目次

2.6.6 毒性試験の概要文 5
2.6.6.1 まとめ 5
2.6.6.2 単回投与毒性試験 10
2.6.6.3 反復投与毒性試験 10
2.6.6.3.1 ラットにおける反復投与毒性試験 11
2.6.6.3.2 サルにおける反復投与毒性試験 18
2.6.6.4 遺伝毒性試験 23
2.6.6.4.1 *In vitro* 遺伝毒性試験 25
2.6.6.4.2 *In vivo* 遺伝毒性試験 26
2.6.6.5 がん原性試験 27
2.6.6.5.1 長期がん原性試験 28
2.6.6.5.2 短期又は中期がん原性試験 30
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 35
2.6.6.6.1 受胎能及び初期胚発生に関する試験 37
2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験 42
2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 48
2.6.6.6.4 新生児を用いた試験 50
2.6.6.7 局所刺激性試験 50
2.6.6.8 その他の毒性試験 51
2.6.6.8.1 抗原性試験 51
2.6.6.8.2 免疫毒性試験 52
2.6.6.8.3 作用機序に関する試験 53
2.6.6.8.4 依存性試験 53
2.6.6.8.5 代謝物に関する試験 54
2.6.6.8.6 不純物に関する試験 54
2.6.6.8.7 その他の試験 54
2.6.6.9 考察及び結論 55
2.6.6.9.1 ブトリシランの一般毒性 55
2.6.6.9.2 標的器官の要約 56
2.6.6.9.3 ブトリシランの遺伝毒性及びがん原性 62
2.6.6.9.4 ブトリシランの生殖発生毒性 62
2.6.6.9.5 その他の毒性試験 64
2.6.6.9.6 全身曝露量の比較に基づくブトリシランの安全域 65
2.6.6.9.7 総括 66
2.6.6.10 図表 67
2.6.6.11 参考文献一覧 67

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
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
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
AD-65492	Vutrisiran drug substance	原薬ブトリシラン
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
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_{0-4}	AUC from hour 0 to 4	投与から投与 4 時間後までの AUC
AUC_{0-8}	AUC from hour 0 to 8	投与から投与 8 時間後までの AUC
AUC_{0-24}	AUC from hour 0 to 24	投与から投与 24 時間後までの AUC
$AUC_{0-t(last)}$	area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration	投与後から最終濃度測定時点までの AUC
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
CNS	central nervous system	中枢神経系
CTD	common technical document	コモン・テクニカル・ドキュメント
DOTAP	*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate	*N*-〔1-（2,3-ジオレオイロキシ）プロピル〕-N,N,N-トリメチルアンモニウム
DRF	dose range-finding	用量設定

略号一覧（続き）

略号・用語	定義	
	英語	日本語
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
ERG	electroretinography	網膜電図
FDA	United States Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor	顆粒球コロニー刺激因子
GalNAc	*N*-acetylgalactosamine	*N*-アセチルガラクトサミン
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
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HED	human equivalent dose	ヒト等価用量
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IFN	interferon	インターフェロン
IL	interleukin	インターロイキン
IL-1RA	interleukin-1 receptor antagonist	インターロイキン-1 受容体拮抗薬
IP-10	interferon gamma-induced protein 10	インターフェロンγ誘導たん白質 10
LD	lactation day	授乳日
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
MCP	monocyte chemoattractant protein	単球走化性因子
MHLW	Ministry of Health, Labour and Welfare	厚生労働省
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
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	no observed effect level	無影響量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PCE	polychromatic erythrocyte	多染性赤血球
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
PTC	proximal tubule cell	近位尿細管細胞

略号一覧（続き）

略号・用語	定義	
	英語	日本語
q3M	once every 3 months	3 ヵ月に 1 回
qd	once daily	1 日 1 回
qM	once monthly	月 1 回
qw	once weekly	週 1 回
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
S9	supernatant fraction obtained from an organ (usually liver) homogenate by centrifuging at 9000 *g* for 20 minutes in a suitable medium	代謝活性化系
SC	subcutaneous(ly)	皮下
siRNA	small interfering RNA	低分子干渉 RNA
$t_{1/2}$	apparent elimination half-life	半減期
T4	thyroxine	チロキシン
TGF	transforming growth factor	トランスフォーミング増殖因子
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
T_{max}	time to reach maximum 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
US	United States	米国
USP	United States Pharmacopeia	米国薬局方
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮細胞増殖因子
VEP	visual evoked potentials	視覚誘発電位
WFI	water for injection	注射用水

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 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）は成人のトランスサイレチン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された新規合成 RNA 干渉（RNAi）治療薬である。ブトリシランはトランスサイレチン（*TTR*）メッセンジャーRNA（mRNA）の翻訳を特異的に阻害するように設計された二本鎖の低分子干渉 RNA（siRNA）であり、増加した肝臓中の TTR たん白質を減少させる。ブトリシランは糖鎖リガンド（*N*-アセチルガラクトサミン〔GalNAc〕）を siRNA と結合させることにより肝臓へ送達され、アシアロ糖たん白質受容体（ASGPR）を介して肝細胞に選択的に取り込まれるように特異的に設計されている。

ATTR アミロイドーシス患者への治療的使用の妥当性を裏付けるために実施した探索的な反復投与毒性試験及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に適合した反復投与毒性試験によりブトリシラン（根拠資料である非臨床試験報告書では AD-65492、ALN-65492 又は ALN-TTRSC02 とも記載）の毒性を評価した。ブトリシランは予定臨床投与経路である皮下（SC）投与により投与した。用量設定（DRF）試験及び GLP 適合反復投与毒性試験では、3 ヵ月に 1 回（q3M）又はより短い投与間隔で臨床において投与したときに認められる可能性のある潜在的影響を確実に検出できるように月 1 回（qM）の投与レジメンを用いた。

本項に記載した試験はいずれも注射用水（WFI）中に 189 mg/mL のブトリシラン（遊離酸）を含有するブトリシラン製剤（200 mg/mL のブトリシランナトリウムに相当）を用いて実施した。一方、本概要文に記載したすべての用量及び濃度は、溶液中のブトリシランナトリウム塩の量として示した（単にブトリシランと記載）。ナトリウム塩と遊離酸の差は分子量に基づくと約 6%であり、本概要文に示したトキシコキネティクス（TK）データの解釈に意義のある影響は及ぼさない。投与用製剤（特に指定のない限り）は必要な用量となるように 0.9%塩化ナトリウム注射液、米国薬局方（USP）（溶媒）で適切な濃度に希釈し、調製した。また、非臨床試験用の製剤（WFI 中に遊離酸として 189 mg/mL）は申請予定の臨床用製剤（リン酸ナトリウム緩衝液中に遊離酸として 50 mg/mL）とは異なっていた。申請予定の臨床用製剤（2.67 mmol/L リン酸二水素ナトリウム二水和物、7.33 mmol/L リン酸水素二ナトリウム二水和物、110 mmol/L 塩化ナトリウム）の添加剤はいずれも米国食品医薬品局（FDA）により既承認品目の不活性成分（添加剤）リストに含まれており、非臨床用製剤と臨床用製剤のわずかな相違が毒性データの解釈に意義のある影響を及ぼすとは考えられない。

ブトリシランはカニクイザル（以下、サル）において薬理活性を示すが、*TTR* ゲノムの種差によりマウス、ラット及びウサギでは薬理活性を示さない。オリゴヌクレオチドの代表的な薬剤と同様に [1]、サル及びげっ歯類を用いた一般毒性試験を実施した。ブトリシランの探索的（非 GLP）DRF 毒性試験を Sprague Dawley ラット（以下、ラット）及びサルを用いて実施し、その後、ラットでは最長 6 ヵ月間投与、サルでは最長 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。主要な反復投与毒性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（検討した最高用量）であった。これらの試験で確認された毒性の主要な標的器官は肝臓であり、腎臓、SC 投与部位及びリンパ節では有害な所見は認められなかった。

受胎能及び初期胚発生に関する試験又は DRF 試験及び主要な胚・胎児発生試験において、ラットにブトリシランを週 1 回（qw）又は 1 日 1 回（qd）投与したとき、肝臓、前立腺及び膵臓が毒性の潜在的標的器官として同定された。Tg-rasH2 WT マウスでは、ブトリシランを qM 投与したときに副腎が毒性の標的器官である可能性が確認されたが、特異的な病理組織学的変化であった被膜下細胞過形成は本系統で一般的にみられる自然発生的所見であった[2]。

毒性試験の一覧を表 2.6.6.1-1 に示し、結果を以下に示す。

毒性試験で評価したブトリシランの詳細な TK に関しては、[2.6.4.3.3]項の「非臨床毒性試験におけるブトリシランの TK」を参照のこと（概要表は[表 2.6.3-4]安全性薬理試験及び[2.6.7]項の毒性試験概要表を参照）。

表 2.6.6.1-1　ブトリシランの毒性試験一覧

Study Number/ Study Type	Route of Admin.	Species or Substrate	Tested Material DP Batch/DS Batch
Repeat-dose Toxicity			
TTRSC02-DSM15-028 13-week dose range-finding (Non-GLP)	SC	Sprague Dawley rat	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-GLP15-026 13-week repeat dose with 12-week recovery (GLP)	SC	Sprague Dawley rat	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-GLP15-040 6-month repeat dose (GLP)	SC	Sprague Dawley rat	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-DSM17-011 6-month investigative repeat dose with 3-month recovery (Non-GLP)	SC	Sprague Dawley rat	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-DSM15-027 13-week dose range-finding (Non-GLP)	SC	Cynomolgus monkey	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-GLP15-025 13-week repeat dose with 12-week recovery (GLP)	SC	Cynomolgus monkey	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-GLP15-039 9-month repeat dose (GLP)	SC	Cynomolgus monkey	Vutrisiran [redacted]

表 2.6.6.1-1 ブトリシランの毒性試験一覧（続き）

Study Number/ Study Type	Route of Admin.	Species or Substrate	Tested Material DP Batch/DS Batch
Genotoxicity			
TTRSC02-GLP15-029 Bacterial reverse mutation assay (GLP)	*In vitro*	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-GLP15-030 Chromosomal aberration assay (GLP)	*In vitro*	Human peripheral blood lymphocytes	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-GLP15-028 Bone marrow micronucleus assay (GLP)	SC	Sprague Dawley rat	Vutrisiran [redacted]
Carcinogenicity			
NCS-21-00440 2-year carcinogenicity study (GLP)[a]	SC	CD-1 mouse	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-GLP18-003 2-year carcinogenicity study (GLP)	SC	Sprague Dawley rat	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-DSM18-031 8-week dose range-finding (Non-GLP)	SC	Tg-rasH2 wild type mouse	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-DSM16-032 12-week dose range-finding (Non-GLP)	SC	C57BL/6NTac and Tg-rasH2 wild type mouse	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-DSM19-009 13-week dose range-finding (Non-GLP)	SC	CD-1 mouse	Vutrisiran [redacted]
Reproductive and Developmental Toxicity			
TTRSC02-GLP16-013 Fertility and embryo-fetal development dose range-finding (GLP)	SC	Sprague Dawley rat	Vutrisiran [redacted] AD-59206 [redacted]
TTRSC02-DSM18-011 12-day dose range-finding (Non-GLP)	SC	Sprague Dawley rat	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-GLP18-005 Fertility/early embryonic development (GLP)	SC	Sprague Dawley rat	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-GLP18-013 Embryo-fetal development (GLP)	SC	Sprague Dawley rat	Vutrisiran [redacted]

表 2.6.6.1-1　ブトリシランの毒性試験一覧（続き）

Study Number/ Study Type	Route of Admin.	Species or Substrate	Tested Material DP Batch/DS Batch
TTRSC02-GLP16-012 Embryo-fetal development dose range-finding (GLP)	SC	New Zealand White rabbit	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-GLP18-014 Embryo-fetal development (GLP)	SC	New Zealand White rabbit	Vutrisiran [redacted]
TTRSC02-GLP19-007 Prenatal and postnatal development (GLP)	SC	Sprague Dawley rat	Vutrisiran [redacted]
Other Toxixity Studies			
TTRSC02-DSM15-045 Cytokine induction (Non-GLP)	*In vitro*	Human whole blood	Vutrisiran [redacted]

