目次

2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.2 薬理試験 7
2.4.2.1 まとめ 7
2.4.2.2 効力を裏付ける試験 8
2.4.2.3 副次的薬理試験 9
2.4.2.4 安全性薬理試験 10
2.4.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 11
2.4.3 薬物動態試験 11
2.4.3.1 まとめ 11
2.4.3.2 分析法 13
2.4.3.3 吸収 14
2.4.3.4 分布 15
2.4.3.5 代謝 16
2.4.3.6 排泄 16
2.4.3.7 薬物動態学的薬物相互作用 17
2.4.3.8 その他の薬物動態試験 17
2.4.4 毒性試験 17
2.4.4.1 まとめ 17
2.4.4.2 単回投与毒性試験 21
2.4.4.3 反復投与毒性試験 21
2.4.4.3.1 毒性所見と薬物動態との関連 24
2.4.4.3.2 標的器官毒性 28
2.4.4.4 遺伝毒性 29
2.4.4.5 がん原性 29
2.4.4.6 生殖発生毒性 30
2.4.4.7 局所刺激性試験 32
2.4.4.8 その他の毒性試験 33
2.4.5 総括及び結論 33
2.4.6 参考文献一覧 36

略号一覧

略号・用語	定義	
	英語	日本語
2′-F	2′-deoxy-2′-fluoro	2′-デオキシ-2′-フルオロ
2′-OMe	2′-*O*-methyl	2′-*O*-メチル
AD-59206	pharmacologically active mouse/rat surrogate	マウス／ラットで薬理活性を示す revusiran 及びブトリシランのサロゲート
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADME	absorption, distribution, metabolism, and excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
ALN-51547	revusiran drug substance	原薬 revusiran
ALN-65492	vutrisiran drug substance	原薬ブトリシラン
ALN-TTRSC02	vutrisiran drug product containing ALN-65492	ALN-65492 を含有するブトリシラン製剤
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
ATTR (amyloidosis)	transthyretin-mediated (amyloidosis)	トランスサイレチン型（アミロイドーシス）
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 concentration-time curve from the time of dosing to last measurable concentration	投与後から最終濃度測定時点までの AUC
CL	total body clearance	総クリアランス
C_{max}	maximum observed (plasma) concentration occurring at T_{max}	T_{max} における最高（血漿中）濃度の実測値
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
DDI	drug-drug interaction	薬物相互作用
DRF	dose range-finding	用量設定
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定
FDA	United States Food and Drug Administration	米国食品医薬品局

略号一覧（続き）

略号・用語	定義	
	英語	日本語
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
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
GD	gestation day	妊娠日齢
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hATTR (amyloidosis)	hereditary transthyretin-mediated (amyloidosis)	遺伝性 ATTR（アミロイドーシス）
HED	human equivalent dose	ヒト等価用量
Hep3B	human hepatoma derived cell line Hep3B	ヒト肝癌細胞株 3B
HepG2	human hepatoma derived cell line HepG2	ヒト肝癌細胞株 G2
hERG	human *ether-à-go-go* related gene	ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IL	interleukin	インターロイキン
IL-1RA	IL-1 receptor antagonist	IL-1 受容体拮抗薬
INN	international nonproprietary name	国際一般名
LC/MS-HRAM	liquid chromatography/mass spectrometry-high resolution accurate mass	液体クロマトグラフィー／高分解能精密質量分析
LD	lactation day	授乳日
MIP	macrophage inflammatory protein	マクロファージ炎症性たん白質
MRHD	maximum recommended human dose	最大推奨臨床用量
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
q3M	once every 3 months	3 ヵ月に 1 回
qM	once monthly	月 1 回

略号一覧（続き）

略号・用語	定義	
	英語	日本語
QWBA	quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RNAi	RNA interference	RNA 干渉
RNA-Seq	RNA sequencing	RNA シークエンシング、RNA 塩基配列の決定
RT-qPCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	定量逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応
siRNA	small interfering RNA	低分子干渉 RNA
SNV	single nucleotide variation	一塩基バリアント
$t_{1/2}$	elimination half-life	半減期
T4	thyroxine	チロキシン
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
T_{max}	time to reach maximum (plasma) concentration	最高（血漿中）濃度到達時間
TNF-α	tumor necrosis factor-α	腫瘍壊死因子-α
TTR	transthyretin	トランスサイレチン
USAN	United States Adopted Name	米国一般名
V30M	valine to methionine variant at amino acid 30	Val39Met（〔ヒトトランスサイレチンの〕アミノ酸 30 位のバリンがメチオニンに置換した遺伝子変異）
wt	wild type	野生型
wtATTR (amyloidosis)	wild-type transthyretin-mediated (amyloidosis)	野生型 ATTR（アミロイドーシス）

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

ブトリシランナトリウム（以下、「ブトリシラン」と表記する）は、トランスサイレチン（TTR）型アミロイドーシス（ATTR アミロイドーシス）の治療のために開発中の RNA 干渉（RNAi）治療薬である。ATTR アミロイドーシスには、遺伝性 ATTR アミロイドーシス（hATTR アミロイドーシス）及び野生型 ATTR アミロイドーシス（wtATTR アミロイドーシス）の 2 種類の異なるタイプがある。hATTR アミロイドーシスでは、*TTR* 遺伝子の遺伝性変異により、四量体たん白質が不安定化し、TTR サブユニットは解離して二量体や変異型単量体及び野生型単量体になり、その後ミスフォールドする。これらのミスフォールドした TTR 単量体は、その後、自己集合して多量体となり、さまざまな組織の細胞外間隙にアミロイド線維及びアミロイド斑を形成する[1]。ほとんどすべての ATTR アミロイドーシス患者は、変異型 *TTR* アレルヘテロ接合体を保有し、アミロイド線維は通常、変異型 TTR 及び野生型 TTR たん白質の両方からなる。これらのアミロイド線維は、末梢神経系、心臓、消化管、腎臓、中枢神経系及び眼を含むさまざまな組織の細胞外間隙に沈着し、衰弱性で最終的に死に至る臨床症状を伴う細胞傷害及び臓器機能不全を引き起こす。hATTR アミロイドーシス患者は、ポリニューロパチー又は心筋症のいずれかを主症状とし、多くの hATTR アミロイドーシス患者は、疾患の経過と共にポリニューロパチー及び心筋症の両方の兆候及び症状を示すようになる。wtATTR アミロイドーシスは、野生型 TTR アミロイド線維の蓄積によって引き起こされ、心筋症を主症状とする[2,3,4]。

ブトリシランは、3 分岐型 *N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）が共有結合した二本鎖低分子干渉 RNA（siRNA）である。ブトリシランは、RNAi を介して肝細胞内の *TTR* メッセンジャーRNA（mRNA）を特異的に標的とし、分解を引き起こし、その結果、TTR たん白質の肝臓での合成を減少させるように設計されている（ブトリシランの作用機序については、[2.2]項「緒言」を参照）。ブトリシランは、肝臓を生産源とする循環血液中のアミロイド形成性 TTR たん白質（変異型 TTR 及び野生型 TTR の両方）を減少することにより、TTR アミロイドの沈着を減少させ、それにより疾患の進行を停止し、ATTR アミロイドーシスの臨床症状の改善の可能性をもたらす。ブトリシランは皮下注射により投与され、慢性治療を目的としている。ブトリシランの推奨用法・用量は、25 mg の 3 ヵ月ごとの投与を予定している。

ブトリシランの薬効薬理、安全性薬理、薬物動態（PK）及び毒性について、一連の *in vitro* 及び *in vivo* 非臨床試験で評価した。ブトリシランは、原薬有効成分の国際一般名（INN）及び米国一般名（USAN）であり、引用元の非臨床試験報告書及び申請前の規制当局との相談資料においては、AD-65492、ALN-65492 又は ALN-TTRSC02 とも表記している。本項に記載する試験はすべて、注射用水に 189 mg/mL のブトリシラン遊離酸（200 mg/mL のブトリシランナトリウム塩に相当）を含有する溶液を用いて実施した。これは、予定している臨床製剤（ブトリシランを 50 mg/mL 濃度で含有する 110 mmol/L 塩化ナトリウム／10 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝溶液）とは異なっているが、予定している臨床製剤に含まれる添加剤（リン酸二水素ナトリウム二水和物、リン酸水素二ナトリウム二水和物及び塩化ナトリウム）は、いずれも米国食品医薬品局（FDA）による賦形剤等非活性成分リストに含まれており、非臨床製剤と臨床製剤のわずかな相違が毒性試験結果の解釈に影響を

与える可能性は低いと考えられる。なお、本概要文及び概要表に記載されているブトリシランの投与量及び濃度はすべて、溶液中のブトリシランナトリウム塩を示している（単にブトリシランと記載している）。ナトリウム塩と遊離酸の分子量の違いは約 6%であり、本申請資料に示したデータの解釈に影響はないと考えられる。

ブトリシランは、標的である *TTR* mRNA 配列に動物種間差があるため、カニクイザル（以下、サル）では薬理活性を示すが、マウス、ラット及びウサギでは薬理活性を示さない。ブトリシランは、ヒト及びサルの細胞アッセイを用いたさまざまな *in vitro* 試験において、標的である *TTR* mRNA に対する用量効果及び特異性に基づき特定された。*In silico* 解析、並びに定量逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）アッセイによる確認解析及び RNA シークエンシング（RNA-Seq）解析の *in vitro* 試験を行い、ブトリシランのオンターゲット活性及びオフターゲット活性を評価した。

アミノ酸 30 位のバリンがメチオニンに置換した遺伝子変異（V30M）を有するヒト *TTR* V30M 変異体を発現するトランスジェニックマウス及びサルを用いて、ブトリシランの薬理活性を *in vivo* 試験で評価した。テレメトリー装着サルを用いた単回投与による GLP 適合安全性薬理試験を実施し、心血管系及び呼吸器系機能に対するブトリシランの投与による影響の可能性を評価した。サルを用いた GLP 適合 13 週間及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験の一部として、神経学的パラメータに対するブトリシランの投与による影響の可能性を評価した。

ラット及びサルにブトリシランの 0.3～40 mg/kg を単回（静脈内及び皮下）及び反復皮下投与し、ブトリシランの PK を検討した。これらの試験の一部において雌雄のラット及びサルを用いて、PK の性差を評価した。GLP 適合毒性試験の一部としてトキシコキネティクス（TK）を検討した。サルに皮下投与したとき、血漿中 TTR たん白質濃度に対するブトリシラン曝露の PK／PD（薬力学）は、用量依存的であった。

マウス、ラット、サル及びヒトの血漿中におけるブトリシランのたん白結合率を測定した。ブトリシラン及び[^{3}H]-ブトリシランを皮下投与しブトリシランの組織分布をマウス、ラット、ウサギ及びサルで検討した。

ブトリシランの代謝安定性及び代謝物の検討を *in vitro*（マウス、ラット、サル、ヒトのプール血清及び肝 S9 画分）並びに *in vivo*（ラット及びサルの血漿及び肝臓、ラットの尿、胆汁及び糞並びにヒトの血漿及び尿)で行った。液体クロマトグラフィー／高分解能精密質量分析（LC/MS-HRAM）を用いて代謝物を同定した。シトクロム P450（CYP）を含むブトリシランの薬物相互作用（DDI）を *in vitro* で検討した。なおトランスポーターに関する *in vitro* での DDI 試験は、構造的に類似した GalNAc-siRNA に相互作用がないため不要と考えた [5]。ラットとサルにおけるブトリシランとその代謝物の排泄速度と量を、[^{3}H]-ブトリシラン（ラット）又は非標識ブトリシラン（ラット及びサル）を用いた試験で検討した。

ブトリシランの非臨床安全性を評価するため、ラット及びサルを用いて探索的及び GLP 適合反復投与毒性試験を実施した。GLP 適合毒性試験として、ラット及びサルを用いた短期反復投与毒性試験（月 1 回の投与レジメンで 13 週間投与、12 週間の回復期間）並びにラット及びサルを用いた長期反復投与毒性試験（ラット：月 1 回の投与レジメンで 6 ヵ月間投与；サル：月 1 回の投与レジメンで 9 ヵ月間投与）を実施し、試験の一環として Draize スコアリング変法により局所刺激性を評価した。*In vitro* の S9 代謝活性化系存在下及び非存在下での細菌を用いた変異原性試験並びに染色体

異常試験（ヒト末梢血リンパ球）、及びラット骨髄における小核試験によりブトリシランが遺伝毒性を示す可能性を評価した。また、毒性試験として、C57BL/6、Tg-rasH2（野生型同腹児）及び CD-1 マウスを用いた非 GLP の用量設定（DRF）試験、GLP 適合の雌雄ラットにおける受胎能及び初期胚発生に関する試験、非 GLP 及び GLP 適合のラット及びウサギを用いた DRF 試験並びに主要な胚・胎児発生に関する試験、GLP 適合のラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した。非 GLP のヒト全血を用いたブトリシランの *in vitro* での免疫刺激試験を実施した。さらに、GLP 適合の Sprague Dawley ラットにおける 2 年間投与のがん原性試験を実施した。GLP 適合の CD-1 マウスにおける 2 年間投与のがん原性試験が進行中であり、試験が終了次第、試験報告書を提出する予定である。

