

目次

2.6.1	緒言	4
2.6.1.1	緒言	4
2.6.1.2	参考文献一覧	7

略号一覧

略号・用語	定義	
	英語	日本語
A-131354	sense strand of vutrisiran	ブトリシランのセンス鎖
A-131359	antisense strand of vutrisiran	ブトリシランのアンチセンス鎖
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	ブトリシラン
ATTR (amyloidosis)	transthyretin-mediated (amyloidosis)	トランスサイレチン型 (アミロイドーシス)
DRF	dose range-finding	用量設定
FDA	United States Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalactosamine	<i>N</i> -アセチルガラクトサミン
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hATTR (amyloidosis)	hereditary transthyretin-mediated (amyloidosis)	遺伝性 ATTR (アミロイドーシス)
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
q3M	once every 3 months	3カ月に1回、3カ月ごと
qM	once monthly	月1回
RISC	RNA-induced silencing complex	RNA誘導サイレンシング複合体
RNAi	RNA interference	RNA干渉
siRNA	small interfering RNA	低分子干渉RNA
TTR	transthyretin	トランスサイレチン

略号一覧 (続き)

略号・用語	定義	
	英語	日本語
USP	United States Pharmacopeia	米国薬局方
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)

2.6.1 緒言

2.6.1.1 緒言

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。ブトリシランは、変異型 TTR 及び野生型 TTR の両メッセンジャーRNA（mRNA）を特異的に標的とする、化学修飾された合成二本鎖低分子干渉 RNA（siRNA）である。ATTR アミロイドーシスを引き起こす根本的な病原たん白質である変異型 TTR 及び野生型 TTR たん白質の両方の肝臓での產生が減少すると、循環血液中の変異型 TTR 及び野生型 TTR 濃度が減少され、組織へのアミロイド沈着の進行が抑制され、既存の沈着物のクリアランスを可能にし、疾患の進行が停止又は抑制される。

TTR は別名プレアルブミンで知られるホモ四量体たん白質であり、主に肝臓で產生され、ごく一部は脈絡叢及び網膜でも產生される^{1,2}。循環血液中の TTR の 95%超は肝臓由来である。TTR の主要な生理学的役割は、レチノール（ビタミン A）の担体として機能することであり、TTR はレチノール結合タンパク質-ビタミン A 複合体に結合する。TTR はチロキシンの非主要担体としても機能する。

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、遺伝性の TTR 遺伝子変異により、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单量体及び野生型单量体になり、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 单量体は、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³。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^{4,5,6}。

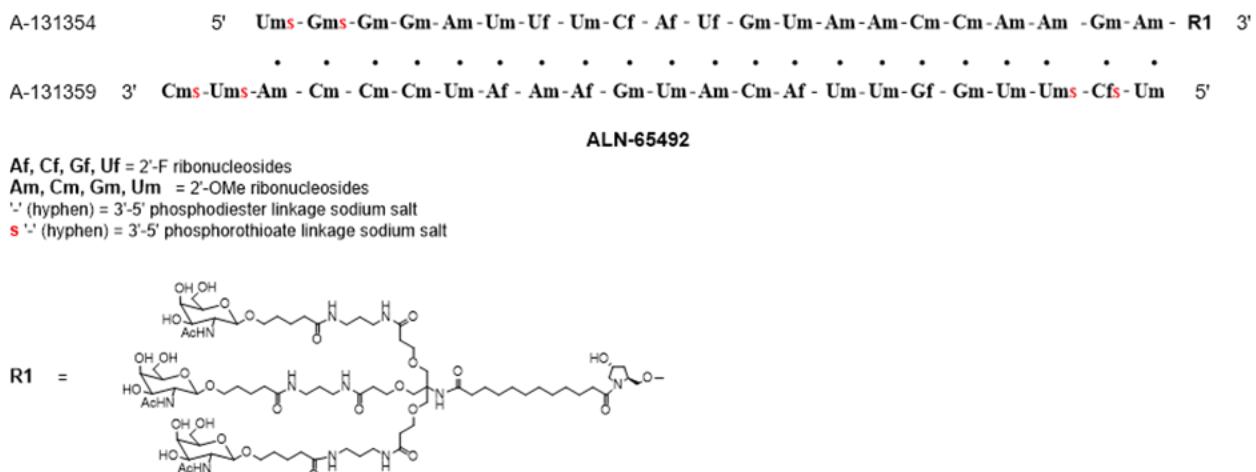
ブトリシランは、siRNA に糖鎖リガンドである N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）を結合することにより肝臓を標的とした送達を実現し、主に肝細胞表面に大量に発現しているアシアロ糖たん白質受容体を介して siRNA が肝細胞に特異的に取り込まれるよう設計されている（[2.2]項「緒言」参照）。肝臓に送達されたブトリシランは、天然に存在する RNAi 経路を介して、肝臓の TTR mRNA を特異的に標的とし発現を抑制する。ブトリシラン siRNA は、RNA 誘導サイレンシング複合体（RISC）と呼ばれる多たん白質酵素切断複合体に取り込まれ、続いて siRNA の 2 本鎖は 1 本鎖に分かれ、アンチセンス鎖（ガイド鎖）は TTR mRNA の相補配列に結合する。RISC-siRNA 複合体

内での *TTR* mRNA とアンチセンス鎖との対合は、*TTR* mRNA の特異的かつ非常に効率的な切断をもたらし、対応する *TTR* たん白質の合成及びその後の循環血液中への分泌を妨げる^{7,8,9,10}。

ブトリシランの皮下注製剤は、50 mg/mL の濃度のブトリシラン（遊離酸、53 mg/mL のブトリシランナトリウム塩 [ALN-65492] に相当）を含有する緩衝溶液（110 mmol/L 塩化ナトリウム/10 mmol/L リン酸ナトリウム）である。臨床用法・用量は、25 mg の固定用量の 3 カ月ごと (q3M) の皮下投与を予定している。

ブトリシランは、GalNAc を 3 残基含有するリガンド (R1) をセンス鎖の 3' 末端に共有結合した、化学合成二本鎖オリゴヌクレオチドである。すべてのヌクレオシドは 2'-O-メチル又は 2'-フルオロ修飾され、3'-5' ホスホジエステル結合で連結されてオリゴヌクレオチドの糖-リン酸骨格を形成している。アンチセンス鎖 (A-131359) には計 4 本のホスホロチオエート結合があり、3' 末端に 2 本、5' 末端に 2 本ある。センス鎖 (A-131354) には 5' 末端に 2 本のホスホロチオエート結合がある。センス鎖の 21 個のヌクレオチドはアンチセンス鎖の相補的な 21 個のヌクレオチドとハイブリダイズし、その結果、21 個のヌクレオチド塩基対を形成し、アンチセンス鎖の 3' 末端に 2 個のヌクレオチドがオーバーハングする。ALN-65492 の化学構造を図 2.6.1-1 に示す。

図 2.6.1-1 ALN-65492 (ブトリシラン) の構造



略語 : Af=2'-フルオロアデノシン ; Am=2'-O-メチルアデノシン ; Cf=2'-フルオロシチジン ; Cm=2'-O-メチルシチジン ; Gf=2'-フルオログアノシン ; Gm=2'-O-メチルグアノシン ; Uf=2'-フルオロウリジン ; Um=2'-O-メチルウリジン ; R1=3 分岐型 N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)。

注 : R1 は、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 L96 とも表記している。

ブトリシランの分子式は $C_{530}H_{715}F_9N_{171}O_{323}P_{43}S_6$ で、16,344.55 Da である。

ブトリシランナトリウムの分子式は $C_{530}H_{672}F_9N_{171}Na_{43}O_{323}P_{43}S_6$ で、17,289.77 Da である。

ブトリシランの薬効薬理、安全性薬理、薬物動態 (PK) / 吸収、分布、代謝及び排泄 (ADME) 、並びに毒性について、一連の非臨床の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。ブトリシランは、原薬有効成分の名称（国際一般名）で、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。特に指定のない限り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）を含有する原液製剤を用いて行った。これはブト

リシラン臨床製剤（ブトリシラン〔遊離酸〕を 50 mg/mL の濃度で含有する 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）と濃度及び組成が異なる。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（データベース）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、並びに試験報告書に記載されている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を示している。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。用量処方（特に指定のない限り）は、ブトリシランの原液製剤を米国薬局方（USP）の 0.9% 注射用塩化ナトリウムで投与量の要件を満たす適切な濃度に希釈して調製した。

非臨床薬理試験では、細胞アッセイを用いた *in vitro* 試験、並びにヒト TTR 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体を発現するトランスジェニックマウス及びカニクイザル（以下、サル）を用いた *in vivo* 試験により、ブトリシランの活性を評価した。ブトリシラン結合部位の塩基配列は、ヒト及びサルの *TTR* mRNA では 100% 保存されているが、マウス、ラット及びウサギでは異なる。このため、ブトリシランはヒト及びサルで薬理活性を示すが、マウス、ラット及びウサギでは薬理活性を示さない。ブトリシランの siRNA 配列は、*TTR* を標的とする以前の開発化合物で、既に最大効果及び用量効果が明らかにされている ALN-51547 の塩基配列と同一である。ブトリシランの塩基配列が ALN-51547 の塩基配列と同一である（しかし、化学修飾は異なる）ため、野生型 TTR 及び一般的な病原性変異型 TTR に対する最大効果及び用量効果を評価した ALN-51547 の *in vitro* 試験結果をブトリシランに適用した。同様に、ブトリシランの化学修飾は、ALN-51547 と比較してその安定性を増強しているがオフターゲット解析には影響しないため、ALN-51547 のオフターゲット解析の結果もブトリシランに適用可能である。初代培養カニクイザル肝細胞を用いてトランスフェクションアッセイ及び自由取り込みアッセイを行い、ブトリシランの *in vitro* 活性を評価した。ブトリシランの単回投与試験及び月 1 回の反復投与試験をトランスジェニックマウス及びサルを用いて実施した。薬効薬理及び副次的薬理作用は、サルを用いた反復投与毒性試験において評価した。

心血管系及び呼吸器系に対する単回投与 GLP 適合安全性薬理試験では、テレメトリー装着サルを用いてブトリシランの投与による心血管系及び呼吸器系機能に対する影響を評価した。サルを用いた GLP 適合 13 週間及び 9 カ月間反復投与毒性試験（それぞれ、月 1 回、4 回投与及び月 1 回、11 回投与）の一部としてブトリシランの投与による神経学的变化を評価した。

ブトリシランの PK を、*in vitro* 並びにラット及びサルを用いた *in vivo* で検討した。単回投与後のブトリシランの PK をラット及びサルで検討し、ブトリシランのトキシコキネティクスをマウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験、並びにラット及びウサギを用いた生殖発生試験で検討した。ラットを用いて、^{[3]H}-ブトリシランの血漿中及び血中濃度推移、排泄、並びにブトリシラン関連放射能のマスバランスを検討した。胆汁排泄試験は雄ラットを用いて実施した。分布試験として、ラットにおける血球への移行、血漿たん白結合を検討し、また数種の非臨床動物における肝臓及び腎臓への分布を検討した。さらに、組織分布／定量的全身オートラジオグラフィーをラットで検討した。代謝安定性及び代謝物の検討を、マウス、ラット、サル及びヒトの血清及び肝 S9 画分

を用いて *in vitro* で実施した。代謝物の検討を、ラットの血漿、尿、糞、肝臓及び胆汁、サルの血漿及び肝臓並びにヒトの血漿及び尿を用いて *in vivo* で行った。ブトリシランと薬物代謝酵素との相互作用を明らかにするための試験を、遺伝子組換え酵素及び肝ミクロソームを用いて *in vitro* で実施した。ブトリシランとその代謝物の排泄速度と量をラットとサルで評価した。

ブトリシランの非臨床毒性試験戦略として、いくつかの非 GLP 用量設定 (DRF) 試験、GLP 適合の遺伝毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験並びにラット及びサルを用いた 6 カ月間及び 9 カ月間までの投与期間の反復投与試験を実施した。ラットにおける 6 カ月間反復投与及びサルにおける 9 カ月間反復投与毒性試験において、抗薬物抗体（免疫グロブリン G／免疫グロブリン M）の評価を行った。ブトリシランは予定臨床投与経路である皮下投与により投与した。ブトリシランのサイトカイン／ケモカイン産生誘導作用を *in vitro* (ヒト全血) アッセイ及びサルにおける DRF 試験で検討した。また、ブトリシランが免疫刺激作用を示す可能性について、ヒト全血アッセイにより *in vitro* で、サルにおいて反復投与後の血漿中サイトカイン濃度を測定することにより *in vivo* で評価した。GLP 適合の DRF 試験並びにラット（受胎能及び初期胚発生、胚・胎児発生並びに出生前及び出生後の発生に関する試験）及びウサギ（胚・胎児発生に関する試験）を用いた重要な生殖発生毒性試験を実施した。がん原性試験を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ドンス」に基づいて開始した。Sprague Dawley ラットにおける 2 年間投与がん原性試験を実施した。また、CD-1 マウスにおける 2 年間投与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。特に記載がある場合を除き、これらの非臨床安全性試験は ICH M3 (R2) の原則に基づき GLP ガイダンスに従って、経済協力開発機構 (OECD) 加盟国で実施した。試験又はその一部は FDA ガイドライン「非臨床試験の GLP、連邦規則集、Title 21 Part 58」又は OECD テストガイドライン及び GLP の原則に従って実施した。

2.6.1.2 参考文献一覧

1. Liz MA, Mar FM, Franquinho F, Sousa MM. Aboard transthyretin: from transport to cleavage. IUBMB Life. 2010;62(6):429-35.
2. Sekijima Y. Transthyretin (ATTR) amyloidosis: clinical spectrum, molecular pathogenesis and disease-modifying treatments. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2015;86(9):1036-43.
3. 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.
4. Hanna M. Novel drugs targeting transthyretin amyloidosis. Curr Heart Fail Rep. 2014;11(1):50-7.
5. 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.

6. 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.
7. Bumcrot D, Manoharan M, Koteliansky V, Sah DWY. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol.* 2006;2(12):711-9.
8. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 2001;15(2):188-200.
9. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* 2004;432(7014):173-8.
10. Vaishnav AK, Gollob J, Gamba-Vitalo C, Hutabarat R, Sah D, Meyers R, et al. A status report on RNAi therapeutics. *Silence.* 2010;1(1):14.

目次

2.6.2	薬理試験の概要文	4
2.6.2.1	まとめ	4
2.6.2.2	効力を裏付ける試験	5
2.6.2.2.1	<i>In vitro</i> 薬理試験	8
2.6.2.2.2	<i>In vivo</i> 薬理試験	9
2.6.2.3	副次的薬理試験	15
2.6.2.3.1	<i>In vitro</i> 副次的薬理試験	16
2.6.2.3.2	<i>In vivo</i> 副次的薬理試験	23
2.6.2.4	安全性薬理試験	25
2.6.2.4.1	<i>In vitro</i> 安全性薬理試験	25
2.6.2.4.2	<i>In vivo</i> 安全性薬理試験	25
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験	26
2.6.2.6	考察及び結論	27
2.6.2.7	図表	28
2.6.2.8	参考文献一覧	28

略号一覧

略号・用語	定義	
	英語	日本語
ALN-51547	revusiran drug substance	原薬 revusiran
ALN-65492	vutrisiran drug substance	原薬ブトリシラン
ALN-TTRSC	revusiran drug product containing ALN-51547	revusiran、AD-51547
ALN-TTRSC02	vutrisiran drug product containing ALN-65492	ブトリシラン
ASGPR	asialoglycoprotein receptor	シアロ糖たん白質受容体
ATTR (amyloidosis)	transthyretin-mediated (amyloidosis)	トランスサイレチン型 (アミロイドーシス)
Cos7	cell line derived from kidney tissue of an African green monkey	アフリカミドリザル腎由来細胞株
CTD	Common Technical Document	コモン・テクニカル・ドキュメント
CTD	Comparative Toxicogenomics Database	—
dbSNP	Database of Single Nucleotide Polymorphisms	一塩基多型データベース
ED ₅₀	effective dose for 50% of maximal effect	50%有効量
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalactosamine	<i>N</i> -アセチルガラクトサミン
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GTEX	Genome-Tissue Expression database; a public resource of gene level expression from 54 healthy tissue types collected from approximately 1000 individuals (https://gtexportal.org/home/)	遺伝子型-組織発現データベース；約1000人の健常ドナーから収集した54種類の組織における遺伝子発現量の公共データベース (https://gtexportal.org/home/)
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 <i>ether-à-go-go</i> related gene	ヒト <i>ether-à-go-go</i> 関連遺伝子
IC ₅₀	concentration for 50% of maximal inhibition	50%阻害濃度
kDa	kilodalton	—
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information	米国立生物工学情報センター
NGS	Next Generation (clonal array) Sequencing	—
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態

略号一覧 (続き)

