillary (No. Examined)	24	25	23	25	25	25	25	24	0	0
Vacuolation; macrophage										
Minimal	0	0	0	0	3	0	13	5	N/A	N/A

表 2.6.7.10-3 Tg-rasH2 マウスを用いた 26 週間皮下投与がん原性試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: A 26-Week Subcutaneous Injection Carcinogenicity Study in Tg-rasH2 Mice							**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Mouse / Hemizygous rasH2 [CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic Hemizygous]		**Duration of Dosing:** Groups 1 to 4: Every 28 days for 26 weeks (total of 7 doses) Group 5: Single dose on Day 1					**Study No.:** [AS1-GLP17-004] **CTD Location:** 4.2.3.4.2-3			
Neoplastic Findings										
Hemolymphoreticular tissue	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Lymphoma, malignant	1	0	0	0	0	0	0	0	22	23
Stomach	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Squamous cell papilloma	0	0	0	0	0	0	0	0	23	22
Squamous cell carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0	5	3
Lungs	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Bronchioalveolar adenoma	0	2	1	1	0	1	2	2	5	3
Bronchioalveolar carcinoma	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Skin	25	25	25	25	25	25	25	25	24	25
Squamous cell papilloma	1	0	0	0	0	0	0	0	3	2
Squamous cell carcinoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
Small intestine (duodenum, jejunum, ileum)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Adenoma	0	0	1	0	0	0	0	0	3	3
Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Spleen	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Hemangioma	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Hemangiosarcoma	0	0	2	2	1	0	0	0	0	1

表 2.6.7.10-3 Tg-rasH2 マウスを用いた 26 週間皮下投与がん原性試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: A 26-Week Subcutaneous Injection Carcinogenicity Study in Tg-rasH2 Mice							**Test Article:** Givosiran			
Species/Strain: Mouse / Hemizygous rasH2 [CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic Hemizygous]		**Duration of Dosing:** Groups 1 to 4: Every 28 days for 26 weeks (total of 7 doses) Group 5: Single dose on Day 1					**Study No.:** [AS1-GLP17-004] **CTD Location:** 4.2.3.4.2-3			
Harderian glands	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Adenoma	1	0	0	0	2	0	0	1	3	3
Adenocarcinoma	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Abbreviations: - = no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 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; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; MNU = *N*-Methyl-*N*-Nitrosourea; N/A = not applicable; No. = Number; T_{max} = time to reach maximal concentration.

a: Values represent overall (combined male+female) means.

b: For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on percent differences).

c: Incidence is presented.

Significantly different from control group 1 value : A - $P \leq 0.001$ (Dunnett)

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

表 2.6.7.11-1 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Nonpivotal Studies					**Test Article:** Givosiran	
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses (mg/kg)**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat, Sprague Dawley	SC/0.9% NaCl	4 times before cohabitation (22, 15,8 and 1 day); Daily (DG 6 – DG 17)	PG: 0, 10, 30, 100; DG: 0, 1.5, 5 and 16.5	24	**100/16.5 mg/kg:** Mortality – 3 deaths attributed to givosiran, transient body weight loss, and reduced food consumption; clinical chemistry changes for ALT and AST **100/16.5 and 30/5 mg/kg:** Clinical chemistry changes for ALT and AST **Plasma TK on DG 17 at 10/1.5, 30/5, 100/16.5 PG/DG, respectively:** T_{max} = 2.0, 1.0, 1.0 h C_{max} = 0.0587, 0.183, 0.770 µg/mL $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 0.306, 1.460, 10.003 µg·h/mL $t_{1/2}$ = NR, 6.63, 5.22 h **Mean maternal givosiran liver concentration on DG 0/18 at 10/1.5, 30/5, 100/16.5 PG/DG, respectively (n = 4/group):** 63.9/32.5, 164/149, 421/512 µg/g **Mean givosiran placenta concentration on DG 18 at 10/1.5, 30/5, 100/16.5 PG/DG (n = 6, 6, and 4), respectively:** NQ, NQ, 0.293 µg/g **Mean givosiran fetal concentration on DG 18 at 10/1.5, 30/5, 100/16.5 PG/DG (n = 30, 30, and 20), respectively:** NQ, NQ, NQ	[AS1-DSM15-041]