ブトリシランを用いて実施した GLP 適合の最終的な毒性試験及びがん原性試験は「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」（2010 年 1 月付、改訂 1 版）、医薬品規制調和国際会議（ICH）M3（R2）に定められた一般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）加盟国において、FDA GLP「連邦規則集、Code of Federal Regulations Title 21 Part 58」又は OECD テストガイドライン並びに欧州連合（欧州医薬品庁〔EMA〕）、米国（FDA）、日本（厚生労働省）及び OECD 相互データ受入れ契約に署名した他の国々の規制当局によって合意された GLP の原則に従って実施した。探索的試験及び DRF 試験はすべてを厳密な GLP の手順に従って実施したわけではないが、データの完全性を保証するために適切な試験計画書及び文書を用いて実施した。ブトリシランの申請戦略を含む非臨床試験の全般的な計画は、以前に EMA 及び FDA と合意している。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 まとめ

ブトリシランの包括的な非臨床薬理試験を、*in vitro* 試験、並びにマウス及びサルを用いた *in vivo* 試験で実施した。*In vitro* 薬理試験、*in vivo* 薬理試験及び安全性薬理試験の一覧を表 2.4.2-1 に示す。非臨床薬理試験では、数種類のヒト細胞株及び初代培養カニクイザル肝細胞を用いてブトリシランの *in vitro* 薬理活性及び特異性を評価し、トランスジェニックマウス及びサルを用いてブトリシランの *in vivo* 薬理活性を評価した。ブトリシランは、*TTR* 標的配列が保存されているサル及びヒトで薬理活性を示す。効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験結果を、それぞれ、2.4.2.2 項、2.4.2.3 項及び 2.4.2.4 項に要約した。

ブトリシラン及びブトリシランに関連して実施した非臨床薬理試験の詳細一覧については、[2.6.3.1]項「薬理試験一覧」、並びに各試験の概要については、[2.6.2]項「薬理試験の概要文」に示した。

表 2.4.2-1 ブトリシランに関する薬理試験

Study Number	Brief Title	Dose (mg/kg)	GLP (Y/N)	Tabulated Summary
Primary Pharmacodynamics				
BIO12032	Identification of ALN-51547 (*in vitro*)	N/A	N	表 2.6.3-2
BIO16007	Identification of ALN-65492 (*in vitro*)	N/A	N	表 2.6.3-2
BIO12028	Analysis of human *TTR* for polymorphism variations in support of ALN-51547	N/A	N	表 2.6.3-2
BIO13029	Analysis of wild type and mutant *TTR* allele suppression of ALN-51547	N/A	N	表 2.6.3-2
BIO16003	PD evaluation (serum TTR) after a single SC injection of vutrisiran in human *TTR* V30M transgenic mice	1, 2.5 (single dose)	N	表 2.6.3-2
BIO16004	PD evaluation (serum TTR) after multiple SC injections of vutrisiran in human *TTR* V30M transgenic mice	0.3, 1, 3 (qM×4)	N	表 2.6.3-2
BIO16005	PD evaluation (serum TTR) after SC injection (various dosing regimens) of vutrisiran in male monkeys	0.3, 0.6, 1, 3 (various regimens)	N	表 2.6.3-2
Secondary Pharmacodynamics				
BIO12037	Off-target analysis of ALN-51547 (*in vitro*)	N/A	N	表 2.6.3-3
NCS-20-00163	Off-target analysis of ALN-65492 (*in vitro*)	N/A	N	表 2.6.3-3
NCS-21-00657	Off-target analysis of ALN-65492 (*in silico*)	N/A	N	表 2.6.3-3
NCS-20-00098	RNA-Sequencing screen for potential off-target inhibition of ALN-65492	N/A	N	表 2.6.3-3
Safety Pharmacology				
TTRSC02-GLP-037	Cardiovascular safety pharmacology evaluation after a single SC injection of vutrisiran to male telemetry-instrumented conscious monkeys	0 (0.9% NaCl), 30, 300	Y	表 2.6.3-4
Pharmacodynamic Drug Interactions				
No studies conducted				

略語：ALN-51547＝原薬 revusiran；ALN-65492＝原薬ブトリシラン；GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；N＝非適用；N/A＝該当せず；PD＝薬効薬理；qM＝月 1 回；SC＝皮下；TTR＝トランスサイレチン；V30M＝Val30Met（〔ヒトトランスサイレチンの〕アミノ酸 30 位のバリンがメチオニンに置換した遺伝子変異）；Y＝適用。
ブトリシランは、非臨床試験報告書において、AD-65492、ALN-65492、ALN-TTRSC02 とも表記している。ALN-51547 は、非臨床試験報告書において、AD-51547、ALN-TTRSC、又は revusiran とも表記している。

2.4.2.2 効力を裏付ける試験

ブトリシランの *in vitro* 及び *in vivo* 試験における主な薬効薬理特性を表 2.4.2-2 に示す。

表 2.4.2-2 主な薬効薬理特性

Assay	Pharmacodynamic Activity
***In vitro* Assay**	
Primary monkey hepatocytes	IC_{50}=0.21 nmol/L (BIO16007)
***In vivo* Assays**	
Single-dose human *TTR* V30M transgenic mice	ED_{95}=approximately 2.5 mg/kg (BIO16003)
Repeat-dose human *TTR* V30M transgenic mice	ED_{95}=approximately 3 mg/kg (BIO16004)

表 2.4.2-2 主な薬効薬理特性（続き）

Assay	Pharmacodynamic Activity
Single-dose monkey (SC)	ED_{95}=1 mg/kg (BIO16005)
Repeat-dose monkey (SC)	ED_{95}=1 mg/kg (BIO16005)

略語：ED_{95}＝95%有効量（血清中 TTR たん白質をベースライン濃度に対して 95%減少するブトリシランの投与量）；IC_{50}＝50%阻害濃度；SC＝皮下投与；TTR＝トランスサイレチン；V30M＝Val30Met（〔ヒトトランスサイレチンの〕アミノ酸 30 位のバリンがメチオニンに置換した遺伝子変異）。

ブトリシランは、ブトリシラン又は ALN-51547（ブトリシランと塩基配列は同じで化学修飾が異なる GalNAc-siRNA）のいずれかをトランスフェクションしたヒト細胞株及び初代培養サル肝細胞を用いた *in vitro* 試験において、*TTR* 遺伝子に対する用量効果及び特異性の評価に基づき特定された。*In vitro* 試験において、ブトリシランの siRNA 配列による、*TTR* のオンターゲットの減少に対する用量効果とすべてのオフターゲット候補遺伝子転写物のオフターゲットの減少との間には 1000 倍超の差が認められた。ブトリシランは濃度依存的な *TTR* mRNA の減少を示し、50%阻害濃度（IC_{50}）は 0.21 nmol/L であった。ALN-51547 は野生型 *TTR* 及び一般的な病原性変異型 *TTR* 又は一塩基バリアント（SNV）に対して同様の活性を示し、siRNA 塩基配列が同一であることからブトリシランが同様の活性を示すことが期待される。

アミノ酸 30 位のバリンがメチオニンに置換した遺伝子変異（V30M）を有するヒト *TTR* V30M 変異体を発現するトランスジェニックマウス及びサルを用いたブトリシランの単回及び反復皮下投与において、持続的かつ投与量依存的な血清中 TTR たん白質の最大 99%の減少が認められた。

以上の非臨床薬理試験の結果より、ブトリシランが ATTR アミロイドーシス患者において循環血液中の TTR たん白質濃度を減少させる治療効果を示すことが裏付けられた。

2.4.2.3 副次的薬理試験

TTR はレチノール結合タンパク質に結合する、ビタミン A の主要な担体であり、チロキシン（T4）の非主要担体である[6,7]。ブトリシランで予測される副次的薬理作用、すなわち循環血液中のビタミン A 及び T4 の減少については、反復投与毒性試験（試験番号[TTRSC02-GLP15-025]及び試験番号[TTRSC02-GLP15-039]）において明らかにされた。サルでは、ベースライン濃度に対して、循環血液中のビタミン A（最大 89%）及び T4（最大 48%）の持続的な減少が認められたが、眼、甲状腺、下垂体に変化は認められなかった。

2.4.2.2 項に記載したように、ブトリシランの選択過程では、塩基配列相同性に基づき、ALN-51547（試験番号[BIO12037]）及びブトリシラン（試験番号[NCS-20-00163]）のアンチセンス鎖によって阻害される可能性のあるオフターゲット候補遺伝子転写物を同定するための *in silico* 試験を用いたバイオインフォマティクス解析を行った。広範囲の 2′-*O*-メチル（2′-OMe）及び 2′-デオキシ-2′-フルオロ（2′-F）修飾、並びに 3 分岐型 GalNAc リガンド及びリンカーをブトリシランのセンス鎖の 3′末端に付加することで、センス鎖がオフターゲットの転写減少を引き起こす可能性は著しく低下される[8]。*In silico* 解析により、5 種類のオフターゲット候補遺伝子転写物（コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体サブユニット C〔*SDHC*〕、核内キャップ結合サブユニット 3〔*NCBP3*〕、サイクリ

ン H〔*CCNH*〕、膜貫通型 p24 輸送タンパク質ファミリーメンバー8〔*TMED8*〕及び PAS ドメイン含有セリン／トレオニンキナーゼ〔*PASK*〕）が同定された。1×10^{-9} から 10 nmol/L の濃度範囲のブトリシランをトランスフェクションしたヒト肝癌細胞株 3B（Hep3B）及びヒト肝癌細胞株 G2（HepG2）細胞で実施した *in vitro* アッセイでは、標的である *TTR* mRNA の強力な減少が認められたが、これらオフターゲット候補遺伝子転写物の mRNA の顕著な減少は認められなかった。追加の *in silico* オフターゲット評価を実施し、センス鎖によって抑制される可能性のあるオフターゲット候補遺伝子転写物を評価し、アンチセンス鎖のオフターゲット候補遺伝子の詳細な解析の更新を行い、ALN-65492 のいくつかのオフターゲット候補遺伝子を特定した（試験番号[NCS-21-00657]）。公共データベースを元にオフターゲット候補遺伝子の発現及び遺伝子アノテーション解析を行い、Hep3B 細胞に ALN-65492 をトランスフェクション後、RNA-Seq 解析を行った（試験番号[NCS-20-00098]）。これらの追加のオフターゲット解析の結果により、*TTR* 転写物に対する ALN-65492 の両二本鎖の特異性が確認され、オフターゲット作用のリスクが少ないことが確認された。

さらに、ブトリシランをトランスフェクションした Hep3B 細胞を用いて RNA-Seq 解析を行い（試験番号[NCS-20-00098]）、遺伝子発現の差異を $\log_2$ 倍率変化で示した。この解析では、ブトリシラン（アンチセンス鎖及びセンス鎖の二本鎖）に曝露後の *TTR* とオフターゲット候補遺伝子の発現の違いを評価し、1 $\log_2$（50%）以上 2 $\log_2$（75%）未満で発現が減少した 2 種類の遺伝子（低分子ユビキチン様修飾因子 2〔*SUMO2*〕及びコイルドコイルドメイン含有タンパク質 47〔*CCDC47*〕）、並びに 1 $\log_2$（50%）以上発現が増加した 1 種類の遺伝子（初期増殖応答因子 1〔*ERG1*〕）が同定された。全試験において、*TTR* 遺伝子のオンターゲットの発現抑制は、最も近いオフターゲット遺伝子の発現抑制よりも 3 $\log_2$ 大きかった。

これらの解析に基づき、ブトリシランは、95%超の *TTR* 遺伝子の発現抑制を示す濃度で顕著なオフターゲット活性を示す可能性は低く、これにより *TTR* に対するブトリシランの特異性が確認された。

2.4.2.4 安全性薬理試験

他の siRNAs 治療薬と同様に、ブトリシランを用いた *in vitro* ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子（hERG）アッセイは、ブトリシランが治療用たん白質と同様、比較的大きな分子（遊離酸で約 16 kDa）であるため実施しなかった。ブトリシランの分子サイズではイオンチャネルとの相互作用は不可能と考えられる。さらに、ブトリシランの 3 分岐型 GalNAc リガンドは、肝細胞上に発現するアシアロ糖たん白質受容体（ASGPR）に特異的に結合し、肝細胞への取り込みを促進する。ブトリシランは、心臓に選択的に分布することはなく、hERG チャネルの内孔に到達して結合し、遮断作用を示すことはないと考えられる。

テレメトリー装着サルを用いた単回投与による心血管系及び呼吸器系に対する安全性薬理試験（試験番号[TTRSC02-GLP-037]）、並びにサルを用いた 13 週間及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験（それぞれ、試験番号[TTRSC02-GLP15-025]及び試験番号[TTRSC02-GLP15-039]）で実施された神経学的評価において、ブトリシランの投与による心血管系、呼吸器系及び神経系に対する影響は認められず、無影響量は 300 mg/kg（評価した最高投与量）と判断された。

2.4.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

ブトリシランの薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。ヒトにおけるブトリシランと他のTTR 減少薬又は安定化剤との薬力学的薬物相互作用の可能性は、作用機序が異なるため低いと考えられる。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 まとめ

ブトリシランの PK 並びに吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）を、ラット及びサルを用いて実施された主要な毒性試験及びブトリシランの臨床開発をサポートするために、種々の非臨床での *in vitro* 及び *in vivo* 試験（表 2.4.3-1 参照）で検討した。総じて、これらの試験は、毒性試験の解釈をサポートし、ヒトにおけるブトリシランの性質の特徴付けを助け、ATTR アミロイドーシスの治療のためのブトリシランの臨床使用をサポートすると考えられる。

ブトリシランの非臨床 PK 試験の詳細については、[表 2.6.5-1]を参照。薬物動態及び個々の試験の概要については、[2.6.4]項「薬物動態試験の概要文」を参照。