略号：Admin.＝投与；DP＝製剤；DS＝原薬；GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；SC＝皮下

a　CD-1 マウスにおける 2 年間投与がん原性試験を 2021 年初旬に開始し、現在進行中である。

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た原薬及び市販品に用いられる予定の原薬の不純物プロファイルと同等であった（[3.2.S.3.2]「不純物」、[3.2.S.4.1]「規格及び試験方法」、[3.2.P.5.1]「規格及び試験方法」参照）。毒性試験に用いた製剤及び原薬のバッチ番号を表 2.6.6.1-1 に示す。

ブトリシランを用いて実施した GLP 適合毒性試験は、医薬品規制調和国際会議（ICH）M3（R2）「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（2009 年 6 月 11 日付ステップ 4）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、欧州連合（EMA）、米国（FDA）、日本（厚生労働省〔MHLW〕）及び OECD 相互データ受入れ合意に署名した他の国々の規制当局によって承諾されている OECD テストガイドライン及び GLP の原則に従って実施した。探索的試験及び DRF 試験はいずれも非 GLP で実施したが、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資料を用いて実施した。

ラットは概してブトリシランの影響に対してサルよりも感受性が高かった。ラットにおける反復投与一般毒性試験では、ブトリシランを qM 投与したとき、肝臓、腎臓、SC 投与部位にブトリシランに関連した非有害所見が認められた。病理組織学的変化として、肝臓において肝細胞空胞化、単細胞壊死、有糸分裂増加及び巨大核が認められた。ラットにおける 13 週間及び長期反復投与毒性試験では、肝臓において肝細胞変化巣（好酸球性、混合型及び／又は好塩基性）も認められ、特に雌ラットでは好塩基性細胞変化巣が最も高頻度に認められた。腎臓では、尿細管上皮に好塩基性顆粒が認められ、ブトリシランの蓄積を示す所見と考えられた[3]。SC 投与部位におけるブトリシランに関連した所見として、混合細胞浸潤及び空胞化マクロファージが認められた。ラットにおいて認め

られた所見は概して臨床病理学的関連を欠き、部分的～完全に可逆的であった。毒性プロファイルは 13 週間（qM×4 回）及び 6 ヵ月間（qM×8 回）投与毒性試験で類似していたが、後者の試験では肝細胞変化巣の発現頻度が高かった。NOAEL は 13 週間投与及び 6 ヵ月間投与毒性試験でそれぞれ 120 mg/kg（qM×4 回投与）及び 150 mg/kg（qM×8 回投与）であった（検討した最高用量）。

サルにおける反復投与毒性試験では、ブトリシランを qM 投与したときに肝臓（クッパー細胞及び／又は肝細胞における好塩基性顆粒）、リンパ節（空胞化マクロファージ）及び SC 投与部位（空胞化マクロファージ）にブトリシランに関連した非有害所見が認められた。これらの所見の重篤度は概して軽度であり、臨床病理学的関連は認められず、部分的に回復性が認められた。サルを用いた試験では、薬理作用から予想された血清中 TTR 濃度の低下（ビタミン A 及びチロキシン〔T4〕の低下を伴う）が認められたが、眼、下垂体及び甲状腺には関連する毒性所見は認められなかった。13 週間（qM×4 回）及び 9 ヵ月間（qM×11 回）投与試験における NOAEL は検討した最高用量である 300 mg/kg であった。

ブトリシランの遺伝毒性を GLP 適合の標準的な *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。評価したいずれの用量においても遺伝毒性又は染色体損傷を示唆するエビデンスは認められなかった。

Sprague Dawley ラットにおける 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 qM 又は q3M 投与及び雌では 25 mg/kg の用量で qM 又は q3M 投与）でがん原性のエビデンスを示さなかった。CD-1 マウスを用いた 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、試験成績を提出する予定である。

受胎能及び初期胚発生、胚・胎児発生、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験を実施し、ブトリシランの生殖発生毒性を包括的に評価した。一般毒性試験において、雌雄ラット及びサルの生殖器官にブトリシランに関連した影響は認められなかった。ラット及びウサギを用いて GLP 適合の DRF 試験並びに主要な胚・胎児発生に関する試験及び生殖発生毒性試験を実施した。ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験を組み合わせた DRF 試験において、母動物に肝毒性及び胎児に二次的な毒性が認められたにもかかわらず、交尾、受胎能及び胚・胎児発生への影響は認められなかった。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（AD-59206）は TTR、ビタミン A 及び T4 濃度を強力に低下させたが、ラットの受胎能、交尾、生殖発生の指標又は胚・胎児発生には影響を及ぼさなかった。ラットにおいて、母動物が全身曝露されたにもかかわらず、定量可能な濃度の AD-59206 又はブトリシランの胎児への移行は認められなかった。ラットを用いた主要な受胎能及び初期胚発生を組み合わせた試験において、雌雄ラットの受胎能及び初期胚発生に対する有害な影響は認められなかった。雌雄ラットにおける NOAEL は 70 mg/kg（雄は qw×7 回投与、雌は qw×4 又は 5 回投与）であり、検討した最高用量であった。ラットにおける主要な胚・胎児発生に関する試験では、30 mg/kg の用量で qd 投与したときに、早産及び着床後胚損失の増加並びに生存胎児数の減少が認められたが、これらの所見は母動物の毒性用量で認められた。いずれの用量においても、ブトリシランに関連した胎児の外表及び内臓への影響並びに骨格の形態異常は認められなかった。母動物に対する NOAEL は 10 mg/kg、胎児に対する NOAEL は 3 mg/kg であった（qd×12 回投与）。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する DRF 試験において、卵巣及び子宮のパラメータ並びに胎児の形態に対するブトリシランの影響は認められなかった。ウサギを用いた主要な胚・胎児発生に関する試験において、ブトリシランを qd 投

与したときの忍容性は良好であり、妊娠、帝王切開パラメータ、胎児の外表、内臓、骨格に対する評価で影響は認められなかった。NOAEL は検討した最高用量である 30 mg/kg（qd×13 回投与）であった。ラットを用いて GLP 適合の出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した。妊娠雌ラットにブトリシランを 0、5、10 又は 20 mg/kg の用量で妊娠日齢（GD）7、13 及び 19 日並びに授乳日（LD）6、12 及び 18 日に SC 投与した。母動物の死亡率、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。これらのデータより、母動物に対する NOAEL は 20 mg/kg であった。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関する NOAEL も 20 mg/kg であった。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（LLOQ）未満であった。

In vitro ヒト全血アッセイにおいて、ブトリシランはサイトカイン放出を刺激しなかった。サルにおいてブトリシランは単回及び反復 SC 投与したときに全身性サイトカイン放出を誘発しなかった。ラットの 6 ヵ月間投与毒性試験で血中抗薬物抗体（ADA）が産生されなかったことから明らかなように、ブトリシランは反復投与により免疫原性の反応を示さなかった。サルでは対照物質又はブトリシラン投与前の試験前の期間中に 3/32 例で既存の抗体又は交差反応性抗体が検出されたが、その後（Day 29）の時点で ADA 力価が陽性であったのは、これらのサルのうち 1 例（100 mg/kg の用量で投与）のみであった。ADA 陽性反応は 30 mg/kg で 2/8 例のサル、100 mg/kg で 5/8 例のサルに認められ、陽性反応の大部分は Day 253（投与期間終了時）のみに認められた。300 mg/kg の用量では ADA 陽性例は認められなかった。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 TK、薬力学（PD）又は毒性において ADA による明らかな影響は認められなかった。

結論として、非臨床毒性試験の結果から、ATTR アミロイドーシス患者治療の推奨用量 25 mg、q3M 投与を担保する良好な安全性プロファイルが示された。

2.6.6.2 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。

GLP 適合の *in vivo* でのラット赤血球を用いた小核試験において、ブトリシランを単回 SC 投与し、一般状態観察を実施した（試験番号[TTRSC02-GLP15-028]；2.6.6.4.2.1 項参照）。本試験において、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 SC 投与し、投与 48 時間後までモニターした。死亡又は一般状態への有害な徴候は認められなかった。ブトリシランは 2000 mg/kg までの用量（本試験での限界用量）で投与後 48 時間良好な忍容性を示した。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

ブトリシランの反復投与による影響を検討する反復投与毒性試験をラット及びサルを用いて実施した。これらの試験に先立ち、必要に応じて予備試験を実施し、最終的な試験で用いる最大耐量を

設定した。ブトリシランの治療的使用の妥当性を裏付けるため、ラットでは最長 6 ヵ月間、サルでは最長 9 ヵ月間、SC 投与により試験を実施した。

ブトリシランを用いて実施した反復投与毒性試験の一覧を GLP の適合状況及び概要表の所在箇所と共に表 2.6.6.3-1 に示す。

表 2.6.6.3-1 ブトリシランの反復投与毒性試験一覧

Species and Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg)	GLP Status	Study number (Tabulated Summary) CTD Location
Rat/Sprague Dawley	SC	13 weeks	0, 40, 120 (qM)	Non-GLP	TTRSC02-DSM15-028 (表 2.6.7-8) CTD: 4.2.3.2-1
Rat /Sprague Dawley	SC	13 weeks	0, 12, 40, 120 (qM)	GLP	TTRSC02-GLP15-026 (表 2.6.7-9) CTD: 4.2.3.2-2
Rat /Sprague Dawley	SC	6 months	0, 15, 50, 150 (qM)	GLP	TTRSC02-GLP15-040 (表 2.6.7-10) CTD: 4.2.3.2-3
Rat /Sprague Dawley	SC	6 months	0, 5, 50 (qM) or 10, 50 (q3M)	Non-GLP	TTRSC02-DSM17-011 (表 2.6.7-11) CTD: 4.2.3.2-4
Monkey/Cynomolgus	SC	13 weeks	0, 100, 300 (qM)	Non-GLP	TTRSC02-DSM15-027 (表 2.6.7-8) CTD: 4.2.3.2-5
Monkey/Cynomolgus	SC	13 weeks	0, 30, 100, 300 (qM)	GLP	TTRSC02-GLP15-025 (表 2.6.7-12) CTD: 4.2.3.2-6
Monkey/Cynomolgus	SC	9 months	0, 30, 100, 300 (qM)	GLP	TTRSC02-GLP15-039 (表 2.6.7-13) CTD: 4.2.3.2-7

略号：Admin.＝投与；CTD＝コモン・テクニカル・ドキュメント；GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；q3M＝3 ヵ月に 1 回；qM＝月 1 回；SC＝皮下

a：下線の用量＝無毒性量（NOAEL）

2.6.6.3.1 ラットにおける反復投与毒性試験

2.6.6.3.1.1 雄ラットにおける 13 週間反復投与用量設定毒性試験

（CTD: 4.2.3.2-1、[TTRSC02-DSM15-028]）

非 GLP の DRF 試験において、雄ラットにブトリシランを qM で 13 週間（計 4 回）反復 SC 投与したときの毒性を評価し、TK を評価した（試験番号[TTRSC02-DSM15-028]；[表 2.6.7-8]参照）。

雄ラット（投与開始時約 5～7 週齢）を 3 群（各群 6 匹）に割り付けた。第 1 群には溶媒対照物質（0.9%塩化ナトリウム注射液、USP〔滅菌生理食塩液〕）を投与した。第 2 及び 3 群には、ブトリシランをそれぞれ 40 及び 120 mg/kg 体重の用量で投与した。すべてのラットにブトリシランを 5 mL/kg の一定の容量で投与期間中の Day 1、29、57 及び 85 に背部に SC 投与した。投与期間終了時の Day 86 にラットを屠殺した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、投与部位の観察、体重、体重変化、臨床病理検査（血液学的検査、血液凝固検査及び血液化学的検査）及び病理組織学的検査に基づいて行った。血液及び組織サンプルを採取し、ブトリシランの薬力学的評価（血清中 TTR たん白質濃度）及び TK の評価を行った。