略号・用語	定義	
	英語	日本語
RefSeq	Reference Sequence	参照配列 (データベース)
RISC	RNA-induced silencing complex	RNA 誘導サイレンシング複合体
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
SNP	single nucleotide polymorphism	一塩基多型
SNV	single nucleotide variation	一塩基バリアント
T4	thyroxine	チロキシン
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
Tm	melting temperature	融解温度
TPM	transcripts per million	遺伝子長で補正しサンプルごとの総リード数で補正した転写物数
TTR	transthyretin	トランスサイレチン
USP	United States Pharmacopeia	米国薬局方
UTR	untranslated region	非翻訳領域
V30M	Val30Met, valine to methionine substitution at position 30	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)

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ブトリシランナトリウム（以下、「ブトリシラン」と表記する）（引用元の非臨床試験報告書では ALN-65492、AD-65492 又は ALN-TTRSC02 とも表記している）は、成人における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 TTR メッセンジャー-RNA（mRNA）量を選択的に減少させる、RNA 干渉（RNAi）治療薬の皮下注製剤である。

TTR はホモ四量体たん白質であり、主に肝細胞で産生され、ビタミン A の主要な担体として機能し、チロキシン（T4）の非主要担体として機能する^{1,2}。TTR 遺伝子の遺伝性変異により、この四量体たん白質が不安定化・解離し、その後ミスフォールドされ、アミロイド線維として凝集する。ATTR アミロイドーシスは、変異型 TTR 及び野生型 TTR の両方からなるアミロイド線維のさまざまな組織での蓄積を特徴とし、全身衰弱を伴う感覺神経性、運動神経性及び自律神経性ポリニューロパチー、並びに心筋症をもたらす³。ブトリシランは、肝臓において変異型 TTR 及び野生型 TTR mRNA の両方の塩基配列を標的とする二本鎖低分子干渉 RNA（siRNA）であり、血清中 TTR、すなわち病原性（アミロイド形成）たん白質濃度の減少をもたらす。

ブトリシランの mRNA 標的部位は、ヒト及びカニクイザル（以下、「サル」）の間では 100% 保存されているが、げっ歯類及びウサギでは異なるため、ブトリシランはヒト及びサルで薬理活性を示すが、げっ歯類及びウサギでは薬理活性を示さない。

非臨床薬理試験では、細胞アッセイを用いた *in vitro* 試験、並びに ATTR アミロイドーシス患者で一般的に認められるアミノ酸 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、ラット、ウサギ及びサルを用いた *in vivo* 試験において、ブトリシランの薬理活性を評価した。前述したように、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ため、薬理活性はげっ歯類及びウサギでは認められないと考えられた。実際、ラットを用いた用量設定毒性試験、並びにラット及びウサギを用いた発生・生殖毒性試験において、ブトリシランはいずれの動物種においても薬理活性を示さないことが確認された。初代培養サル肝細胞を用いたブトリシランのトランスフェクションアッセイ及び（トランスフェクション試薬の非存在下での）自由取り込みアッセイにおいて、内因性 TTR mRNA の発現は濃度依存的に抑制され、トランスフェクションによる 50% 阻害濃度（IC₅₀）は 0.21 nmol/L、自由取り込みによる IC₅₀ は 3.63 nmol/L であった。

In silico 及び *in vitro* 試験において、ブトリシランの siRNA 塩基配列の TTR mRNA に対する特異性を評価した。ブトリシランの siRNA 塩基配列は、TTR 遺伝子発現のオンターゲットの抑制に必要な濃度の 1000 倍超まで、オフターゲット候補遺伝子転写物の有意な抑制を示さなかった。さらに、バイオインフォマティクス解析及び RNA シークエンシング（RNA-Seq）によって同定されたオフターゲット候補遺伝子の明らかな減少は認められなかった。

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皮下投与により、血清中 TTR は投与量依存的かつ持続的に減少し、50% 有効量（ED₅₀）は 1 mg/kg 未満であり、3 mg/kg のブトリシランの単回投与では 95% 超の血清中 TTR の減少が認めら

れた。ブトリシランの月1回の反復皮下投与により、サルでは1 mg/kgの低投与量で血清中TTRの投与期間中持続的な減少が維持された。サルを用いた単回及び反復皮下投与による薬物動態(PK)／薬効薬理併合試験において評価した血漿中TTRたん白質濃度は、ブトリシランの投与量に依存して、それぞれ、最大95%及び90%超の減少を示した。さらに、サルを用いたGLP適合13週間及び9カ月間反復投与毒性試験で評価した血清中TTRたん白質濃度は、ブトリシランの反復投与により、ベースライン濃度に対して最大98%の血清中TTR濃度の持続的な減少を示した。

TTR濃度の減少によるビタミンA及びT4への影響を評価する副次的薬理試験をサルで実施した。サルを用いたGLP適合13週間及び9カ月間反復投与毒性試験において、ブトリシランの反復投与により、ブトリシランで予想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(最大89%)及びT4(最大48%)の持続的な減少が認められた。ビタミンA及びT4の持続的な減少が認められたにもかかわらず、動物は眼科学的検査、網膜電図及び眼の病理組織学的検査において正常であり、甲状腺及び下垂体の組織学的評価も同様であった。

サルを用いたブトリシランの単回皮下投与による心血管系及び呼吸器系に対するGLP適合安全性薬理試験において、心血管系及び呼吸器系機能への影響は認められず、無影響量は300 mg/kg(試験最高投与量)以上と判断された。神経学的評価は、サルを用いたGLP適合13週間(月に1回、4回投与)及び9カ月間(月1回、11回投与)反復投与毒性試験において実施された。試験したいずれの投与量においてもブトリシランの投与に関連した神経学的变化は認められず、両試験の無影響量は300 mg/kg(試験した最高投与量)と判断された。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験として、細胞アッセイを用いた *in vitro* 試験、並びにヒトTTR V30Mトランスジェニックマウス、Sprague Dawleyラット(以下、「ラット」)、Hra:(NZW)SPFウサギ及びサルを用いた *in vivo* 試験を実施した。ラットを用いた用量設定毒性試験(試験番号[TTRSC02-DSM15-028])、並びにラット及びウサギを用いた発生・生殖発生毒性試験(それぞれ、試験番号[TTRSC02-GLP16-013]及び試験番号[TTRSC02-GLP16-012])において、いずれの動物種においてもブトリシランは薬理活性を示さないことが確認された([2.6.6]項「毒性試験の概要文」参照)。ブトリシランの効力を裏付ける試験の一覧を表2.6.2.2-1に示す。

表 2.6.2.2-1 ブトリシランの効力を裏付ける試験

Species and Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg ^a)	Type of Study	Study Number (Tabulated Summary) CTD Location
Hep3B cells; primary monkey and human hepatocytes	<i>In vitro</i>	N/A	N/A	Identification of ALN-51547	BIO12032 (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.1.1-1
Hep3B cells; primary monkey hepatocytes	<i>In vitro</i>	N/A	N/A	Identification of ALN-65492	BIO16007 (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.1.1-2
N/A	<i>In silico</i>	N/A	N/A	Analysis of human <i>TTR</i> for polymorphism variations in support of ALN-51547	BIO12028 (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.1.1-3
Cos7 cells	<i>In vitro</i>	N/A	N/A	ALN-51547 <i>in vitro</i> activity: Analysis of wt and mutant <i>TTR</i> allele suppression	BIO13029 (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.1.1-4
Human <i>TTR</i> V30M transgenic mouse	SC	Single dose	ALN-65492: 1, 2.5	PD evaluation (serum <i>TTR</i>) after a single SC injection in mice	BIO16003 (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.1.1-5
Human <i>TTR</i> V30M transgenic mouse	SC	12 weeks (qM×4)	ALN-65492: 0.3, 1, 3	PD evaluation (serum <i>TTR</i>) after multiple SC injections in mice	BIO16004 (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.1.1-6
Sprague Dawley rat	SC	12 weeks (qM×4)	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 40, 120	PD evaluation (serum <i>TTR</i>) in a repeat-dose range-finding toxicity study in male rats ^b	TTRSC02-DSM15-028 (Subreport BIO15038) (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.3.2-1
Sprague Dawley rat	SC	Premating to GD 17	Vutrisiran: PM (qw×3): 0 (0.9% NaCl), 15, 50, 150; GD 6-17 (qd): 0 (0.9% NaCl), 3, 10, 30 AD-59206: PM (qw×3) and GD 6, 12, 17 (qd): 30	PD evaluation (serum <i>TTR</i>) in a repeat-dose range-finding toxicity and TK study in female rats ^{b,c}	TTRSC02-GLP16-013 (Subreport BIO16032) (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.3.5.1-1

表 2.6.2.2-1 ブトリシランの効力を裏付ける試験（続き）

Species and Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg ^a)	Type of Study	Study Number (Tabulated Summary) CTD Location
Hra:(NZW) SPF rabbit	SC	GD 7-19	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 3, 10, 30	PD evaluation (hepatic TTR) in a repeat-dose range-finding developmental toxicity and TK study in female rabbits ^{b,c}	TTRSC02-GLP16-012 (Subreport BIO16021) (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.3.5.2-3
Cynomolgus monkey	SC	up to 20 weeks	ALN-65492: 0.3, 1 (single dose); 1, 3 (qM×4); 0.3, 0.6 (qM×6); 1 (qM×1) followed by 0.3 (qM×5)	PD evaluation (serum TTR) after SC injection (various dosing regimens) in a PK/PD study in monkeys	BIO16005 (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.1.1-7
Cynomolgus monkey	SC, IV, IM ^d	up to 13 weeks	Vutrisiran: 10 (IV); 0.3, 1, 3, 30 (SC, single dose); 0.3, 1 (SC, qM×4); 1 (IM, single dose)	PD evaluation (plasma TTR) in a PK/PD study in monkeys	TTRSC02-DSM15-035 (Subreport BIO16006) (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.2.2-2
Cynomolgus monkey	SC	13 weeks (qM×4)	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 30, 100, 300	PD evaluation (serum TTR) in a 13-week repeat-dose toxicity and TK study with a 12-week recovery in monkeys ^c	TTRSC02-GLP15-025 (Subreport 3800240) (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.3.2-6
Cynomolgus monkey	SC	9 months (qM×11)	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 30, 100, 300	PD evaluation (serum TTR) in a 9-month repeat-dose toxicity and TK study in monkeys ^c	TTRSC02-GLP15-039 (Subreport 3800274) (表 2.6.3-2) CTD: 4.2.3.2-7

略語： Admin.=投与；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；ALN-51547=原薬 revusiran；Cos7=アフリカミドリザル腎由来細胞株；GD=妊娠後日数；GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；Hep3B=ヒト肝癌細胞株3B；IM=筋肉内；IV=静脈内；NaCl=塩化ナトリウム；N/A=該当せず；NZW=New Zealand White；PD=薬力学；PK=薬物動態；PM=交配前；qd=1日1回；qM=月1回；qw=週1回；SC=皮下；SPF=特定病原体未感染の；TK=トキシコキネティクス；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）；wt=野生型。

ブトリシランは、非臨床試験報告書において、AD-65492、ALN-65492 又は 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。

a 特に記載のない場合。

b 結果は 2.6.6 項「毒性試験の概要文」で考察している。

c GLP 適合試験。

d 筋肉内投与については、薬理作用を評価しなかった。

2.6.2.2.1 *In vitro* 薬理試験

2.6.2.2.1.1 ブトリシラン siRNA の特定

(CTD: 4.2.1.1-1、[BIO12032])

ブトリシランの ALN-65492 原薬の塩基配列は、既に最大効果及び用量効果が明らかにされている ALN-51547 の塩基配列と同一である。この塩基配列の *TTR* mRNA 結合部位はサル及びヒトでは 100% 保存されているが、げっ歯類及びウサギでは異なる。このため、ブトリシランはヒト及びサルにおいて薬理活性を示すが、げっ歯類及びウサギでは薬理活性を示さない。

センス鎖の 3'末端に 3 分岐型 *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) リガンドを共有結合した 116 種類の siRNA を、ヒト肝癌細胞株 3B (Hep3B) 細胞及び初代培養サル肝細胞 (試験番号 [BIO16007]) にそれぞれトランスフェクションし、*in vitro* 活性を評価した。トランスフェクションした siRNA はすべて、ALN-51547 と塩基配列は同じだが、*in vivo* において *TTR* 減少作用をより強化した二本鎖を特定するために化学修飾 (組成) が異なる。二本鎖について、さらに、*in vitro* 試験で初代培養サル肝細胞 (試験番号 BIO16007 ; 2.6.2.2.1.2 項参照) 、並びに *in vivo* 試験でヒト *TTR* V30M トランスジェニックマウス (試験番号 BIO16003 : 2.6.2.2.2.1 項、試験番号 BIO16004 : 2.6.2.2.2.2 項参照) 及びサル (試験番号 BIO16005 : 2.6.2.2.2.3 項参照) を用いて *TTR* 減少に対する用量反応性を評価し、改良された ALN-65492 を特定した。

2.6.2.2.1.2 初代培養サル肝細胞でのブトリシランの活性

(CTD: 4.2.1.1-2、[BIO16007])

ALN-65492 の *in vitro* 活性を、LipofectamineTM RNAiMAX トランスフェクション試薬 (Invitrogen 社) を用いたトランスフェクションアッセイ及び漸増濃度の ALN-65492 の自由取り込み (トランスフェクション試薬なし) アッセイにより、初代培養サル肝細胞で評価した。24 時間インキュベート後に細胞を採取し、定量逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR) により *TTR* mRNA 量の減少を測定した。トランスフェクションアッセイでは、*TTR* mRNA 量は陰性対照の siRNA で処理した細胞に対して標準化したが、自由取り込みアッセイでは、*TTR* mRNA 量はナイーブ細胞に対して標準化した。初代培養サル肝細胞を用いたトランスフェクションアッセイ及び自由取り込みアッセイにおいて、内因性 *TTR* mRNA 量は濃度依存的に抑制され、ALN-65492 の IC_{50} は、それぞれ、0.21 及び 3.63 nmol/L であった。

2.6.2.2.1.3 ALN-65492 の標的部位全域における遺伝子多型変異の解析

(CTD: 4.2.1.1-3、[BIO12028])

RNAi が配列特異的に作用することを考慮すると、*TTR* を標的とする siRNA のアンチセンス鎖とその標的 mRNA 配列間の一塩基の不一致が、RNAi の活性の低下又は消失につながる可能性がある⁴。 siRNA 標的部位に自然発生する一塩基バリエント (SNV) は、活性に影響を及ぼす可能性があり、特定の民族／地理的背景の個人において SNV が濃縮されている場合、この影響は増幅される可能性がある。ブトリシランは、多様な地理的及び民族的背景にわたる ATTR アミロイドーシス患者を治療することを意図しているため、*in silico* 解析を実施し ALN-65492 の siRNA 標的部位全域に潜

在する配列変動性について解析した。本解析は ALN-51547 に対して実装し、1000 Genome SNP discovery project (米国立生物工学情報センター [NCBI] 一塩基多型データベース [dbSNP] 、 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> 参照) の一環として幅広い人種を用いて標的部位全域が解析され、その結果、推定頻度 0.0005 でただ一種類の単一 SNV が同定された。同定された SNV は siRNA のアンチセンス鎖の 3'末端近くに位置し、この不一致は siRNA の特異性及び用量効果に影響しないと考えられた。

2.6.2.2.1.4 野生型と変異型の *TTR* アレルヘテロ接合体の発現抑制の解析

(CTD: 4.2.1.1-4、[BIO13029])

TTR のアミロイド形成性突然変異は、*TTR* コード領域内の特定の位置にある SNV に起因し、現在までに 120 超のアミロイド形成性変異体が同定されている⁵。*TTR* 遺伝子のアミロイド形成性変異は、*TTR* たん白質の四量体型の不安定化、*TTR* たん白質の二量体及び単量体への解離、並びに最終的にミスフォールドしてさまざまな組織に多量体及びアミロイド線維の沈着をもたらす⁶。アミロイド沈着物は一般に変異型 *TTR* 及び野生型 *TTR* の両方を含み、時間の経過と共にこれらの沈着物は重大な組織傷害をもたらす^{6,7,8,9}。ALN-65492 配列は、*TTR* 遺伝子の 3'非翻訳領域 (UTR) を標的とする。そのため、野生型と変異型のアレルヘテロ接合体からの *TTR* 遺伝子発現を同様の効率で減少させることが期待される。ALN-51547 で評価した以外に、野生型 *TTR* 及び一般的な病原性変異型 *TTR* に対する最大効果及び用量効果を評価するブトリシランの追加の解析は実施していないが、一般的な病原性変異型 *TTR* V30M、アミノ酸 60 位のトレオニンからアラニンへの変異体

(T60A)、アミノ酸 77 位のセリンからチロシンへの変異体 (S77Y)、アミノ酸 77 位のセリンからフェニルアラニンへの変異体 (S77F) 及びアミノ酸 122 位のバリンからイソロイシンへの変異体 (V122I) (それぞれ、G148A、A238G、C290A、C290T 及び G424A のヌクレオチド変異) に対応する *TTR* の 5 種類の変異型と野生型のアレルヘテロ接合体に対して *in vitro* 試験を行い、ALN-51547 の同様の抑制活性が認められた。