表 2.4.3-1 ブトリシランの薬物動態試験

Study Number	Brief Title	Dose (mg/kg)[a]	GLP (Y/N)	Tabulated Summary
Absorption				
TTRSC02-DSM15-033	Single- and repeat-dose PK study in rats (including absorption, distribution, and excretion)	5 IV (single dose); 0.3, 1, 3, 10 SC (single dose); 1, 40 SC (qM×4)	N	表 2.6.5-5 表 2.6.5-7
TTRSC02-DSM15-035	Single- and repeat-dose PK/PD study in monkeys (including absorption, distribution, and excretion)	10 IV (single dose); 0.3, 1, 3, 30 SC (single dose); 1 IM (single dose); 0.3, 1 SC (qM×4)	N	表 2.6.5-6 表 2.6.5-8

表 2.4.3-1 ブトリシランの薬物動態試験（続き）

Study Number	Brief Title	Dose (mg/kg)[a]	GLP (Y/N)	Tabulated Summary
Distribution				
BA18007	Plasma protein binding study (*in vitro*)	0.5, 1, 5, 10, 25, 50 µg/mL	N	表 2.6.5-12
TTRSC02-DSM17-009	Blood cell partitioning, excretion mass balance and tissue distribution via QWBA, and microautoradiography analysis in rats	3 SC (single dose) [^{3}H]-vutrisiran	N	表 2.6.5-10 表 2.6.5-14 表 2.6.5-15
TTRSC02-DSM15-033	Single- and repeat-dose PK study in rats (including absorption, distribution, and excretion)	0.3, 1, 3 SC(single dose); 1, 40 SC (qM×4)	N	表 2.6.5-9
TTRSC02-DSM15-035	Single- and repeat-dose PK/PD study in monkeys (including absorption, distribution, and excretion)	10 IV (single dose); 0.3, 1, 3, 30 SC (single dose); 1 IM (single dose); 0.3, 1 SC (qM×4)	N	表 2.6.5-11
Metabolism				
BA16004	Mouse, rat, monkey, and human serum and liver S9 fractions (*in vitro*); human urine and plasma; rat and monkey plasma and liver (*in vivo*)	Rat: 10 SC (single dose)[b] Monkey: 30 SC (single dose)[c] Human: 50 mg SC (single dose)[d]	N	表 2.6.5-16 表 2.6.5-18 2.6.5.11
TTRSC02-DSM17-009	*In vivo* metabolic profiling and identification of [^{3}H]-vutrisiran	3 SC (single dose) [^{3}H]-vutrisiran	N	表 2.6.5-17
319N-1527	CYP substrate study in cDNA expressed enzymes (*in vitro*)	800, 8000 ng/mL	N	表 2.6.5-19
319N-1528	CYP direct and time-dependent inhibition study in human liver microsomes (*in vitro*)	0, 0.01, 1, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10,000 µg/mL	N	表 2.6.5-20

表 2.4.3-1 ブトリシランの薬物動態試験（続き）

Study Number	Brief Title	Dose (mg/kg)[a]	GLP (Y/N)	Tabulated Summary
Excretion				
TTRSC02-DSM15-033	Single- and repeat-dose PK study in rats (including absorption, distribution, and excretion)	3 SC (single dose)	N	表 2.6.5-21
TTRSC02-DSM17-009	Blood cell partitioning, excretion mass balance and tissue distribution via QWBA, and microautoradiography analysis in rats	3 SC (single dose) [^{3}H]-vutrisiran	N	表 2.6.5-22 表 2.6.5-24
TTRSC02-DSM15-035	Single- and repeat-dose PK/PD study in monkeys (including absorption, distribution, and excretion)	1, 30 SC (single dose)	N	表 2.6.5-23
Pharmacokinetic Drug Interactions				
No studies conducted				
Other PK Studies				
No studies conducted				

略語：cDNA＝相補的 DNA；CYP＝シトクロム P450；GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；IM＝筋肉内；IV＝静脈内；N＝非適用；PD＝薬力学；PK＝薬物動態；qM＝月 1 回；QWBA＝定量的全身オートラジオグラフィー；SC＝皮下；Y＝適用。

a 特に記載のない場合

b ラット血漿及び肝臓試料は TTRSC02-DSM15-033 試験から得た。

c サル血漿及び肝臓試料は TTRSC02-DSM15-035 試験から得た。

d ヒト血漿及び尿は臨床試験 ALN-TTRSC02-001 から得た。

2.4.3.2 分析法

非臨床試験における PK、PD 及び免疫原性（抗薬物抗体〔ADA〕）評価をサポートするために、複数の生体試料中薬物濃度分析法を用いた。探索目的のために、その他の分析法を用いた。[2.6.4.2] 項「分析法」を参照。

種々の動物種の血漿中ブトリシランを定量するため、定量下限が 20.0 ng/mL の LC/MS-HRAM を用いた生体試料中薬物濃度分析法をバリデーションした。GLP 試験用の分析法の開発及びバリデーション試験は、FDA 及び EMA の生体試料中薬物濃度分析法バリデーションガイダンス文書に基づいて実施した。実試料再分析（ISR：incurred sample reanalysis）は、試料分析時に実施した。種々の

マトリックス及び動物種中のブトリシランを定量するため、LC/MS-HRAM 法によるその他の分析法を用いた。LC/MS-HRAM 法を、代謝安定性試験及び代謝プロフィリングにも使用した。

GLP 適合サル試験をサポートするため、酵素結合免疫吸着測定（ELISA）法を用いてサル（及びヒト）血清中の総 TTR たん白質を定量する PD バイオマーカー測定法をバリデーションした。適切な ELISA キットを用いて、他の動物種の総血清 TTR 濃度を測定した。

ラット及びサルの血清試料中のブトリシランに対する ADA すなわち免疫グロブリン G（IgG）／免疫グロブリン M（IgM）の検出のための ELISA 法を、FDA 及び EMA のガイダンスに従ってバリデーションした。試料分析には、カットポイント値に基づく ADA 陽性のスクリーニング試験及び確認試験を行った後、ADA 抗体価を測定する段階的アプローチを実施した。

探索目的及びバリデーションしたその他の分析法も使用した。非 GLP の用量設定（DRF）毒性試験におけるサル血漿中のサイトカインを *in vitro* での分析のために市販の Milliplex®キットと BioRad Bio-Plex Pro アッセイキットを用いてマルチプレックスアッセイを行った。市販試薬を用いた RT-qPCR により、肝臓におけるウサギ *TTR* の mRNA 発現を測定した。ラットの血清中総 TTR 濃度は、適切な ELISA キットを用いて測定した。高速液体クロマトグラフィーを用いて、ラット及びサル血清中のビタミン A レチノールを測定した。

2.4.3.3 吸収

薬理作用を示す投与量、ラットでは 0.3～40 mg/kg（試験番号[TTRSC02-DSM15-033]）、サルでは 0.3～30 mg/kg（試験番号[TTRSC02-DSM15-035]）を単回（静脈内及び皮下）及び反復皮下投与後のブトリシランの血漿中 PK を評価した。肝臓への GalNAc を介した siRNA の標的送達から予想されるように、静脈内投与後、ブトリシランは、ラットでは総クリアランス（CL）が 376 mL/h/kg（ラットにおける半減期〔$t_{1/2}$〕は明確な消失相がないため算出不能）、サルでは CL 及び $t_{1/2}$ がそれぞれ 130 mL/h/kg 及び 0.45 時間で全身循環から速やかに消失した。ラット及びサルにブトリシランを単回皮下投与したとき、ブトリシランは速やかに吸収され、最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）はラットで約 0.5～1 時間、サルで約 1.9～2.8 時間であり、T_{max} における最高血漿中濃度の実測値（C_{max}）はラットで 0.0582～1.92 µg/mL、サルで 0.0384～7.46 µg/mL、投与後から最終濃度測定時点までの濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}t(last)}$）はラットで 0.0407～4.93 µg·h/mL、サルで 0.105～55.0 µg·h/mL とほぼ投与量比例性又は投与量比を上回る増加を示した。明確な消失相が認められなかったため、ラットでは血漿中 $t_{1/2}$ は算出できなかったが、サルでは 3.3～4.7 時間であった。概して、ラット及びサルにおけるブトリシランの PK 特性に性差は認められなかった。

ラットに 1 又は 40 mg/kg（試験番号[TTRSC02-DSM15-033]）、サルに 0.3 又は 1 mg/kg（試験番号[TTRSC02-DSM15-035]）を月 1 回 4 回皮下投与したときのブトリシランの反復投与時の PK プロファイルは、単回投与時のデータと類似しており、蓄積性及び PK に時間依存性は認められなかった。

サルに静脈内（10 mg/kg）及び皮下（0.3、1、3、又は 30 mg/kg）投与（試験番号[TTRSC02-DSM15-035]）した後、血漿中における TTR の最大低下に対するブトリシラン投与量と肝臓曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$）の PK/PD を評価した。10 mg/kg を急速静脈内投与したとき、肝臓の C_{max} 及

び $AUC_{0\text{-}t(last)}$はそれぞれ 10.5 μg/g 及び 7450 μg·h/g であり、投与後約 30 日間でベースラインと比較して 84%の血漿中 TTR の低下が認められた。血漿中 TTR たん白濃度に対する肝臓中ブトリシラン曝露量の PK/PD は、ブトリシランの 0.3、1、3 又は 30 mg/kg を皮下投与したとき投与量依存的で、投与後 504～840 時間（Day 21～35）において、ベースラインと比較して 44～95%の範囲で最大 TTR 低下が認められた。ブトリシランの PD 効果は持続的であり、血漿中 TTR たん白質の用量依存的な減少（ベースラインの 27～95%以内）は投与後 1344 時間（Day 56）（評価した最終時点）まで維持された。サルに月 1 回（qM×4）皮下反復投与したとき、1 mg/kg 投与時の血漿中 TTR 濃度は、最終投与 2 週間後（初回投与 99 日後）に 90%を超える最大低下を示し、血漿中 TTR の 75%を超える低下は初回投与 141 日後（最終評価時点）でも維持された。

毒性試験をサポートするために、ブトリシランの TK を、種々の非臨床動物種（マウス、ラット、ウサギ及びサル）で検討した。血漿中曝露量（C_{max} 及び血漿中濃度－時間曲線下面積〔AUC〕）は、ほぼ投与量に比例して増加したが、一部の例では、試験した投与量範囲で投与量比をわずかに上回って増加した。マウス、ラット及びサルにおいて、ブトリシランは月 1 回投与したとき血漿中に蓄積せず、血漿における TK に性差は認められなかった。一般に、毒性試験における肝臓（標的臓器）及び腎臓のブトリシランの曝露量は用量依存的に増加した。

2.4.3.4 分布

マウス、ラット、サル及びヒト血漿におけるブトリシランの血漿たん白結合率を、ブトリシラン濃度 0.5～50 μg/mL でゲルシフトアッセイ（EMSA）を用いて *in vitro* で評価した（試験番号[BA18007]）。評価したすべての動物種において、たん白結合率はブトリシランの濃度の増加に伴って減少した。たん白結合率は、マウスで 11.7～75.6%、ラットで 26.0～87.0%、サルで 15.9～86.8%、ヒトで 19.0～82.0%であった。ヒト単回漸増投与試験で認められた C_{max} の平均値（25 及び 50 mg 投与でそれぞれ 0.0984 及び 0.191 μg/mL）（試験番号[ALN-TTRSC02-001]）を考慮すると、臨床における血漿中ブトリシラン濃度において、血漿たん白結合率は約 80%と比較的一定に保たれることが予想される。なお、[^{3}H]-ブトリシランはラットの血球に特異的に分布しなかった（試験番号[TTRSC02-DSM17-009]）。

ラットとサルの両方で血漿と比較して肝臓で一貫して高濃度であることから、ブトリシランの肝臓への標的送達が確認された（試験番号[TTRSC02-DSM15-033]及び試験番号[TTRSC02-DSM15-035]）。ラットに 0.3、1 又は 3 mg/kg を単回皮下投与したとき、ブトリシランの肝臓中濃度は 3.0 又は 7.0 時間で最高に達し、血漿中よりも肝臓中でかなり遅い速度（肝臓中 $t_{1/2}$ は 84.5～151.5 時間）で低下した。$AUC_{0\text{-}t(last)}$で算出した肝臓の曝露量は、投与量全体で血漿中曝露量の 4350～11,425 倍であった。ブトリシランはラットの腎臓にも存在したが、その程度は肝臓よりも低かった。3 mg/kg における腎臓でのブトリシランの $t_{1/2}$ は 156.3 時間であったが、低投与量では算出できなかった（明確な消失相が認められなかったため）。0.3、1、3 mg/kg を単回皮下投与したとき、ラット肝臓における $AUC_{0\text{-}t(last)}$は、腎臓の対応する $AUC_{0\text{-}t(last)}$の 10～104 倍であった。雄 Sprague Dawley ラットを用いた定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験（試験番号[TTRSC02-DSM17-009]）において、[^{3}H]-ブトリシラン由来放射能は迅速に吸収され、投与部位、肝臓、腎臓、リンパ

節及び胸管で高濃度の放射能がみられた。[^{3}H]-ブトリシランを皮下投与したとき、中枢神経系への放射能の曝露は無視できる程度であった。

サルにブトリシランの 0.3、1、3 又は 30 mg/kg を単回皮下投与したとき、ブトリシランの肝臓中曝露量は血漿中曝露量と比較して一貫して 2600～21,000 倍高かった（試験番号[TTRSC02-DSM15-035]）。肝臓における $t_{1/2}$ は 17.9～30.8 日であった。ブトリシランを単回皮下投与したときの腎臓における PK は検討しなかった。