ブトリシランを 40 又は 120 mg/kg の用量で反復 SC 投与したとき、一般状態の異常、肉眼で確認できる投与部位の異常、血液凝固又は血液化学的パラメータの変化、器官重量変化及び肉眼的所見は認められなかった。

ブトリシランを 40 及び 120 mg/kg の用量で投与したラットの体重増加率は試験期間中（Day 1～85）に対照群と比較してわずかに減少した（それぞれ 5 及び 13%）。

組織の病理組織学的評価では、心臓、脳又は脾臓にブトリシランに関連した所見は認められなかった。肝臓におけるブトリシラン関連の病理組織学的変化として、ブトリシランを 40 mg/kg の用量で投与した 1/6 匹及び 120 mg/kg の用量で投与した 6/6 匹のラットで軽微～軽度の小葉中心性及び中間帯から多巣性の微小小胞体及び大小胞体の混合型の肝細胞空胞化の増加が認められた。40 mg/kg の用量で投与した他のラットでは、対照群と類似の分布及び重篤度で、軽微な多巣性の肝細胞空胞化が認められた。腎臓でのブトリシランに関連した所見として、120 mg/kg の用量で投与したラットの近位尿細管上皮に軽微な好塩基性顆粒が認められた。40 mg/kg 以上の用量では、SC 投与部位でのブトリシラン関連所見として、空胞化マクロファージを伴う単核細胞浸潤の重篤度及び分布の増加が認められた。

血漿中曝露量はおおむね用量に比例して増加し、時間依存性は認められなかった。また、肝臓及び腎臓中濃度もおおむね用量に比例して増加した。

ブトリシランはラット *TTR* mRNA と配列相同性を有していない。ラットにおいて、40 又は 120 mg/kg の用量で血清中 TTR たん白質濃度の低下は認められず、薬理活性を示さないことが確認された。

結論として、雄ラットにブトリシランを 120 mg/kg 以下の用量で qM の投与レジメンで SC 投与（計 4 回）したときに、良好な忍容性を示し、用量制限毒性は特定されなかった。ブトリシランに関連した病理組織学的所見として、40 mg/kg 以上の用量で軽微～軽度の肝細胞空胞化、120 mg/kg の用量で腎近位尿細管上皮に軽微な好塩基性顆粒、40 mg/kg 以上の用量で投与部位に軽微～軽度の単核細胞浸潤及び空胞化マクロファージの重篤度及び分布の増加が認められた。これらの所見は、臨床病理学的パラメータの変化と関連していなかった。Day 85 において、T_{max} における最高（血漿中）濃度の実測値（C_{max}）及び投与後から最終濃度測定時点までの AUC（$AUC_{0\text{-}t(last)}$）の平均値は、120 mg/kg でそれぞれ 24.1 µg/mL 及び 235 µg·h/mL であった。

2.6.6.3.1.2 ラットにおける 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験

（CTD: 4.2.3.2-2、[TTRSC02-GLP15-026]）

GLP 適合の本試験において、雌雄ラットにブトリシランを qM の投与レジメンで 13 週間（計 4 回）反復 SC 投与したときの毒性を評価し、TK を測定した。また、12 週間の回復期間の後、影響の可逆性、持続性又は遅発性の発現について評価した（試験番号[TTRSC02-GLP15-026]；[表 2.6.7-9]参照）。

雌雄ラット（投与開始時約 6～7 週齢）を 4 群（第 1～4 群：雌雄各 15 匹、第 1 群 TK 試験用：雌雄各 6 匹、第 2～4 群 TK 試験用：雌雄各 27 匹）に割り付けた。第 1 群には溶媒対照物質（0.9%塩化ナトリウム注射液、USP〔滅菌生理食塩液〕）を投与した。第 2 群～4 群にはブトリシランをそれぞれ 12、40 又は 120 mg/kg 体重の用量で投与した。すべてのラットにブトリシランを 2 mL/kg の一定の容量で投与期間中の Day 1、29、57 及び 85 に背部に SC 投与した。毒性試験用の 10 匹/性/群（生存状況による）のラットを投与期間終了時の Day 86 に屠殺した。残りのすべてのラットは回復期間の Day 84 に屠殺した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、体重、体重変化、摂餌量、皮膚刺激性スコア、眼科検査、臨床及び病理組織学的検査に基づいて行った。TK の評価及び ADA 濃度の分析のために血液サンプルを採取した。TK の評価のために組織サンプルも採取した。

ブトリシランに関連した死亡は認められなかった。120 mg/kg 群の雄 1 匹が Day 14 に死亡し、死因は胸部炎症及び線維増殖病変に起因した肝壊死であり、ブトリシランの投与とは関連しない所見であると考えられた。一般状態、摂餌量、眼科検査、皮膚刺激性スコア、臨床病理検査結果又は器官重量変化にブトリシランに関連した影響は認められなかった。

120 mg/kg の用量で投与したラットでは投与期間中、対照群よりもわずかに（7%）体重増加量が少なかったが、120 mg/kg の用量で投与したラットと対照群との間に試験期間中に平均体重の統計学的有意差は認められなかった。120 mg/kg の用量で投与した雄では回復期間中、対照群よりも体重増加量が少なかった（13%）。本影響はその程度が小さく、一般状態に変化が認められなかったことから、有害とは判断しなかった。

投与期間終了時の剖検において、肝臓、腎臓、鼠径リンパ節、投与部位にブトリシランに関連した病理組織学的変化が認められた。これらの所見はいずれも程度が小さく、臨床病理学的関連は認められず、ラットの一般的な健康状態への影響も認められなかったことから、有害とは判断しなかった。40 又は 120 mg/kg の用量で投与した雄及び 120 mg/kg の用量で投与した雌の肝臓に、軽微～軽度の肝細胞空胞化が認められた。また、120 mg/kg の用量で投与した数匹の雄では、個々の肝細胞壊死の軽微な増加が、12 又は 120 mg/kg の用量で投与した雌では、肝細胞の有糸分裂像の軽微な増加が認められた。120 mg/kg の用量で投与した雌では軽微な好塩基性顆粒状病変が認められた。40 mg/kg 以上の用量で投与したラットでは、近位尿細管上皮細胞に好塩基性顆粒が認められた。これらの好塩基性顆粒は、40 mg/kg の用量で投与した雌雄で重篤度は軽微であり、120 mg/kg の用量で投与した雄及び雌では、重篤度はそれぞれ軽微～軽度及び軽度～中等度であった。40 mg/kg 以上の用量で投与した雄及び 12 mg/kg 以上の用量で投与した雌の鼠径リンパ節の皮質洞に空胞化マクロファージ（軽微）が認められた。ブトリシランを 12 mg/kg 以上の用量で投与した一部のラットの

SC 投与部位において、軽微～軽度の炎症細胞の混合浸潤及び／又は軽微な空胞化マクロファージが認められた。

回復期間中の剖検時には、個々の肝細胞壊死又は肝細胞有糸分裂像増加の所見は認められず、これらの所見は完全に回復することが示された。40 又は 120 mg/kg の用量で投与した雄及び 120 mg/kg の用量で投与した雌では、軽微な肝細胞空胞化が認められた。対照群にも認められたが、120 mg/kg の用量で投与した雌では、軽微な好塩基性細胞変化巣の発現頻度上昇が認められた。これらの所見はいずれも有害とは判断しなかった。鼠径リンパ節及び腎臓でみられたブトリシランに関連した所見は投与期間終了時の剖検の際には認められなかった。SC 投与部位の所見は軽微であり、発現頻度は低く、回復性を示すと考えられた。

血漿中 C_{max}、$AUC_{0\text{-}t(last)}$及び投与から投与 4 時間後までの AUC（$AUC_{0\text{-}4}$）で評価したときのブトリシランの曝露量は 12～120 mg/kg の範囲で用量と共に増加した。C_{max}、$AUC_{0\text{-}t(last)}$及び $AUC_{0\text{-}4}$ の増加は用量比をおおむね上回った。ラットにブトリシランを 12、40 又は 120 mg/kg の用量で qM 反復投与したとき、血漿中にブトリシランの蓄積は認められなかった。肝臓及び腎臓中の C_{max} 及び（血漿中）濃度－時間曲線下面積（AUC）はいずれもおおむね用量に比例して増加し、肝臓中の AUC の値は腎臓の約 1.2～2.4 倍であった。

結論として、雌雄ラットにブトリシランを 12、40 又は 120 mg/kg の用量で qM×4 回 SC 投与したときの忍容性はいずれの用量においても良好であった。ブトリシランに関連した病理組織学的変化が肝臓（軽微～軽度の肝細胞空胞化、軽微な有糸分裂像の増加、軽微な肝細胞壊死の増加、軽微な好塩基性細胞変化巣）、腎臓（軽微～中等度の好塩基性顆粒）、鼠径リンパ節（軽微な空胞化マクロファージ）及び SC 投与部位（軽微～軽度の混合炎症性細胞及び／又は空胞化マクロファージ）で認められた。所見の重篤度は低く、ラットの全身状態に影響がないことから、ブトリシランに関連した病理組織学的変化は有害とは判断しなかった。これらの結果から、ラットに qM 投与したとき、ブトリシランの NOAEL は 120 mg/kg であった。Day 85 での血漿中ブトリシランの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値は雌雄を合算してそれぞれ 23.8 µg/mL 及び 240 µg·h/mL であった。

2.6.6.3.1.3 ラットにおける 6 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験

（CTD: 4.2.3.2-3、[TTRSC02-GLP15-040]）

GLP 適合の本試験において、ラットにブトリシランを qM の投与レジメンで 28 週間以上（計 8 回）反復 SC 投与したときの毒性を評価し、TK を測定した（試験番号[TTRSC02-GLP15-040]；[表 2.6.7-10]参照）。本試験では回復性試験群を設定しなかった。6 ヵ月間反復投与試験のデザインはラットの 13 週間反復投与毒性試験（投与終了時まで）の中間結果から得られた知見に基づいている。6 ヵ月間反復投与試験で回復期間を設定しなかったことは、Pandher ら（2012）[4]が概説しているように、回復群の適切な設定と一致していた。13 週間反復投与毒性試験では有害な所見は認められなかった。このことから、可逆性の評価は 13 週間反復投与毒性試験のみで十分であると考えられ、ICH M3（R2）「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（2009 年 6 月 11 日付のステップ 4）と一致したものである。

雌雄ラット（投与開始時約 6～7 週齢）を 4 群（第 1～4 群：雌雄各 15 匹、第 1 群 TK 試験用：雌雄各 9 匹、第 2～4 群 TK 試験用：雌雄各 40 匹）に割り付けた。第 1 群には溶媒対照物質（0.9%塩化ナトリウム注射液、USP〔滅菌生理食塩液〕）を投与した。第 2～4 群にはブトリシランをそれぞれ 15、50 又は 150 mg/kg 体重の用量で投与した。すべてのラットにブトリシランを 2 mL/kg の一定の容量で投与期間中の Day 1、29、57、85、113、141、169 及び 197 に背部に SC 投与した（計 8 回）。毒性試験群の生存ラットはすべて投与期間終了時の Day 198 に屠殺した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、体重、体重変化、摂餌量、皮膚刺激性スコア、眼科検査、臨床及び病理組織学的検査に基づいて行った。TK の評価及び ADA 濃度の分析のために血液サンプルを採取した。TK の評価のために組織サンプルも採取した。

ブトリシランに関連した死亡は認められず、ブトリシランに関連した臨床所見又は眼科的所見も認められなかった。150 mg/kg の用量で投与した毒性試験群の雄 1 匹及び 50 mg/kg の用量で投与した TK 試験群の雄 1 匹が Day 57（それぞれ投与前及び投与後）に死亡した。毒性試験群のラットの一般状態に異常はなく、病理組織学的評価で死因は特定されなかった。TK 試験群のラットで投与直後に認められた一般状態の異常（不規則な呼吸、筋攣縮、口から赤色の分泌物、鼻の皮膚の発赤）はブトリシランを同様に SC 投与した他のラットでは認められなかった。当該ラットは TK 試験用であったため、病理組織学的評価は実施しなかった。いずれの死亡もブトリシランの投与との関連性はないと判断した。