表 2.6.7.11-1 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Nonpivotal Studies					**Test Article:** Givosiran	
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses (mg/kg)**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rabbits	SC/0.9% NaCl	DG 7–19	0, 3, 10, 30	5	**30 mg/kg/day** 1 Abortion and euthanized. **≥10 mg/kg/day:** Maternal body weight losses or reduced maternal body weight gains at all dose levels; reduced food consumption. **≥3 mg/kg/day:** Increased number of early resorption and corresponding increase in postimplantation loss. **Plasma TK on DG7/19 at 3, 10, 30 mg/kg, respectively:** T_{max} [a] = 1.0/1.0, 1.0/1.0, 2.0/2.0 h C_{max} = 0.207/0.172, 0.791/0.515, 4.853/4.520 µg/mL $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 1.032/0.864, 4.036/3.422, 27.419/29.634 µg·h/mL $t_{1/2}$ = NR/NR, NR/NR, NR/16.7[b] h t_{last} = 8/8, 8/8, 8/72 h **Mean maternal givosiran liver concentration on DG 29 at 3, 10, 30 mg/kg, respectively (n = 4-5/group):** 84.3, 894, 4409 µg/g **Mean givosiran placenta concentration on DG 29 at 3, 10, 30 mg/kg (n = 16, 34, and 9), respectively:** NQ, NQ, 442 ng/g	[AS1-DSM16-012]

Abbreviations: ALP = alkaline phosphatase; ALT = alanine amino transferase; AST = aspartate aminotransferase; $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 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}; DG = days of presumed gestation; NQ = not quantifiable (below the lower limit of quantitation); NR = not reportable – insufficient values to calculate parameter; PG = prior to gestation; SC = subcutaneous; $t_{1/2}$ = elimination half-life; TK = toxicokinetics; T_{max} = time to reach maximal concentration.

a: Median value.

b: n = 2.

2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

表 2.6.7.12-1 ラットの受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験

Report Title: ALN-AS1: A Subcutaneous Injection Fertility and Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats				**Test Article:** Givosiran
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD) Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:** Female rats were dosed 4 times (QW) before cohabitation (22, 15, 8, and 1 day before cohabitation [Days 1, 8, 15, and 22) at 0, 3, 10 and 30 mg/kg. From DG 6 through DG 17, animals were dosed daily at 0, 0.5, 1.5, and 5 mg/kg/day.			**Study No.:** [AS1-GLP16-011] **CTD Location:** 4.2.3.5.1-2
Initial Age: 65 days	**Day of Mating:** Day 0			
Date of First Dose: 16 May 2016	**Day of C-Section**: Day 21 of gestation			**GLP Compliance:** Yes
Special Features: Toxicokinetics	**Method of Administration:** SC injection			
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 3/0.5 mg/kg; F_1 Litters: 30/5 mg/kg		**Vehicle/Formulation:** 0.9% NaCl for Injection		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**3/0.5**	**10/1.5**	**30/5**
F_0 Females (No. Evaluated)	24	24	24	24
Plasma TK (DG 17): No. Evaluated	NA	9	9	9
T_{max} (h)	NA	NR	NR	0.5
C_{max} (µg/mL)	NA	NR	NR	0.340
AUC_{0-24} (µg·h/mL)	NA	NR	NR	1.64
Apparent $t_{1/2}$ (h)	NA	NR	NR	4.0
Maternal liver concentration (No. Evaluated)	3	8	9	9
Mean maternal liver givosiran concentration (µg/g) (DG 18)	NA	23.5	133	347
Placenta concentration (No. Evaluated)	26	69	115	114
Mean placenta givosiran concentration (µg/g) (DG 18)	NA	NQ	NQ	0.388
Fetal concentration (No. Evaluated)	10	25	41	40
Mean fetal givosiran concentration (µg/g) (DG 18)	NA	NQ	NQ	NQ