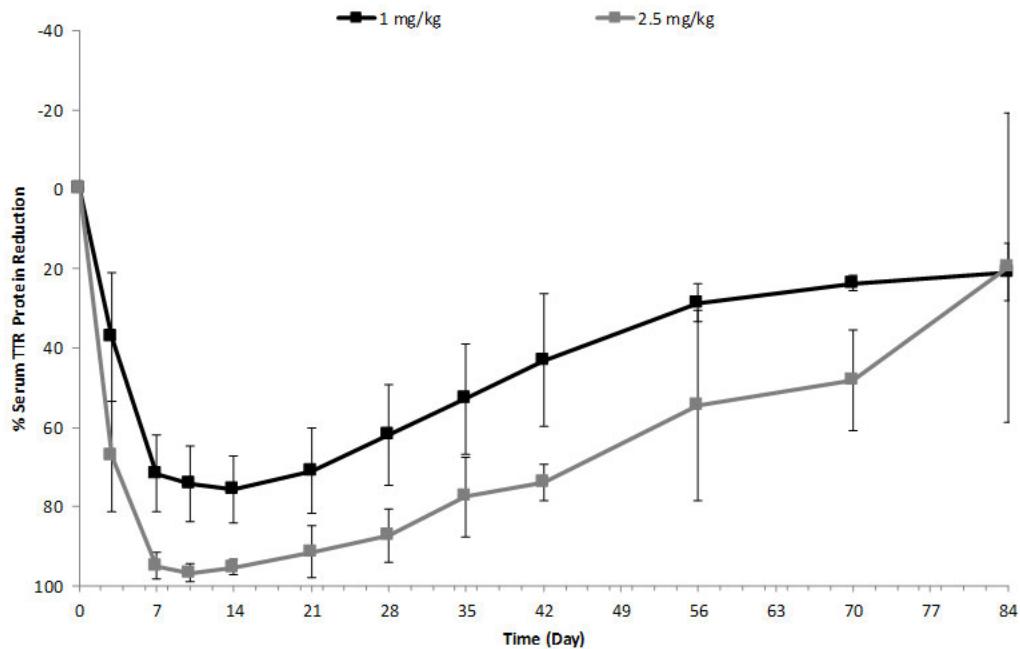
2.6.2.2.2 *In vivo* 薬理試験

2.6.2.2.2.1 ヒト *TTR* V30M トランスジェニックマウスを用いた単回投与薬理試験

(CTD: 4.2.1.1-5、[BIO16003])

ヒト *TTR* V30M 変異体を発現するトランスジェニックマウスを用い、血清中 *TTR* たん白質濃度を測定して、ブトリシランの活性を評価した (図 2.6.2.2-1)。1 及び 2.5 mg/kg のブトリシランの単回皮下投与により、*TTR* たん白質濃度の投与量依存的な減少 (それぞれ、最低値で 76% 及び 97% の *TTR* 平均濃度の減少) が認められた。*TTR* たん白質濃度の減少は単回投与後持続的かつ可逆的で、最終測定日である投与 84 日目までに血清中 *TTR* 濃度はベースライン濃度に対して約 20% の減少率まで徐々に回復した。

図 2.6.2.2-1 ヒト TTR V30M トランスジェニックマウスを用いたブトリシランの単回皮下投与後の血清中 TTR たん白質濃度の推移



略語 : 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)。

ヒト TTR V30M トランスジェニックマウス (各群 n=4) に 1 及び 2.5 mg/kg のブトリシランを単回皮下投与後、TTR たん白質濃度を測定した。TTR たん白質濃度の減少は、投与 0、3、7、10、14、21、28、35、42、56、70 及び 84 日目の投与前に測定した。各動物から採取した血清中の TTR たん白質濃度は酵素結合免疫吸着測定法により測定し、それぞれの動物の投与前血清中たん白質濃度に対して標準化した。各データポイントは、2 回のアッセイによる 4 匹の動物の群平均値の投与前値に対する血清中 TTR 濃度の減少率土群標準偏差を示す。

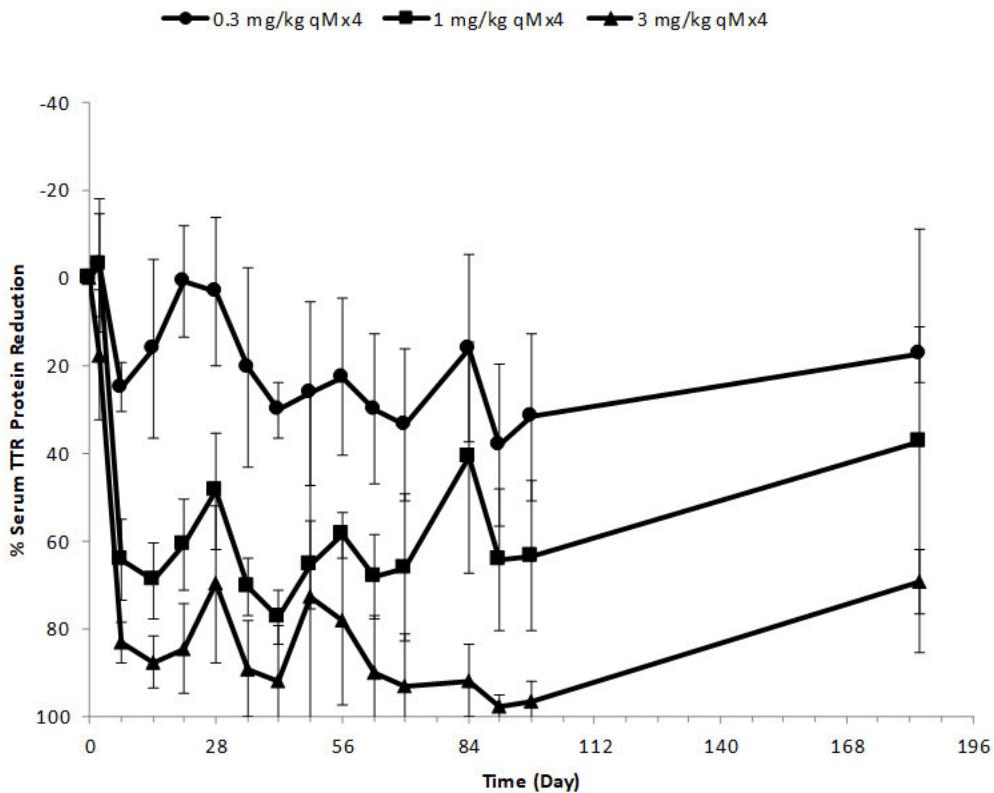
出典 : 試験番号 BIO16003 の Figure 1 を改変。

2.6.2.2.2.2 ヒト TTR V30M トランスジェニックマウスを用いた反復投与薬理試験

(CTD: 4.2.1.1-6、[BIO16004])

ヒト TTR V30M トランスジェニックマウスに 0.3、1 及び 3 mg/kg のブトリシランを月 1 回、4 回皮下投与し血清中 TTR たん白質濃度を測定した (図 2.6.2.2-2)。ブトリシランは、0.3、1 及び 3 mg/kg を各月 1 回の投与後 7~14 日に、ベースライン濃度に対して、それぞれ約 25~38%、64~73% 及び 88~98% の血清中 TTR たん白質濃度の最大の減少を示した。図 2.6.2.2-2 に示すように、ブトリシランは、各月 1 回の投与後、血清中 TTR たん白質濃度の一貫した最大平均減少率を示し、その後の各投与前に同様の回復動態を示した。すべての投与量において最終投与後に部分回復が認められ、最終投与後 100 日までに 0.3 mg/kg 投与群ではベースライン濃度の約 15%、1 mg/kg 投与群ではベースライン濃度の約 40%、3 mg/kg 投与群でベースライン濃度の 70% 未満の TTR 濃度の減少率を示した。

図 2.6.2.2-2 ヒト TTR V30M トランスジェニックマウスを用いたブトリシランの月 1 回、4 回皮下投与における血清中 TTR たん白質濃度の推移



略語 : qM=月 1 回 ; TTR=トランスサイレチン ; V30M=Val30Met ([ヒトトランスサイレチン] 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)。

ヒト TTR V30M トランスジェニックマウス (各群 n=4) に 0.3、1 及び 3 mg/kg のブトリシランを月 1 回、4 回 (投与 0、28、56 及び 84 日目) 皮下投与し、TTR たん白質濃度を測定した。TTR たん白質濃度の減少は、投与 0、2、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、84、91、98 及び 185 日目に (投与日は投与前に) 測定した。各動物から採取した血清中の TTR たん白質濃度は酵素結合免疫吸着測定法により測定し、それぞれの動物の投与前血清中たん白質濃度に対して標準化した。各データポイントは、2 回のアッセイによる 4 匹の動物の群平均値の投与前値に対する血清中 TTR 濃度の減少率±群標準偏差を示す。

出典 : 試験番号 BIO16004。

2.6.2.2.3 サルを用いた単回及び反復投与薬理試験

(CTD: 4.2.1.1-7、[BIO16005])

(CTD: 4.2.2.2-2、[TTRSC02-DSM15-035] 別添 BIO16006 試験)

サルを用いて、血清中 TTR たん白質濃度を測定して、ブトリシランの薬理作用を評価した (試験番号 BIO16005 ; 図 2.6.2.2-3 及び図 2.6.2.2-4)。サルにブトリシランを、(1) 0.3 及び 1 mg/kg で単回皮下投与、(2) 1 及び 3 mg/kg で月 1 回、4 回皮下投与、(3) 0.3 及び 0.6 mg/kg で月 1 回、6 回皮下投与、並びに (4) 1 mg/kg で単回皮下投与後、0.3 mg/kg で月 1 回、5 回皮下投与の投与レジメンで投与した。

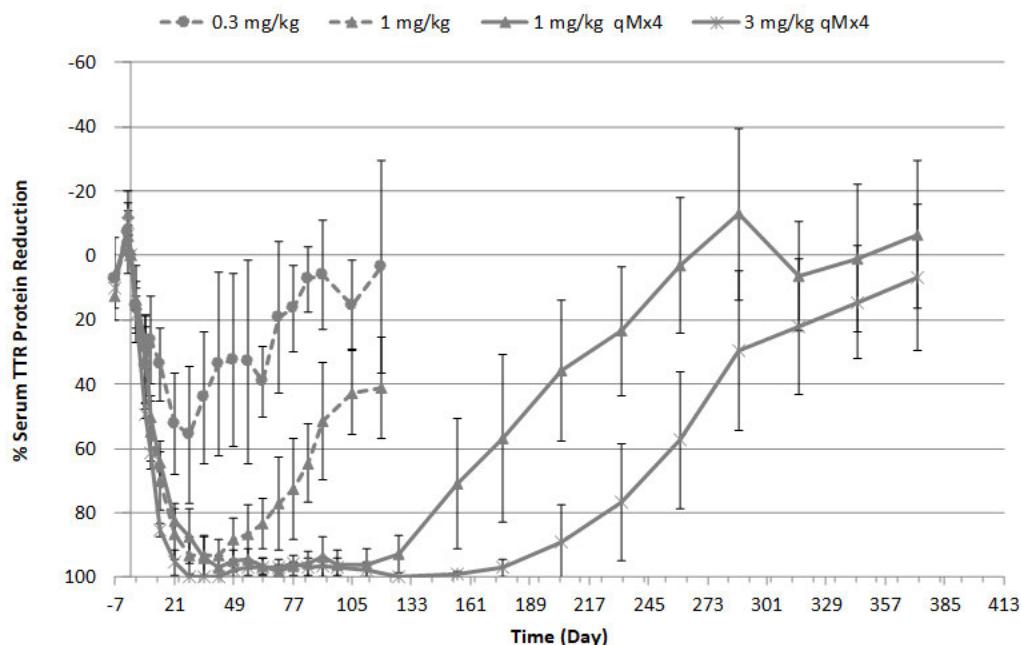
0.3 及び 1 mg/kg のブトリシランの単回投与により、投与後 21~28 日までに血清中 TTR たん白質濃度は、それぞれ、最大約 60% 及び 95% の平均減少率を示した。1 及び 3 mg/kg のブトリシランの月 1 回投与では、ベースライン濃度に対して最大 95% 超の TTR たん白質濃度の減少を示した。初回投与から約 21 日後までに最低値に達し、その後の投与により最低値濃度で減少が維持された。TTR

2.6.2 薬理試験の概要文

ブトリシランナトリウム

の減少は可逆的であり、3 mg/kg のブトリシランと比較して 1 mg/kg を月 1 回投与した方がベースライン濃度への回復が早かった。単回投与では、0.3 及び 1 mg/kg のブトリシランの投与後 84~119 日で、それぞれ、ベースライン濃度に対して TTR 濃度は 10%未満及び約 40%の減少率まで回復した。1 mg/kg のブトリシランの月 1 回の投与では、最終投与後 204 日までにベースライン濃度に対して完全な回復が認められ、3 mg/kg の月 1 回の投与では、最終投与後 288 日（最終測定日）で約 7%の TTR 濃度の減少が認められた。6 カ月間の投与レジメンでは、投与開始 1~2 カ月において 75~90%の血清中 TTR 濃度の最大の減少が認められ、投与期間中おおむね維持された。その後、最終投与後 64 日までの測定においてベースライン濃度に対して 56~76%未満まで減少率の部分的な回復が認められた。

図 2.6.2.2-3 サルを用いたブトリシランの単回及び月 1 回、4 回皮下投与における血清中 TTR 濃度の推移

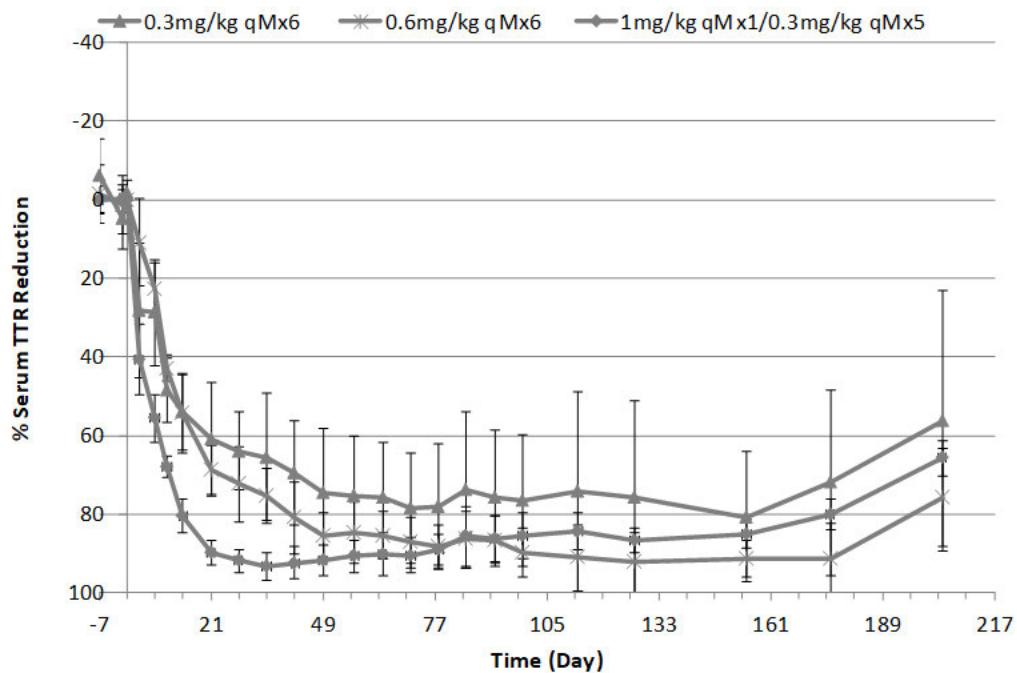


略語 : qM=月 1 回 ; TTR=トランスサイレチン。

サル（各群 n=3）にブトリシランを (a) 0.3 及び 1 mg/kg で単回、並びに (b) 1 及び 3 mg/kg で月 1 回、4 回（投与 0、28、56 及び 84 日目）皮下投与し、血清中 TTR たん白質濃度の減少を測定した。TTR たん白質濃度の減少は、酵素結合免疫吸着測定法を用いて、単回投与後 119 日まで及び 4 回目の最終投与後 288 日までのさまざまな時点で測定した。各動物から採取した血清中 TTR たん白質濃度は、それぞれの動物の投与前血清中たん白質濃度に対して標準化した。各データポイントは、投与開始前に 2 回、血清中 TTR を測定し、投与前値の群平均濃度に対する血清中 TTR 濃度の減少率±群標準偏差を示した。

出典：試験番号 BIO16005。

図 2.6.2.2-4 サルを用いたブトリシランの 6 カ月間反復皮下投与における血清中 TTR たん白質濃度の推移



略語 : qM=月 1 回 ; TTR=トランスサイレチン。

サル (各群 n=4) にブトリシランを (a) 0.3 及び 0.6 mg/kg で月 1 回、6 回 (投与 0、28、56、84、112 及び 140 日目)、並びに (b) 1 mg/kg で単回 (投与 0 日目) 皮下投与後、0.3 mg/kg で月 1 回、5 回 (投与 28、56、84、112 及び 140 日目) 皮下投与し、血清中 TTR たん白質濃度の減少を測定した。TTR たん白質濃度の減少は、酵素結合免疫吸着測定法を用いて、6 回目の最終投与後 64 日までのさまざまな時点で測定した。各動物から採取した血清中 TTR たん白質濃度を測定し、それぞれの動物の投与前血清中たん白質濃度に対して標準化した。各データポイントは、投与開始前に 2 回、血清中 TTR を測定し、投与前値の群平均濃度に対する血清中 TTR 濃度の減少率土群標準偏差を示した。