15 mg/kg 以上の用量で投与した雄では、Day 1～197 に対照群より体重増加量が少なかった（15、50 又は 150 mg/kg の用量で投与した雄でそれぞれ 12、18 又は 23%の体重増加の減少）。50 又は 150 mg/kg の用量で投与した雄では、試験期間中を通して（Day 197 を含む）の平均体重の差は統計学的に有意であった。Day 197 での雄の平均体重は 50 及び 150 mg/kg 群でそれぞれ対照群より 13 及び 18%少なかった。150 mg/kg の用量で投与した雌も対照群よりわずかに（7%）体重増加が少なかったが、この差は統計学的に有意ではなかった。50 又は 150 mg/kg の用量で投与した雄の体重への影響は、用量依存的な摂餌量減少とおおむね関連していた。体重及び摂餌量への影響はその程度が小さく、試験期間中にすべてのラットで体重が増加し、動物の全身状態に全体的な影響が認められなかったことから、有害ではないと判断した。

血液学的検査、血液凝固検査又は尿検査において、ブトリシランに関連した影響は認められなかった。血液化学的検査の結果へのブトリシランに関連した影響は軽微であり、50 mg/kg 以上の用量で投与した雄ではアルブミン濃度（7%）及びアルブミン：グロブリン比（31～38%）が軽度に増加し、グロブリン濃度（13～16%）が軽度に低下した。15 mg/kg 以上の用量で投与した雌ではアルブミン濃度（3～5%）及びグロブリン濃度（7～14%）がわずかに低かったため、総たん白質濃度（5～8%）がわずかに低かった。50 mg/kg 以上の用量で投与した雌ではカルシウム濃度（2%）がわずかに低かった（これらの群ではアルブミン濃度の低下と関連している可能性あり）。これらの所見はいずれもその程度が小さく、ラットの一般的な健康状態への影響が認められなかったことから、有害とは判断しなかった。

ブトリシランに関連した肉眼的観察所見及び器官重量の差は認められなかった。ブトリシランに関連した病理組織学的所見が 15 mg/kg 以上の用量で投与したラットの肝臓若しくは投与部位又は 50 mg/kg 以上の用量で投与したラットの腎臓で認められた。肝臓では軽微な好酸球性細胞変化巣

（150 mg/kg の用量で投与したラット）、軽微な混合細胞性細胞変化巣（15 mg/kg の用量で投与した雌 1 匹）、軽微～軽度の好塩基性細胞変化巣（50 mg/kg の用量で投与した雄 1/15 匹、50 mg/kg の用量で投与した雌 9/15 匹及び 150 mg/kg の用量で投与した雌 14/15 匹）、軽微～中等度の肝細胞空胞化（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）、肝細胞有糸分裂の軽微な増加（150 mg/kg の用量で投与した雌）並びに軽微な肝細胞巨大核（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）が認められた。腎臓では尿細管細胞の軽微な空胞化が認められ（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）、本所見は尿細管希薄化により特徴付けられ、軽度の好塩基性細胞質空胞化を伴っており、変性のエビデンスが認められず、軽微～中等度の好塩基性顆粒（50 mg/kg 以上の用量で投与したラット）を伴っていた。15 mg/kg 以上の用量で投与したラットの SC 投与部位（部位 A〔Day 1 及び 113 に投与〕、部位 B〔Day 29 及び 141 に投与〕、部位 C〔Day 57 及び 169 に投与〕及び／又は部位 D〔Day 85 及び 197 に投与〕）において、軽微～軽度のマクロファージ浸潤が認められた。これらの病理組織学的変化はいずれもその程度が小さく、臨床病理学的関連性は認められず、ラットの一般的な健康状態への影響が認められないことから、有害とは判断しなかった。

ブトリシランの C_{max}、$AUC_{0\text{-}t(last)}$、投与から投与 8 時間後までの AUC（$AUC_{0\text{-}8}$）及び投与から投与 24 時間後までの AUC（$AUC_{0\text{-}24}$）で評価したときの血漿中曝露量は 15～150 mg/kg の用量で、用量の増加に伴って増加した。C_{max}、$AUC_{0\text{-}t(last)}$及び $AUC_{0\text{-}8}$ の値の増加は用量比をおおむね上回った。ラットに qM 反復 SC 投与したとき、ブトリシランの蓄積性は認められなかった。

検査したサンプルはすべて ADA 陰性であった。

全般的に Day 1 又は 197 において、肝臓及び腎臓中のブトリシランの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の値に全投与群で性差は認められなかった。肝臓中のブトリシラン曝露量は Day 1 及び 197 において、おおむね用量比例性を示した。ブトリシランを qM 反復投与したとき、肝臓への蓄積性は認められなかった。腎臓中のブトリシラン曝露量は Day 1 及び 197 において、用量比を上回るか又はおおむね用量比例性を示した。ブトリシランは 6 ヵ月間の試験期間中に腎臓に蓄積した。肝臓中のブトリシランの最高濃度は全用量群を通じて腎臓中の最高濃度よりも高く、Day 1 では 3.6～18.3 倍、Day 197 では 1.1～7.7 倍高かった。

結論として、雌雄ラットにブトリシランを 15、50 又は 150 mg/kg の用量で qM×8 回 SC 投与したときの忍容性は、いずれの用量においても良好であった。15 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において、平均体重増加量の減少が認められた。50 mg/kg 以上の用量で投与した雄では、試験終了時（Day 197）の平均体重が対照群と比較して 10%超減少した。ブトリシランに関連した病理組織学的変化が肝臓（混合型細胞、好塩基性及び／又は好酸性の細胞変化巣、肝細胞空胞化、肝細胞有糸分裂の増加及び肝細胞巨大核）、腎臓（尿細管細胞の空胞化及び好塩基性顆粒）及び SC 投与部位（マクロファージ浸潤）で認められた。所見の重篤度が軽度であり、ラットの全身状態に影響がないことから、これらの影響は有害ではないと判断した。これらの結果から、ラットに qM 投与したとき、ブトリシランの NOAEL は 150 mg/kg（検討した最高用量）であった。本用量における雌雄を合わせた Day 197 での血漿中ブトリシランの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$ の平均値はそれぞれ 29.1 μg/mL 及び 331 μg·h/mL であった。

2.6.6.3.1.4 雌ラットにおける探索的 6 ヵ月間反復投与毒性試験及び投与スケジュールの影響を検討するための 3 ヵ月間回復性試験

（CTD: 4.2.3.2-4、[TTRSC02-DSM17-011]）

本試験はラットにおけるブトリシランの毒性プロファイルに対する投与スケジュール（qM vs q3M）の影響を評価する目的で実施した。この非 GLP 試験では、雌ラットにブトリシランを qM 又は q3M で 6 ヵ月間反復 SC 投与（それぞれ計 7 回又は 3 回）したときの毒性を評価し、TK を測定した。また、3 ヵ月間の回復期間後の所見の可逆性を評価した（試験番号[TTRSC02-DSM17-011]；[表 2.6.7-11]参照）。

雌ラット（投与開始時約 8 週齢）を 5 群（16 匹/群）に割り付けた。第 1 群には溶媒対照物質（0.9%塩化ナトリウム注射液、USP〔滅菌生理食塩液〕）を投与した。第 2 及び 3 群にはブトリシランをそれぞれ 5 又は 50 mg/kg 体重の用量で投与した。第 4 及び 5 群にはブトリシランをそれぞれ 10 又は 50 mg/kg 体重の用量で投与した。すべてのラットにブトリシランを 5 mL/kg の一定の容量で投与期間中の Day 1、29、57、85、113、141 及び 169（第 1～3 群）又は Day 1、85 及び 169（第 4 及び 5 群）に背部に SC 投与した。投与期間終了時の Day 170 に毒性試験用の 10 匹/群のラットを屠殺した。残りのすべてのラットは回復期間終了時の Day 84 に屠殺した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、体重、体重変化、臨床病理検査（血液学的検査、血液凝固検査及び血清化学的検査）及び病理組織学的検査に基づいて行った。TK の評価のために血液サンプルを採取した。ブトリシラン濃度分析のため、肝臓及び腎臓を採取した。

すべてのラットが予定した剖検時（Day 170 又は 254）まで生存した。動物の生死、一般状態、体重、体重増加量、臨床病理学的パラメータ、肝臓及び腎臓重量並びに肉眼的所見にブトリシランに関連した影響は認められなかった。

血漿中のブトリシラン曝露量は用量の増加に伴って増加した。ブトリシランの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は 5～10 mg/kg の用量では、用量におおむね比例して増加し、10～50 mg/kg では用量の増加を上回って増加した。ブトリシランの C_{max} は 5 及び 10 mg/kg の用量では Day 1 と 169 で同程度であった。ブトリシランの $AUC_{0\text{-}t(last)}$は 5 mg/kg の用量では Day 1 の値が算出不能であったため、Day 169 との比較はできなかったが、10 mg/kg では Day 1 と 169 で同程度であった。ブトリシランを 50 mg/kg の用量で qM 投与したとき、Day 1 と比較して Day 169 に C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$のわずかな低下が認められた。ブトリシランの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の値は 50 mg/kg の用量で q3M 投与したときと比較して、qM 投与したときではわずかに低かった。

肝臓及び腎臓中のブトリシラン濃度を比較するときには、総投与量（又は累積投与量）を考慮した。Day 170 での肝臓中ブトリシラン濃度は投与量におおむね比例して増加した。累積投与量が 35 mg/kg（5 mg/kg、qM×7 回）では、Day 170 の肝臓中濃度は 30 mg/kg（10 mg/kg、q3M×3 回）よりわずかに低かった。50 mg/kg 群では、肝臓中ブトリシラン濃度は qM（累積投与量は 350 mg/kg に相当）の投与レジメンでは、q3M（累積投与量は 150 mg/kg に相当）と比較してわずかに高かった。Day 170 での腎臓中ブトリシラン濃度は投与量におおむね比例して増加した。Day 170 での腎臓中ブトリシラン濃度は累積投与量が 35 mg/kg（5 mg/kg、qM×7 回）では、30 mg/kg（10 mg/kg、q3M×3 回）よりもわずかに低かった。50 mg/kg 群では、腎臓中ブトリシラン濃度は qM と q3M の投与レジメンで同程度であった。

50 mg/kg 群において、回復期間終了時に肝臓中に一貫した検出可能濃度のブトリシランが検出された。50 mg/kg の用量で qM×7 回投与（累積投与量は 350 mg/kg）したときの肝臓中ブトリシラン濃度の平均値は 50 mg/kg の用量で q3M×3 回投与（累積投与量は 150 mg/kg）したときの 12.7 倍であった。50 mg/kg の用量で qM×7 回投与したときの腎臓中ブトリシラン濃度の平均値は 50 mg/kg の用量で q3M×3 回投与したときの 0.62 倍であった。肝：腎の濃度比の平均値はばらつきが大きく、50 mg/kg の用量で qM×7 回投与及び 50 mg/kg の用量で q3M×3 回投与したとき、それぞれ 4.7±6.3（平均値±標準偏差）及び 0.34±0.24（平均値±標準偏差）であった。

ブトリシランを投与したラットの肝臓に病理組織学的変化が認められた。50 mg/kg の用量で qM 及び q3M 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。また、50 mg/kg の用量で qM 投与又は 10 mg/kg 以上の用量で q3M 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 qM 投与又は 50 mg/kg の用量で q3M 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の細胞変化巣が認められた。細胞変化巣の発現頻度は 50 mg/kg の用量で q3M 投与したときと比較して 50 mg/kg の用量で qM 投与したときの方が高かった。5 mg/kg の用量で qM 投与したラットの累積投与量は 35 mg/kg であり、一方、10 mg/kg の用量で q3M 投与したラットの累積投与量は 30 mg/kg であった。10 mg/kg の用量で q3M 投与した群では好塩基性の細胞変化巣が認められず、5 mg/kg の用量で qM 投与したときに本所見が認められたことから、投与頻度が肝臓での本所見に関与していると考えられる。