表 2.6.7.12-1 ラットの受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: A Subcutaneous Injection Fertility and Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats		**Test Article:** Givosiran
Species/Strain: Rat/ Crl:CD(SD) Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:** Female rats were dosed 4 times (QW) before cohabitation (22, 15, 8, and 1 day before cohabitation [Days 1, 8, 15, and 22) at 0, 3, 10 and 30 mg/kg. From DG 6 through DG 17, animals were dosed daily at 0, 0.5, 1.5, and 5 mg/kg/day.	**Study No.:** [AS1-GLP16-011] **CTD Location:** 4.2.3.5.1-2

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**3/0.5**	**10/1.5**	**30/5**
F_0 Females (No. Evaluated)	24	24	24	24
No. Died or Sacrificed Moribund	1 [a]	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Premating Body Weight, Day 22 (g, %) [b]	271.0	+0.2	+1.0	+1.6
Gestation Body Weight, DG 20 (g, %) [b]	403.0	+0.6	+3.0	+4.2
Premating Food Consumption (g, %) [b]	40.8	+2.0	-2.2	-0.5
Gestation Food Consumption (g, %) [b]	25.7	-1.2	+0.4	+0.4
Mean No. Estrous Cycles/22 days	5.4	5.3	5.2	5.1
Mean No. Days Prior to Mating	1.9	2.5	2.4	2.8
No. of Females Sperm Positive	24	23	24	24
No. of Pregnant Females	17	18	21	18
No. Aborted or With Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Mean No. Corpora Lutea	14.6	16.5	15.0	15.5
Mean No. Implantations	12.7	13.2	13.6	13.7
Mean % Preimplantation Loss	13.8	17.0	10.4	17.4
Hematology (DG 21)	-	-	-	-
Coagulation (DG 21)	-	-	-	-

表 2.6.7.12-1 ラットの受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: A Subcutaneous Injection Fertility and Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats				**Test Article:** Givosiran
Species/Strain: Rat/ Crl:CD(SD) Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:** Female rats were dosed 4 times (QW) before cohabitation (22, 15, 8, and 1 day before cohabitation [Days 1, 8, 15, and 22) at 0, 3, 10 and 30 mg/kg. From DG 6 through DG 17, animals were dosed daily at 0, 0.5, 1.5, and 5 mg/kg/day.			**Study No.:** [AS1-GLP16-011] **CTD Location:** 4.2.3.5.1-2
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**3/0.5**	**10/1.5**	**30/5**
F_0 Females (No. Evaluated)	24	24	24	24
Clinical Chemistry (DG 21)				
AST (U/L)	65.22	76.14	85.96*	108.33***
ALT (U/L)	43.83	50.14	50.79	55.75***
ALP (U/L)	50.30	46.64	45.63	66.38
Potassium (mEq/L)	3.70	3.93	4.00*	4.10**
Triglycerides (mg/dL)	236.96	339.09	459.83*	614.50*
Phosphorous (mg/dL)	5.08	5.20	5.39	5.69*
Albumin (g/dL)	2.80	2.68	2.48	2.30*
Albumin:Globulin Ratio	1.21	1.14	1.12	1.04***
F_1 Litters (No. Litters Evaluated)	17	17	20	18
No. Live Fetuses	12.2	12.1	13.2	13.3
Mean No. Resorptions	0.5	1.1	0.4	0.4
No. of Litters With Dead Fetuses	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	3.3	8.1	7.3	3.8
Mean Fetal Body Weight (g)	5.51	5.47	5.38	5.38
Fetal Sex Ratios (% males)	49.2	54.6	44.1	42.8