ラット（試験番号[TTRSC02-DSM15-033]）及びサル（試験番号[TTRSC02-DSM15-035]）における反復投与試験において、肝臓中ブトリシラン濃度は血漿中濃度よりも一貫して高値を示し、肝臓中濃度の増加はほぼ投与量比例性を示した。ラットでの反復投与、あるいはサルでの 0.3 mg/kg の反復投与では、肝臓への蓄積性は認められなかった。1 mg/kg を月 1 回反復投与したサルの肝臓では、$AUC_{0\text{-}t(last)}$で計算すると 2.6 倍の蓄積性が認められた。ヒトの肝臓での $t_{1/2}$ は、サルの肝臓の PK（クリアランス及び分布容積）からアロメトリックスケーリングすると体重 70 kg の患者で約 53 日と予測された。予定されている臨床における投与法（すなわち、3 ヵ月に 1 回〔q3M〕投与）を考慮すると、ヒトでは肝臓において蓄積性は無いと予想される。

ラット（試験番号[TTRSC02-GLP16-013]）及びウサギ（試験番号[TTRSC02-GLP16-012]）の DRF 胚・胎児毒性試験のいずれにおいても、ブトリシランは母動物の肝臓、腎臓及び胎盤で検出されたが、胎児及び肝臓では検出されなかった。

2.4.3.5 代謝

ブトリシランの代謝安定性及び代謝物検討のため、*in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。ブトリシランは、CYP の基質ではなかった（試験番号[319N-1527]）。ブトリシランは主にエキソ又はエンドヌクレアーゼによるヌクレオチドの開裂により代謝され、同様の *in vitro* での代謝安定性がマウス、ラット、サル、ヒトのプールした血清及び肝 S9 画分で観察された。*In vivo* のラット及びサルにおいて、ブトリシランの主要代謝物は、アンチセンス鎖の 3′末端の N-1（1 ヌクレオチドの消失）及び N-3（3 ヌクレオチドの消失）（それぞれ AS(N-1)3′ブトリシラン及び AS(N-3)3′ブトリシラン）であった（試験番号[BA16004]；試験番号[TTRSC02-DSM17-009]）。ヒト血漿ではブトリシランの循環血中の代謝物は検出されず（試験番号[ALN-TTRSC02-001]）、ヒト尿では低濃度の AS(N-3)3′ブトリシランが観察された（試験番号[BA16004]）。

総合すると、これらのデータは、ブトリシラン及びその代謝物の毒性を評価するためにラット及びサルを使用することが妥当であることをサポートしている。これらのデータから、ブトリシランは血漿中で安定であり、ラット、サル及びヒトでも同様に代謝されることが示された。

2.4.3.6 排泄

まとめると、ブトリシランの排泄はラットとサルで類似していた。[^{3}H]-ブトリシランを皮下投与したとき、胆管カニューレ処理を行っていないラットでは尿中（約 53%）に、胆管カニューレ処理したラットでは胆汁中（約 24%）に大量の放射能が排泄され、ラットにおける[^{3}H]-ブトリシラン由来放射能の主な排泄経路は腎臓及び胆汁中排泄であることが示された（試験番号[TTRSC02-DSM17-

009]）。排泄された放射能は主にブトリシランの代謝物であり、それらは放射性標識部分を含んでいた。ラットに 3 mg/kg を単回皮下投与したときの未変化体のブトリシランの腎排泄は、投与量の約 9%であった（試験番号[TTRSC02-DSM15-033]）。サルに 1 又は 30 mg/kg を単回皮下投与したとき、尿中に投与量の 11～24%が未変化体として排泄された（試験番号[TTRSC02-DSM15-035]）。糞中排泄は両種とも無視できる程度であった。これらのデータは、吸収された薬物の大部分が肝臓に分布し、排泄前に代謝（ヌクレアーゼによる開裂）されることを示唆している。

2.4.3.7 薬物動態学的薬物相互作用

ブトリシランは、CYP（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4/5）の直接的、時間依存的な阻害剤ではなく（試験番号[319N-1528]）、ブトリシランは CYP 基質でもない（試験番号[319N-1527]）。このことから、ブトリシランが主な CYP アイソフォームの阻害を介した DDI を引き起こしたり、CYP 阻害薬の影響を受けたりする可能性は低いと考えられる。構造的に類似した GalNAc-siRNA の *in vitro* における DDI データから、これらの分子には相互作用の可能性がないことが示唆されているため[5]、ブトリシランを用いた CYP 誘導試験及びトランスポーター基質／阻害試験は実施していない。全体として、データは CYP 又はトランスポーターに対する DDI の可能性が低いことを示唆している。したがって、DDI の可能性を更に検討するための追加試験は必要ないと考えられた。

2.4.3.8 その他の薬物動態試験

その他の PK 試験は実施していない。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 まとめ

表 2.4.4-1 に示した一連の非臨床毒性試験においてブトリシランの毒性を評価した。ブトリシランはサル及びヒトで薬理活性を示すが、げっ歯類又はウサギでは薬理活性を示さない。ラット及びサルを用いてブトリシランの探索的（非 GLP）DRF 毒性試験を実施し、続いてラットでは最長 6 ヵ月間投与、サルでは 9 ヵ月間投与による GLP 適合の主要な毒性試験を実施した。月 1 回投与による長期反復投与試験における無毒性量（NOAEL）は、ラット及びサルでそれぞれ 150 及び 300 mg/kg であった。これらの試験で認められた毒性の主要な標的器官は肝臓であり、腎臓、リンパ節及び皮下投与部位において非有害所見及び二次的な所見が認められた。

これまでに実施した非臨床毒性試験の結果から、ATTR アミロイドーシス患者の治療にヒトへの推奨投与レジメンであるブトリシランを 25 mg の用量で 3 ヵ月に 1 回投与することを支持する良好な安全性プロファイルが示されている。

ブトリシランを用いて実施した非臨床毒性試験の詳細な一覧は[表 2.6.7-1]を参照のこと。毒性試験の総括及び個々の試験の概要については、[2.6.6]項「毒性試験の概要文」を参照のこと。

表 2.4.4-1 ブトリシランを用いて実施した毒性試験

Study Number	Brief Title	Dose (mg/kg)	GLP (Y/N)	Tabulated Summary
Single-Dose Toxicity				
No studies conducted				
Repeat-Dose Toxicity				
TTRSC02-DSM15-028	13-Week DRF repeat-dose toxicity study in Sprague Dawley rats	0 (0.9% NaCl), 40, 120 (qM×4)	N	表 2.6.7-8
TTRSC02-GLP15-026	13-Week repeat-dose toxicity and TK study in Sprague Dawley rats	0 (0.9% NaCl), 12, 40, 120 (qM×4)	Y	表 2.6.7-9
TTRSC02-GLP15-040	6-Month repeat-dose toxicity and TK study in Sprague Dawley rats	0 (0.9% NaCl), 15, 50, 150 (qM×8)	Y	表 2.6.7-10
TTRSC02-DSM17-011	6-Month repeat-dose toxicity study with a 3-month recovery in Sprague Dawley rats	0 (0.9% NaCl), 5, 50 (qM×7); 10, 50 (q3M×3)	N	表 2.6.7-11
TTRSC02-DSM15-027	13-Week DRF repeat-dose toxicity study in cynomolgus monkeys	0 (0.9% NaCl), 100, 300 (qM×4)	N	表 2.6.7-8
TTRSC02-GLP15-025	13-Week repeat-dose toxicity and TK study with a 12-week recovery in cynomolgus monkeys	0 (0.9% NaCl), 30, 100, 300 (qM×4)	Y	表 2.6.7-12
TTRSC02-GLP15-039	9-Month repeat-dose toxicity and TK study in cynomolgus monkeys	0 (0.9% NaCl), 30, 100, 300 (qM×11)	Y	表 2.6.7-13

表 2.4.4-1 ブトリシランを用いて実施した毒性試験（続き）

Study Number	Brief Title	Dose (mg/kg)	GLP (Y/N)	Tabulated Summary
Genotoxicity				
TTRSC02-GLP15-029	Bacterial reverse mutation assay (*in vitro*)	5.00, 16.0, 50.0, 160, 500, 1600, and 5000 µg/plate	Y	表 2.6.7-14
TTRSC02-GLP15-030	Human lymphocyte chromosomal aberration assay (*in vitro*)	245, 350, and 500 µg/mL	Y	表 2.6.7-15
TTRSC02-GLP15-028	Rat bone marrow micronucleus assay (*in vivo*)	Single SC dose, harvest at 24 or 48 hours M: 0 (0.9% NaCl), 60 (cyclophosphamide), 500, 1000, and 2000; F: 0 (0.9% NaCl), 2000	Y	表 2.6.7-16
Carcinogenicity				
NCS-21-00440	2-Year carcinogenicity and TK study in CD-1 mice	M: 0 (0.9% NaCl), 2, 6, 13 (qM) F: 0 (0.9% NaCl), 3, 9, 18 (qM)	Y	N/A (ongoing)
TTRSC02-GLP18-003	2-Year carcinogenicity and TK study in Sprague Dawley rats	M: 0 (0.9% NaCl), 4.0, 7.5, 15 (qM); 15 (q3M) F: 0 (0.9% NaCl), 6.0, 12.5, 25 (qM); 25 (q3M)	Y	表 2.6.7-20
TTRSC02-DSM18-031	8-Week DRF toxicity and TK study in Tg-rasH2 WT mice	0 (0.9% NaCl), 500, 1000, 1500 (qM×3)	N	表 2.6.7-17
TTRSC02-DSM16-032	12-Week DRF toxicity and TK study in Tg-rasH2 WT and C57BL/6 mice	0 (0.9% NaCl), 30, 100, 300 (qM×4)	N	表 2.6.7-18
TTRSC02-DSM19-009	13-Week DRF toxicity and TK study in CD-1 mice	0 (0.9% NaCl), 10, 25, 50 (qM×4)	N	表 2.6.7-19

表 2.4.4-1 ブトリシランを用いて実施した毒性試験（続き）

Study Number	Brief Title	Dose (mg/kg)	GLP (Y/N)	Tabulated Summary
Reproductive and Developmental Toxicity				
TTRSC02-GLP16-013	DRF developmental toxicity and TK study in female rats	**Vutrisiran:** qw prior to pairing: 0 (0.9% NaCl), 15, 50, 150; qd after mating (GD 6-17): 0 (0.9% NaCl), 3, 10, 30 **AD-59206:** 30 (qw prior to pairing; qd: GD 6, 12, and 17)	Y	表 2.6.7-21
TTRSC02-DSM18-011	12-Day DRF toxicity study in female Sprague Dawley rats	0 (0.9% NaCl), 3, 10, 30, 100 (qd×12)	N	表 2.6.7-22
TTRSC02-GLP18-005	Fertility and early embryonic development to implantation study with TK in rats	0 (0.9% NaCl), 15, 30, 70 **M:** qw prior to and during pairing (7 doses) **F:** qw prior to and during pairing and on GD 6 (4 to 5 doses)	Y	表 2.6.7-24
TTRSC02-GLP18-013	Embryo-fetal development and TK study in female rats	0 (0.9% NaCl), 3, 10, 30 (qd: GD 6-17)	Y	表 2.6.7-25
TTRSC02-GLP16-012	DRF early embryonic developmental toxicity and TK study in female rabbits	0 (0.9% NaCl), 3, 10, 30 (qd: GD 7-19)	Y	表 2.6.7-23
TTRSC02-GLP18-014	Embryo-fetal development and TK study in female rabbits	0 (0.9% NaCl), 3, 10, 30 (qd: GD 7-19)	Y	表 2.6.7-26

表 2.4.4-1 ブトリシランを用いて実施した毒性試験（続き）

Study Number	Brief Title	Dose (mg/kg)	GLP (Y/N)	Tabulated Summary
TTRSC02-GLP19-007	Prenatal and postnatal development and TK study in rats	0 (0.9% NaCl), 5, 10, 20 (qd: GD 7, 13, 19 and LD 6, 12, 18)	Y	表 2.6.7-27
Local Tolerance				
No studies conducted				
Other Toxicity Studies				
TTRSC02-DSM15-045	Cytokine induction in human whole blood assay (*in vitro*)	4 µg/mL	N	表 2.6.7-28

略号：AD-59206＝マウス／ラットで薬理活性を示す revusiran 及びブトリシランのサロゲート；DRF＝用量設定；F＝雌；GD＝妊娠日齢；GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；LD＝授乳日；M＝雄；N＝非適用；N/A＝該当せず；q3M＝3 ヵ月に 1 回；qd＝1 日 1 回；qM＝月 1 回；qw＝週 1 回；SC＝皮下；TK＝トキシコキネティクス；wt＝野生型；Y＝適用。

2.4.4.2 単回投与毒性試験

ブトリシランの単回投与毒性試験は実施しなかった。初期に実施したブトリシランの反復投与毒性試験は 13 週間の投与期間で実施し、早期臨床試験での 3 ヵ月に 1 回×2 回投与の可能性を支持するようにデザインした。

GLP 適合の *in vivo* でのラット赤血球における小核試験（試験番号[TTRSC02-GLP15-028]）において、単回皮下投与した後、一般状態を観察した。本試験では雄ラット 5 匹/群（500、1000 又は 2000 mg/kg）及び雌ラット 5 匹/群（2000 mg/kg）にブトリシランを皮下投与し、投与 48 時間後までモニターした。死亡又は一般状態に有害な徴候は認められなかった。ブトリシランは最大 2000 mg/kg（本試験の限界用量）の用量で投与後 48 時間良好な忍容性を示した。