結論として、雌ラットにブトリシランを 0、5 若しくは 50 mg/kg の用量で qM×7 回投与又は 10 若しくは 50 mg/kg の用量で q3M×3 回 6 ヵ月間投与したとき、忍容性は良好であった。ブトリシランに関連した病理組織学的変化が肝臓で認められ、有糸分裂の増加、両染性及び好塩基性細胞変化巣が認められた。これらの所見は、投与期間終了時と比較して回復期間終了時に概してより重篤であった。累積投与量を考慮したとき（すなわち、5 mg/kg の用量で qM 投与 vs 10 mg/kg の用量で q3M 投与）、投与頻度を増やすと（qM 投与 vs q3M 投与）、回復期間終了時の好塩基性細胞変化巣の発現頻度が上昇した。本所見は 10 mg/kg の用量で q3M 投与したときと比較して 5 mg/kg の用量で qM 投与したときでは肝臓中濃度がわずかに低かったにもかかわらず認められた。50 mg/kg の用量で qM 投与及び 50 mg/kg の用量で q3M 投与したラットの血漿中 C_{max} はそれぞれ 2.56 及び 7.90 µg/mL であった。50 mg/kg の用量で qM 投与及び 50 mg/kg の用量で q3M 投与したラットの血漿中 $AUC_{0\text{-}t(last)}$はそれぞれ 18.0 及び 35.6 µg·h/mL であった。

2.6.6.3.2 サルにおける反復投与毒性試験

2.6.6.3.2.1 サルにおける 13 週間反復投与用量設定毒性試験

（CTD: 4.2.3.2-5、[TTRSC02-DSM15-027]）

本 DRF 試験では、サルにブトリシランを qM（4 回）反復 SC 投与したときの毒性を評価し、TK を測定した（試験番号[TTRSC02-DSM15-027]；[表 2.6.7-8]参照）。

雌サル（投与開始時約 2.5～4 歳齢）を 3 群（各群 3 例）に割り付けた。第 1 群のサルには 0.9%塩化ナトリウム注射液、USP（滅菌生理食塩液）を投与した。第 2 及び 3 群のサルにはブトリシラ

ンをそれぞれ 100 又は 300 mg/kg 体重の用量で投与した。ブトリシランを生理食塩液で希釈し、第 2 及び 3 群用にブトリシラン濃度をそれぞれ 66.7 及び 200 mg/mL に調製した。すべてのサルにブトリシランを 1.5 mL/kg の一定の容量で Day 1、29、57 及び 85 に SC 投与した。投与期間終了時の Day 86 に全例を屠殺した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、摂餌量、体重、体重変化、刺激性スコア、臨床検査（血液学的検査、血液化学的検査、血液凝固検査及び尿検査）及び病理組織学的検査に基づいて行った。ブトリシランの TK の評価のために血液及び組織サンプルを採取した。サイトカイン濃度分析のために血液サンプルを採取した。

すべてのサルが予定した試験終了時まで生存した。ブトリシランに関連した臨床所見及び体重への影響は認められなかった。ブトリシランに関連した皮膚刺激性を示唆する唯一の所見が Day 1 に認められ、対照群を含むすべてのサルで投与 30 分後に浮腫が認められた。対照群では投与 2 時間後までに回復したものの、ブトリシランを 100 又は 300 mg/kg の用量で投与した雌では依然として用量依存的に認められた。いずれも投与 4 時間後までに回復した。

臨床病理検査においてブトリシランに関連した影響は認められなかった。

ブトリシランに関連した器官重量及び肉眼的所見は認められなかった。300 mg/kg の用量で投与したサルの肝臓におけるブトリシランに関連した病理組織学的変化として、クッパー細胞及び／又は肝細胞における軽微な好塩基性顆粒が認められた。100 又は 300 mg/kg の用量で投与したサルでは、1 ヵ所以上の投与部位で軽微な好酸球及び／又はマクロファージの浸潤が認められ、ときに空胞化又は好塩基性顆粒が認められた。

ブトリシランを 100 又は 300 mg/kg の用量で qM×4 回 SC 投与したとき、Day 1 又は 85 において血漿中サイトカイン濃度にブトリシランに関連した影響は認められなかった。

血漿中 C_{max} は Day 1 及び 85 でそれぞれおおむね用量比例性を示すか又は用量比を下回って増加したが、$AUC_{0\text{-}24}$ は Day 1 及び 85 ではおおむね用量に比例して増加した。Day 1～85 の間にブトリシランの蓄積性は認められなかった。

肝臓中ブトリシラン濃度は Day 85 で用量比を下回って増加したが、腎臓中ブトリシラン濃度は用量比を上回って増加し、肝臓中濃度は腎臓中濃度よりも高濃度であった。

結論として、雌サルにブトリシランを 100 又は 300 mg/kg の用量で qM×4 回 SC 投与したときに、すべての用量で忍容性は良好であり、有害な影響は認められなかった。100 mg/kg 以上の用量で投与したとき、Day 1 で投与部位にブトリシランに関連した軽度～中等度の一過性の浮腫が認められた。肝臓の病理組織学的変化（300 mg/kg の用量で投与したとき、クッパー細胞及び／又は肝細胞において軽微な好塩基性顆粒、100 mg/kg 以上の用量で投与したとき、投与部位において好酸球及び／又はマクロファージの軽微な浸潤）は有害とは判断しなかった。300 mg/kg の用量で投与した雌における Day 85 での血漿中ブトリシランの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値は、それぞれ 83 µg/mL 及び 1600 µg·h/mL であった。

2.6.6.3.2.2 サルにおける 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験

（CTD: 4.2.3.2-6、[TTRSC02-GLP15-025]）

GLP 適合の本試験ではサルにブトリシランを qM の投与レジメンで 13 週間（計 4 回）SC 投与したときの毒性を評価し、TK を測定した。また、12 週間の回復期間の後に影響の可逆性、持続性又は遅発性の発現を評価した（試験番号[TTRSC02-GLP15-025]；[表 2.6.7-12]参照）。

雌雄サル（投与開始時約 2.5～4 歳齢）を 4 群（雌雄各 5 例/群）に割り付けた。第 1 群のサルに溶媒対照物質（0.9%塩化ナトリウム注射液、USP〔滅菌生理食塩液〕）を投与した。第 2～4 群のサルには、ブトリシランをそれぞれ 30、100 又は 300 mg/kg 体重の用量で投与した。すべてのサルにブトリシランを 1.5 mL/kg の一定の容量で投与期間中の Day 1、29、57 及び 85 に SC 投与した。投与期間終了時の Day 86 に雌雄各 3 例/群を屠殺した。残りのすべてのサルは回復期間中の Day 84 に屠殺した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、体重、定性的摂餌量、神経学的検査、皮膚刺激性スコア、身体検査、眼科検査、臨床及び病理組織学的検査に基づいて行った。TK の評価、ADA の測定、薬力学的作用及びビタミン A 濃度の分析のために血液サンプルを採取した。TK の評価のために組織サンプルも採取した。

ブトリシランに関連した死亡は認められなかった。100 mg/kg の用量で投与した雄 1 例を *Campylobacter* spp.の偶発的感染のため、Day 54 に屠殺した。30 mg/kg の用量で投与した雌を同じケージで飼育していたサルからの攻撃行動による可能性が高い前肢損傷のため、Day 57 に屠殺した。ブトリシランに関連した一般状態（定性的摂餌量を含む）、眼科検査、身体検査及び神経学的検査の所見、皮膚刺激性スコア及び体重への影響は認められなかった。

血液学的検査、血液化学的検査、血液凝固検査及び尿検査において、ブトリシランに関連した影響は認められなかった。

投与期間終了時又は回復期間終了時の剖検時において、ブトリシランに関連した肉眼的観察及び器官重量の差は認められなかった。投与期間終了時の剖検の際には、ブトリシランに関連した病理組織学的検査は肝臓及びリンパ節に限定して行った。100 mg/kg 以上の用量で投与したサルの肝臓のクッパー細胞において、軽微～軽度の好塩基性顆粒が認められた。100 mg/kg 以上の用量で投与したサルの腋窩、鼠径及び下顎リンパ節に軽微～軽度の空胞化マクロファージが認められ、30 mg/kg 以上の用量で投与したサルの腸間膜リンパ節に軽微～中等度の空胞化マクロファージが認められた。回復期間終了時にブトリシランに関連した所見が肝臓及びリンパ節で認められ、これらの所見は投与期間中に認められた所見と類似していたが、顕著ではなく（発現頻度及び／又は重篤度は低い）、部分的に可逆性が示された。ブトリシランに関連した所見はいずれも有害とは判断しなかった。

薬理作用の指標として、30 mg/kg 以上の用量で投与したサルにおいて、ベースラインと比較して血清中 TTR 濃度の顕著な低下が認められた。TTR 濃度の低下（ベースラインから最大 99%）は、Day 1 の投与後の予定していた最初の時点（すなわち、Day 5 の投与前）で顕著であり、投与期間及び回復期間（回復期間の Day 84 まで）を通して持続した。

サルにおいて TTR たん白質は T4 のマイナーな輸送担体として、また、ビタミン A の主要な輸送担体としての役割を有していることと一致して、30 mg/kg 以上の用量で投与したサルで Day 86 に血清中 T4 濃度の軽度な低下（雌雄を合算してベースラインから最大 48%）及び血清中ビタミン A 濃度の顕著な低下（雌雄を合算してベースラインから最大 89%）が認められ、回復期間終了時の剖検時にも同程度の持続がみられた。

C_{max}、$AUC_{0\text{-}t(last)}$、$AUC_{0\text{-}8}$ 及び $AUC_{0\text{-}24}$ で評価したとき、血漿中のブトリシラン曝露量は 30～300 mg/kg の用量で用量の増加に伴って増加した。C_{max}、$AUC_{0\text{-}t(last)}$、$AUC_{0\text{-}8}$ 及び $AUC_{0\text{-}24}$ の値の増加は、雌雄でおおむね用量比例性が示された。ブトリシランの C_{max}、$AUC_{0\text{-}t(last)}$、$AUC_{0\text{-}8}$ 及び $AUC_{0\text{-}24}$ の平均値の性差は 2 倍未満であった。サルにブトリシランを 30、100 及び 300 mg/kg の用量で qM 反復投与したとき、蓄積性は認められなかった。

ブトリシランは溶媒を投与した対照群のサルの肝臓及び腎臓では検出されなかった。ブトリシランを投与した全例で投与期間中の Day 86 及び回復期間中の Day 84（Day 169）に肝臓及び腎臓でブトリシランが検出された。早期に屠殺した 2 例（100 mg/kg の用量で投与した雄：動物番号 I10934、Day 54 に屠殺、30 mg/kg の用量で投与した雌：動物番号 I10950、Day 57 に屠殺）からもブトリシランが検出された。ブトリシランを qM×4 回投与したとき、Day 86 及び回復期間終了時に肝臓及び腎臓中濃度に性差は認められなかった。組織中濃度の平均値は、肝臓及び腎臓のいずれも用量に比例して増加した。回復期間終了時には、肝臓中濃度は Day 86 と比較して 1/6～1/5 に低下した。腎臓中濃度の低下はより顕著（1/71～1/11 に低下）であったが、用量相関性は認められなかった。

結論として、サルにブトリシランを 30、100 又は 300 mg/kg の用量で qM×4 回 SC 投与したときの忍容性はいずれの用量においても良好であった。明らかな薬理活性がすべての用量で投与期間及び回復期間を通して血清中 TTR 濃度の顕著な低下（ベースラインから最大 99%）として認められた。想定したとおり、TTR の既知の機能と一致して、TTR 濃度の低下はすべての用量で T4（軽度）及びビタミン A（顕著）の血中濃度の低下を伴っていた。ブトリシランはすべての用量で肝臓及び腎臓で検出された。ブトリシランに関連した病理組織学的変化が、肝臓（軽微～軽度のクッパー細胞における好塩基性顆粒）並びに腋窩、鼠径、下顎及び腸間膜リンパ節（軽微～中等度の空胞化マクロファージ）で認められた。所見の重篤度が軽度であり、サルの全身状態に影響がないことから、これらの影響は有害とは判断しなかった。これらの結果から、サルにブトリシランを qM 投与したときの NOAEL は 300 mg/kg であった。300 mg/kg の用量で qM 投与したサルの Day 85 での血漿中ブトリシランの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$は雌雄を合算してそれぞれ 60.1 µg/mL 及び 1360 µg·h/mL であった。