表 2.6.7.12-1 ラットの受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: A Subcutaneous Injection Fertility and Embryo-Fetal Development Study in Sprague Dawley Rats				**Test Article:** Givosiran
Species/Strain: Rat/ Crl:CD(SD) Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:** Female rats were dosed 4 times (QW) before cohabitation (22, 15, 8, and 1 day before cohabitation [Days 1, 8, 15, and 22) at 0, 3, 10 and 30 mg/kg. From DG 6 through DG 17, animals were dosed daily at 0, 0.5, 1.5, and 5 mg/kg/day.			**Study No.:** [AS1-GLP16-011] **CTD Location:** 4.2.3.5.1-2
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**3/0.5**	**10/1.5**	**30/5**
Fetal Anomalies				
Gross External	-	-	-	-
Visceral Anomalies	-	-	-	-
Skeletal Anomalies				
Incompletely Ossified Pubes				
No. Fetuses (%)	0	0	0	2.4
No. Litters (%)	0	0	0	16.7
Fetal Ossification Site Averages	-	-	-	-

Abbreviations: - = no noteworthy findings; ALP = alkaline phosphatase; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; AUC_{0-24} = area under the concentration-time curve from the time 0 to 24 hours postdose; C_{max} = maximum observed concentration occurring at T_{max}; DG = days of presumed gestation; GLP = Good Laboratory Practice; NA = not applicable; NQ = not quantifiable; NR = not reportable – insufficient values to calculate parameter; QW = once weekly; SC = subcutaneous; $t_{1/2}$ = elimination half-life; TK = toxicokinetics; T_{max} = time to reach maximal concentration.

Note: * = p≤0.05; ** = p≤0.01; *** = p≤0.001. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

a: One animal in the control group was euthanized on DG 18 due to an apparent leg injury.

b: At end of premating or gestation period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

表 2.6.7.13-1 ウサギの胚・胎児発生に関する皮下投与試験

Report Title: ALN-AS1: An Embryo-Fetal Development Study by Subcutaneous Injection in Rabbits				**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Rabbit/New Zealand white	**Duration of Dosing:** Once daily from DG 7 through DG 19 (Groups 1 to 4); once on DG 7 (Group 5)			**Study No.:** [AS1-GLP16-018] **CTD Location:** 4.2.3.5.2-2	
Design similar to ICH 4.1.3: Yes	**Day of Mating:** Day 0			**GLP Compliance:** Yes	
Initial Age: 4-6 months	**Day of C-Section:** Day 29 of gestation				
Date of First Dose: 25 July 2016	**Method of Administration:** SC Injection				
Special Features: Toxicokinetics and Pharmacodynamics				**Vehicle/Formulation:** 0.9% NaCl	
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: Could not be determined; F_1 Litters: 0.5 mg/kg/day					
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**0.5**	**1.5**	**5**	**20**
Dams/Does (No. of Main Study Animals)	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Plasma Toxicokinetics (No. of Animals)	2	3	3	3	3
T_{max} (h)					
DG 7	NA	NC	1.7	2.0	1.5
DG 19	NA	NC	1.3	1.5	NC
C_{max} (μg/mL)					
DG 7	NA	NC	0.0996	0.453	2.99
DG 19	NA	NC	0.0940	0.443	NA
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·h/mL)					
DG 7	NA	NC	NA	2.24	13.5
DG 19	NA	NC	NA	2.20	NA
$t_{1/2}$ (h)					
DG 7	NR	NR	NR	NR	NR
DG 19	NR	NR	NR	NR	NR