出典 : 試験番号 BIO16005。

TTR たん白質濃度は、PK／薬効薬理併合試験（試験番号 TTRSC02-DSM15-035 の別添 BIO16006 試験、[2.6.4]項「薬物動態試験の概要文」参照）において、サルにおけるブトリシランの単回静脈内投与後、並びに単回及び反復皮下投与後の血漿中でも評価した。10 mg/kg のブトリシランの単回静脈内投与により、血漿中 TTR たん白質濃度は最大約 85% の減少率を示し、投与 56 日目まで、ベースライン濃度に対して 60~75% の減少が維持された。血漿中 TTR たん白質濃度の減少は、0.3~30 mg/kg の投与量のブトリシランの単回皮下投与により、雌雄両方で認められた。単回皮下投与群で投与 21~35 日目に認められた血漿中 TTR たん白質濃度の最大の減少率は、投与量に依存して約 44~95% の範囲であった。いずれの単回皮下投与群においても、血漿中 TTR 濃度は投与 56 日目まで投与量に依存して約 27~95% の減少が維持された。1 mg/kg のブトリシランを月 1 回、4 回皮下投与した群では、最終投与（初回投与後 99 日）後 2 週間で 90% 超の血漿中 TTR 濃度の最大の減少が認められ、75% 超の血漿中 TTR 濃度の減少が初回投与後 141 日まで持続した。この試験では、ブトリシランの薬理活性が単回静脈内投与群、並びに単回及び反復皮下投与全群で認められ、TTR の血

漿中濃度の減少は、単回投与後及び反復投与の最終投与後、それぞれ、56 及び 57 日間の観察期間中、維持された。

2.6.2.2.4 サルを用いた反復投与毒性試験における薬理評価

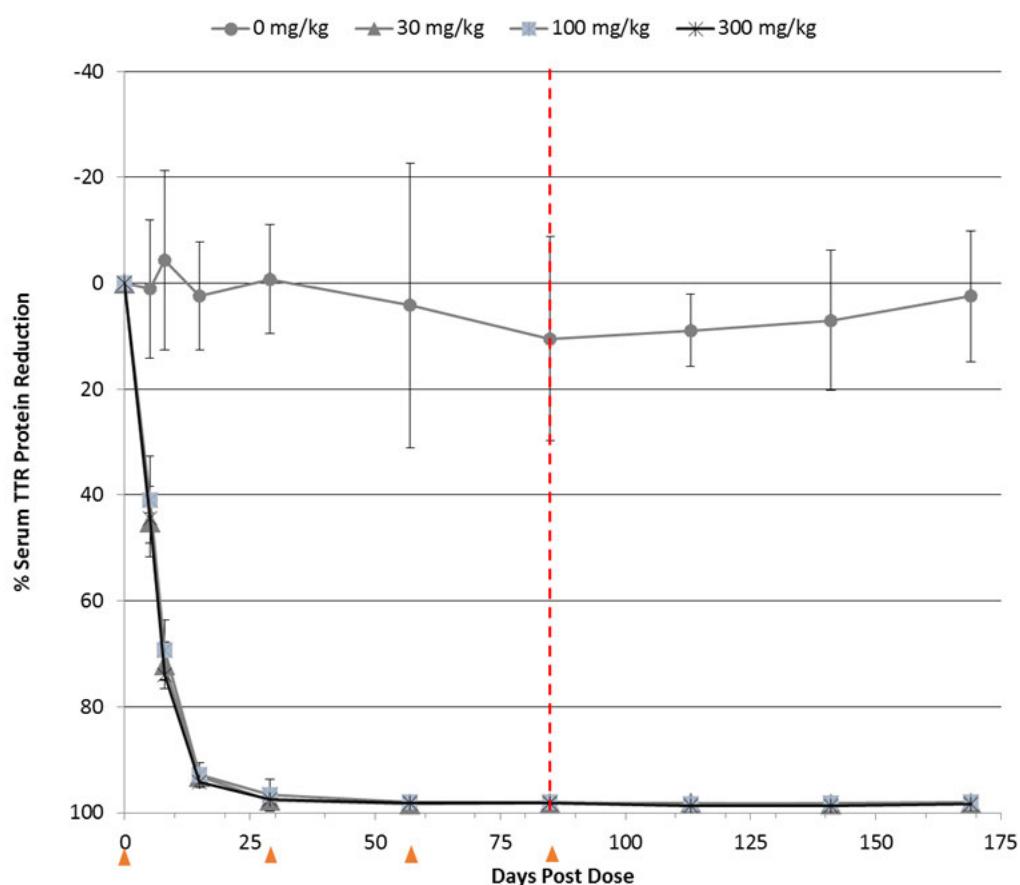
(CTD: 4.2.3.2-6、[TTRSC02-GLP15-025] 別添 3800240 試験)

(CTD: 4.2.3.2-7、[TTRSC02-GLP15-039] 別添 3800274 試験)

サルを用いた 12 週間の回復期間を含む GLP 適合 13 週間反復投与毒性試験及びトキシコキネティクス (TK) 試験 (試験番号 TTRSC02-GLP15-025、[2.6.6]項「毒性試験の概要文」参照) において、ブトリシランの薬理活性を評価した。サルに溶媒対照／希釈液 (0.9% 塩化ナトリウム注射液、USP)、並びに 30、100 及び 300 mg/kg のブトリシラン (各群雌雄各 5 匹) を投与 1、29、57 及び 85 日目に皮下投与した。

図 2.6.2.2-5 にみられるように、30 mg/kg 以上を投与した動物では、溶媒対照群と比較して、血清中 TTR 濃度の持続した減少が認められた。これらの TTR 濃度の減少 (平均変化量はベースライン濃度に対して 38.7~99.0% の減少) は、投与 1 日目の投与後の最初の測定時点 (84 日目) で明らかであり、投与及び回復期間 (回復期間の 84 日目まで) 中、持続した。

図 2.6.2.2-5 サルを用いたブトリシランの 13 週間 (月 1 回、4 回投与) 反復皮下投与における血清中 TTR 濃度の推移



略語 : TTR = トランスサイレチン。

2.6.2 薬理試験の概要文

ブトリシランナトリウム

12週間の回復期間を含む13週間（月1回、4回投与）反復投与毒性試験において、サル（主試験：n=9～10群及び回復期間：n=3～4/群）にブトリシランを皮下投与し、血清中TTRたん白質濃度の減少を測定した。TTRたん白質濃度の減少は、酵素結合免疫吸着測定法を用いて、初回投与後169日までの各測定時点において測定した。各動物の血清中TTRたん白質濃度は、それぞれの動物の投与前血清中たん白質濃度に対して標準化した。各データポイントは、雌雄を合わせた血清中TTRたん白質濃度の減少率の平均値±標準偏差を示す。橙色の矢印は投与日を示す。破線の縦の赤線は投与85日目（回復期間開始時）の最終投与を示す。

出典：試験番号TTRSC02-GLP15-025の別添3800240試験のFigure1及びFigure2を合体。

同様に、サルを用いたGLP適合9ヶ月間反復投与毒性試験及びTK試験（試験番号TTRSC02-GLP15-039の別添3800274試験、[2.6.6]項「毒性試験の概要文」参照）において、ブトリシランの薬理活性を評価した。サルに溶媒対照／希釈液（0.9%塩化ナトリウム注射液、USP）、並びに30、100及び300mg/kgのブトリシラン（各群雌雄各4匹）を投与1、29、57、85、113、141、169、197、225、253及び281日目に皮下投与した。30mg/kg以上を投与した動物では、溶媒対照群及びベースライン濃度に対して、血清中TTR濃度の顕著な減少（平均変化量はベースライン濃度に対して41.6～98.6%の減少）が初回測定時点（投与5日目）において認められ、その後投与281日目まで、持続した。

2.6.2.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は、細胞アッセイを用いたin vitro試験及びサルを用いたin vivo試験で評価した。ブトリシランの副次的薬理試験の一覧を表2.6.2.3-1に示す。

表2.6.2.3-1 ブトリシランの副次的薬理試験

Species and Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg ^a)	Type of Study	Study Number (Tabulated Summary) CTD Location
HepG2 cells; Cos7 cells	<i>In vitro</i>	N/A	N/A	Off-target analysis of ALN-51547	BIO12037 (表2.6.3-3) CTD: 4.2.1.2-1
HepG2 cells; Hep3B cells	<i>In vitro</i>	N/A	N/A	Off-target analysis of ALN-65492	NCS-20-00163 (表2.6.3-3) CTD: 4.2.1.2-2
N/A	<i>In silico</i>	N/A	N/A	Off-target analysis of ALN-65492	NCS-21-00657 (表2.6.3-3) CTD: 4.2.1.2-3
Hep3B cells	<i>In vitro</i>	N/A	N/A	RNA-sequencing screen for potential off-target inhibition of ALN-65492	NCS-20-00098 (表2.6.3-3) CTD: 4.2.1.2-4
Cynomolgus monkey	SC	13 weeks (qM×4)	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 30, 100, 300	PD evaluation (vitamin A and T4) in a 13-week repeat-dose toxicity and TK study with a 12-week recovery in monkeys ^b	TTRSC02-GLP15-025 (表2.6.3-3) CTD: 4.2.3.2-6
Cynomolgus monkey	SC	9 months (qM×11)	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 30, 100, 300	PD evaluation (vitamin A and T4) in a 9-month repeat-dose toxicity and TK study in monkeys ^b	TTRSC02-GLP15-039 (表2.6.3-3) CTD: 4.2.3.2-7

略語 : Admin. =投与 ; ALN-51547=原薬 revusiran ; ALN-65492=原薬ブトリシラン ; Cos7=アフリカミドリザル腎由来細胞株 ; GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 ; Hep3B=ヒト肝癌細胞株 3B ; HepG2=ヒト肝癌細胞株 G2 ; NaCl=塩化ナトリウム ; N/A=該当せず ; PD=薬力学 ; qM=月 1回 ; SC=皮下 ; T4=チロキシン ; TK=トキシコキネティクス。

ブトリシランは、非臨床試験報告書において、AD-65492、ALN-65492 又は 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。

a 特に記載のない場合。

b GLP 適合試験。

2.6.2.3.1 *In vitro* 副次的薬理試験

2.6.2.3.1.1 ALN-65492 の標的部位のオフターゲット作用の *in vitro* 解析

(CTD: 4.2.1.2-1, [BIO12037])

シード領域及びアンチセンス鎖の切断領域の一塩基の不一致により、siRNA の活性を消失させることができるとある¹⁰。この見識に基づき、ALN-65492 の塩基配列は、TTR 遺伝子によって発現される mRNA 以外の mRNA の RNAi による減少と定義されるオフターゲット活性を防ぐように設計されている。siRNA がオフターゲット作用を誘導する活性は、二本鎖の融解温度 (Tm) 理論値と高い相関性を示し、オフターゲット作用の程度を決定する主要因子として二本鎖の熱力学的安定性が重要と考えられている¹¹。

ALN-65492 と同じ siRNA 塩基配列の ALN-51547 について、この塩基配列に対するオフターゲット候補遺伝子を特定するために、Alnylam 社で開発したアルゴリズムを用いて *in silico* 解析を最初に行った。2.5×10⁴ 細胞のアフリカミドリザル腎由来細胞株 (Cos7) 細胞に 50 ng の各オフターゲットプラスミド構築物をトランスフェクション後、10 nmol/L の ALN-18324 (ALN-51547 の 5'末端の 2 塩基を欠如した親 siRNA) を更にトランスフェクションし、二重ルシフェラーゼアッセイによりオフターゲット作用を評価した。また、96 ウエルプレートに 2×10⁴ 細胞/ウェルのヒト肝癌細胞株 G2 (HepG2) 細胞を播種し、5 fmol/L~10 nmol/L の濃度範囲で ALN-51547 をトランスフェクションし、RT-qPCR により内因性オフターゲット候補遺伝子を評価した。このバイオインフォマティクス及び *in vitro* オフターゲット解析結果 (2009 年 4 月 24 日にダウンロードした FASTA Release 34¹² により解析) は、siRNA のアンチセンス鎖と 3 塩基未満の不適正塩基対を有するヒト遺伝子がないことを示し (表 2.6.2.3-2 参照)、siRNA による TTR のオンターゲットの減少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 1000 倍超の差が認められ、標的配列の TTR に対する特異性が確認された。

表 2.6.2.3-2 AD-18324 の 19 塩基コア配列に基づく ALN-51547 のオフターゲット候補遺伝子

NCBI Accession Number	Gene	Mismatch Positions ^a
NM_004810.2	GRAP2	[REDACTED]
NM_024949.5	WWC2	[REDACTED]
NM_032141.2	NSRP1	[REDACTED]
NM_014615.1	KIAA0182	[REDACTED]
NM_002738.5	PRKCB1	[REDACTED]
NM_018659.2	CYTL1	[REDACTED]

2.6.2 薬理試験の概要文

ブトリシランナトリウム

NCBI Accession Number	Gene	Mismatch Positions ^a
XM_930072.3 ^b	LOC644191	[REDACTED]
NM_030816.4	ANKRD13C	[REDACTED]

略語 : AD-18324=ALN-51547 と同じ 19 塩基コア配列を含み、N-アセチルガラクトサミンに結合していないトランスサイレチン特異的低分子干渉 RNA ; ALN-51547=原薬 revusiran ; ANKRD13C=アンキリンリピートドメイン含有タンパク質 13C ; CYTLI=サイトカイン様タンパク質 1 ; GRAP2=増殖因子受容体結合タンパク質 2 (GRB2) 関連アダプタータンパク質 2 ; NCBI=米国立生物工学情報センター ; NSRPI=核スペックルスプライシング調節タンパク質 1 ; PRKCB1=プロテインキナーゼ C β 1 ; WWC2=WW and C2 domain containing 2。

NM プレフィックスは検証済み mRNA の RefSeq 分類区分であり、XM プレフィックスは予測された mRNA の RefSeq 分類区分である。

a 不適正塩基対の位置は、アンチセンス鎖の 5'-3' 方向に番号付けした。すなわち、「1」位は ALN-51547 のアンチセンス鎖の 5' 末端ヌクレオチドに相補的な塩基に対応する。

b この遺伝子情報は、標準的なゲノムアノテーション処理の結果、NCBI 塩基配列データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) から削除された。

出典 : 試験番号 BIO12037。

2.6.2.3.1.2 ALN-65492 の *in vitro* オフターゲット作用の解析

(CTD: 4.2.1.2-2、[NCS-20-00163])

前項の ALN-51547 の検索と同じ検索アルゴリズムを用いて、2019 年 8 月 28 日にダウンロードしたヒト参照配列データベース (RefSeq) を利用して ALN-65492 のオフターゲット候補遺伝子の再評価を 2019 年 8 月に行った。Alnylam 社で開発した「BruteForce」検索によって、2.6.2.3.1.1 項のオフターゲット評価 (試験番号 BIO12037) で特定されていない 13 種類のオフターゲット候補遺伝子が新たに特定された。

Alnylam 社によってプログラムされ、ブトリシランのオフターゲット候補遺伝子を予測するために採用されている「BruteForce」検索アルゴリズムは、siRNA とオフターゲット候補転写物アニーリング配列との間の不適正塩基対が多いほど、RNA の切断又は遺伝子発現抑制につながるいかなる相互作用も起こりにくいという前提に基づいている。シード領域の不適正塩基対は遺伝子発現抑制活性を無効にする可能性がはるかに高いため¹³、このアルゴリズムでは、他の領域の不適正塩基対に比較してシード領域の不適正塩基対に不均衡な優先度の重みを付け、siRNA 特異性をスコア化しランク付けする。このアルゴリズムでは、米国立生物工学情報センター (NCBI) の RefSeq データベースに含まれる既知のヒトトランスクリプトーム全体で可能性のあるすべての領域に対して、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方を配列比較し、スコア化した。米国国立医学図書館のゲノム情報を管理する NCBI は、ヒト遺伝子及びその関連転写物を網羅するリストを維持管理している。NCBI は、バージョン管理したデータを公開するのではなく、データが利用可能になると、記録を追加及び更新する。*In silico* 解析で予測されたオフターゲット候補遺伝子を表 2.6.2.3-3 に示す。

In vitro アッセイで評価するオフターゲット転写物のセットは、Genotype-Tissue Expression (GTEx) 組織特異的発現データベース (バージョン 8 ; <http://gtexportal.org/home>) を用い、1 TPM 以上のカットオフを規定して肝臓で発現する遺伝子に限定した。その結果、部分的な配列同一性に基づき、ALN-65492 のアンチセンス鎖である A-131359 によって抑制される可能性のあるヒト肝細胞で発現する 5 種類の転写物が特定された。*In silico* 解析で予測された 5 種類のオフターゲット候補遺伝子について、ALN-65492 による mRNA 減少を *in vitro* 試験で解析した。5 種類のオフターゲッ