2.6.6.3.2.3 サルにおける 9 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験

（CTD: 4.2.3.2-7、[TTRSC02-GLP15-039]）

GLP 適合の本試験ではサルにブトリシランを qM の投与レジメンで 41 週間以上（計 11 回）SC 投与したときの毒性を評価し、TK を測定した（試験番号[TTRSC02-GLP15-039]；[表 2.6.7-13]参照）。

雌雄サル（投与開始時約 2.2～3.2 歳齢）を 4 群（雌雄各 4 例/群）に割り付けた。第 1 群には溶媒対照物質（0.9%塩化ナトリウム注射液、USP〔滅菌生理食塩液〕）を投与した。第 2～4 群には、ブトリシランをそれぞれ 30、100 又は 300 mg/kg 体重の用量で投与した。すべてのサルにブトリシランを 1.5 mL/kg の一定の容量で投与期間中の Day 1、29、57、85、113、141、169、197、225、253 及び 281 に背部に SC 投与した（計 11 回）。投与期間終了時の Day 282 にサルを屠殺した。本毒性試験でのサルの使用総数を減らすために、また、13 週間反復毒性試験の結果に基づき、本試験では回復性を検討するためのサルの群を設定しなかった [4]。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、定性的摂餌量、体重、体重変化、神経学的検査、皮膚刺激性スコア、身体検査、眼科検査、網膜電図（ERG）、視覚誘発電位（VEP）、臨床及び病理組織学的検査に基づいて行った。TK の評価、ADA の測定、薬力学的作用（TTR）及びビタミン A 濃度の分析のために血液サンプルを採取した。TK の評価のために組織サンプルも採取した。

すべてのサルが予定していた最終剖検時まで生存した。臨床所見、眼科的、身体的及び神経学的検査所見、皮膚刺激スコア所見、ERG 又は VEP の記録にブトリシランに関連した影響は認められなかった。

30 mg/kg 以上の用量で投与した雄では、対照群よりも体重増加量が少なかった（30、100 及び 300 mg/kg でそれぞれ 27、36 及び 36%）。300 mg/kg の用量で投与した雌では、対照群よりも体重増加量が 20%少なかった。体重へのこれらの影響は試験期間中、すべてのサルで体重が維持されるか又は増加し、サルの全身状態に影響が認められなかったことから、有害とは判断しなかった。

血液学的検査、血液化学的検査、血液凝固検査及び尿検査の結果にブトリシランに関連した影響は認められなかった。

器官重量及び肉眼的所見にブトリシランに関連した影響は認められなかった。病理組織学的変化にブトリシランに関連した有害な影響は認められなかった。投与期間終了時の剖検時に有害ではない病理組織学的変化として、30 mg/kg 以上の用量で投与したサルの肝臓のクッパー細胞及び／又は肝細胞において軽微～軽度の好塩基性顆粒、リンパ節（下顎、腸間膜、腋窩及び／又は鼠径）の類洞において空胞化マクロファージの軽微～軽度な集積及び SC 投与部位（A、B、C 及び／又は D）において空胞化マクロファージの軽微な集積が認められた。

薬理作用の指標として、30 mg/kg 以上の用量で投与したサルにおいて、ベースラインと比較して血清中 TTR 濃度の顕著な低下が認められた。TTR 濃度の低下（ベースラインから最大 98.6%）は、Day 1 での投与後の予定していた最初の時点（すなわち、Day 5 の投与前）で顕著であり、投与期間を通して持続した（投与期間の Day 281 まで）。

サルにおいて TTR たん白質は T4 のマイナーな輸送担体として、また、ビタミン A の主要な輸送担体としての役割を有していることと一致して、30 mg/kg 以上の用量で投与したサルでは、Day 281 に血清中 T4 濃度の軽微～軽度な低下（雌雄を合算してベースラインから 22～35%）及び血清中ビタミン A 濃度の顕著な低下（雌雄を合算してベースラインから 84～86%）が認められた。

3/32 例のサルで投与前に ADA 陽性反応が認められた。これらのサルのうち 1 例（100 mg/kg）のみが Day 29 に引き続き陽性反応を示した。このサルでは Day 253 に ADA は検出されなかった。陽性反応を示したサルの発現頻度は 30 及び 100 mg/kg の用量で投与したとき経時的に上昇し、陽性反応の大部分は Day 253 のみに認められた。ADA 陽性反応を示したサルは 30 mg/kg 群で 2/8 例、

100 mg/kg 群で 5/8 例及び 300 mg/kg 群で 0/8 例であった。いずれも抗体価は 100 以下であり、TK、PD 又はブトリシランの毒性に影響は認められなかった。

ブトリシランの C_{max}、AUC_{0-8} 及び AUC_{0-24} の平均値の性差は 2 倍未満であるため、雌雄を合わせた値に基づいて結果及び考察を記載した。ブトリシランの C_{max}、AUC_{0-8} 及び AUC_{0-24} の平均値により評価した曝露量は、30～300 mg/kg の用量で用量の増加に伴い増加した。ブトリシランの C_{max}、AUC_{0-8} 及び AUC_{0-24} の平均値の増加はおおむね用量比例性が認められた。ブトリシランを反復投与したとき、蓄積性は認められなかった。血漿中の TK は ADA の存在による影響を受けなかった。

対照群のサルの肝臓又は腎臓でブトリシランは検出されなかった。Day 282 において、ブトリシランを投与したすべてのサルの肝臓及び腎臓サンプル中でブトリシランが定量可能であった。肝臓又は腎臓サンプルでは、ブトリシラン濃度に明らかな性差は認められなかった。ブトリシランの肝臓中濃度の平均値は 30～100 mg/kg でおおむね用量に比例して増加したが、100～300 mg/kg では用量比を下回って増加した。ブトリシランの腎臓中濃度の平均値は、30～100 mg/kg では用量比を上回って増加し、100～300 mg/kg では用量におおむね比例して増加した。すべてのブトリシラン投与群で肝臓中濃度は腎臓中濃度よりも大幅に高かった（30、100 又は 300 mg/kg でそれぞれ 75、25 又は 11 倍）。

以上より、サルにブトリシランを 30、100 又は 300 mg/kg の用量で qM×11 回 SC 投与したときの忍容性はいずれの用量においても良好であった。投与期間を通して、いずれの用量においても血清中 TTR 濃度の顕著な低下（ベースラインから 41.6～98.6%）が薬理活性として認められた。想定したとおり、TTR の既知の機能と一致して、TTR 濃度の低下はすべての用量で T4（軽微～軽度）及びビタミン A（顕著）の血中濃度の低下を伴っていた。肝臓及び腎臓において試験終了時にすべての用量でブトリシランが検出された。ブトリシランに関連した病理組織学的変化は肝臓（クッパー細胞及び／又は肝細胞における軽微～軽度の好塩基性顆粒）、腋窩、鼠径、下顎及び腸間膜リンパ節（軽微～軽度の空胞化マクロファージ）並びに SC 投与部位（軽微な空胞化マクロファージ）で認められた。所見の重篤度が軽度であること、臨床病理学的所見に関連性が認められないこと、サルの全身状態に影響が認められないことから、これらの所見は有害とは判断しなかった。これらの結果から、サルに qM 投与したときのブトリシランの NOAEL は 300 mg/kg であった。300 mg/kg の用量で qM 投与したサルの Day 253 でのブトリシランの血漿中 C_{max} 及び $AUC_{0-t(last)}$の平均値は雌雄を合わせてそれぞれ 71.7 µg/mL 及び 1170 µg·h/mL であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

ブトリシランの遺伝毒性を GLP 適合の標準的な *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。変異原性の可能性を標準的な細菌を用いた Ames 試験により *in vitro* で評価した。また、ブトリシランの染色体異常誘発作用についても、哺乳類細胞のヒト末梢血リンパ球を用いた試験において *in vitro* で評価した。ラット肝代謝活性化系（S9 mix）の存在下及び非存在下の両方で、適切な溶媒及び陽性対照を用いて試験を実施した。染色体異常誘発の可能性については、ラットに SC 投与したときの小核試験により *in vivo* でも評価した。

ブトリシランを用いて実施した遺伝毒性試験の一覧を GLP 適合状況及び概要表のデータの所在箇所と共に表 2.6.6.4-1 に示す。

表 2.6.6.4-1 ブトリシランの遺伝毒性試験一覧

Species and Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Status	Study Number (Tabulated Summary) CTD Location
Salmonella typhimurium (TA100, TA98, TA1535, TA1537); *Escherichia coli* (WP2 *uvr*A)	*In vitro*	52±4 hours	With and without metabolic activation: 5.00, 16.0, 50.0, 160, 500, 1600, or 5000 µg/plate	GLP	TTRSC02-GLP15-029 (表 2.6.7-14) CTD: 4.2.3.3.1-1
Human peripheral blood lymphocytes	*In vitro*	3 hours ± S9 ; 24 hours -S9	3.39, 4.84, 6.92, 9.89, 14.1, 20.2, 28.8, 41.2, 59.0, 84.0, 120, 172, 245, 350, or 500 µg/mL	GLP	TTRSC02-GLP15-030 (表 2.6.7-15) CTD: 4.2.3.3.1-2
Rat/Sprague Dawley	SC	Single dose; harvest at 24 or 48 hours	0, 500, 1000, 2000	GLP	TTRSC02-GLP15-028 (表 2.6.7-16) CTD: 4.2.3.3.2-1

略号：Admin.＝投与；CTD＝コモン・テクニカル・ドキュメント；GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；SC＝皮下

a 特に記載がない場合

2.6.6.4.1 *In vitro* 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1.1 ネズミチフス菌及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験

（CTD: 4.2.3.3.1-1、[TTRSC02-GLP15-029]）

本試験ではラット S9 非存在下及び存在下でネズミチフス菌のヒスチジン要求性変異株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）及び大腸菌のトリプトファン要求性変異株（WP2 *uvr*A）を用いたブトリシランの復帰突然変異誘発作用を評価した（試験番号[TTRSC02-GLP15-029]；[表 2.6.7-14]参照）。

試験菌株 TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び WP2 *uvr*A を用いた変異原性試験において、S9 存在下及び非存在下でブトリシランの影響を 5.00、16.0、50.0、160、500、1600 及び 5000 µg/plate の濃度で評価した（各濃度 3 枚のプレート）。陽性対照及び溶媒対照の値はいずれも許容範囲内であり、確立された試験の基準をすべて満たした。ブトリシランは S9 mix の存在下又は非存在下にかかわらず、いずれの試験菌株に対しても復帰突然変異の陽性結果の増加を示さなかった。

これらの結果は、試験計画書及び規制ガイドラインの条件及び基準に従って実施した細菌を用いた復帰突然変異試験においてブトリシランは陰性であることを示している。

2.6.6.4.1.2 ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 哺乳類染色体異常試験

（CTD: 4.2.3.3.1-2、[TTRSC02-GLP15-030]）

本試験では S9 非存在下及び存在下で培養ヒト末梢血リンパ球の染色体に対するブトリシランの影響を検討することにより、ブトリシランが染色体異常誘発作用を示す可能性を評価した（試験番号[TTRSC02-GLP15-030]；[表 2.6.7-15]参照）。