表 2.6.7.13-1 ウサギの胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: An Embryo-Fetal Development Study by Subcutaneous Injection in Rabbits				**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Rabbit/New Zealand white	**Duration of Dosing:** Once daily from DG 7 through DG 19 (Groups 1 to 4); once on DG 7 (Group 5)			**Study No.:** [AS1-GLP16-018] **CTD Location:** 4.2.3.5.2-2	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**0.5**	**1.5**	**5**	**20**
Dams/Does (No. of Main Study Animals)	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Liver Exposure (DG 22) (No. of Animals)	2	3	3	3	3
Mean Maternal Liver Givosiran Concentration (µg/g)	NA	7.47	64.6	562	4.51
Placental and Fetal Exposure (DG 22) (No. Evaluated)	16	16	19	19	19
Mean Placentae Givosiran Concentration	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
Mean Fetal Givosiran Concentration	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
Pharmacodynamics	-	-	-	-	-
No. Pregnant	18	18	19	19	19
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0
No. Aborted or With Total Resorption of Litter	0	0	0	1[a]	2[a]
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Necropsy Observations					
Tan, multifocal discoloration of the liver	0	1	5	11	0
Body Weight Changes DG 7 to 20 (g, %)[b]	216.3	-73.2*	-90.1*	-133.8**	-121.4**
Food Consumption DG 7 to 20 (%)[b]	153.7	-23.3	-24.5	-31.4	-25.8

表 2.6.7.13-1 ウサギの胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: An Embryo-Fetal Development Study by Subcutaneous Injection in Rabbits				**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Rabbit/New Zealand white	**Duration of Dosing:** Once daily from DG 7 through DG 19 (Groups 1 to 4); once on DG 7 (Group 5)			**Study No.:** [AS1-GLP16-018] **CTD Location:** 4.2.3.5.2-2	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**0.5**	**1.5**	**5**	**20**
Dams/Does (No. of Main Study Animals)	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Hematology					
Red blood cells (10^6 cells/µL)	6.35	5.72*	5.72*	5.40**	5.97
Hemoglobin (g/dL)	13.52	12.08**	11.85**	11.28**	12.77
Hematocrit (%)	42.11	38.16*	38.05*	36.01**	40.26
Monocytes (10^3 cells/µL)	0.12	0.12	0.28**	0.30**	0.11
Platelets (10^3 cells/µL)	260.29	376.12	372.20	438.35**	316.06
Reticulocytes (10^9 cells/L)	77.13	87.68	138.31	172.22*	156.02
Coagulation					
Fibrinogen (mg/dL)	203.50	258.89	272.64	377.73**	241.83
Clinical Chemistry					
AST (U/L)	16.00	17.30	18.95	37.26**	14.17
ALT (U/L)	12.30	11.55	17.20	37.32*	14.00
Mean No. Corpora Lutea	11.06	10.89	10.58	9.89	10.29
Mean No. Implantations	11.06	10.89	10.58	9.72	10.29
Mean % Preimplantation Loss	0	0	0	2.4	0

表 2.6.7.13-1 ウサギの胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: An Embryo-Fetal Development Study by Subcutaneous Injection in Rabbits				**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Rabbit/New Zealand white	**Duration of Dosing:** Once daily from DG 7 through DG 19 (Groups 1 to 4); once on DG 7 (Group 5)			**Study No.:** [AS1-GLP16-018] **CTD Location:** 4.2.3.5.2-2	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**0.5**	**1.5**	**5**	**20**
Litters (No. Litters Evaluated)	18	18	19	18	17
No. Live Fetuses	10.67	10.06	8.79	6.78*	6.29**
Mean No. Resorptions	0.33	0.78	1.79	2.94**	4.00**
No. of Litters with Dead Fetuses	1	1	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	3.9	8.0	16.2	35.4**	39.3**
Mean Fetal Body Weight (g)	39.619	37.424	36.958	38.160	39.094
Fetal Sex Ratios (% males)	50.1	49.0	39.4	44.9	45.5
Fetal Anomalies					
Gross External	-	-	-	-	-
Visceral Anomalies	-	-	-	-	-
Skeletal Anomalies					
Asymmetric Sternebrae					
No. Fetuses (%)	1 (0.5)	2 (1.1)	1 (0.6)	0 (0)	5 (4.7)
No. Litters (%)	1 (5.6)	2 (11.1)	1 (5.9)	0 (0)	4 (28.6)
Isolated Ossification Site of Sternebrae					
No. Fetuses (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (4.7)
No. Litters (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (21.4)
Sternebrae, Misshapen					
No. Fetuses (%)	2 (1.0)	1 (0.6)	1 (0.6)	0 (0)	6 (5.6)
No. Litters (%)	2 (11.1)	1 (5.6)	1 (5.9)	0 (0)	3 (21.4)