2.4.4.3 反復投与毒性試験

毒性プロファイルはラットでは投与頻度に影響を受け、肝毒性が 1 日 1 回投与でみられたが、月 1 回投与では認められなかった。受胎能及び胚・胎児発生に関する試験を組み合わせた DRF 試験（試験番号[TTRSC02-GLP16-013]）において、妊娠中の雌ラットに連日皮下投与したとき、母動物に毒性が認められたことから、主要な胚・胎児発生に関する試験の用量選択を更に可能とするため、非妊娠雌ラットを用いて連日反復投与による探索的 DRF 試験（試験番号[TTRSC02-DSM18-011]）を実施した。ブトリシランを 10 又は 30 mg/kg の用量で 1 日 1 回×12 日間連日投与したとき、それぞれ軽度又は中等度の肝毒性と一致する一連の臨床病理学的及び病理組織学的所見が認められた（2.4.4.6 項参照）。

探索的反復投与毒性 DRF 試験において、雄ラット（試験番号[TTRSC02-DSM15-028]）及び雌サル（試験番号[TTRSC02-DSM15-027]）にブトリシランを最高用量である 120 mg/kg（ラット）又は 300 mg/kg（サル）までの用量で月 1 回×4 回投与したとき、忍容性は良好であった。

ラット及びサルを用いた GLP 適合の 13 週間投与毒性試験をラットの 6 ヵ月間投与毒性試験及びサルの 9 ヵ月間投与毒性試験と併せて実施した。ラットの 13 週間投与毒性試験（試験番号[TTRSC02-GLP15-026]）では、0、12、40 又は 120 mg/kg の用量で皮下投与（月 1 回×4 回）したときの毒性を評価した。サルの 13 週間投与毒性試験（試験番号[TTRSC02-GLP15-025]）では、0、30、100 又は 300 mg/kg の用量で皮下投与（月 1 回×4 回）したときの毒性を評価した。ラットにおける 6 ヵ月間投与毒性試験（試験番号[TTRSC02-GLP15-040]）では、0、15、50 又は 150 mg/kg の用量で皮下投与（月 1 回×8 回）したときの毒性を評価した。サルにおける 9 ヵ月間投与毒性試験（試験番号[TTRSC02-GLP15-039]）では、0、30、100 又は 300 mg/kg の用量で皮下投与（月 1 回×11 回）したときの毒性を評価した。

反復投与毒性試験で認められたブトリシランに関連した所見は、ラット及びサルにおいて主にブトリシランの取込み器官であり薬理活性を示す（サルのみ）標的器官である肝臓において認められた。ラットにおける 13 週間投与毒性試験での肝臓における所見として、40 mg/kg 以上の用量で投与した雄及び 120 mg/kg の用量で投与した雌で肝細胞の軽微～軽度の空胞化、12 及び 120 mg/kg の用量で投与した雌で肝細胞の軽微な有糸分裂像の増加、120 mg/kg の用量で投与した雄で軽微な個々の肝細胞壊死の増加、120 mg/kg の用量で軽微な好塩基性肝細胞変化巣の増加が認められた（雌のみ；試験番号[TTRSC02-GLP15-026]）。12 週間の回復期間の後、肝細胞空胞化は部分的に回復したと考えられたが、雄では 40 mg/kg 以上の用量で、雌では 120 mg/kg の用量で依然として認められた。肝細胞の有糸分裂像の増加及び個々の肝細胞壊死は完全に可逆的であった。対照群でも認められたが、120 mg/kg の用量で投与した雌ラットでは、回復期間終了時に軽微な好塩基性肝細胞変化巣の発現頻度の上昇が認められた。ラットにおける 6 ヵ月間投与毒性試験の肝臓での所見として、15 mg/kg 以上の用量で投与した雄及び 50 mg/kg 以上の用量で投与した雌で軽微～中等度の肝細胞空胞化、150 mg/kg の用量で投与した雌で軽微な肝細胞有糸分裂の増加、150 mg/kg の用量で軽微な好酸性細胞変化巣、軽微な混合細胞変化巣（15 mg/kg の用量で投与した雌 1 匹）、50 mg/kg の用量で投与した雄 1 匹及び 50 又は 150 mg/kg の用量で投与した雌のそれぞれ 9/15 匹又は 14/15 匹で軽微～軽度の好塩基性細胞変化巣、50 mg/kg 以上の用量で投与した雄及び 150 mg/kg の用量で投与した雌で軽微な肝細胞巨大核が認められた（試験番号[TTRSC02-GLP15-040]）。13 週間投与試験と比較して 6 ヵ月間投与試験では、肝臓での所見の全般的な発現頻度及び／又は重篤度の上昇が認められた。その後に実施した非 GLP のラットを用いた探索的毒性試験では、雌ラットにブトリシランを月 1 回×7 回又は 3 ヵ月に 1 回×3 回 6 ヵ月間皮下投与した後、3 ヵ月間の回復期間を設けた（試験番号[TTRSC02-DSM17-011]）。50 mg/kg の用量で月 1 回投与及び 50 mg/kg の用量で 3 ヵ月に 1 回投与したとき、投与期間終了時に軽微～軽度の両染性及び／又は好塩基性の細胞変化巣が認められ、両群で発現頻度及び重篤度は同程度であった。50 mg/kg の用量で月 1 回投与又は 10 mg/kg 以上の用量で 3 ヵ月に 1 回投与したとき、有糸分裂像の増加が認められた。5 mg/kg 以上の用量で月 1 回投与又は 50 mg/kg の用量で 3 ヵ月に 1 回投与したラットの肝臓において、回復期間終了時に軽微な好塩基性細胞変化巣が認められた。回復期間終了時の好塩基性細胞変化巣の発現頻度は、50 mg/kg の

用量で 3 ヵ月に 1 回×3 回投与（累積投与量は 150 mg/kg）したラットと比較して、50 mg/kg の用量で月 1 回×7 回投与（累積投与量は 350 mg/kg）したラット、また、10 mg/kg の用量で 3 ヵ月に 1 回×3 回投与（累積投与量は 30 mg/kg）したラットと比較して、5 mg/kg の用量で月 1 回×7 回投与（累積投与量は 35 mg/kg）を投与したラットで高かった。これらの結果は、累積投与量及び／又は投与スケジュールが肝細胞変化巣の形成に関与していることを示唆している。肝細胞変化巣はラットに特異的な所見であり、実施した非臨床試験で用いた他の動物種ではいずれも認められなかった。

サルにおける 13 週間投与試験では、100 mg/kg 以上の用量で投与したとき、肝臓における所見として、クッパー細胞に軽微～軽度の好塩基性顆粒が認められた（試験番号[TTRSC02-GLP15-025]）。本所見は 12 週間の回復期間終了時に部分的に回復した。サルにおける 9 ヵ月間投与試験では、雌では 30 mg/kg 以上の用量で、雄では 100 mg/kg 以上の用量でクッパー細胞及び／又は肝細胞に軽微～軽度の好塩基性顆粒が認められた（試験番号[TTRSC02-GLP15-039]）。いずれの試験においても、いずれの動物種でもこれらの変化と関連する臨床病理学的所見は認められなかったことから、これらの所見は有害とは判断しなかった。クッパー細胞及び／又は肝細胞におけるこれらの好塩基性顆粒は、ブトリシランの蓄積を示唆している可能性が高いと考えられる[9]。

ラットにおける 13 週間投与試験において、腎臓では 40 mg/kg 以上の用量で近位尿細管上皮細胞の細胞質において、軽微～中等度の好塩基性顆粒が認められた。本所見は 12 週間の回復期間終了時には認められなかった（試験番号[TTRSC02-GLP15-026]）。ラットの 6 ヵ月間投与試験では、50 mg/kg 以上の用量で尿細管細胞質において軽微～中等度の好塩基性顆粒（ときに軽微な空胞化を伴う）が認められた（試験番号[TTRSC02-GLP15-040]）。本所見は反復投与後に進行しなかった。ラットの腎臓への蓄積はオリゴヌクレオチドによる治療法でよくみられる所見である[9]。腎機能への影響を示唆する関連した臨床病理学的所見も、病理組織学的変化も認められなかったことから、本所見は有害とは判断しなかった。

ラット若しくはサルにおける 13 週間投与試験又はサルにおける 9 ヵ月間投与試験において、ブトリシランを反復皮下投与したとき、投与部位において初回投与後又は最終投与後に皮膚刺激性を示唆する所見は認められなかった。ラットにおける 6 ヵ月間投与試験では、50 mg/kg 以上の用量で最終投与 4 時間後に投与部位において一過性のごく軽度の浮腫（雌雄）及び／又はごく軽度の紅斑（雌のみ）が認められたが、有害とは判断しなかった（試験番号[TTRSC02-GLP15-040]）。ラットにおける 13 週間投与試験では、12 mg/kg 以上の用量で試験終了時に、投与部位において軽微～軽度の混合炎症細胞浸潤及び／又は軽微な空胞化マクロファージ浸潤が認められた（試験番号[TTRSC02-GLP15-026]）。本所見は 12 週間の回復期間終了時に回復したと考えられた。同様に、6 ヵ月間投与試験では、15 mg/kg 以上の用量で投与したラットにおいて、投与部位に軽微～軽度の空胞化マクロファージ浸潤が認められたが、本所見は反復投与により進行しなかった（試験番号[TTRSC02-GLP15-040]）。サルにおける 13 週間投与試験では投与部位に病理組織学的変化は認められなかった（試験番号[TTRSC02-GLP15-025]）。サルにおける 9 ヵ月間投与試験ではすべての用量で皮下投与部位に軽微な空胞化マクロファージの蓄積が認められたが、有害とは判断しなかった（試験番号[TTRSC02-GLP15-039]）。マウスにおける 12 週間投与 DRF 試験では、30 mg/kg 以上の用量で投与部位において軽微～中等度の空胞化マクロファージ浸潤が認められ、両系統（C57BL/6

及び Tg-rasH2 WT）のマウスにおいて、30 mg/kg 以上の用量でときに軽微～中等度の線維芽細胞空胞化を伴った（試験番号[TTRSC02-DSM16-032]）。

リンパ節に関して、13 週間投与試験では 12 mg/kg 以上の用量で投与した雌及び 40 mg/kg 以上の用量で投与した雄の鼠径リンパ節において軽微な空胞化マクロファージが認められたが、12 週間の回復期間終了時には認められなかった（試験番号[TTRSC02-GLP15-026]）。サルにおける 13 週間投与試験では、すべての用量群で雌雄の各種リンパ節において、軽微～軽度の空胞化マクロファージが認められた（試験番号[TTRSC02-GLP15-025]）。これらの所見は、12 週間の回復期間終了時に部分的に回復した。サルにおける 9 ヵ月間投与試験では、すべての用量でいくつかのリンパ節で軽微～軽度の空胞化マクロファージの蓄積が認められた（試験番号[TTRSC02-GLP15-039]）。これらの病理組織学的変化は、退行性変化、臨床的又は臨床病理学的所見とは関連しておらず、反復投与によっても進行しなかったことから、ブトリシランの取込みを反映している可能性が高いと考えられる。

ラット及びサルを用いた一般毒性試験において、ブトリシランに関連した影響（肝臓、腎臓、リンパ節及び／又は皮下投与部位）はいずれも肝臓での ASGPR を介した取込み、腎臓を介した全身クリアランス又はマクロファージによる貪食性の取込みと一致しており、他の組織では取込みはほとんどないか、全くないことが示された。

サルを用いた 13 週間及び 9 ヵ月間投与による両方の試験において、ブトリシランを 30 mg/kg 以上の用量で反復投与したとき、予想通り、血中 TTR（最大 99%）及びビタミン A（最大 89%）濃度のベースラインからの持続的な低下が認められ、13 週間投与試験では 12 週間の回復期間を通じて作用は持続していた（試験番号[TTRSC02-GLP15-025]及び[TTRSC02-GLP15-039]）。TTR 及びビタミン A 濃度の低下に伴う明らかな毒性所見は認められず、眼科検査、網膜電図及び眼の病理組織学的検査は正常であった。サルを用いた両試験において、T4 のマイナーな輸送担体としての TTR の役割と一致して、血清中 T4 濃度のベースラインと比較した低下（最大 48%）が認められた。下垂体又は甲状腺に病理組織学的変化は認められなかった。

ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験における NOAEL は投与したそれぞれの最高用量である 150 及び 300 mg/kg であった。

2.4.4.3.1 毒性所見と薬物動態との関連

主要な反復投与毒性試験において、重要な反応に関連するブトリシランの血漿中濃度の閾値及びこれらの重要な反応に対して算出した曝露量の安全域を表 2.4.4-2 に示した。

表 2.4.4-2 主要な非臨床反復投与毒性試験：重要な反応と関連するブトリシランの用量

Key Response(s)	Dose (mg/kg)	C_{max}[a] (µg/mL)	AUC (µg·h/mL)	Safety Margins[b] C_{max}/AUC
TTRSC02-GLP15-026: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats with a 12-week Recovery Phase				
Dosing Schedule: Monthly				
Main necropsy: minimal ↑mitotic figures in hepatocytes (F); minimal vacuolated macrophages in the inguinal lymph nodes (F); minimal-to-slight infiltrates of mixed inflammatory cells and/or minimal vacuolated macrophages in SC injection sites. **Recovery necropsy:** partial resolution of liver findings; lymph node, kidney, and injection site findings recovered.	12	1.64	4.07	17/13
Main necropsy: minimal-to-slight vacuolation of hepatocytes (M); minimal-to-moderate basophilic granules in the proximal tubule epithelial cells of the kidney; minimal vacuolated macrophages in the inguinal lymph nodes; minimal-to-slight infiltrates of mixed inflammatory cells and/or minimal vacuolated macrophages in SC injection sites. **Recovery necropsy:** minimal vacuolation of hepatocytes (M); partial resolution of liver findings; lymph node, kidney, and injection site findings recovered.	40	5.00	15.7	51/51
Slight ↓BWG (-7%). **Main necropsy:** minimal-to-slight vacuolation of hepatocytes; minimal ↑mitotic figures in hepatocytes (F); minimal foci of basophilic hepatocellular alteration (F); minimally ↑individual hepatocyte necrosis (M); minimal-to-moderate basophilic granules in the proximal tubule epithelial cells of the kidney; minimal vacuolated macrophages in the inguinal lymph nodes; minimal-to-slight infiltrates of mixed inflammatory cells and/or minimal vacuolated macrophages in SC injection sites. **Recovery necropsy:** minimal vacuolation of hepatocytes; ↑incidence of minimal foci of basophilic cellular alteration (F); partial resolution of liver findings; lymph node, kidney, and injection site findings recovered.	**120 (NOAEL)**	23.8	240	242/786