染色体異常試験では、処理時間は代謝活性化系の非存在下及び存在下で 3 時間、並びに代謝活性化系の非存在下で 24 時間に設定した。処理開始から約 24 時間後に培養細胞を回収した。細胞毒性試験において、代謝活性化系の非存在下及び存在下でブトリシランを 3.39、4.84、6.92、9.89、14.1、20.2、28.8、41.2、59.0、84.0、120、172、245、350 及び 500 μg/mL の濃度で処理し、検討を行った。続いて、代謝活性化系の非存在下及び存在下で培養細胞にブトリシランを 245、350 及び 500 μg/mL の濃度で 3 時間、また、代謝活性化系の非存在下で 24 時間処理し、染色体異常を分析した。分析した培養細胞では、染色体異常、倍数体又は核内倍加を有する細胞の有意な増加は認められなかった。

溶媒を処理した対照群の培養細胞は染色体異常を有する細胞の対照群の背景データの範囲内であり、陽性対照物質を処理した培養細胞では、溶媒を処理した対照群の培養細胞と比較して、染色体異常を有する細胞の有意な増加が認められた。本試験で分析に選択した高濃度である 500 μg/mL は、規制ガイドラインに基づき本試験法で推奨されている最高濃度であった。

ブトリシランは代謝活性化系の非存在下及び存在下で、培養ヒトリンパ球において染色体異常、倍数性又は核内倍加を誘発する作用について陰性であると考えられた。

2.6.6.4.2 *In vivo* 遺伝毒性試験

2.6.6.4.2.1 ラット骨髄の哺乳類赤血球における小核試験

（CTD: 4.2.3.3.2-1、[TTRSC02-GLP15-028]）

本試験ではラット骨髄の多染性赤血球（PCE）細胞の小核を検出することにより、ブトリシランの染色体異常誘発作用及び／又は紡錘体阻害作用を *in vivo* で評価した（試験番号[TTRSC02-GLP15-028]；[表 2.6.7-16]参照）。

DRF 試験では雌雄各 3 匹（投与開始時に約 8 週齢）にブトリシランを 2000 mg/kg の用量で投与した。雌雄いずれも毒性は認められなかったことから、DRF 試験の結果に基づき、本試験で選択した高用量は規制ガイドラインに基づく限界用量である 2000 mg/kg に設定した。ブトリシランを雌雄ラットに 2000 mg/kg の用量で、雄のみに 500 及び 1000 mg/kg の用量で投与した。

本試験では被験物質を注射用滅菌水で 200 mg/mL に調製し、その後、200 mg/mL の調製原液を 0.9%塩化ナトリウム注射液で希釈し、投与した。小核試験では、ブトリシランを 10 mL/kg の容量で単回 SC 投与した。

陽性対照物質であるシクロホスファミドは、溶媒対照群と比較して小核を有する細胞を統計学的に有意に増加させ、本試験の妥当性が示された。

ブトリシランは検討したいずれの用量（500、1000 又は 2000 mg/kg）においても、雌雄ラットにおいて、小核を有する PCE を統計学的に有意に増加させなかった。

また、ブトリシランは 500、1000 又は 2000 mg/kg の用量で骨髄に対する細胞毒性を示さなかった（すなわち、%PCE を有意に減少させなかった）。

ブトリシランを単回 SC 投与したとき、ブトリシランは吸収され、Day 1 の最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）は 1.0～2.0 時間の範囲であった。C_{max} に到達した後、ブトリシランの濃度は低下し、Day 1 の見かけの消失半減期（$t_{1/2}$）は 2.6～6.0 時間の範囲であった。ブトリシランはすべての投与群で少なくとも投与 24 時間後まで定量可能であった。雄の 1/3 匹において、最高用量（2000 mg/kg）で投与 48 時間後に血漿中濃度が測定可能であった。

雄ラットにおけるブトリシランの C_{max} 及び AUC から評価した血漿中曝露量は 500～2000 mg/kg の用量で用量の増加に伴い増加した。雄ラットにおけるブトリシランの C_{max} 及び AUC の値の増加はおおむね用量に比例した。曝露量は 2000 mg/kg の用量で雌よりも雄でわずかに高かったが、その差は 2 倍未満であった。

結論として、ブトリシランを 2000 mg/kg 以下の用量で単回 SC 投与したとき、ラット骨髄において小核形成は認められなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

Sprague Dawley ラットを用いた 2 年間投与がん原性試験を実施した。CD-1 マウスを用いた 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。本アプローチは ICH M3（R2）「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（2009 年 6 月 11 日付のステップ 4）に記載されている「がん原性試験が推奨される場合であっても、重篤な疾患の治療のために開発された医薬品については、成人患者／小児患者用を問わず、製造販売承認後にがん原性試験の結論を出すことができる」と一致している。

Tg-rasH2 マウスを用いた 6 ヵ月間反復投与試験実施の可能性を検討するための用量選択に関する情報を得るために、CByB6F1-Tg（HRAS）2Jic: 野生型（以下、Tg-rasH2 WT）マウス及び C57BL/6Ntac（以下、C57BL/6）マウスを用いた 12 週間投与 DRF 試験を実施した（試験番号 [TTRSC02-DSM16-032]）。しかしながら、Tg-rasH2 WT マウスにおける最大耐量（MTD）が確立されなかったため、本試験は適切ではないと考えられた。その後、001178-W（野生型）RasH2（以下、Tg-rasH2 WT）マウスを用いて、より高用量（0、500、1000 又は 1500 mg/kg；試験番号 [TTRSC02-DSM18-031]）での 8 週間投与 DRF 試験を実施した。Tg-rasH2 WT マウスにおいて、有害ではないと考えられたが、絶対及び相対肝重量の増加、肝細胞空胞化及び肝細胞肥大／腫大が治療用量を超える用量で認められ、肝クリアランスの許容を超える肝臓中曝露に関連していると考えられた。申請者はこのような何倍もの高曝露量で Tg-rasH2 マウスを用いた 6 ヵ月間投与がん原性試験を実施することにより、推奨用量であるブトリシランを 25 mg の用量で q3M 投与した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ると結論付けた。その後、CD-1 マウスを用

いた 2 年間投与試験の用量選択の情報を得るため、CD-1 マウスを用いた 13 週間投与 DRF 試験（試験番号[TTRSC02-DSM19-009]）を実施した。

DRF 試験及び長期投与がん原性試験の一覧を GLP 適合状況及び概要表のデータの所在箇所と共に表 2.6.6.5-1 に示す。

表 2.6.6.5-1 ブトリシランのがん原性試験一覧

Species and Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Status	Study Number (Tabulated Summary) CTD Location
Mouse/CD-1	SC	2 years	M: 0, 2, 6, 13 (qM) F : 0, 3, 9, 18 (qM)	GLP	NCS-21-00440[a]
Rat/Sprague Dawley	SC	2 years	M: 0, 4.0, 7.5, 15 (qM); 15 (q3M) F: 0, 6.0, 12.5, 25 (qM); 25 (q3M)	GLP	TTRSC02-GLP18-003 (表 2.6.7-20) CTD: 4.2.3.4.1-1
Mouse/Tg-rasH2 WT	SC	8 weeks	0, 500, 1000, 1500 (qM)	Non-GLP	TTRSC02-DSM18-031 (表 2.6.7-17) CTD: 4.2.3.4.2-1
Mouse/C57BL/6 Mouse/Tg-rasH2 WT	SC	12 weeks	0, 30, 100, 300 (qM)	Non-GLP	TTRSC02-DSM16-032 (表 2.6.7-18) CTD: 4.2.3.4.2-2
Mouse/CD-1	SC	13 weeks	0, 10, 25, 50 (qM)	Non-GLP	TTRSC02-DSM19-009 (表 2.6.7-19) CTD: 4.2.3.4.2-3

略号：Admin.＝投与；CTD＝コモン・テクニカル・ドキュメント；F＝雌；GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；M＝雄；q3M＝3 ヵ月に 1 回；qM＝月 1 回；SC＝皮下

a CD-1 マウスにおける 2 年間投与がん原性試験を 2021 年初旬に開始し、進行中である。

2.6.6.5.1 長期がん原性試験

2.6.6.5.1.1 Sprague Dawley ラットにおける SC 投与による 2 年間投与がん原性及びトキシコキネティクス試験

（CTD: 4.2.3.4.1-1、[TTRSC02-GLP18-003]）

本試験は Sprague Dawley ラットにブトリシランを qM 又は q3M の投与レジメンで 105 週間以上（それぞれ計 27 又は 9 回）SC 投与したとき、がん原性を示す可能性を評価し、TK を測定する目的で実施した（試験番号[TTRSC02-GLP18-003]；[表 2.6.7-20]参照）。

雌雄ラット（投与開始時 6～7 週齢）を 5 群に割り付けた（がん原性試験用ラットの第 1～5 群は雌雄各 60 匹/群、TK 試験用ラットの第 1 群は雌雄各 4 匹、第 2～5 群は雌雄各 10 匹/群とした）。また、無処置対照群のラットの第 6 群は雌雄各 10 匹とし、これらのラットには投与を行わず、健康状態をモニターするためだけに用いた。第 1 群のラットには溶媒対照物質（0.9%塩化ナトリウム注射液、USP〔滅菌生理食塩液〕）を投与した。第 2～4 群のラットにはブトリシランを 4.0、7.5 若しくは 15 mg/kg（雄）又は 6.0、12.5 若しくは 25 mg/kg（雌）の用量で qM の投与レジメンで投与した。第 5 群のラットにはブトリシランを 15 mg/kg（雄）又は 25 mg/kg（雌）の用量で q3M の投与レジメンで投与した。ラットに 2 mL/kg の容量で背部に SC 投与した。

がん原性試験において、動物の生死、一般状態、体重及び摂餌量の評価並びに臨床病理学的（血液学的検査のみ）及び病理組織学的評価を行った。TK の評価のために血液サンプルを採取した。

ブトリシランに関連した死亡又は生存への影響は認められなかった。対照群を含む生存動物数に基づき、全群において Week 86（雌へ 25 mg/kg の用量で qM 投与）、Week 87（雌へ 0、6.0 若しくは 12.5 mg/kg の用量で qM 投与又は 25 mg/kg の用量で q3M 投与）又は Week 99（生存しているすべての雄）の期間に試験を終了した。ブトリシランががん原性を示す可能性を適切に評価できるだけの十分な動物数が生存した。

ブトリシランに関連した一般状態、組織塊若しくは肉眼的観察における影響又は体重、体重増加量若しくは摂餌量の変化は認められなかった。ブトリシランが白血病を誘発するエビデンスは認められず、血液学的検査の結果にブトリシランに関連した影響は認められなかった。

ブトリシランに関連した腫瘍性又は増殖性の所見は認められなかった。

雄に 15 mg/kg の用量で qM 若しくは q3M 投与又は雌に 25 mg/kg の用量で qM 投与したとき、肝臓のクッパー細胞において色素沈着の増加が認められたが、15 mg/kg 以上の用量で投与したラットの肝臓ではブトリシランに関連した腫瘍性の病理組織学的変化は認められなかった。

ブトリシランを qM 投与したラットにおいて、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$により評価したとき、雄では 4.0 から 15 mg/kg へ、雌では 6.0 から 25 mg/kg へ用量を増加させたときに曝露量は増加した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の値はおおむね用量比例性を示した。雄及び雌ラットにブトリシランをそれぞれ 15 及び 25 mg/kg の用量で qM 投与したとき、q3M 投与したラットと比較して曝露量は類似していた。反復投与したときの C_{max} の値は類似しているか又はわずかに低かった。$AUC_{0\text{-}t(last)}$の値は Day 1 と比較して Day 169 ではより遅い時点で濃度が測定可能であるため、反復投与したときにより高かった。

結論として、雄ラットに 4.0、7.5 若しくは 15 mg/kg の用量で qM 又は 15 mg/kg の用量で q3M の投与レジメンで SC 投与したとき、又は雌ラットに 6.0、12.5 若しくは 25 mg/kg の用量で qM 又は 25 mg/kg の用量で q3M の投与レジメンで SC 投与したとき、ブトリシランに関連した腫瘍性又は増殖性の所見は認められなかった。ブトリシランががん原性を示す可能性を適切に評価できるだけの十分な動物数が生存した。ブトリシランが白血病を誘発するエビデンスは認められず、血液学的検査の結果にブトリシランに関連した影響は認められなかった。いずれの用量においてもがん原性を