表 2.6.7.13-1 ウサギの胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Report Title: ALN-AS1: An Embryo-Fetal Development Study by Subcutaneous Injection in Rabbits				**Test Article:** Givosiran	
Species/Strain: Rabbit/New Zealand white	**Duration of Dosing:** Once daily from DG 7 through DG 19 (Groups 1 to 4); once on DG 7 (Group 5)			**Study No.:** [AS1-GLP16-018] **CTD Location:** 4.2.3.5.2-2	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**0.5**	**1.5**	**5**	**20**
Litters (No. Litters Evaluated)	18	18	19	18	17
Ossification Sites	-	-	-	-	-
Total Affected Fetuses (Litters)	-	-	-	-	-

Abbreviations: - = no noteworthy findings; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; $AUC_{0\text{-}t(last)}$ = 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}; DG = days of presumed gestation; GLP = Good Laboratory Practice; LLOQ = lower limit of quantitation; NA = not applicable; NC = not calculated; NR = not reportable – insufficient values to calculate parameter; SC = subcutaneous; $t_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to reach maximal concentration.

Note: * = p≤0.05, ** = p≤0.01.

a: One female in the 5-mg/kg/day dose group aborted on DG 24 and was euthanized, and 2 females in the 20-mg/kg dose group aborted on DG 20 and 24 and were euthanized. The abortions were considered related to givosiran.

b: For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

表 2.6.7.14-1 ラットの周産期及び出生後の発生並びに出生後の行動／機能評価に関する皮下投与生殖毒性試験

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
Species/Strain: Rat/ Crl:CD(SD) Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** Female rats were dosed on DGs 7, 13, and 19, and on LDs 6, 12, and 18			**Study No.** [AS1-GLP17-009] **CTD Location:** 4.2.3.5.3-1
Initial Age: 62 to 76 days of age upon arrival	**Day of Mating:** Day 0			**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 30 October 2017	**Method of Administration:** SC injection			
Special Features: Bioanalytical/Milk Analysis	**Vehicle/Formulation:** 0.9% NaCl for Injection, USP			
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 30 mg/kg; F_1 Males: 30 mg/kg; F_1 Females: 30 mg/kg				

Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**3**	**10**	**30**
F_0 Females	Bioanalysis: LD 12 (2 Hours Postdose)				
	Givosiran				
	Plasma Concentration (ng/mL)	NA	95.5	435	2712
	Milk Concentration (ng/mL)	NA	BLQ	BLQ	BLQ [a]
	No. Pregnant	19	20	19	19
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Gestation Body Weight (g, %) [b]	364.9	+1.9	+1.0	+3.0
	Lactation Body Weight (g, %) [b]	321.6	+1.4	+0.8	+3.7
	Gestation Food Consumption DG 7 to 18 (g/day, %) [b]	50.1	+4.2	-2.8	-5.2
	Lactation Food Consumption (g/day, %) [b]	54.9	-1.5	-2.2	+1.6
	Mean Duration of Gestation (days)	22.4	22.4	22.3	22.6
	Abnormal Parturition	-	-	-	-
	Organ Weights	-	-	-	-

表 2.6.7.14-1 ラットの周産期及び出生後の発生並びに出生後の行動／機能評価に関する皮下投与生殖毒性試験（続き）

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
Species/Strain: Rat/ Crl:CD(SD) Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** Female rats were dosed on DGs 7, 13, and 19, and on LDs 6, 12, and 18	**Study No.** [AS1-GLP17-009] **CTD Location:** 4.2.3.5.3-1

Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**3**	**10**	**30**
F_1 Litters (Preweaning)	No. Litters Evaluated	19	20	19	19
	Mean No. of Implantations	13.4	13.5	13.4	13.3
	Mean No. Pups/Litter	12.5	12.6	12.5	12.5
	Mean No. Liveborn Pups/Litter	12.4	12.4	12.4	12.3
	Mean No. Stillborn Pups/Litter	0.1	0.2	0.1	0.3
	Postnatal Survival to Day 4	98.7	98.8	99.6	99.1
	Postnatal Survival to Weaning	99.6	99.6	99.6	100
	No. of Total Litters Losses	0	0	0	0
	Pup Body Weights PND 21 (g, %) [c]	44.4	-1.1	-0.4	+2.0
	Pup Sex Ratios (% males)	45.2	56.6	48.9	45.5
	Pup Clinical Signs	-	-	-	-
	Pup Necropsy Observations	-	-	-	-
F_1 Males (Postweaning)	No. Evaluated	22	22	22	22
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	1 [d]	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Body Weight Change (g, %) [e]	492.3	-0.2	-0.3	+3.6
	Food Consumption (g/day, %) [f]	57.2	-2.6	-2.4	-0.2
	Day of Preputial Separation	42.3	43.8	44.0**	44.0
	Passive Avoidance	-	-	-	-
	Watermaze	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	2.5	2.6	2.5	3.0
	No. of Males that Mated	22	21	21	20
	No. of Fertile Males	22	20	20	20
	Organ Weights	-	-	-	-

表 2.6.7.14-1 ラットの周産期及び出生後の発生並びに出生後の行動／機能評価に関する皮下投与生殖毒性試験（続き）

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
Species/Strain: Rat/ Crl:CD(SD) Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** Female rats were dosed on DGs 7, 13, and 19, and on LDs 6, 12, and 18	**Study No.** [AS1-GLP17-009] **CTD Location:** 4.2.3.5.3-1

Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**3**	**10**	**30**
F_1 Females (Postweaning)	No. Evaluated	22	22	22	22
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	1 [g]	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Premating Body Weight (g, %) [h]	295.1	-1.3	-4.9	+0.7
	Gestation Body Weight (g, %) [h]	366.0	-2.6	-4.0	+0.4
	Premating Food Consumption (g, %) [h]	39.8	+3.5	+1.3	+6.5
	Gestation Food Consumption (g, %) [h]	26.9	-5.6	-5.6	+2.2
	Mean Age of Vaginal Patency (days)	32.1	32.0	32.2	32.2
	Passive Avoidance	-	-	-	-
	Watermaze	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	2.5	2.4	2.5	2.6
	No. of Females Sperm Positive	22	22	22	21
	No. of Pregnant Females	22	21	21	21
	Organ Weights	-	-	-	-
	Mean No. Corpora Lutea	18.7	16.6	17.6	18.0
	Mean No. Implantations	17.5	15.8	15.9	16.6
	Mean % Preimplantation Loss	5.8	6.6	8.1	8.3

表 2.6.7.14-1 ラットの周産期及び出生後の発生並びに出生後の行動／機能評価に関する皮下投与生殖毒性試験（続き）

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
Species/Strain: Rat/ Crl:CD(SD) Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** Female rats were dosed on DGs 7, 13, and 19, and on LDs 6, 12, and 18			**Study No.** [AS1-GLP17-009] **CTD Location:** 4.2.3.5.3-1
Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**3**	**10**	**30**
F_2 Litters:	Mean No. Viable Embryos/Litter	16.7	15.0	15.1	15.4
	Mean No. Nonviable Embryos/Litter	0.8	0.7	0.8	1.2
	Mean % Postimplantation Loss	4.5	5.5	5.0	7.0

Abbreviations: - = no noteworthy findings; BLQ = below the lower limit of quantitation; DG = day of presumed gestation; GLP = Good Laboratory Practice; LD = lactation day; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; SC = subcutaneous; USP = United States Pharmacopeia.

Note: Significantly different from control (vehicle) group value: ** = $p<0.01$.