表 2.4.4-2 主要な非臨床反復投与毒性試験：重要な反応と関連するブトリシランの用量（続き）

Key Response(s)	Dose (mg/kg)	C_{max}[a] (µg/mL)	AUC (µg·h/mL)	Safety Margins[b] C_{max}/AUC
TTRSC02-GLP15-040: ALN-TTRSC02: A 6-Month Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Sprague-Dawley Rats				
Dosing Schedule: Monthly				
↓BWG Day 1-197 (M: -12%); minimal ↓total protein concentration, ALB, and GLOB (F); minimal mixed cell focus of cellular alteration in liver (1 F); minimal-to-moderate hepatocellular vacuolation (M); minimal-to-slight infiltrates of macrophages at SC injection site.	15	1.53	8.91	16/29
↓BWG Day 1-197 (M: -18%); ↓BW Day 197 (M: -13%); very slight injection site edema Day 197 (M); very slight injection site erythema (F); mild ↑ALB and A/G and mild ↓GLOB (M); minimal ↓total protein concentration, ALB, and GLOB (F); minimal ↓calcium (F); minimal-to-slight basophilic foci of cellular alteration in liver (1 M; F); minimal-to-moderate hepatocellular vacuolation; minimal hepatocyte karyomegaly (M); minimal vacuolation of rare tubule cells in kidney (M); minimal-to-moderate basophilic granules in kidney; minimal-to-slight infiltrates of macrophages at SC injection site.	50	7.33	43.8	74/143
↓BWG Day 1-197 (M: -23%); ↓BW Day 197 (M: -18%); very slight injection site edema Day 197; very slight injection site erythema (F); mild ↑ALB and A/G and mild ↓GLOB (M); minimal ↓total protein concentration, ALB, and GLOB (F); minimal ↓calcium (F); minimal eosinophilic foci of cellular alteration in liver; minimal-to-slight basophilic foci of cellular alteration in liver; minimal-to-moderate hepatocellular vacuolation; minimally ↑hepatocyte mitosis (F); minimal hepatocyte karyomegaly; minimal vacuolation of rare tubule cells in kidney; minimal-to-moderate basophilic granules in kidney; minimal-to-slight infiltrates of macrophages at SC injection site.	**150 (NOAEL)**	29.1	331	296/1084

表 2.4.4-2 主要な非臨床反復投与毒性試験：重要な反応と関連するブトリシランの用量（続き）

Key Response(s)	Dose (mg/kg)	C_{max}[a] (µg/mL)	AUC (µg·h/mL)	Safety Margins[b] C_{max}/AUC
TTRSC02-GLP15-025: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase				
Dosing Schedule: Monthly				
Main necropsy: minimal-to-moderate vacuolated macrophages in mesenteric lymph node. **Recovery necropsy:** similar findings at recovery necropsy but with ↓incidence and/or severity indicating partial reversibility.	30	6.88	77.8	70/255
Main necropsy: minimal-to-slight basophilic granules in Kupffer cells; minimal-to-slight vacuolated macrophages in axillary, inguinal, and mandibular lymph nodes; minimal to moderate vacuolated macrophages in mesenteric lymph node. **Recovery necropsy:** Similar findings at recovery necropsy but with ↓incidence and/or severity indicating partial reversibility.	100	28.4	345	289/1130
Main necropsy: minimal-to-slight basophilic granules in Kupffer cells; minimal-to-slight vacuolated macrophages in axillary, inguinal, and mandibular lymph nodes; minimal-to-moderate vacuolated macrophages in mesenteric lymph node. **Recovery necropsy:** Similar findings at recovery necropsy but with ↓incidence and/or severity indicating partial reversibility.	**300 (NOAEL)**	60.1	1360	611/4454
TTRSC02-GLP15-039: ALN-TTRSC02: A 9-Month Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Cynomolgus Monkeys				
Dosing Schedule: Monthly				
↓BWG (M: -27%); minimal basophilic granules in Kupffer cells and/or hepatocytes (F); minimal vacuolated macrophages in axillary lymph nodes; minimal vacuolated macrophages in mesenteric lymph node; minimal vacuolated macrophages at SC injection sites; positive ADA response (1/8 animals) on Day 253.	30	8.53	86.0	87/282

表 2.4.4-2　主要な非臨床反復投与毒性試験：重要な反応と関連するブトリシランの用量（続き）

Key Response(s)	Dose (mg/kg)	C_{max}[a] (µg/mL)	AUC (µg·h/mL)	Safety Margins[b] C_{max}/AUC
↓BWG (M: -36%); minimal basophilic granules in Kupffer cells and/or hepatocytes; minimal vacuolated macrophages in axillary, inguinal, and/or mandibular lymph nodes; minimal-to-slight vacuolated macrophages in mesenteric lymph node (M: minimal); minimal vacuolated macrophages at SC injection sites; positive ADA response (4/8 animals) on Day 253; predose positive ADA response (1/8 animals) which was lower on Day 29 and negative on Day 253.	100	29.1	479	296/1569
↓BWG (M: -36%; F: -20%); minimal-to-slight basophilic granules in Kupffer cells and/or hepatocytes; minimal vacuolated macrophages in axillary, inguinal, and/or mandibular lymph nodes; minimal-to-slight vacuolated macrophages in mesenteric lymph node; minimal vacuolated macrophages at SC injection sites; no positive ADA responses.	**300 (NOAEL)**	71.7	1170	729/3832

略号：A/G＝アルブミン／グロブリン、ADA＝抗薬物抗体、ALB＝アルブミン、ALN-TTRSC02＝ALN-65492 を含有するブトリシラン製剤、AUC＝（血漿中）濃度－時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}t(last)}$＝投与後から最終濃度測定時点までの AUC、BW＝体重、BWG＝体重増加量、C_{max}＝T_{max}における最高（血漿中）濃度の実測値、F＝雌、GLOB＝グロブリン、M＝雄、NOAEL＝無毒性量、q3M＝3 ヵ月に 1 回、qM＝月 1 回、SC＝皮下、T_{max}＝最高（血漿中）濃度到達時間。

a　反復投与試験では血漿中濃度の AUC 及び C_{max} の値は雌雄合計の平均値を示した。値は試験終了時付近のものであり、$AUC_{0\text{-}t(last)}$として示した。

b　曝露量の安全域は健康被験者に 25 mg の用量で単回 SC 投与したときの曝露量として、ヒトでの C_{max} が 0.0984 µg/mL、$AUC_{0\text{-}t(last)}$が 0.916 µg·h/mL であることが示されており、これらのデータに基づいて算出した（試験番号 ALN-TTRSC02-001：「A Phase 1, Randomized, Single-Blind, Placebo-Controlled, Single-Ascending Dose, Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics Study of Subcutaneously Administered ALN-TTRSC02 in Healthy Subjects. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02797847）」。ヒト（q3M）及びラット又はサル（qM）における投与レジメンの相違を補正するため、ラット及びサルでの AUC の値に 3 を乗じた。

2.4.4.3.2　標的器官毒性

ラットにおける DRF 試験及び主要な胚・胎児発生に関する試験において、ブトリシランを 1 日 1 回×12 日間連日投与したとき、肝毒性が認められた（2.4.4.6 項参照）。

ラット及びサルにおける反復投与毒性試験では、ブトリシランを月 1 回投与したとき、ブトリシランに関連した標的器官毒性は認められなかった。肝臓、腎臓、皮下投与部位及びリンパ節ではブトリシランに関連した非有害所見又は二次的な所見が認められた。

2.4.4.4 遺伝毒性

ブトリシランを用いた GLP 適合の遺伝毒性試験（細菌を用いた復帰突然変異試験：試験番号[TTRSC02-GLP15-029]、ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験：試験番号[TTRSC02-GLP15-030]及びラット骨髄における小核試験：試験番号[TTRSC02-GLP15-028]）は、ICH S2（R1）「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」に概説されている限界用量までの用量／濃度で実施し、いずれも陰性であった。これらの試験結果はブトリシランが変異原性も染色体異常誘発作用も有していないことを示している。

2.4.4.5 がん原性

Sprague Dawley ラットを用いた 2 年間投与がん原性試験が完了した。ラットにおいて、ブトリシランは検討した最高用量（雄では 15 mg/kg の用量で月 1 回又は 3 ヵ月に 1 回投与及び雌では 25 mg/kg の用量で月 1 回又は 3 ヵ月に 1 回投与）でがん原性を示さなかった。雄及び雌ラットにそれぞれ 15 mg/kg（3 ヵ月に 1 回）及び 25 mg/kg（3 ヵ月に 1 回）の用量で投与したときの AUC に基づく曝露量の安全域は、最大推奨臨床用量（MRHD）でのヒトにおける曝露量のそれぞれ 18 及び 29 倍であった。臨床投与スケジュールである 3 ヵ月に 1 回投与に標準化したとき、雄及び雌ラットにそれぞれ 15 mg/kg（月 1 回）及び 25 mg/kg（月 1 回）の用量で投与したときの AUC に基づく曝露量の安全域は、MRHD でのヒトにおける曝露量のそれぞれ 57 及び 52 倍であった。

当初の非臨床試験開発計画には、Sprague Dawley ラットを用いた 2 年間投与がん原性試験（前述）及び Tg-rasH2 マウスを用いた 6 ヵ月間投与がん原性試験が含まれていた。Tg-rasH2 マウスを用いた 6 ヵ月間投与がん原性試験の準備のため、2 つの DRF 試験を実施した。C57BL/6 及び Tg-rasH2 WT マウスを用いて、初期に非 GLP の 12 週間投与 DRF 試験を実施した（試験番号[TTRSC02-DSM16-032]）。C57BL/6 及び Tg-rasH2 WT マウスにブトリシランを 0、30、100 又は 300 mg/kg の用量で月 1 回×4 回投与したときの忍容性は良好であり、最大耐量は特定されなかった。両系統のマウスの肝臓での所見として、30 mg/kg 以上の用量で軽微～中等度の肝細胞空胞化が認められ、本所見は ALT 活性の軽微な高値（2.5 倍以下）と関連していた。その後、Tg-rasH2 WT マウスを用いた非 GLP の 8 週間投与 DRF 試験（試験番号[TTRSC02-DSM18-031]）を限界用量までのより高用量（0、500、1000 又は 1500 mg/kg）で実施した。ブトリシランを 1500 mg/kg 以下の用量で月 1 回×3 回投与したとき、一般状態として良好な忍容性を示した。肝臓での所見として、500 mg/kg 以上の用量で投与したマウスで肝細胞の空胞化、500 mg/kg 以上の用量で投与した雄及び 1000 mg/kg の用量で投与した雌において肝細胞の肥大／腫大が認められた。1000 mg/kg 以上の用量で投与した雌の副腎皮質において、用量依存的な被膜下細胞過形成の程度の上昇がブトリシランに関連した所見であると考えられたが、Tg-rasH2 マウスによくみられる自然発生的な所見であることから、意義は不明であった[10]。リンパ節及び皮下投与部位では、いずれの用量においても空胞化マクロファージが認められた。これらの月 1 回投与したときの用量（500～1500 mg/kg）及びそのときの血漿中曝露倍数は予定臨床用量である 25 mg（3 ヵ月に 1 回投与）と比較して非常に高かった。肝臓での所見に関しては、Tg-rasH2 マウスを用いた主要な試験において、6 ヵ月間の過剰な曝露により患者には該当しない二次性の腫瘍を生じる毒性を誘発する可能性があり、試験期間が 6 ヵ月間であるため、所見

を関連付けることはできなかった。これらの理由のため、ブトリシランの投与による発がんリスクの可能性を患者に情報提供するためには、25 mg の用量でのヒトでの AUC の少なくとも 25 倍の曝露量に到達する用量で CD-1 マウスを用いた 2 年間がん原性試験を実施することがより適切であると考えられた。CD-1 マウスを用いた 2 年間投与がん原性試験の準備のため、本系統のマウスを用いて 13 週間投与 DRF 試験を実施した。CD-1 マウスを用いた 13 週間投与 DRF 試験（試験番号[TTRSC02-DSM19-009]）において、ブトリシラン（0、10、25 又は 50 mg/kg；月 1 回×4 回）は良好な忍容性を示した。ブトリシランに関連した軽微な血液化学的変化として、対照群と比較して 25 mg/kg 以上の用量で投与した雄で総たん白質（11.5%以下）及びアルブミン（8.1%以下）の低値、10 mg/kg 以上の用量で投与した雌雄でコレステロールの低値（61.4%以下）が認められた。病理組織学的変化との関連は特定されなかった。肝臓ではブトリシランに関連した病理組織学的変化として、10 mg/kg 以上の用量で軽度～中等度の肝細胞グリコーゲンの増加（雌）、軽微～中等度の肝細胞空胞化及び軽度の肝細胞変性／壊死が認められた。皮下投与部位では 10 mg/kg 以上の用量で軽微～軽度の空胞化マクロファージが認められた。これらの所見はいずれも全般的に重篤度が低く、マウスの健康状態に影響を及ぼさなかったことから、有害とは判断しなかった。CD-1 マウスを用いた 2 年間投与がん原性試験を 2021 年初旬に開始した。本試験報告書は試験が終了次第、提出する予定である。