2.6.2 薬理試験の概要文

ブトリシランナトリウム

ト候補遺伝子転写物（コハク酸デヒドログ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]）を、TTR 転写物を対照として、 1×10^{-9} ～ 10 nmol/L の濃度範囲の ALN-65492 をトランスフェクションした Hep3B 及び HepG2 細胞で解析した。ALN-65492 への曝露後のオフターゲット mRNA の発現抑制は、RT-qPCR を用いて測定した。

Hep3B 及び HepG2 細胞に ALN-65492 をトランスフェクション後、TTR mRNA の強力なオフターゲットの減少が認められた (IC₅₀ は、それぞれ、 0.112 及び 0.108 nmol/L)。一方、オフターゲット候補遺伝子転写物については、評価した最高濃度の 10 nmol/L においても、mRNA の顕著な減少はまったく認められなかった。In vitro 試験による評価では、アンチセンス鎖と *in silico* 検索で同定された mRNA 間の不適正塩基対数及び位置に起因して、肝臓において発現される遺伝子の ALN-65492 によるオフターゲットの発現抑制は起こりうる可能性が低いことが示唆された。

表 2.6.2.3-3 Alnylam 社で開発した検索アルゴリズムによって同定されたオフターゲット候補遺伝子

NCBI Accession Number	Gene	Mismatch Positions ^a
NM_001035511.2	SDHC ^b	[REDACTED]
NM_001114118.3	NCBP3 ^b	[REDACTED]
NM_001363539.1	CCNH ^b	[REDACTED]
NM_213601.3	TMED8 ^b	[REDACTED]
XM_011510834.1	PASK ^b	[REDACTED]
XM_011511983.1	C2orf88	[REDACTED]
XM_024448760.1	CADM3	[REDACTED]
NM_152910.6	DGKH	[REDACTED]
NM_000494.4	COL17A1	[REDACTED]
NM_003319.4	TTN	[REDACTED]
XM_011510524.2	CHRND	[REDACTED]
XM_011509417.2	GJA8	[REDACTED]
XM_011515343.3	HOXA3	[REDACTED]

略語 : C2orf88=chromosome 2 open reading frame 88 ; CADM3=細胞接着分子 3 ; CCNH=サイクリン H ; CHRND=アセチルコレイン受容体 8 サブユニット ; COL17A1=XVII 型コラーゲン a1 鎮 ; DGKH=ジアシルグリセロールキナーゼ η ; GJA8=ギャップ結合タンパク質 a8 ; HOXA3=ホメオボックスタンパク質 Hox-A3 ; mRNA=メッセンジャー-RNA ; NCBI=米国立生物工学情報センター ; NCBP3=核内キャップ結合タンパク質サブユニット 3 ; PASK=PAS ドメイン含有セリン／トレオニンキナーゼ ; SDHC=コハク酸デヒドログナーゼ複合体サブユニット C ; TMED8=膜貫通型 p24 輸送タンパク質ファミリーメンバー 8 ; TTN=タイチン。

NM プレフィックスは検証済み mRNA の RefSeq 分類区分であり、XM プレフィックスは予測された mRNA の RefSeq 分類区分である。

a 不適正塩基対の位置は、アンチセンス鎖の 5'-3' 方向に番号付けした。すなわち、「1」位は ALN-65492 のアンチセンス鎖の 5' 末端ヌクレオチドに相補的な塩基に対応する。

b オフターゲット候補遺伝子転写物は、Hep3B 及び HepG2 細胞を用いた *in vitro* 試験で更に解析した。

出典 : 試験番号 NCS-20-00163。

2.6.2.3.1.3 ALN-65492 のオフターゲット作用の *in silico* 解析

(CTD: 4.2.1.2-3, [NCS-21-00657])

オフターゲット作用について、追加の *in silico* 解析を行った。ブトリシランのアンチセンス鎖のオフターゲット評価において前項で使用した方法（試験番号 NCS-20-00163、2.6.2.3.1.2 項参照）と同様の方法を用いて、ALN-65492 のセンス鎖（A-131354）のオフターゲット候補遺伝子転写物の抑制の可能性を評価し、さらにアンチセンス鎖（A-131359）のオフターゲット作用の詳細な再解析を行った。ブトリシランのバイオインフォマティクスによるオフターゲット作用の解析は、GGGenome¹⁴検索アルゴリズムを用いてセンス鎖及びアンチセンス鎖の両鎖に対して行った。この解析は、ゲノムデータセット「human spliced RNA、hg38.p12 でキュレートされた RefSeq（別名 Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 12 [GRCh38.p12] ）、D3G 21.01（2021 年 1 月）」を用いて実施し、ギャップなしで最大 [] 個の不適正塩基対を許容した。また、前述の Alnylam 社で開発した「BruteForce」検索アルゴリズムも 2021 年 2 月 9 日に入手したヒト RefSeq トランスクリプトームを用いて実施した。siDirect 2.0¹⁵ 及びヒト TTR 転写物 NM_000371.4 を用いたバイオインフォマティクス解析を 2021 年 5 月 6 日に実施した。siRNA 検索ツールである siDirect2.0 は、提供されている siRNA の中にブトリシランの標的部位が含まれていないため、siDirect2.0 を使用したオフターゲット作用の解析は行わなかった。オフターゲット候補遺伝子の評価には、公共データベース（GTEx 及び NCBI の遺伝子データベース）を元に発現及び遺伝子アノテーション解析を行い、さらに最終濃度 10 nmol/L で Hep3B 細胞に ALN-65492 をトランスフェクションし、トランスフェクション後 24 時間に回収したトータル RNA の RNA-Seq 解析を行った（試験番号 NCS-20-00098、2.6.2.3.1.4 項参照）。

詳細な *in silico* 再解析では、ALN-65492 のいくつかのオフターゲット候補遺伝子が特定された（表 2.6.2.3-4 参照）。siRNA によるオフターゲット候補遺伝子 mRNA の直接切断による発現抑制については、RNA-Seq を用いて評価した。さらに公共 GTEx データベースを用いて、健康成人の肝臓のオフターゲット候補遺伝子の発現量を評価した。これらの追加のオフターゲット作用の解析の結果により、TTR 転写物に対する ALN-65492 の両二本鎖の特異性が確認された。

表 2.6.2.3-4 GGGenome 又は Alnylam 社で開発した検索アルゴリズムによって同定された ALN-65492 のオフターゲット候補遺伝子

NCBI Accession Number	Gene	Off-Target of Sense or Antisense Strand	Mismatch Positions ^a
NR_002817.2	<i>AQP7P1</i>	Antisense	[]
NR_126055.1	<i>THCAT155</i>	Antisense	[]
NM_001318156.1	<i>AQP7</i>	Antisense	[]
NM_004810.4	<i>GRAP2</i>	Antisense	[]
NR_940094.2	<i>LOC102724072</i>	Antisense	[]
XR_001744383.1	<i>LOC107986652</i>	Antisense	[]

表 2.6.2.3-4 GGGenome 又は Alnylam 社で開発した検索アルゴリズムによって同定された ALN-65492 のオフターゲット候補遺伝子（続き）

NCBI Accession Number	Gene	Off-Target of Sense or Antisense Strand	Mismatch Positions ^a
NR_110765.1	<i>L3MBTL4-AS1</i>	Sense	[REDACTED]
NR_103482.1	<i>LOC101559451</i>	Sense	[REDACTED]
NR_134624.1	<i>LOC105369595</i>	Sense	[REDACTED]
NM_006822.3	<i>RAB40B</i>	Sense	[REDACTED]
NM_018039.3	<i>KDM4D</i>	Sense	[REDACTED]
NM_001130524.2	<i>AP1M1</i>	Sense	[REDACTED]
NR_130764.2	<i>NKAIN3</i>	Sense	[REDACTED]
NM_003756.3	<i>EIF3H</i>	Sense	[REDACTED]
NM_032427.4	<i>MAML2</i>	Sense	[REDACTED]
NM_001161630.1	<i>KDM4E</i>	Sense	[REDACTED]
NM_017419.3	<i>ASIC5</i>	Sense	[REDACTED]
NM_173528.4	<i>CFAP161</i>	Sense	[REDACTED]
NM_080671.3	<i>KCNE4</i>	Sense	[REDACTED]
XR_923199.2	<i>LOC105373559</i>	Antisense	[REDACTED]
NM_015234.5	<i>ADGRF5</i>	Sense	[REDACTED]
NR_110236.1	<i>LOC101928371</i>	Sense	[REDACTED]
XR_002959478.1	<i>LOC112268438</i>	Sense	[REDACTED]
NM_001320042.1	<i>ISCU</i>	Sense	[REDACTED]
NM_002338.5	<i>LSAMP</i>	Sense	[REDACTED]
XM_011511447.3	<i>PRPF40A</i>	Sense	[REDACTED]
NM_000021.4	<i>PSEN1</i>	Sense	[REDACTED]

略語 : *ADGRF5*=接着 G タンパク質共役受容体 F5 ; *ALN-65492*=原薬ブトリシラン ; *AP1M1*=アダプター関連タンパク質複合体 1 サブユニット mu-1 ; *AQP7*=アクアポリン 7 ; *AQP7P1*=アクアポリン 7 偽遺伝子 1 ; *ASIC5*=酸感受性イオンチャネルサブユニットファミリーメンバー 5 ; *CFAP161*=纖毛及び鞭毛関連タンパク質 161 ; *EIF3H*=真核生物翻訳開始因子 3 サブユニット H ; *GRAP2*=増殖因子受容体結合タンパク質 2 (GRB2) 関連アダプタータンパク質 2 ; *ISCU*=鉄硫黄クラスター集合酵素 ; *KCNE4*=カリウム電位依存性チャネルサブファミリー-E 調節サブユニット 4 ; *KDM4D*=リジンデメチラーゼ 4D ; *KDM4E*=リジンデメチラーゼ 4E ; *L3MBTL4-AS1*=*L3MBTL4* に対するアンチセンス RNA 1 ; *LOC1101559451*=性質不明の *LOC1101559451* ; *LOC101928371*=性質不明の *LOC101928371* ; *LOC102724072*=性質不明の *LOC102724072* ; *LOC105369595*=性質不明の *LOC105369595* ; *LOC105373559*=性質不明の *LOC105373559* ; *LOC107986652*=性質不明の *LOC107986652* ; *LOC112268438*=性質不明の *LOC112268438* ; *LSAMP*=大脳辺縁系関連膜タンパク質 ; *MAML2*=Mastermind 様転写コアチベーター 2 ; mRNA=メッセンジャー RNA ; *NKAIN3*= Na^+/K^+ -ATP アーゼ結合タンパク質 3 ; NCBI=米国立生物工学情報センター ; *PRPF40A*=mRNA 前駆体プロセシング因子 40 相同遺伝子 A ; *PSEN1*=プレセニリン 1 ; *RAB40B*=*RAB40B*, Ras がん遺伝子ファミリーメンバー ; *THCATT5*=甲状腺がん関連転写物 155。

NCBI アクセシジョン番号の NM プレフィックスは、たん白質をコードする転写物である mRNA 分子を示す（通常監修済）。 NR プレフィックスは、たん白質非コード転写物である RNA 分子を示す。 XM プレフィックスは、たん白質コード転写物型としてコンピューター予測された mRNA 分子を示す。 XR プレフィックスは、たん白質非コード転写物型としてコンピューター予測された RNA 分子を示す。

a 不適正塩基対の位置は、アンチセンス鎖の 5'-3' 方向に番号付けした。すなわち、「1」位は ALN-65492 のアンチセンス鎖の 5' 末端ヌクレオチドに相補的な塩基に対応する。

出典：試験番号 NCS-21-00657。

2.6.2.3.1.4 ALN-65492 により発現抑制されるオフターゲット候補遺伝子の RNA シークエンス (RNA-Seq) による *in vitro* スクリーニング

(CTD: 4.2.1.2-4, [NCS-20-00098])

Next Generation (clonal array) Sequencing (NGS) 技術を用いて作成したデータのバイオインフォマティクス解析を行い、ALN-65492 をトランスフェクションした Hep3B 細胞培養におけるオフターゲット候補遺伝子発現の変動を、RNA-Seq 解析により、*TTR* 発現のオンターゲットの減少と比較した。この解析により、3 回の独立した試験で発現が $1 \log_2$ 以上 $2 \log_2$ 未満まで減少した 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]、別名カルミン）、並びに 3 試験のうち 1 試験で発現が $1 \log_2$ 以上増加した 1 種類の遺伝子（初期増殖応答因子 1 [EGRI]）を同定した。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。RNA-Seq 解析によって同定されたオフターゲット候補遺伝子の数及び抑制程度がわずかであったことに基づき、ALN-65492 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 ALN-65492 の特異性が確認された。

上記の 3 種類の遺伝子 (SUMO2, CCDC47 及び EGRI) の Hep3B 細胞での発現はブトリシランのトランスフェクションにより変化したが、標的である *TTR* 遺伝子よりもはるかに低い程度の変化であった。

SUMO2

SUMO2 はヒト肝臓に発現する (TPM [中央値] =18.41) が、他の組織と比較して発現量は低い（すべての TPM 値は、2020 年 7 月 14 日に GTEx 遺伝子型-組織発現データベース [www.gtexportal.org/home/gene/SUMO2] にアクセスして得た）。*SUMO2* 発現量が高い生体組織は、小脳 (TPM [中央値] =120.4)、子宮頸管外及び子宮頸管内（それぞれ、TPM [中央値] =107.3 及び 96.95）、卵巣 (TPM [中央値] =99.65)、子宮 (TPM [中央値] =97.63)、卵管 (TPM [中央値] =88.87) 及び膣 (TPM [中央値] =84.86) である。3 種類の SUMO ファミリーメンバー (SUMO1-3) は、ほとんどの脊椎動物組織で遍在的に発現が認められ、*SUMO2* 及び *SUMO3* は、DNA 配列は異なる（相同性 50%未満）が、たん白質のアミノ酸配列の相同性は高い¹⁶。*SUMO2* は、ユビキチンと同様の機能を有するたん白質をコードする。標的たん白質に可逆的に結合し、核輸送、転写調節、アポトーシス及びたん白質の安定性に関連する翻訳後修飾に関与している（2020 年 7 月 14 日に www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6613 にアクセス）。近年、UV 照射に反応したヌクレオチドの除去修復における *SUMO2* の役割が *in vitro* 試験で実証されている¹⁷。肝臓において SUMO タンパク質は、生体異物に対する反応、炎症、病原体への反応及びその他の代謝経路に関与するいくつかの核内受容体の翻訳後修飾に関与している^{16,18,19}。*Sumo2* ノックアウトマウスの報告はない。*Sumo2*^{-/-} マウスの胚は、重篤な発達遅延を示し、約 10.5 日胚で死亡する²⁰。しかし、SUMO 化経路にかかる酵素の阻害剤は、腫瘍治療候補対象として研究が継続されている^{21,22,23}。ヒトの塩基配列には、siRNA の重要なシード領域の ■ 位での不適正塩基対など、複数の不適正塩基対が存在する。有力なアラインメントがなく、ブトリシランをトランスフェクションした Hep3B 細胞における *SUMO2* 発現量の変化は直接的な siRNA 効果によるものではないことが示唆される。

CCDC47

CCDC47 (別名カルミン) はヒト肝臓に発現する (TPM [中央値] =26.80) が、他の組織と比較して発現量は低い (すべての TPM 値は、2020 年 7 月 15 日に www.gtexportal.org/home/gene/CCDC47 にアクセスして得た)。*CCDC47* の発現量が高い組織は、小脳半球 (TPM [中央値] =67.41)、肺 (TPM [中央値] =62.03) 及び副腎 (TPM [中央値] =60.41) である。*CCDC47* は、小胞体 (ER) の Ca^{2+} 結合膜貫通型タンパク質をコードしている²⁴。マウスでは、*CCDC47* が完全に失われると胚の致死性がもたらされ、*CCDC47* が初期の発達に不可欠であることを示唆している²⁵。Morimoto らは²⁴、チリチリの髪、肝機能障害、そう痒症、異形症所見、低血圧症及び全般的な発達遅延を特徴とする多系統障害に罹患している *CCDC47* の両アレルの機能喪失変異を保有する 4 人の血縁関係のない小児罹患者について報告している。ブトリシランのアンチセンス鎖に対して最も相補性を示す *CCDC47* 配列は、ヒト及びカニクイザルの間で保存されているが、両者の塩基配列には、siRNA の重要なシード領域での ■ つの不適正塩基対など、複数の不適正塩基対が存在する。有力なアラインメントがなく、ブトリシランをトランスフェクションした Hep3B 細胞における *CCDC47* 発現量の変化は直接的な siRNA 効果によるものではないことが示唆される。