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

b: At end of gestation or lactation. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

c: For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

d: Male 2451 (10 mg/kg) was found dead on Day 87 postpartum. This rat had no clinical signs before death. Body weights and food consumption were unremarkable. The testes, epididymides, and skin in the pelvic region were missing and presumed cannibalized; all other tissues appeared normal at necropsy. The cause of death for this rat was unknown; however, the death was considered unrelated to givosiran because it was not dose dependent.

e: From weaning to mating. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

f: At the end of postweaning period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

g: Female 2546 (10 mg/kg) was found dead on DG 2. This rat had no clinical signs before death. Body weights and food consumption were unremarkable. There were no abnormalities detected at necropsy examination. This rat was confirmed mated, but pregnancy status could not be determined due to early gestational age. The cause of death for this rat could not be determined; however, the death was considered unrelated to givosiran because it was not dose dependent.

h: At the end of premating or gestation period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

2.6.7.15 新生児を用いた試験

幼若動物を用いたギボシランの毒性試験は実施しなかった。表 2.6.7.7-5、試験番号[AS1-GLP15-018]参照。

2.6.7.16 局所刺激性試験

局所刺激性に特化した試験は実施しなかった。しかし、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験の一部として皮膚刺激性を評価した。表 2.6.7.7-1、試験番号[AS1-NCD14-010]、表 2.6.7.7-2、試験番号[AS1-GLP16-022]、表 2.6.7.7-3、試験番号[AS1-GLP15-022]、表 2.6.7.7-4、試験番号[AS1-NCD14-011]、及び表 2.6.7.7-5、試験番号[AS1-GLP15-018]参照。

2.6.7.17 その他の毒性試験

表 2.6.7.17-1 その他の毒性試験

Other Toxicity Studies						
Antigenicity						
Dedicated antigenicity studies have not been conducted with givosiran. Anti-drug antibody (ADA, IgG/IgM) was evaluated in the 26-week rat and 39-week monkey pivotal studies. See 表 2.6.7.7-3, [AS1-GLP15-022] (rats) and 表 2.6.7.7-5, [AS1-GLP15-018] (monkeys).						
Immunotoxicity [a]				**Test Article:** Givosiran		
Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Sex and No. Per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Fresh human whole blood	*In vitro* (transfection with DOTAP)	20-24 h incubation at 37°C	300 nmol/L	4 donors	No significant induction of IL-1β, IL-RA, IL-6, IL-8, G-CSF, IP-10, MIP-1α, and TNF-α.	[BIO14026]
CD-1 Mice	SC	Single dose	0 (PBS), 30, 100	5 males/group	No significant increases in serum levels of G-CSF, IL-6, IP-10, KC, MCP-1, and TNF-α at 4 h after a single SC administration of givosiran at ≤100 mg/kg.	[AS1-NCD14-013]
Mechanistic Studies						
Mechanistic studies have not been conducted with givosiran.						
Dependence						
Dependence studies have not been conducted with givosiran. There were no general behavioral changes in the pivotal repeat-dose rat studies (see 表 2.6.7.7-1, [AS1-NCD14-010]; 表 2.6.7.7-2, [AS1-GLP16-022]; and 表 2.6.7.7-3, [AS1-GLP15-022]) or neurobehavioral effects in the pivotal repeat-dose monkey studies (see 表 2.6.7.7-3, [AS1-NCD14-011]; and 表 2.6.7.7-5, [AS1-GLP15-018]).						
Studies on Metabolites						
Metabolite toxicity studies have not been conducted with givosiran.						
Studies on Impurities						
Impurity studies have not been conducted with givosiran.						
Other Studies						
Other toxicity studies, including evaluation of phototoxicity, have not been conducted with givosiran.						

Abbreviations: ADA = anti-drug antibodies; DOTAP = N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium; IgG = immunoglobulin G; IgM = immunoglobulin M; PBS = phosphate-buffered saline; QWBA = quantitative whole-body autoradiography; SC = subcutaneous.

a: Dedicated immunotoxicity studies have not been conducted with givosiran. However, the immunostimulatory potential was investigated in these 2 non-GLP studies ([BIO14026]; [AS1-NCD14-013]).