2.4.4.6 生殖発生毒性

雌ラットにブトリシランを器官形成期に 1 日 1 回×12 日間連日投与したとき、母動物に肝毒性が認められた。そこで、ラットを用いた主要な生殖発生毒性試験において、母動物に軽微な毒性を発現する最高用量の特定を目的として、2 つの DRF 試験を実施した。また、ウサギを用いた主要な試験の用量設定のため、妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する DRF 試験も実施した。これらの試験について、以下に更に考察する。

ラットを用いた 1 つ目の DRF 試験（試験番号[TTRSC02-GLP16-013]）では、雌ラットにブトリシランを 15、50 又は 150 mg/kg の用量で週 1 回×3 回皮下投与した後、未処置の雄と同居させ、妊娠中にブトリシランをそれぞれ 3、10 又は 30 mg/kg の用量で連日投与した。別の群の雌ラットにマウス／ラットに薬理活性を示す revusiran 及びブトリシランのサロゲート（AD-59206）を 30 mg/kg の用量で同居させる前に週 1 回×3 週間、妊娠中に週 1 回投与し、薬理作用（TTR 及びビタミン A の低下）を誘発した。50/10 及び 150/30 mg/kg の用量で母動物に対する毒性（肝毒性を示唆）及び胎児に対する毒性（母動物への毒性による二次的な所見）が認められた。母動物に対する毒性として、肝機能の変化（総たん白質、アルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン及びコレステロールの低値）及び肝細胞傷害、肝胆道系病変及び／又は胆汁うっ滞（AST、ALT 及び ALP 活性の高値並びに総ビリルビンの高値）を示唆する臨床病理学的変化が認められた。催奇形性のエビデンスは認められず、受胎能及び／又は交尾への影響も認められなかった。母動物がブトリシランに全身曝露されたにもかかわらず、胎児では曝露は検出されなかった。T4 濃度は対照群を含むすべての群で低下したが（交配前の Day 0 の濃度から妊娠日齢〔GD〕21 に最大 69%低下）、妊娠ラットでは想定された変化であり、ブトリシランの投与によるものではなかった。サロゲート分子を 30 mg/kg の用

量で投与したとき、母動物で曝露がみられたが、胎児では検出されず、また、予想通り、血中 TTR（95%超）、T4（交配前の Day 14 において対照群から 67%及び妊娠 21 日では定量下限未満）及びビタミン A（72%以上）の低下が認められた。受胎能、交尾、生殖に関する指標及び胚・胎児発生に対する影響は認められなかった。

2 つ目の DRF 試験（試験番号[TTRSC02-DSM18-011]）はブトリシランを 1 日 1 回連日皮下投与したときに認められた肝毒性を更に特徴付けるために、非妊娠雌ラットを用いて実施した。ラットにブトリシランを 0、3、10、30 又は 100 mg/kg の用量で 1 日 1 回×12 日間連日皮下投与した。対照群と比較した血液化学的変化として、すべての用量で用量依存的な AST の高値（611%以下）、10 mg/kg 以上で ALT の高値（687%以下）、30 mg/kg 以上で ALP（151%以下）及び総ビリルビン（3027%以下）の高値並びに 30 及び／又は 100 mg/kg で肝機能の異常を示唆する他の検査項目の低値（トリグリセリド、コレステロール、アルブミン、グロブリン、総たん白質、カルシウム、血中尿素窒素、グルコース及びクレアチニン）が認められた。3 及び 10 mg/kg の用量（組織学的に評価した用量のみ）では、軽微～顕著な肝細胞空胞化、軽微な単細胞壊死並びに軽微～軽度の混合細胞浸潤及び／又はクッパー細胞の肥大／過形成の用量依存的な増加が認められた。また、有糸分裂像の増加及びクッパー細胞への軽微な色素沈着が認められた。10 mg/kg の用量で認められた一連の変化は軽度の肝毒性と一致しており、30 mg/kg 以上の用量で認められた変化は中等度の肝毒性と一致していた。

GLP 適合の主要なラットにおける受胎能及び初期胚発生に関する試験（試験番号[TTRSC02-GLP18-005]）では、雌雄ラットにブトリシランを 0、15、30 又は 70 mg/kg の用量で週 1 回皮下投与した。雄には同居前に 5 回、同居期間を通して週 1 回投与した（計 7 回）。雌には同居前、同居期間を通して 3 回及び妊娠 6 日に投与した（計 4 又は 5 回）。雄では試験終了時にブトリシランに関連した体重減少（30 mg/kg 以上の用量で対照群から 7.7%）及び体重増加量の減少（30 又は 70 mg/kg 群でそれぞれ対照群から 21%及び 19%）が認められたが、交尾、受胎能又は精子検査パラメータへの影響は認められなかった。30 mg/kg 以上の用量で前立腺重量の減少（対照群から 20～23%）が認められ、本所見は病理組織学的変化である腺房／導管における分泌物の軽微な減少と関連していた。本所見はブトリシランに関連した影響である可能性が考えられ、これらのラットで認められた体重増加量減少による二次的な影響である可能性もある[11]。雌ラットでは交尾、繁殖能、受胎能、性周期及び初期胚発生への影響は認められなかった。生殖能及び初期胚発生に対する NOAEL は雌雄共に 70 mg/kg（検討した最高用量）であった。

GLP 適合の主要なラットにおける胚・胎児発生に関する試験（試験番号[TTRSC02-GLP18-013]）では、妊娠ラットにブトリシランを 0、3、10 又は 30 mg/kg の用量で器官形成期（妊娠 6～17 日）に連日皮下投与した。10 mg/kg 以上の用量でブトリシランに関連した母動物の体重減少及び体重増加量の減少が認められ、30 mg/kg の用量では有害な影響と考えられた。これらの変化は 10 mg/kg 以上の用量では摂餌量の減少と関連していた。30 mg/kg の用量では、生殖に対する有害な所見として、早産の発現頻度上昇（母動物 4/22 匹）、着床後胚損失の増加（28%）、生存胎児数の減少が認められた。10 mg/kg 以上の用量では、対照群と比較して胎児重量の有害な減少（10 及び 30 mg/kg でそれぞれ 10 及び 26%）が認められた。黄体数、着床数及び着床前胚損失率に影響は認められなかった。胎児の外表及び内臓の評価で影響は認められず、骨格の形態異常も認められなかった。

30 mg/kg の用量では、有害ではない骨格変異として結節性又は波状肋骨、頭頂骨の不完全骨化、胸骨分節の未骨化が認められた。これらの骨格変異はげっ歯類でよく認められる所見であり、ラットの成長及び発育に影響を及ぼすとは予想されず、母動物に対する有害な毒性による二次的な所見である可能性が高いため、有害とは判断しなかった[12]。30 mg/kg の用量で母動物の体重及び／又は体重増加量及び摂餌量の有害な減少並びに病理組織学的観察所見が認められたことから、母動物に対する毒性の NOAEL は 10 mg/kg であった。本試験での投与頻度は 1 日 1 回であったが、予定している臨床投与頻度は 3 ヵ月に 1 回である。MRHD は 25 mg の用量で 3 ヵ月に 1 回（84 日間ごと）投与であり、これは 0.42 mg/kg（ヒトの体重を 60 kg と仮定）に相当し、標準化すると 0.005 mg/kg/日に相当する。これを考慮すると、母動物に対する NOAEL でのヒト等価用量（HED）は、標準化した MRHD の 323 倍に相当する（医薬品業界のためのガイダンス、成人健康志願者における治療のための初回臨床試験での最大安全開始用量の推定、米国保健福祉省食品医薬品局、医薬品評価研究センター〔CDER〕、2005 年 7 月）。10 mg/kg 以上の用量で胎児重量の有害な減少が認められたことから、生殖発生に対する NOAEL は 3 mg/kg である。生殖発生に対する NOAEL での HED は標準化した MRHD の 97 倍に相当する。

ウサギにおける胚・胎児に関する DRF 試験（試験番号[TTRSC02-GLP16-012]）では、30 mg/kg の用量で軽度で有害ではない体重及び摂餌量の減少が認められた。30 mg/kg 以下の用量で生殖に関する指標及び胎児の形態に影響は認められなかった。母動物がブトリシランに全身曝露されたにもかかわらず、妊娠中の胎児に曝露は検出されなかった。

GLP 適合の主要なウサギの胚・胎児発生に関する試験（試験番号[TTRSC02-GLP18-014]）では、いずれの用量においても忍容性は良好であり、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、妊娠、帝王切開パラメータ、胎児の外表、内臓及び骨格の評価に影響は認められなかった。母動物及び胎児への影響が認められなかったことから、母動物及び胚・胎児発生に対する NOAEL は 30 mg/kg である。母動物及び胚・胎児発生に対する NOAEL の HED は標準化した MRHD の 1935 倍に相当する。GLP 適合のラットにおける出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した（試験番号[TTRSC02-GLP19-007]）。妊娠雌ラットにブトリシランを 0、5、10 又は 20 mg/kg の用量で妊娠 7、13 及び 19 日並びに授乳 6、12 及び 18 日に皮下投与した。胚・胎児発生に関する試験では、ラットに 1 日 1 回投与したときに誘発される毒性を考慮して、週 1 回に近い投与スケジュールを用いた。母動物の生死、一般状態、体重、摂餌量及び生殖能にブトリシランによる影響は認められなかった。これらのデータから、ラットの母動物に対する NOAEL は 20 mg/kg である。F_1 世代において、出生から成熟までの期間を通して、出生児の発育、神経行動学的発達及び生殖能にブトリシランに関連した影響は認められなかった。これらのことから、出生児の生存及び発育に対する NOAEL も 20 mg/kg である。F_1 世代の出生児（生後 12 日）の血漿中ブトリシラン濃度はいずれも定量下限未満であった。

2.4.4.7 局所刺激性試験

ブトリシランを用いた局所刺激性試験は実施しなかった。ラット及びサルを用いた反復投与試験において、皮膚刺激性を最高用量（ラットでは 150 mg/kg 及びサルでは 300 mg/kg）まで Draize スコアリング変法により評価した。臨床使用が予定されている 50 mg/mL を超える濃度である

200 mg/mL（検討した最高濃度）までブトリシランによる有害な皮膚刺激性の所見は認められなかった。

2.4.4.8 その他の毒性試験

ブトリシランは *in vitro* 及び *in vivo* で免疫刺激作用を示さない。*In vitro* のヒト全血アッセイにおいて、インターロイキン（IL）-1β、IL-1 受容体拮抗薬（IL-1RA）、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 又は腫瘍壊死因子-α（TNF-α）のサイトカイン産生誘導は対照群と比較して認められなかった（試験番号[TTRSC02-DSM15-045]）。また、サルにおける DRF 試験において、ブトリシランを 100 及び 300 mg/kg の用量で月 1 回×4 回投与したときの血漿中サイトカイン濃度を評価した。同時期の対照群と比較して、血漿サンプル中において急性のサイトカイン（G-CSF、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロンγ、IL-1β、IL-1RA、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12/23〔p40〕、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、単球走化性因子-1、MIP-1α、MIP-1β、CD40 リガンド、トランスフォーミング増殖因子-α、TNF-α 及び血管内皮細胞増殖因子）放出を示唆するエビデンスは認められなかった（試験番号[TTRSC02-DSM15-027]）。

ラットにブトリシランを反復投与したとき、ADA 陽性反応は認められなかった（試験番号[TTRSC02-GLP15-040]）。

サルではブトリシランを慢性的に曝露させたとき、30（1/8 例）及び 100 mg/kg（4/8 例）の用量のみで ADA が認められ、対照物質又はブトリシランを投与する前に、一部のサル（3/32 例）で既存の抗体又は交差反応性抗体の存在が示唆された（試験番号[TTRSC02-GLP15-039]）。一貫した投与後の反応は認められず、すべての抗体価は 100 以下であった。ブトリシランの PD、TK 又は毒性に対する ADA の明らかな影響は認められなかった。

ブトリシランの光毒性試験は実施しなかった。ICH ガイドライン S10「医薬品の光安全性評価」の適用範囲は、ガイドラインの 1.3 項に記載されているように、一般的にはオリゴヌクレオチドには適用されない。

ブトリシランの依存性試験は実施しなかった。物理化学的特性及び反復投与毒性試験において行動に関連した所見が認められなかったことから、ブトリシランに依存性に関する懸念はないことが示されている。

ブトリシランを用いて実施した包括的パッケージの非臨床毒性試験において、ブトリシランに関連した代謝物及び不純物の安全性については適切に対応した。非臨床毒性試験に用いた原薬バッチの不純物プロファイルは、臨床試験で用いられた原薬及び市販製剤で使用される予定の原薬の不純物プロファイルと同等であった。

2.4.5 総括及び結論

RNAi 治療薬であるブトリシランの標的は、TTR たん白質をコードする *TTR* 遺伝子である。TTR は、循環血液中のレチノール（ビタミン A）の主要な担体であり、また T4 の非主要担体でもあるホモ四量体たん白質である。ATTR アミロイドーシスには 2 種類の異なるタイプがある。hATTR ア