EGR1

EGR1 は、Hep3B 細胞を用いて実施した 3 回の *in vitro* RNA-Seq アッセイにおいて 1 試験で発現が増加した。*EGR1* は、卵管 (TPM [中央値] =1108)、大網脂肪組織 (TPM [中央値] =709.5)、大動脈 (TPM [中央値] =562.6) などの他の組織と比較して、肝臓 (TPM [中央値] =48.86) では低い発現量を示している (すべての TPM 値は、2020 年 7 月 15 日に www.gtexportal.org/home/gene/EGR1 にアクセスして得た)。*EGR1* たん白質は、C2H2 型 Zn フィンガータンパク質の EGR (初期成長応答) ファミリー (EGR1-4) に属している。*EGR1* は核タンパク質で、分化、有糸分裂誘発及び腫瘍形成の細胞プロセスに関する転写調節因子である (2020 年 7 月 15 日に www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1958 にアクセス)。肝臓でインスリンに応答して誘導される *EGR1* が、2 型糖尿病、肥満及び肥満関連脂肪肝患者にみられるインスリン抵抗性に関与している可能性がある。*EGR1* は、多くのコレステロール生合成遺伝子の発現を調節し、肝臓におけるコレステロール代謝の重要なモジュレーターである。*EGR1* は、損傷後の肝臓再生において細胞周期の回復及び進行に不可欠であることが明らかにされている²⁶。Li らの最近の見解によると²⁷、癌における *EGR1* の正確な役割は不明とされているが、癌における *EGR1* の潜在的な役割には、アポトーシスの促進、腫瘍抑制遺伝子の調節、転移の調節及び腫瘍の血管新生などがある。ブトリシランのアンチセンス鎖に対して最も相補性を示す *EGR1* 配列は、ヒト及びカニクイザルの間で保存されているが、両者の塩基配列には、siRNA の重要なシード領域での幾つもの不適正塩基対など、多数の不適正塩基対が存在する。有力なアラインメントがなく、ブトリシランをトランスフェクションした Hep3B 細胞における *EGR1* 発現量の変化は直接的な siRNA 効果によるものではないことが示唆される。

オフターゲット作用の安全性評価

SUMO2、*CCDC47* 及び *EGR1* は、肝臓での発現量が比較的低い (TPM [中央値] は 50 未満)。ブトリシランは、肝臓でのみ発現するアシアロ糖たん白質受容体 (ASGPR) に特異的に認識され結合する 3 分岐型 GalNAc リガンドを共有結合している。*SUMO2*、*CCDC47* 及び *EGR1* を肝臓より著しく発現している他の臓器及び組織においてブトリシランが蓄積する可能性は、腎臓を除いてほと

んど想定されない。他の mRNA を標的とする GalNAc-siRNA に関する Alnylam 社の社内データに基づき、腎臓でのブトリシランの蓄積により、これらのオフターゲット候補遺伝子のいずれの発現も変化しないと考えられる。Hep3B 細胞では、ブトリシラン (10 及び 100 nmol/L) のトランسفエクションにより、わずか ($2 \log_2$ 未満) の発現減少 (*SUMO2* 及び *CCDC47*) 、並びに発現増加 (*EGRI*) が認められたが、これらの濃度では、*TTR* のオンターゲットの抑制は、*SUMO2* 及び *CCDC47* のオフターゲットの抑制を $3 \log_2$ 超上回った。これらの濃度では、標的遺伝子 (*TTR*) 発現の 95% 超の減少が引き起こされた。肝臓におけるこれらの特定の遺伝子のいずれかの差次的発現と肝毒性又はヒトの疾患との間に直接的な因果関係は報告されていない (2020 年 7 月 21 日に Comparative Toxicogenomics Database [CTD ; ctdbase.org] にアクセス) ²⁸。

2.6.2.3.2 *In vivo* 副次的薬理試験

(CTD: 4.2.3.2-6、[TTRSC02-GLP15-025])

(CTD: 4.2.3.2-7、[TTRSC02-GLP15-039])

TTR たん白質は、サルにおいてビタミン A の主要な担体であり、T4 の非主要担体である²⁹。したがって、ビタミン A 及び T4 の減少は、ブトリシランの投与による *TTR* たん白質の減少に伴う副次的薬理作用と考えられ、循環血液中のビタミン A 及び T4 に対する *TTR* の減少の影響について、サルを用いた 12 週間の回復期間を含む GLP 適合 13 週間反復投与毒性試験及び TK 試験 (試験番号 TTRSC02-GLP15-025) 、並びにサルを用いた GLP 適合 9 カ月反復投与毒性試験及び TK 試験 (試験番号 TTRSC02-GLP15-039) で評価した。

13 週間毒性試験では、30、100 及び 300 mg/kg のブトリシランの反復投与により、循環血液中の *TTR* (最大 98%) 、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予測された持続的な減少が認められ、これらは 12 週間の回復期間中維持された (表 2.6.2.3-5)。同様の変化がサルを用いた 9 カ月毒性試験でも認められた (表 2.6.2.3-6 参照)。30、100 及び 300 mg/kg のブトリシランの反復投与において、30 mg/kg 以上を投与した動物では、投与 281 日目 (*TTR* 及びビタミン A) 及び投与 282 日目 (T4) の投与前に、循環血液中の *TTR* (最大 99%) 、ビタミン A (最大 86%) 及び T4 (最大 35%) のベースライン濃度に対する減少が認められた。

いずれの試験においても、*TTR*、ビタミン A 及び T4 の減少に伴う明らかな毒性所見は認められず、眼科学的検査、網膜電図及び眼の病理組織学的検査において正常であり、甲状腺及び下垂体の組織学的評価も正常であった。

表 2.6.2.3-5 サルを用いた 13 週間（月 1 回、4 回投与）反復投与毒性試験における血清中のトランスサイレチン（TTR）、ビタミン A 及びチロキシン（T4）の変化

Dose (mg/kg)	Mean±SD Change in Circulating Biomarker (% Baseline)					
	Main Phase			Recovery Phase		
	TTR ^a	Vitamin A ^b	T4 ^c	TTR ^a	Vitamin A ^b	T4 ^c
0	-8.1 ± 19	-0.3 ± 28	9 ± 20	1.3 ± 20	-26 ± 23	9 ± 13
30	-98 ± 0.6	-87 ± 3	-30 ± 18	-98 ± 0.4	-82 ± 0.2	-29 ± 5
100	-98 ± 0.6	-84 ± 9	-25 ± 19	-98 ± 0.4	-67 ± 6	-48 ± 2
300	-98 ± 0.5	-89 ± 3	-28 ± 17	-98 ± 0.5	-81 ± 2	-43 ± 9

略語 : SD=標準偏差 ; T4=チロキシン ; TTR=トランスサイレチン。

12 週間の回復期間を含む 13 週間（月 1 回、4 回投与）反復投与毒性試験においてサル（雌雄合わせて、主試験 : n=9~10/群及び回復期間 : n=3~4/群）にブトリシランを皮下投与後、血清中の TTR たん白質、ビタミン A 及び T4 の減少を評価した。各パラメータは、主試験及び回復期間の終了時に測定した。各動物の血清中の各パラメータ濃度は、それぞれ、動物の投与前血清中濃度に対して標準化した（血清中の TTR のベースライン濃度=投与-1 及び-2 日目の平均濃度；T4 ベースラインの濃度=投与 8 及び 14 日目の投与前濃度の平均濃度；ビタミン A のベースライン濃度=投与 14 日目の投与前濃度）。血清中の TTR、ビタミン A 及び T4 濃度のベースライン濃度に対する変化率は、次の式を使用して各動物で計算した。ベースライン濃度に対する変化率=[(主試験又は回復期間の測定値/ベースライン平均値*100)-100]。群平均値及び標準偏差は標準化した値を用いて算出した。

a TTR 濃度は、投与 85 日目（主試験）の投与前及び投与 169 日目（回復期間終了時の剖検時）に測定した。

b ビタミン A 濃度は、投与 85 日目（主試験）の投与前及び投与 169 日目（回復期間終了時の剖検時）に測定した。

c T4 濃度は投与 86 日目（主試験）及び投与 169 日目（回復期間終了時の剖検時）に測定した。

出典：試験番号 TTRSC02-GLP15-025、TTR の各測定値は別添 3800240 試験の Appendix1。ビタミン A 及び T4 の各測定値は最終臨床病理報告書の Table 6.2。

表 2.6.2.3-6 サルを用いた 9 カ月間（月 1 回、11 回投与）反復投与毒性試験における血清中のトランスサイレチン（TTR）、ビタミン A 及びチロキシン（T4）の変化

Dose (mg/kg)	Mean±SD Change in Circulating Biomarker (% Baseline)		
	TTR ^a	Vitamin A ^b	T4 ^c
0	-13 ± 7.7	28 ± 26	4 ± 16
30	-98 ± 0.4	-86 ± 2	-22 ± 18
100	-98 ± 0.6	-84 ± 4	-35 ± 13
300	-98 ± 0.3	-85 ± 3	-24 ± 18

略語 : SD=標準偏差 ; T4=チロキシン ; TTR=トランスサイレチン。

9 カ月間（月 1 回、11 回投与）反復投与毒性試験においてサル（雌雄合わせて各群 n=8）にブトリシランを皮下投与後、血清中の TTR たん白質、ビタミン A 及び T4 の減少を評価した。各パラメータは、試験終了時に測定した。各動物の血清中の各パラメータ濃度は、それぞれ、動物の投与前血清中の値に対して標準化した。（血清中の TTR のベースライン濃度=試験開始前測定値 1 及び 2 の平均濃度；T4 のベースライン濃度=投与 6 及び 17 日目の投与前濃度の平均濃度；ビタミン A のベースライン濃度=投与 6 日目の投与前濃度）。血清中の TTR、ビタミン A 及び T4 濃度のベースライン濃度に対する変化率は、次の式を使用して各動物で計算した。ベースライン濃度に対する変化率=[(主試験の測定値/ベースライン平均値*100)-100]。群平均値及び標準偏差は標準化した値を用いて算出した。

a TTR 濃度は、投与 281 日目の投与前に測定した。

b ビタミン A 濃度は、投与 281 日目の投与前に測定した。

c T4 濃度は、投与 282 日目に測定した。

出典：試験番号 TTRSC02-GLP15-039、TTR の各測定値は別添 3800274 試験の Appendix1。ビタミン A 及び T4 の各測定値は最終臨床病理報告書の Table 6.2。

2.6.2.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験は、サルを用いた *in vivo* 試験で実施した。ブトリシランを用いて実施した安全性薬理試験の一覧を表 2.6.2.4-1 に示す。

表 2.6.2.4-1 ブトリシランの安全性薬理試験

Species and Strain	Method of Admin	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Type of Study	Study Number (Tabulated Summary) CTD Location
Cynomolgus monkey	SC	Single dose	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 30, 300	Cardiovascular safety pharmacology study in telemetry-instrumented conscious male monkeys ^a	TTRSC02-GLP-037 (表 2.6.3-4) CTD: 4.2.1.3-1

略語 : Admin.=投与 ; NaCl=塩化ナトリウム ; SC=皮下 ; GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準。

a GLP 適合試験。

2.6.2.4.1 *In vitro* 安全性薬理試験

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た。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 ASGPR に結合し、肝細胞への取り込みを促進する。ラットを用いた定量的全身オートラジオグラフィー試験において、心臓では総放射能の 1%未満しか回収されず、心臓組織への取り込みはごくわずかであることが示されている (試験番号[TTRSC02-DSM17-009]、[2.6.4.4]項「分布」参照)。したがって、ブトリシランは心臓組織に選択的に分布することではなく、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。

2.6.2.4.2 *In vivo* 安全性薬理試験

サルを用いた安全性薬理試験 (試験番号 TTRSC02-GLP-037 ; 2.6.2.4.2.1 項参照) では、心血管系及び呼吸器系パラメータ、並びにサルを用いた 13 週間及び 9 カ月間毒性試験 (試験番号[TTRSC02-GLP15-025]及び試験番号[TTRSC02-GLP15-039] ; [2.6.6.3]項「反復投与毒性試験」参照) では、神経学的パラメータを評価した。300 mg/kg 以下の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、心血管系、呼吸器系及び神経学的パラメータに対する無影響量は 300 mg/kg (評価した最高投与量) と判断された。

2.6.2.4.2.1 雄性テレメトリー装着覚醒サルを用いた皮下投与による心血管系に対する安全性薬理評価

(CTD: 4.2.1.3-1、[TTRSX02-GLP-037])

ブトリシランの心血管系及び呼吸器系に対する安全性薬理試験を、雄性テレメトリー装着サルを用いた GLP 適合試験（[表 2.6.3-4]参照）で評価した。ブトリシランは並行群間試験デザインで動物に皮下投与された。

雄性サル 12 匹を 3 群（4 匹/群）に割り付けた。動物に溶媒対照／希釈液（0.9% 塩化ナトリウム注射液、USP [滅菌生理食塩液]）、並びに 30 及び 300 mg/kg のブトリシランを 1.5 mL/kg の投与容量で単回皮下投与した。

心血管系機能は、血行動態（動脈圧波形から求めた心拍数、収縮期・拡張期・平均動脈血圧、動脈圧及び呼吸数）、心電図パラメータ（PR、QT、心拍数で補正した QT [QTc、動物ごとの補正係数を用いる] 間隔及び QRS 時間）、並びに体温測定に基づき評価した。テレメトリー法を用いた心電図、血圧、呼吸数及び体温測定は、投与前少なくとも 2.5 時間、投与後少なくとも 84 時間、連続して評価した。全般的な健康状態は、一般状態、体重及び体温（テレメトリー法により採取）の変化に基づき評価した。血漿中曝露量を評価するための血液試料採取は、テレメトリー評価中の動物への妨害を最小限にするため、投与 1 日目の投与後 6 及び 25 時間のみに採取した。

投与後に採取した血液試料中のブトリシランの血漿中濃度の測定に基づき、すべての動物が適切に投与されていることが確認された。投与 6 時間後に、30 及び 300 mg/kg のブトリシランを投与した動物のブトリシランの平均血漿中濃度（土標準偏差）は、それぞれ、 5488 ± 1225 及び $49,100 \pm 7657$ ng/mL とほぼ投与量に比例して増加した。ブトリシランの血漿中濃度は投与後 25 時間でも測定可能で、30 及び 300 mg/kg のブトリシランを投与した動物の平均血漿中濃度は、それぞれ、 58 ± 44 及び $12,593 \pm 3217$ ng/mL であった。

試験終了まで全動物が生存し、投与 5 日目にストックコロニーに戻した。ブトリシランの投与による一般状態及び体重の変化は認められなかった。30 及び 300 mg/kg のブトリシランを投与した動物において、投与後 84 時間まで、定性的心電図所見、並びに定量的心電図、血行動態パラメータ、呼吸数及び体温の変化は認められなかった。

以上、12 匹の雄性テレメトリー装着覚醒サル（4 匹/群）に、並行群間試験デザインで、投与 1 日目に 0、30 及び 300 mg/kg のブトリシランを皮下投与し、心血管系及び呼吸器系に対する影響を評価した。ブトリシランは、投与後 84 時間まで、一般状態、定性的心電図、定量的心電図、血行動態パラメータ、呼吸数及び体温に即時的又は遅延的な影響を示さなかった。したがって、心血管系及び呼吸器系に対する無影響量は、試験した最高投与量である 300 mg/kg 以上と判断された。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用を評価するブトリシランの非臨床試験は実施していない。

ヒトにおけるブトリシランと他の TTR 減少薬又は TTR 安定化薬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。ブトリシランが細胞質の RNA 誘導サイレンシング複合体（RISC）を介して作用するのに対し、アンチセンス核酸医薬品（例、inotersen）は、

Watson-Crick 型ハイブリダイゼーションにより標的である核内 *TTR* mRNA に結合することにより RNase H 依存性機序による分解を介して肝 *TTR* 産生を減少させる^{30,31}。*TTR* 安定化薬（例、タファミジスメグルミン）は、細胞外で作用し、アミロイド形成性モノマーへの解離を阻害することにより、四量体 *TTR* たん白質を安定化させる³²。これらの異なる作用機序を考慮すると、*TTR* たん白質の産生及び分布に対する薬理作用に関して他の *TTR* 減少薬又は安定化薬とブトリシランの同時投与の効果については、研究の必要がある。

2.6.2.6 考察及び結論

一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験での活性評価により、*TTR* 遺伝子を標的とする非常に強力な siRNA である ALN-65492 を特定した。包括的な非臨床 *in vitro* 試験を実施し、ALN-65492 siRNA の薬理活性を明らかにした。これらの試験結果は、ALN-65492 の *TTR* mRNA に対する濃度依存的な抑制活性を示し、初代培養サル肝細胞を用いた ALN-65492 のトランスフェクションによる IC₅₀ は 0.21 nmol/L、自由取り込みによる IC₅₀ は 3.63 nmol/L であった（試験番号 BIO16007）。ALN-65492 の塩基配列は ALN-51547 の塩基配列と同一であり（しかし、化学修飾が異なる）、ALN-51547 で評価した以外に、野生型 *TTR* 及び一般的な病原性変異型 *TTR*、並びに SNV に対する最大効果及び用量効果を評価するブトリシランの追加の解析は実施していない。ALN-51547 は、野生型 *TTR* 及び試験したすべての病原性変異型 *TTR* に対して同様の活性を示した（試験番号 BIO13029）。SNV 解析の結果、ブトリシランの標的部位内にただ一種類の单一 SNV が同定され、幅広い人種における推定頻度は 0.0005 であった（試験番号 BIO12028）。siRNA 標的配列に関する *in vitro* 試験では、（バイオインフォマティクスにおいて）オフターゲット作用の可能性が最も高い候補遺伝子の発現抑制の試験結果は、ブトリシランの標的配列による *TTR* の“オンターゲット”の減少と、試験した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 1000 倍超の差があることを示し、*TTR* 遺伝子に対する siRNA 塩基配列の特異性が確認された（試験番号 BIO12037）。さらに、バイオインフォマティクス解析（試験番号 NCS-20-00163）（試験番号 NCS-21-00657）及び RNA-Seq（試験番号 NCS-20-00098）によって同定されたオフターゲット候補遺伝子の明らかな減少は認められなかった。

ブトリシランは、ヒト及びサルで薬理活性を示すが、げっ歯類及びウサギでは活性を示さない。ブトリシランの単回及び反復投与薬理試験を、ATTR アミロイドーシス患者で一般的に認められるヒト *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実施し、血清中 *TTR* たん白質の強力かつ持続的な減少が *in vivo* 試験で示された。ヒト *TTR* V30M トランスジェニックマウスを用いた 1 及び 2.5 mg/kg のブトリシランの単回皮下投与により、それぞれ、76% 及び 97% の *TTR* たん白質の投与量依存的な減少が認められた。*TTR* たん白質の減少は単回投与後持続的かつ可逆的で、投与後 12 週間までに血清中 *TTR* のベースライン濃度に対して約 20% の減少率まで回復が認められた（試験番号 BIO16003）。ヒト *TTR* V30M トランスジェニックマウスを用いた 0.3、1 及び 3 mg/kg のブトリシランの月 1 回、4 回皮下投与により、各月 1 回の投与後 7~14 日の間に血清中 *TTR* たん白質濃度の最大の減少が認められ、各月 1 回の投与後の血清中 *TTR* たん白質濃度の最大平均減少率は一貫しており、その後の各投与の投与前の回復動態も同様であった（試験番号

BIO16004)。すべての投与量において最終投与後 TTR 濃度の回復が認められ、最終投与後 100 日までに、0.3、1 及び 3 mg/kg の投与において、ベースライン濃度に対して、それぞれ、約 15%、40%及び 70%の減少率まで回復した。

サルを用いた 0.3 及び 1 mg/kg のブトリシランの単回投与において、投与後 21～28 日までの血清中 TTR たん白質濃度の最大平均減少率は、それぞれ、約 60%及び 95%であった。1 及び 3 mg/kg のブトリシランの月 1 回の投与により、最大で 95%超の TTR たん白質濃度の減少が認められた。初回投与後約 21 日までに最低値に達し、その後の投与により最低値濃度を示す減少率が維持された。ブトリシランの 6 カ月間の投与レジメン全体で、投与開始 1～2 カ月において 75%～90%の最大の減少が認められ、投与期間中おおむね維持された。TTR 濃度の減少は、評価したすべての投与量及びレジメンで可逆的であった（試験番号 BIO16005）。

サルを用いたブトリシランの単回及び反復皮下投与による PK／薬効薬理併合試験において評価した血漿試料の測定においても、TTR たん白質濃度の投与量依存的な持続した減少が示された。0.3～30 mg/kg の投与量でブトリシランを単回皮下投与後、血漿中 TTR たん白質濃度は、雌雄共に約 44～95%の減少が投与 21～35 日目までに認められた。1 mg/kg を月 1 回、4 回皮下投与により、血漿中 TTR たん白質濃度は、最終投与後 2 週間で 90%超の最大減少率を示した。血漿中 TTR たん白質濃度は、評価したすべての投与量及び投与レジメンにおいて、観察期間中減少が維持された（試験番号 TTRSC02-DSM15-035）。

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、反復投与毒性試験において明らかにされた。サルにおいて、循環血液中のビタミン A（最大 89%）及び T4（最大 48%）のベースライン濃度に対する持続的な減少が認められたが、眼、甲状腺及び下垂体に変化は認められなかった（表 2.6.2.3-5 及び表 2.6.2.3-6 参照）。

サルを用いた *in vivo* 安全性薬理試験（試験番号 TTRSC02-GLP-037）、並びに 13 週間及び 9 カ月間毒性試験（それぞれ、試験番号 TTRSC02-GLP15-025 及び試験番号 TTRSC02-GLP15-039）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。

これら非臨床薬理試験結果より、ブトリシランの安全性、特異性及び強力な薬理作用が示唆された。

2.6.2.7 図表

図表はいずれも本文中に示した。

2.6.2.8 参考文献一覧

1. Liz MA, Mar FM, Franquinho F, Sousa MM. Aboard transthyretin: from transport to cleavage. IUBMB Life. 2010;62(6):429-35.
2. Stangou AJ, Hawkins PN. Liver transplantation in transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy. Curr Opin Neurol. 2004;17(5):615-20.

3. 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.
4. Du Q, Thonberg H, Wang J, Wahlestedt C, Liang Z. A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(5):1671-7.
5. Connors LH, Lim A, Prokaeva T, Roskens VA, Costello CE. Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003. *Amyloid.* 2003;10(3):160-84.
6. Reixach N, Deechongkit S, Jiang X, Kelly JW, Buxbaum JN. Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):2817-22.
7. Liepnieks JJ, Benson MD. Progression of cardiac amyloid deposition in hereditary transthyretin amyloidosis patients after liver transplantation. *Amyloid.* 2007;14(4):277-82.
8. Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Kametani F, Sekijima Y, Ikeda S. Wild-type transthyretin significantly contributes to the formation of amyloid fibrils in familial amyloid polyneuropathy patients with amyloidogenic transthyretin Val30Met. *Hum Pathol.* 2011;42(2):236-43.
9. Yazaki M, Tokuda T, Nakamura A, Higashikata T, Koyama J, Higuchi K, et al. Cardiac amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy consists of abundant wild-type transthyretin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;274(3):702-6.
10. 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.
11. Ui-Tei K, Naito Y, Nishi K, Juni A, Saigo K. Thermodynamic stability and Watson-Crick base pairing in the seed duplex are major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(22):7100-9.
12. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufo S, Haddad D, McVeigh R, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D733-45.
13. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, et al. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA.* 2006;12(7):1197-205.
14. GGGenome [homepage on the Internet]. Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0). Japan: DBCLS; 2018 [update July 31, 2019]. Available from: <http://gggenome.dbcls.jp/>
15. siDirect. siDirect version 2.0. [updated Dec 3, 2009]; Available from: <http://sidirect2.rnai.jp/>
16. Hendriks IA, Lyon D, Su D, Skotte NH, Daniel JA, Jensen LJ, et al. Site-specific characterization of endogenous SUMOylation across species and organs. *Nat Commun.* 2018;9(1):2456.

17. Liebelt F, Schimmel J, Verlaan-de Vries M, Klemann E, van Royen ME, van der Weegen Y, et al. Transcription-coupled nucleotide excision repair is coordinated by ubiquitin and SUMO in response to ultraviolet irradiation. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(1):231-48.
18. Cui W, Sun M, Galeva N, Williams TD, Azuma Y, Staudinger JL. SUMOylation and ubiquitylation circuitry controls pregnane X receptor biology in hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(9):1316-25.
19. Impens F, Radoshevich L, Cossart P, Ribet D. Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(34):12432-7.
20. Wang L, Wansleeben C, Zhao S, Miao P, Paschen W, Yang W. SUMO2 is essential while SUMO3 is dispensable for mouse embryonic development. *EMBO Rep.* 2014;15(8):878-85.
21. He X, Riceberg J, Pulukuri SM, Grossman S, Shinde V, Shah P, et al. Characterization of the loss of SUMO pathway function on cancer cells and tumor proliferation. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123882.
22. He X, Riceberg J, Soucy T, Koenig E, Minissale J, Gallery M, et al. Probing the roles of SUMOylation in cancer cell biology by using a selective SAE inhibitor. *Nat Chem Biol.* 2017;13(11):1164-71.
23. Yang Y, Xia Z, Wang X, Zhao X, Sheng Z, Ye Y, et al. Small-molecule inhibitors targeting protein SUMOylation as novel anticancer compounds. *Mol Pharmacol.* 2018;94(2):885-94.
24. Morimoto M, Waller-Evans H, Ammous Z, Song X, Strauss KA, Pehlivan D, et al. Bi-allelic *CCDC47* variants cause a disorder characterized by woolly hair, liver dysfunction, dysmorphic features, and global developmental delay. *Am J Hum Genet.* 2018;103(5):794-807.
25. Yamamoto S, Yamazaki T, Komazaki S, Yamashita T, Osaki M, Matsabayashi M, et al. Contribution of calumin to embryogenesis through participation in the endoplasmic reticulum-associated degradation activity. *Dev Biol.* 2014;393(1):33-43.
26. Magee N, Zhang Y. Role of early growth response 1 in liver metabolism and liver cancer. *Hepatoma Res.* 2017;3:268-77.
27. Li TT, Liu MR, Pei DS. Friend or foe, the role of EGR-1 in cancer. *Med Oncol.* 2019;37(1):7.
28. Davis AP, Grondin CJ, Johnson RJ, Sciaky D, McMorran R, Wiegers J, et al. The Comparative Toxicogenomics Database: update 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D948-54.
29. 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.
30. Benson MD, Dasgupta NR, Monia BP. Inotersen (*transthyretin*-specific antisense oligonucleotide) for treatment of transthyretin amyloidosis. *Neurodegener Dis Manag.* 2019;9(1):25-30.
31. Shen X, Corey DR. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(4):1584-600.

32. Maurer MS, Schwartz JH, Gundapaneni B, Elliott PM, Merlini G, Waddington-Cruz M, et al.

Tafamidis treatment for patients with transthyretin amyloid cardiomyopathy. *N Engl J Med.*

2018;379(11):1007-16.

目次

2.6.3	薬理試験概要表	2
2.6.3.1	薬理試験一覧表	2
2.6.3.2	効力を裏付ける試験	5
2.6.3.3	副次的薬理試験	11
2.6.3.4	安全性薬理試験	14
2.6.3.5	薬力学的薬物相互作用試験	15

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

表 2.6.3-1 薬理試験一覧表

Overview			Test Article: Vutrisiran ^a or ALN-51547 ^b		
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
Primary Pharmacodynamics					
Identification of ALN-51547	Hep3B cells; primary monkey and human hepatocytes	<i>In vitro</i>	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	BIO12032	CTD: 4.2.1.1-1
Identification of ALN-65492	Hep3B cells; primary monkey hepatocytes	<i>In vitro</i>	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	BIO16007	CTD: 4.2.1.1-2
Analysis of human <i>TTR</i> for polymorphism variations in support of ALN-51547	N/A	<i>In silico</i>	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	BIO12028	CTD: 4.2.1.1-3
ALN-51547 <i>in vitro</i> activity: Analysis of wt and mutant <i>TTR</i> allele suppression	Cos7 cells	<i>In vitro</i>	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	BIO13029	CTD: 4.2.1.1-4
PD evaluation (serum TTR) after a single SC injection in mice	Human <i>TTR</i> V30M transgenic mouse	SC	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	BIO16003	CTD: 4.2.1.1-5
PD evaluation (serum TTR) after multiple SC injections in mice	Human <i>TTR</i> V30M transgenic mouse	SC	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	BIO16004	CTD: 4.2.1.1-6
PD evaluation (serum TTR) after multiple SC injections of vutrisiran in a repeat-dose range-finding toxicity study in male rats	Sprague Dawley rat	SC	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	TTRSC02-DSM15-028 (Subreport BIO15038)	CTD: 4.2.3.2-1
PD evaluation (serum TTR) after multiple SC injections of vutrisiran or AD-59206 in a repeat-dose range-finding developmental toxicity and TK study in female rats ^c	Sprague Dawley rat	SC	[REDACTED] [REDACTED]	TTRSC02-GLP16-013 (Subreport BIO16032)	CTD: 4.2.3.5.1-1

表 2.6.3-1 薬理試験一覧表 (続き)

Overview			Test Article: Vutrisiran ^a or ALN-51547 ^b		
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
PD evaluation (hepatic TTR) after multiple SC injections of vutrisiran in a repeat-dose range-finding developmental toxicity and TK study in female rabbits ^c	Hra:(NZW) SPF rabbit	SC	[REDACTED] [REDACTED]	TTRSC02-GLP16-012 (Subreport BIO16021)	CTD: 4.2.3.5.2-3
PD evaluation (serum TTR) after SC injection (various dosing regimens) in a PK/PD study in monkeys	Cynomolgus monkey	SC	[REDACTED] [REDACTED]	BIO16005	CTD: 4.2.1.1-7
PD evaluation (plasma TTR) after a single IV, single or multiple SC, or a single IM injection of vutrisiran in a PK/PD study in monkeys	Cynomolgus monkey	SC, IV, IM ^d	[REDACTED] [REDACTED]	TTRSC02-DSM15-035 (Subreport BIO16006)	CTD: 4.2.2.2-2
PD evaluation (serum TTR) after multiple SC injections of vutrisiran in a 13-week repeat-dose toxicity and TK study with a 12-week recovery in monkeys ^c	Cynomolgus monkey	SC	[REDACTED] [REDACTED]	TTRSC02-GLP15-025 (Subreport 3800240)	CTD: 4.2.3.2-6
PD evaluation (serum TTR) after multiple SC injections of vutrisiran in a 9-month repeat-dose toxicity and TK study in monkeys ^c	Cynomolgus monkey	SC	[REDACTED] [REDACTED]	TTRSC02-GLP15-039 (Subreport 3800274)	CTD: 4.2.3.2-7
Secondary Pharmacodynamics					
Off-target analysis of ALN-51547	HepG2 cells; Cos7 cells	<i>In vitro</i>	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	BIO12037	CTD: 4.2.1.2-1
Off-target analysis of ALN-65492	HepG2 cells; Hep3B cells	<i>In vitro</i>	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	NCS-20-00163	CTD: 4.2.1.2-2
Off-target analysis of ALN-65492	N/A	<i>In silico</i>	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	NCS-21-00657	CTD: 4.2.1.2-3

表 2.6.3-1 薬理試験一覧表 (続き)

Overview			Test Article: Vutrisiran ^a or ALN-51547 ^b		
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
RNA-sequencing screen for potential off-target inhibition of ALN-65492	Hep3B cells	<i>In vitro</i>	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	NCS-20-00098	CTD: 4.2.1.2-4
PD evaluation (vitamin A and T4) after multiple SC injections of vutrisiran in a 13-week repeat-dose toxicity and TK study with a 12-week recovery in monkeys ^c	Cynomolgus monkey	SC	[REDACTED] [REDACTED]	TTRSC02-GLP15-025	CTD: 4.2.3.2-6
PD evaluation (vitamin A and T4) after multiple SC injections of vutrisiran in a 9-month repeat-dose toxicity and TK study in monkeys ^c	Cynomolgus monkey	SC	[REDACTED] [REDACTED]	TTRSC02-GLP15-039	CTD: 4.2.3.2-7
Safety Pharmacology					
Cardiovascular safety pharmacology evaluation following a single SC injection of vutrisiran to telemetry-instrumented conscious male monkeys ^c	Cynomolgus monkey	SC	[REDACTED] [REDACTED]	TTRSC02-GLP-037	CTD: 4.2.1.3-1
Pharmacodynamic Drug Interactions					
No studies conducted					

Abbreviations: AD-59206=pharmacologically active mouse/rat surrogate; ALN-51547=revusiran drug substance; ALN-65492=vutrisiran drug substance; Cos7=cell line derived from kidney tissue of an African green monkey; Hep3B=human hepatoma derived cell line Hep3B; HepG2=human hepatoma derived cell line HepG2; IM=intramuscular(ly); IV=intravenous(ly); N/A=not applicable; NZW>New Zealand White; PD=pharmacodynamic(s); PK=pharmacokinetic(s); SC=subcutaneous(ly); SPF=specific pathogen free; T4=thyroxine; TK=toxicokinetic(s); TTR=transthyretin; V30M=valine to methionine variant at amino acid 30; wt=wild type.

a Vutrisiran is also referred to as AD-65492, ALN-65492, or ALN-TTRSC02 in nonclinical study reports.

b ALN-51547 is also referred to as AD-51547, ALN-TTRSC, or revusiran in nonclinical study reports.

c Good Laboratory Practice-compliant study.

d The IM route of exposure was not evaluated for PD.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