ミロイドーシスでは、四量体たん白質が解離して二量体や変異型単量体及び野生型単量体になり、その後ミスフォールドする。これらのミスフォールドした TTR 単量体は自己集合して多量体となり、末梢神経系及び心臓を含むさまざまな組織でアミロイド線維及びアミロイド斑を形成し、全身衰弱性ポリニューロパチー及び心筋症をもたらす。wtATTR アミロイドーシスは、野生型 TTR アミロイド線維の蓄積によって引き起こされ、心筋症を主症状とする[2,3,4]。

TTR の遺伝子配列は動物により異なり、ブトリシランはサルの *TTR* とは交差反応性を示すが、げっ歯類及びウサギとは交差反応性を示さない。したがって、げっ歯類及びやウサギではブトリシランは薬理活性を示さなかった。ヒト細胞株及び初代培養サル肝細胞を用いた *in vitro* 試験、並びにヒト *TTR* V30M 遺伝子変異体を発現するトランスジェニックマウス及びサルを用いた *in vivo* 試験において、ブトリシランは、*in vitro* 試験で *TTR* 発現を、*in vivo* 試験で循環血液中の TTR たん白質を、濃度又は投与量依存的に特異的かつ持続的に減少した。サルを用いた 13 週間及び 9 ヵ月間毒性試験では、循環血液中の TTR（最大 99%）、ビタミン A（最大 89%）及び T4（最大 48%）のベースライン濃度に対する減少が認められたが、眼、下垂体及び甲状腺に対する影響は認められなかった。雄性サルを用いた心血管系及び呼吸器系に対する安全性薬理試験において、ブトリシランの投与による心電図及び呼吸器系パラメータに対する影響は認められなかった。サルを用いた 13 週間及び 9 ヵ月間毒性試験において実施された神経学的評価では、神経学的影響は認められなかった。以上の非臨床試験の結果より、ATTR アミロイドーシス患者においてブトリシランが循環血液中の TTR 濃度を減少させる有力な治療薬であることが裏付けられた。

ブトリシランの PK 及び ADME を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。ブトリシランは、*in vivo* で試験した動物種間及び *in vitro* でヒト及び動物間で類似の PK 及び ADME を示した。得られたデータから、ブトリシランを皮下投与すると標的器官（肝臓）へ siRNA の適切な曝露がおきることが示された。

血漿中 PK を、ブトリシランの単回皮下投与（ラット：0.3、1、3 又は 10 mg/kg；サル：0.3、1、3 又は 30 mg/kg)及び反復皮下投与（ラット：1 又は 40 mg/kg、qM×4；サル：0.3 又は 1 mg/kg、qM×4）して検討した。いずれの動物種においても、反復投与時の血漿中 PK データは単回投与時のデータと類似していた。投与頻度と比較してブトリシランの $t_{1/2}$ が短いため（ラットで 2 時間、サルで 0.45 時間）、ラット又はサルの血漿中への蓄積性は認められなかった。ラット及びサルにおけるブトリシランの PK は、反復皮下投与したとき、時間依存性又は投与量依存性を示さなかった。ブトリシランの PK に性差は認められなかった。

毒性評価をサポートするためブトリシランの TK 特性をマウス、ラット、ウサギ、サルを用いて検討した。ブトリシランは、マウス、ラット、雌ウサギ、サルにおいて、月 1 回の皮下投与でも血漿中に蓄積せず、検討した結果、性差は 2 倍未満であった。血漿中曝露量（C_{max} 及び AUC）は、投与量にほぼ比例して増加したか、いくつかの例の検討した投与量の範囲で、投与量比をわずかに上回る増加を示した。

ブトリシランの血漿たん白結合率は、マウス、ラット、サル、ヒトで同程度であった。ブトリシランは特異的に血球に分布しなかった。血漿たん白結合率はブトリシランの高濃度で低下したが、臨床における血漿中ブトリシラン濃度において、ヒト血漿中で約 80%と一定に保たれることが予想された。

マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける分布データから、肝臓（取込みの標的臓器及びサルにおける薬理活性部位）が主要な分布部位であり、次いで腎臓であることが示された。ラットにブトリシランの 0.3、1 又は 3 mg/kg を単回皮下投与したときの肝臓中 $t_{1/2}$ は 84.5～151.5 時間であった。ブトリシランはラット腎にも存在したが、その程度は肝臓よりも小さかった。3 mg/kg では、腎臓におけるブトリシランの $t_{1/2}$ は 156.3 時間であり、低投与量では $t_{1/2}$ は算出できなかった（明確な消失相が認められなかったため）。0.3、1 又は 3 mg/kg を単回皮下投与したとき、ラット肝臓での $AUC_{0\text{-}t(last)}$は、腎臓での $AUC_{0\text{-}t(last)}$の 10～104 倍であった。サルに 0.3、1、3 又は 30 mg/kg を単回皮下投与したときの肝臓での $t_{1/2}$ は 17.9～30.8 日であった。両動物においても、肝臓への曝露量は血漿中曝露量よりも数桁大きかった。ラット及びサルからヒト肝臓での PK をアロメトリックスケーリングしたとき、ヒト肝臓におけるブトリシランの有意な蓄積は、3 ヵ月に 1 回の投与では予想されない。[^{3}H]-ブトリシランを投与したラットにおける QWBA を用いた全組織曝露を比較したとき、高濃度の放射能が投与部位、肝臓、腎臓、リンパ節及び胸管でみられた。[^{3}H]-ブトリシランを皮下投与したとき、中枢神経組織への放射能曝露量は無視できる程度であった。ラット及びウサギ DRF 胚・胎児毒性試験のいずれにおいても、ブトリシランは母動物の肝臓、腎臓及び胎盤で検出されたが、胎児及び肝臓では検出されなかった。ラット出生前／出生後発生試験では、ブトリシランは授乳 12 日の仔動物で検出されなかった。

マウス、ラット、サル及びヒト血清におけるブトリシランの *in vitro* 安定性では、センス鎖、アンチセンス鎖共に 24 時間で残存率 95%以上の安定性を示し類似していた。肝 S9（24 時間インキュベーション）において、アンチセンス鎖及びセンス鎖は、すべての動物種で、それぞれ残存率≧70%及び≧59%の安定性を示した。

ラット及びサルへの皮下投与後の血漿及び肝臓試料の代謝検討から、ブトリシランの一次代謝物はアンチセンス鎖の 3′末端の N-1 及び N-3 の切断であることが示された。ヒト血漿中の代謝物検討で、ブトリシランの検出可能な循環血中の代謝物がないことが示され、尿試料から 3′末端の N-3 切断が尿中で低レベルで観察された。このマイナーなヒトでの代謝物は、ラット及びサルの肝臓試料で高濃度に存在することから、毒性試験において十分に評価されていると考えられる。

ブトリシランは 612 µmol/L までの濃度で、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、3A の直接的又は時間依存的な阻害剤又は基質ではなかった。したがって、ブトリシランが主要な CYP アイソフォームの阻害を介して DDI を引き起こす可能性は低いと考えられる。ブトリシランを用いた CYP 誘導試験及びトランスポーター基質／阻害試験は実施していない。しかし、ブトリシランと同様の物理化学的特性を共有する GalNAc-siRNA の *in vitro* における DDI データは、主要な CYP の基質、阻害剤、又は誘導剤として、またトランスポーターの基質及び阻害剤として評価されている。これらのデータは、GalNAc-siRNA が CYP 又はトランスポーターによって媒介される DDI を誘発する可能性が低いことを示している [5]。

放射性標識した[^{3}H]-ブトリシランを用いたラットのマスバランス試験では、皮下投与後に大量の放射能が尿中及び胆汁中に排泄されることが示され、腎臓及び胆汁排泄がラットにおける主要な排泄経路であることが示された。ラットに 3 mg/kg を単回皮下投与したときのブトリシランの腎排泄は、投与量の約 9%であった。サルに 1 又は 30 mg/kg を単回皮下投与したとき、尿中に投与量の 11～24%が未変化体として排泄された。糞中排泄は両種とも無視できる程度であった。これらのデー

タは、吸収された薬物の大部分が肝臓に分布し、排泄前に代謝（ヌクレアーゼによる開裂）されたことを示唆している。

予定している成人 ATTR アミロイドーシス患者への治療的使用の MRHD である 25 mg の用量での 12 週間ごとの投与の妥当性を裏付けるため、ブトリシランの包括的パッケージの非臨床毒性試験をマウス、ラット、ウサギ及びサルを用いて *in vitro* 及び *in vivo* の両方で実施した。一般毒性試験において、ラット又はサルにブトリシランを月 1 回皮下投与したとき、忍容性は良好であり、有害な影響は認められなかった。肝臓（ラット及びサル）、腎臓（ラットのみ）、リンパ節（ラット及びサル）及び皮下投与部位（ラット及びサル）において、ブトリシランに関連した非有害所見が認められた。NOAEL は各試験で検討した最高用量であり、ラットでは 120 mg/kg（13 週間投与試験）及び 150 mg/kg（6 ヵ月間投与試験）、サルでは 300 mg/kg（13 週間及び 9 ヵ月間投与試験）であった。反復投与試験では非臨床及び臨床の投与頻度の相違を補正したとき、患者に 25 mg の用量で投与したときのヒトでの血漿中曝露量と比較して、AUC で評価したときの血漿中曝露量はラット及びサルでそれぞれ 1084 及び 3832 倍であった。胚・胎児発生に関する試験において、ラットにブトリシランを 1 日 1 回皮下投与したときに、用量制限肝毒性を誘発したことは特記すべき点である。この投与頻度は予定している臨床投与スケジュールと比較して非常に高かった。MRHD は 3 ヵ月に 1 回（84 日間ごと）の投与で 25 mg であり、本用量は 0.42 mg/kg（ヒトの体重を 60 kg と仮定）に相当し、標準化すると 0.005 mg/kg/日に相当する。これを考慮すると、主要な胚・胎児に関する試験における母動物に対する NOAEL での HED は標準化した MRHD の 323 倍に相当する。

ブトリシランは変異原性及び染色体異常誘発作用を示さず、免疫刺激作用及び免疫毒性を示す可能性もないと考えられる。Sprague Dawley ラットを用いた 2 年間投与がん原性試験において、ブトリシランは検討した最高用量（雄では 15 mg/kg の用量で月 1 回又は 3 ヵ月に 1 回投与及び雌では 25 mg/kg の用量で月 1 回又は 3 ヵ月に 1 回投与）でがん原性のエビデンスを示さなかった。

ラットにおける雌雄の受胎能及び初期胚・胎児発生に対するブトリシランの影響は認められなかった。ラットにおいて、母動物に対して用量制限性の毒性を誘発したにもかかわらず、ブトリシランを器官形成期に 1 日 1 回皮下投与したとき、催奇形性は認められなかった。この 1 日 1 回の投与レジメンは早産、早期及び後期吸収胚、死亡胎児及び着床後胚損失の増加と関連しており、結果として生存胎児数及び胎児体重の減少が認められた。ウサギの胚・胎児発生に対するブトリシランの 1 日 1 回投与による影響は認められなかった。ラットにブトリシランを週 1 回皮下投与したとき、出生前及び出生後の発育に有害な影響は認められなかった。

以上、包括的な非臨床開発プログラムにより ICH ガイダンス及び規制当局の助言に従い、ブトリシランの薬効薬理、薬物動態及び毒性学的特性を明らかにした。これまでに実施した非臨床毒性試験の結果は良好な安全性プロファイルを示し、ATTR アミロイドーシスの成人患者の治療に 25 mg のブトリシランを 3 ヵ月ごとに投与する用法・用量を担保する。

2.4.6 参考文献一覧

1. Hou X, Aguilar MI, Small DH. Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy: recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration. FEBS J. 2007;274(7):1637-50.

2. Hanna M. Novel drugs targeting transthyretin amyloidosis. Curr Heart Fail Rep. 2014;11(1):50-7.

3. Maurer MS, Bokhari S, Damy T, Dorbala S, Drachman BM, Fontana M, et al. Expert consensus recommendations for the suspicion and diagnosis of transthyretin cardiac amyloidosis. Circ Heart Fail. 2019;12(9):e006075.

4. Mohty D, Damy T, Cosnay P, Echahidi N, Casset-Senon D, Virot P, et al. Cardiac amyloidosis: updates in diagnosis and management. Arch Cardiovasc Dis. 2013;106(10):528-40.

5. Ramsden D, Wu JT, Zerler B, Iqbal S, Jiang J, Clausen V, et al. In vitro drug-drug interaction evaluation of GalNAc conjugated siRNAs against CYP450 enzymes and transporters. Drug Metab Dispos. 2019;47(10):1183-94.

6. Choksi NY, Jahnke GD, St Hilaire C, Shelby M. Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2003;68(6):479-91.

7. van Bennekum AM, Wei S, Gamble MV, Vogel S, Piantedosi R, Gottesman M, et al. Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice. J Biol Chem. 2001;276(2):1107-13.

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

9. Frazier KS. Antisense oligonucleotide therapies: the promise and the challenges from a toxicologic pathologist's perspective. Toxicol Pathol. 2015;43(1):78-89.

10. Boyle MH, Paranjpe MG, Creasy DM. High background incidence of spontaneous subcapsular adrenal gland hyperplasia of Tg.rasH2 mice used in 26-week carcinogenicity studies. Toxicol Pathol. 2018;46(4):444-8.

11. Vidal JD, Mirsky ML, Colman K, Whitney KM, Creasy DM. Reproductive system and mammary gland. Toxicologic Pathology. Nonclinical Safety Assessment. Boca Raton, FL: CRC Press; 2013. p. 717-830.

12. Carney EW, Kimmel CA. Interpretation of skeletal variations for human risk assessment: delayed ossification and wavy ribs. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2007;80(6):473-96.