表 2.6.3-2 効力を裏付ける試験

Primary Pharmacodynamics: Overview					Test Article: Vutrisiran ^a or ALN-51547 ^b	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg ^c)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Identification of ALN-51547	Hep3B cells; primary monkey and human hepatocytes	<i>In vitro</i>	N/A	N/A	<p>ALN-51547 exhibited dose-dependent inhibition of <i>TTR</i> mRNA by both transfection in Hep3B cells and free-uptake in primary hepatocytes.</p> <ul style="list-style-type: none"> · $IC_{50}=2.8$ pmol/L (Hep3B cells) · $IC_{50}=3.7$ nmol/L (primary monkey hepatocytes) · $IC_{50}=9.7$ nmol/L (primary human hepatocytes) 	[BIO12032]
Identification of ALN-65492	Hep3B cells; primary monkey hepatocytes	<i>In vitro</i>	N/A	N/A	<p>116 chemically modified variants of TTR-targeting ALN-51547 were developed and evaluated with ALN-51547 <i>in vitro</i> in Hep3B cells and primary cynomolgus hepatocytes. The siRNA duplexes with the greatest inhibition of <i>TTR</i> mRNA after transfection in Hep3B cells were evaluated by dose response with the parent molecule in primary cynomolgus hepatocytes. ALN-65492 exhibited IC_{50} values by transfection and free uptake in primary cynomolgus monkey hepatocytes of 0.21 and 3.63 nmol/L, respectively.</p>	[BIO16007]

表 2.6.3-2 効力を裏付ける試験（続き）

Primary Pharmacodynamics: Overview					Test Article: Vutrisiran ^a or ALN-51547 ^b	
Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg ^c)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Analysis of human <i>TTR</i> for polymorphism variations in support of ALN-51547	N/A	<i>In silico</i>	N/A	N/A	Diverse ethnic and geographical populations demonstrated near 100% sequence conservation for the ALN-51547 target sequence. Only one SNV with an estimated frequency of 0.0005 in the broader human population was identified. Since the position of the SNV is near the 3' end of the antisense strand of the siRNA, the mismatch in question is unlikely to have a significant impact on siRNA specificity and potency.	[BIO12028]
ALN-51547 <i>in vitro</i> activity: Analysis of wt and mutant <i>TTR</i> allele suppression	Cos7 cells	<i>In vitro</i>	N/A	N/A	ALN-51547 showed similar potency (<i>TTR</i> mRNA reduction) against wt and <i>TTR</i> mutant variants and that the suppression was specific to the <i>TTR</i> gene.	[BIO13029]
PD evaluation (serum <i>TTR</i>) after a single SC injection in mice	Human <i>TTR</i> V30M transgenic mouse	SC (single dose)	ALN-65492: 1, 2.5	4/group	ALN-65492 demonstrated 76% and 97% <i>TTR</i> protein reduction relative to predose at doses of 1 and 2.5 mg/kg, respectively, with gradual recovery to approximately 20% relative to baseline serum <i>TTR</i> concentration by 84 days postdose.	[BIO16003]
PD evaluation (serum <i>TTR</i>) after multiple SC injections in mice	Human <i>TTR</i> V30M transgenic mouse	SC (qM×4)	ALN-65492: 0.3, 1, 3	4/group	ALN-65492 demonstrated robust serum <i>TTR</i> protein reduction across all 3 dose levels, with a maximum reduction of approximately 40%, 75%, and 98% after multiple SC dose administrations at 0.3, 1, or 3 mg/kg, respectively.	[BIO16004]

表 2.6.3-2 効力を裏付ける試験（続き）

Primary Pharmacodynamics: Overview					Test Article: Vutrisiran ^a or ALN-5154 ^b	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg ^c)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
PD evaluation (serum TTR) after multiple SC injections of vutrisiran in a repeat-dose range-finding toxicity study in male rats	Sprague Dawley rats	SC (qM×4)	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 40, 120	6M/group	Vutrisiran is not pharmacologically active in rats. As expected, no reductions of serum TTR protein were observed at predose on Day 85 or on Day 86 following qM doses of vutrisiran at 40 or 120 mg/kg on Days 1, 29, 57, and 85.	[TTRSC02-DSM15-028] (Subreport BIO15038)
PD evaluation (serum TTR) after multiple SC injections of vutrisiran in a repeat-dose range-finding developmental toxicity and TK study in female rats ^d	Sprague Dawley rats	SC (Premating to GD 17)	Vutrisiran: PM (qw×3): 0 (0.9% NaCl), 15, 50, 150; GD 6-17 (qd): 0 (0.9% NaCl), 3, 10, 30 AD-59206: PM (qw×3) and GD 6, 12, 17 (qd): 30	10F/group	As expected, no reductions of serum TTR protein were observed on Premating Day 14 following 3 qw vutrisiran doses at 15, 50, or 150 mg/kg or on GD 21 following qd doses at 3, 10, or 30 mg/kg on GD 6-17. Dosing with the pharmacologically active surrogate, AD 59206, resulted in >95% serum TTR protein reduction on Premating Day 14 and on GD 21 when normalized to pretreatment TTR expressions levels.	[TTRSC02-GLP16-013] (Subreport BIO16032)
PD evaluation (hepatic TTR) after multiple SC injections of vutrisiran in a repeat-dose range-finding developmental toxicity and TK study in female rabbits ^d	Hra:(NZW) SPF rabbits	SC (GD 7-19, qd)	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 3, 10, 30	3 time-mated F/group	Vutrisiran is not pharmacologically active in rabbits. As expected, no significant reductions in hepatic TTR mRNA were observed at 24 hours post-daily dosing of vutrisiran on GD 7-19 at 3, 10, or 30 mg/kg.	[TTRSC02-GLP16-012] (Subreport BIO16021)

表 2.6.3-2 効力を裏付ける試験（続き）

Primary Pharmacodynamics: Overview					Test Article: Vutrisiran ^a or ALN-51547 ^b	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg ^c)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
PD evaluation (serum TTR) after SC injection (various dosing regimens) in a PK/PD study in monkeys	Cynomolgus monkey	SC (various regimens)	ALN-65492: 0.3, 1 (single dose); 1, 3 (qM×4); 0.3, 0.6 (qM×6); 1 (qM×1) followed by 0.3 (qM×5)	3-4M/group	<p>Single-dose administration of vutrisiran at 0.3 or 1 mg/kg resulted in a maximum serum TTR protein reduction of ~60% and 95%, with recovery to baseline to within 10% and 40% by 84 and 119 days postdose, respectively.</p> <p>Monthly dosing at 1 and 3 mg/kg (qM×4) demonstrated an overall maximum of >95% serum TTR protein reduction relative to baseline with a full recovery by 204 days or a partial recovery (~7% remaining) at 288 days after the final dose.</p> <p>Monthly dosing of 0.3 and 0.6 mg/kg (qM×6) resulted in mean reductions of ~65% and 70% in serum TTR protein relative to baseline after the first dose and 75% and 86% mean reductions in serum TTR protein after the second dose.</p> <p>Vutrisiran administered at 1 mg/kg followed by monthly doses at 0.3 mg/kg resulted in a maximum reduction of ~90% in serum TTR protein after the first dose (1 mg/kg) that was maintained beyond the second monthly dose at 0.3 mg/kg. Partial recovery of serum TTR protein concentrations to within 56% to 76% relative to baseline was observed across all doses and regimens.</p>	[BIO16005]

表 2.6.3-2 効力を裏付ける試験（続き）

Primary Pharmacodynamics: Overview					Test Article: Vutrisiran ^a or ALN-5154 ^b	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg ^c)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
PD evaluation (plasma TTR) after a single IV, single or multiple SC, or a single IM injection of vutrisiran in a PK/PD study in monkeys	Cynomolgus monkey	SC, IV, IM ^e (various regimens)	Vutrisiran: 10 (IV, single dose); 0.3, 1, 3, 30 (SC, single dose); 0.3, 1 (SC, qM×4) 1 (IM, single dose)	IV and SC groups: 3/sex/group; IM group: 4 males	Pharmacologic activity of vutrisiran was observed in the single-dose IV group (maximum reductions of plasma TTR protein of approximately 85%), as well as all single- and multiple-dose SC dose groups (ranging from approximately 44% to 95%, and >90%, respectively). TTR plasma protein levels remained reduced throughout the observation period of 1344 and 1368 hours (56 and 57 days) after the single and final doses, respectively.	[TTRSC02-DSM15-035] (Subreport BIO16006)
PD evaluation (serum TTR) after multiple SC injections of vutrisiran in a 13-week repeat-dose toxicity and TK study with a 12-week recovery in monkeys ^d	Cynomolgus monkey	SC (qM×4)	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 30, 100, 300	5/sex/group	Robust decreases in serum TTR protein concentrations, relative to baseline, were observed in animals given ≥30 mg/kg. These decreased TTR concentrations (mean changes ranged from 38.7% to 99.0% from baseline) were apparent at the first scheduled time point after the Day 1 dose (ie, predose on Day 5) and persisted throughout the dosing and recovery phases (up to Day 84 of the recovery phase).	[TTRSC02-GLP15-025] (Subreport 3800240)

表 2.6.3-2 効力を裏付ける試験（続き）

Primary Pharmacodynamics: Overview					Test Article: Vutrisiran ^a or ALN-51547 ^b	
Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg ^c)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
PD evaluation (serum TTR) after multiple SC injections of vutrisiran in a 9-month repeat-dose toxicity and TK study in monkeys ^d	Cynomolgus monkey	SC (qM×11)	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 30, 100, 300	4/sex/group	Marked decreases in serum TTR protein concentrations, relative to baseline, were observed in animals administered ≥ 30 mg/kg. These decreased TTR concentrations (mean changes ranged from 41.6% to 98.6% from baseline) were apparent at the first scheduled time point after the Day 1 dose (ie, predose on Day 5) and persisted throughout the dosing phase (up to Day 281 of the dosing phase).	[TTRSC02-GLP15-039] (Subreport 3800274)

Abbreviation: Admin.=administration; AD-59206=pharmacologically active mouse/rat surrogate; ALN-51547=revusiran drug substance; ALN-65492=vutrisiran drug substance; Cos7=cell line derived from kidney tissue of an African green monkey; F=female; GD=gestation day; Hep3B=human hepatoma derived cell line Hep3B; IC₅₀=concentration for 50% of maximal inhibition; IM=intramuscular(ly); IV=intravenous(ly); M=male; mRNA=messenger RNA; NaCl=sodium chloride; N/A=not applicable; No.=number; NZW>New Zealand White; PD=pharmacodynamic(s); PK=pharmacokinetic(s); PM=prematuring; qd=once daily; qM=once monthly; qw=once weekly; SC=subcutaneous(ly); siRNA=small interfering RNA; SNV=single nucleotide variation (previously referred to as single nucleotide polymorphism [SNP]); SPF=specific pathogen free; TK=toxicokinetic(s); TTR=transthyretin; V30M=valine to methionine variant at amino acid 30; wt=wild type.

a Vutrisiran is also referred to as AD-65492, ALN-65492, or ALN-TTRSC02 in nonclinical study reports.

b ALN-51547 is also referred to as AD-51547, ALN-TTRSC, or revusiran in nonclinical study reports.

c Unless otherwise specified.

d Good Laboratory Practice-compliant study.

e The IM route of exposure was not evaluated for PD.

2.6.3.3 副次的薬理試験

表 2.6.3-3 副次的薬理試験

Secondary Pharmacodynamics: Overview					Test Article: Vutrisiran ^a or ALN-51547 ^b	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg ^c)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Off-target analysis of ALN-51547	HepG2 cells; Cos7 cells	<i>In vitro</i>	N/A	N/A	ALN-51547 was shown to be highly specific for <i>TTR</i> ; there is a >1000 fold difference between the “on-target” suppression of <i>TTR</i> by ALN-51547 and the “off-target” suppression of any of the predicted off-target transcripts tested.	[BIO12037]
Off-target analysis of ALN-65492	HepG2 cells; Hep3B cells	<i>In vitro</i>	N/A	N/A	ALN-65492 produced no substantial off-target reduction of the 5 potential off-target genes identified by bioinformatic analysis when tested at concentrations far exceeding the IC ₅₀ determined for on-target <i>TTR</i> inhibition, confirming the specificity of vutrisiran for the <i>TTR</i> transcript.	[NCS-20-00163]
Off-target analysis of ALN-65492	N/A	<i>In silico</i>	N/A	N/A	The updated <i>in silico</i> analyses identified several potential off-targets of ALN-65492. Assessment of the potential for physiological changes in cell metabolism due to unintended diminishment through an immediate siRNA effect, performed using RNA-Seq as well as a thorough evaluation of off target expression levels in healthy human liver, confirmed the specificity of both strands of ALN-65492 for the <i>TTR</i> transcript.	[NCS-21-00657]

表 2.6.3-3 副次的薬理試験（続き）

Secondary Pharmacodynamics: Overview					Test Article: Vutrisiran ^a or ALN-51547 ^b	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg ^c)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
RNA-Seq screen for potential off-target inhibition of ALN-65492	Hep3B cells	<i>In vitro</i>	N/A	N/A	RNA-Seq analysis of vutrisiran-transfected cells identified two genes (<i>SUMO2</i> and <i>CCDC47</i>) whose expression decreased by greater than 1 \log_2 but less than 2 \log_2 in the presence of 10 nmol/L (observed once) and 100 nmol/L (observed twice) of ALN-65492. In all instances the on-target inhibition of <i>TTR</i> was 3 \log_2 greater than the inhibition of the nearest off-target gene inhibition. Based on the number and modest scale of inhibition of potential off target genes identified by the RNA-Seq analysis, ALN 65492 is unlikely to generate substantial off target perturbation at concentrations exceeding 95% of <i>TTR</i> inhibition, thereby confirming the specificity of ALN-65492 for <i>TTR</i> .	[NCS-20-00098]
PD evaluation (vitamin A and T4) after multiple SC injections of vutrisiran in a 13-week repeat-dose toxicity and TK study with a 12-week recovery in monkeys ^d	Cynomolgus monkey	SC (qM×4)	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 30, 100, 300	5/sex/group	Consistent with the role of TTR protein as a minor carrier of T4 and a major carrier of vitamin A in monkeys, mildly decreased serum T4 concentration (25% to 30% from predose) and markedly decreased serum vitamin A concentration (84% to 89% from predose) were noted on Day 85 or 86 in animals given \geq 30 mg/kg; these persisted at similar magnitudes at the recovery sacrifice.	[TTRSC02-GLP15-025]

表 2.6.3-3 副次的薬理試験（続き）

Secondary Pharmacodynamics: Overview					Test Article: Vutrisiran ^a or ALN-51547 ^b	
Type of Study	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg ^c)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
PD evaluation (vitamin A and T4) after multiple SC injections of vutrisiran in a 9-month repeat-dose toxicity and TK study in monkeys ^d	Cynomolgus monkey	SC (qM×11)	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 30, 100, 300	4/sex/group	Consistent with the role of TTR protein as a minor carrier of T4 and a major carrier of vitamin A in monkeys, minimally to mildly decreased serum T4 concentrations (up to 35% from baseline) and markedly decreased serum vitamin A concentrations (up to 86% from baseline) were noted at necropsy in animals administered >30 mg/kg.	[TTRSC02-GLP15-039]

Abbreviation: Admin.=administration; ALN-51547=revisiran drug substance; ALN-65492=vutrisiran drug substance; CCDC47=coiled-coil domain containing 47; Cos7=cell line derived from kidney tissue of an African green monkey; Hep3B=human hepatoma derived cell line Hep3B; HepG2=human hepatoma derived cell line HepG2; IC₅₀=concentration for 50% of maximal inhibition; NaCl=sodium chloride; N/A=not applicable; No.=number; PD=pharmacodynamic(s); qM=once monthly; RNA-Seq=RNA sequencing; SC=subcutaneous(ly); SUMO2=small ubiquitin-like modifier 2; T4=thyroxine; TK=toxicokinetic(s); TTR=transthyretin.

a Vutrisiran is also referred to as AD-65492, ALN-65492, or ALN-TTRSC02 in nonclinical study reports.

b ALN-51547 is also referred to as AD-51547, ALN-TTRSC, or revisiran in nonclinical study reports.

c Unless otherwise specified.

d Good Laboratory Practice-compliant study.

2.6.3.4 安全性薬理試験

表 2.6.3-4 安全性薬理試験

Safety Pharmacology: Overview					Test Article: Vutrisiran ^a		
Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular and respiratory	Cynomolgus monkey	SC (single dose)	Vutrisiran: 0 (0.9% NaCl), 30, 300	4M/group	Vutrisiran had no immediate or delayed effect on clinical observations, qualitative ECGs, quantitative ECG or hemodynamic parameters, respiration rate, or body temperature through 84 hours postdose. Therefore, in terms of cardiovascular and respiratory endpoints, the NOEL is ≥ 300 mg/kg, the highest dose tested.	Yes	[TTRSC02-GLP-037]

Abbreviations: Admin.=administration; ECG=electrocardiogram; GLP=Good Laboratory Practice; M=male; NaCl=sodium chloride; No.=number; NOEL=no observed effect level; SC=subcutaneous(ly).

a Vutrisiran is also referred to as AD-65492, ALN-65492, or ALN-TTRSC02 in nonclinical study reports.

Additional information: There were no neurological effects of vutrisiran in monkeys in the 13 week (TTRSC02-GLP15-025) or 9-month (TTRSC02 GLP15-039) repeat-dose toxicity studies at ≤ 300 mg/kg (highest dose tested). Refer to 2.6.7, Toxicology Tabulated Summary.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用を評価する試験は実施していない。