示す可能性は認められなかった。15 mg/kg 以上の用量で投与したラットの肝臓のクッパー細胞において、ブトリシランに関連した非腫瘍性の色素沈着の増加が病理組織学的変化として認められた。高用量である雄に 15 mg/kg の用量で qM 投与及び雌に 25 mg/kg の用量で qM 投与したとき、Day 169 での C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の値は雄ではそれぞれ 1.77 µg/mL 及び 17.4 µg·h/mL であり、雌ではそれぞれ 2.21 µg/mL 及び 15.8 µg·h/mL であった。

2.6.6.5.2 短期又は中期がん原性試験

2.6.6.5.2.1 Tg-rasH2 WT マウスにおける SC 投与による 8 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験

（CTD: 4.2.3.4.2-1、[TTRSC02-DSM18-031]）

非 GLP の本 DRF 試験（試験番号[TTRSC02-DSM18-031]；[表 2.6.7-17]参照）は、MTD を特定できなかった Tg-rasH2 WT マウス及び C57BL/6 マウスを用いた 12 週間投与 DRF 試験（試験番号[TTRSC02-DSM16-032]）で以前に評価した用量よりも高用量の範囲で、Tg-rasH2 WT マウスに qM の投与レジメンで少なくとも 57 日間（計 3 回）SC 投与したときのブトリシランの毒性を評価し、TK を測定する目的で実施した（2.6.6.5.2.2 項参照）。

雌雄の Tg-rasH2 WT マウス（投与開始時 8～9 週齢）を 4 群に割り付けた。第 1 群には溶媒対照物質（0.9%塩化ナトリウム注射液、USP、滅菌生理食塩液）を投与した。第 2～4 群にはブトリシランをそれぞれ 500、1000 又は 1500 mg/kg の用量で投与した。マウスに 10 mL/kg の容量で 4 週間に 1 回計 3 回（Day 1、29 及び 57）背部に SC 投与した。毒性試験用マウスは雌雄各 10 匹/群とした。TK 試験用マウスの対照群は雌雄各 6 匹、第 2～4 群は雌雄各 18 匹/群とした。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、体重、摂餌量、臨床及び病理組織学的所見に基づいて行った。TK の評価のために血液及び組織サンプルを採取した。

死亡は認められず、ブトリシランに関連した一般状態、体重及び摂餌量への影響も認められなかった。

500 mg/kg 以上の用量で投与したマウスでは、ブトリシランに関連した有害ではない血液化学的所見が認められた。これらの所見は投与群内の個体によって異なり、一貫した用量相関性を示さなかった。ALT 活性は 500 mg/kg 以上の用量で投与した雄（68～122%；用量相関性なし）及び 1000 mg/kg の用量で投与した雌（114%）で軽微～軽度に高く、ALP 活性は 1500 mg/kg の用量で投与した雄でわずかに（33%）高かった。これらの血清酵素量の変化は、病理組織学的に肝細胞の空胞化及び肥大／腫大と関連している可能性がある。500 mg/kg 以上の用量で投与したマウスでは、用量との関連性は認められず、グロブリン（8～25%）及びコレステロール（37～54%）濃度がわずかに低く、アルブミン：グロブリン比がわずかに高かった（3～30%）。ブトリシランに関連した血液学的検査値の異常は認められなかった。

ブトリシランに関連した肝臓／胆嚢及び副腎重量への影響が認められた。500 mg/kg 以上の用量で投与した雌雄マウスにおいて、ブトリシランに関連した用量非依存性の絶対及び相対（体重又は脳重量に対する）肝臓／胆嚢重量パラメータの増加（対照群の 10～28%）が認められた。肝臓／胆嚢重量の増加は、病理組織学的に雌雄で肝細胞空胞化と、雄では肝細胞肥大／腫大と関連が認めら

れた。500 mg/kg 以上の用量で投与した雄では、ブトリシランに関連した用量非依存性の副腎の絶対及び相対（体重又は脳重量に対する）重量の増加（対照群の 22～69%）が認められたが、副腎重量の増加は病理組織学的変化との関連性は認められなかった。

500 mg/kg 以上の用量で投与したマウスの肝臓、腋窩及び鼠径リンパ節並びに SC 投与部位において、また、1000 mg/kg 以上の用量で投与した雌マウスの副腎皮質において、ブトリシランに関連した有害ではない病理組織学的変化が認められた。ブトリシランに関連した大部分の所見は明確な用量相関性を示さなかった。肝臓ではブトリシランに関連した所見として、500 mg/kg 以上の用量で投与したマウスで肝細胞空胞化、500 mg/kg 以上の用量で投与した雄マウス及び 1000 mg/kg の用量で投与した雌マウスで肝細胞肥大／腫大が認められた。空胞化は小葉中間性から小葉中心性であり、微小空であった。これらの所見は変色の肉眼的観察所見及び／又は肝重量パラメータの増加と関連していた。腋窩及び／又は鼠径リンパ節並びに SC 投与部位では、ブトリシランを投与したすべての群でブトリシランに関連した空胞化マクロファージの浸潤が認められた。1000 mg/kg 以上の用量で投与した雌の副腎皮質では、被膜下細胞過形成の重篤度の用量依存的な増加がブトリシランに関連した所見と考えられたが、Tg-rasH2 マウスでは自然発生的に一般的に認められる所見であるため、意義は不明であった [2]。

全般的に雄マウスでは曝露量が高い傾向にもかかわらず、ブトリシランの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$ の性差は 2 倍未満であった。ブトリシランの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$ で評価した曝露量は 500 から 1000 mg/kg の用量で用量の増加に伴い増加したが、用量比を下回り、1000 mg/kg 超で飽和した。

ブトリシランを投与したすべてのマウスで肝臓中ブトリシラン濃度が測定可能であった。肝臓中の曝露量は用量比を下回ったことから、肝臓への取込みは 500 mg/kg を超えると飽和することが示唆された。算出した肝臓の TK パラメータに性差は認められなかった。

結論として、雌雄の Tg-rasH2 WT マウスにブトリシランを 500、1000 又は 1500 mg/kg の用量で qM×3 回 SC 投与したときの忍容性は良好であり、1500 mg/kg までの用量で用量制限毒性又は有害な影響は認められなかった。1500 mg/kg の用量で投与した雌雄を合わせた Day 57 でのブトリシランの血漿中 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$ の平均値はそれぞれ 207 µg/mL 及び 1060 µg·h/mL であった。

2.6.6.5.2.2 CByB6F1-Tg（HRAS）2Jic：野生型マウス及び C57BL/6NTac マウスにおける SC 投与による 12 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験

（CTD: 4.2.3.4.2-2、[TTRSC02-DSM16-032]）

初期に実施した非 GLP の本 DRF 試験は Tg-rasH2 WT 及び C57BL/6 マウスにブトリシランを qM の投与レジメンで少なくとも 12 週間（計 4 回）反復 SC 投与したときの毒性を評価し、TK の測定を行う目的で実施した（試験番号[TTRSC02-DSM16-032]；[表 2.6.7-18]参照）。また、C57BL/6 マウスは Tg-rasH2 WT マウスの系統のバックグラウンドの系統の 1 種であることから、本試験の副次的な目的として、Tg-rasH2 WT マウス及び C57BL/6 マウスの毒性プロファイルを比較した。

雌雄の Tg-rasH2 WT マウス及び C57BL/6 マウス（投与開始時 8～9 週齢）を 8 群に割り付けた。第 1～4 群は Tg-rasH2 WT マウス（毒性試験用の第 1～4 群は雌雄各 5 匹、TK 試験用の第 2 及び 4 群は雌雄各 15 匹）とした。第 5～8 群は C57BL/6 マウス（毒性試験用の第 5～8 群は雌雄各 10 匹、

TK 試験用の第 5 群は雌雄各 7 匹、TK 試験用の第 6～8 群は雌雄各 31 匹）とした。第 1 及び 5 群には溶媒対照物質（0.9%塩化ナトリウム注射液、USP〔滅菌生理食塩水〕）を投与した。第 2 及び 6 群、第 3 及び第 7 群、第 4 及び第 8 群には、ブトリシランをそれぞれ 30、100 又は 300 mg/kg 体重の用量で投与した。投与期間の Day 1、29、57 及び 85 にすべてのマウスに 5 mL/kg の一定の容量で背部に SC 投与（計 4 回）した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、体重、体重変化、摂餌量、臨床及び病理組織学的所見に基づいて行った。ブトリシラン濃度の測定のため、血液及び組織サンプルを採取した。血漿及び組織サンプルにおける十分な TK プロファイル（7 時点）を C57BL/6 マウスのすべての用量から得て、30 及び 300 mg/kg の用量で投与した Tg-rasH2 WT マウスではブリッジングのため、いくつかの時点を含めた。C57BL/6 マウスにおいて、Day 1（初回投与後）及び Day 85（最終投与後）に血漿及び組織中 TK パラメータを測定した。

ブトリシランに関連した死亡は認められず、一般状態、体重及び摂餌量への影響も認められなかった。

30 mg/kg 以上の用量で投与した C57BL/6 マウスにおいて、ブトリシランに関連した臨床病理学的パラメータへの影響は軽微であり、血液化学的検査の所見に限定されていた（血液化学的検査は C57BL/6 マウスのみで評価）。対照群と比較して総たん白質濃度の軽微～軽度の低値（6～10%）及びアルブミン：グロブリン比の高値（3～33%）が認められ、これらの変化はアルブミン（雌のみ 6%）及び／又はグロブリン（17～29%）濃度の低値、コレステロール（61～80%）及びトリグリセリド（雄のみ 34～43%）濃度の軽度の低値、並びに肝重量の増加及び病理組織学的変化として空胞化を伴う肝細胞肥大に関連していると考えられる ALT 活性の軽微な高値（2.5 倍以下）に起因していると考えられる。カルシウム濃度の用量非依存性の低値（4～5%）が認められ、雄では原因が特定できなかったが、雌ではアルブミン濃度の低値がカルシウム濃度の低値に関連していると考えられた。血液学的検査でブトリシランに関連した影響は認められなかった。

30 mg/kg 以上の用量で投与した両系統のマウスに軽微～中等度の肝細胞空胞化が認められ、30 mg/kg の用量で投与した雌 Tg-rasH2 WT マウスを除き、本所見は 30 mg/kg 以上の用量で投与した両系統のマウスの数匹で認められた肝臓の肉眼的黄褐色化と関連していた。30 mg/kg 以上の用量で投与した両系統のマウスで肝臓／胆嚢重量の増加が認められ、30 mg/kg 以上の用量で投与した C57BL/6 マウスでは軽微な ALT 活性の上昇が認められた。

100 mg/kg 以上の用量で投与した雄 Tg-rasH2 WT マウス、30 mg/kg 以上の用量で投与した雌 Tg-rasH2 WT マウス及び C57BL/6 マウスの SC 投与部位において、軽微～中等度の空胞化マクロファージの浸潤が認められた。30 mg/kg 以上の用量で投与した両系統の一部のマウスの SC 投与部位において、軽微～軽度の線維芽細胞の空胞化が認められ、重篤度は雄と比較して雌で高かった。

生理食塩液を投与した対照群のマウス（第 5 群）ではブトリシランは検出されなかった。全般的に、Day 1 又は 85 のすべての投与群において、血漿、肝臓又は腎臓中でのブトリシランの TK の値に明らかな性差は認められなかった。

Tg-rasH2 WT マウス及び C57BL/6 マウスのいずれにおいても、Day 1（初回 SC 投与後）及び Day 85（最終 SC 投与後）において、30～300 mg/kg の用量範囲でブトリシランの血漿中曝露量におおむ

ね用量比例性が認められた。Tg-rasH2 WT マウス又は C57BL/6 マウスのいずれにおいても、ブトリシランの qM 反復投与により血漿中において蓄積性は認められなかった。

Tg-rasH2 WT マウス及び C57BL/6 マウスのいずれにおいても、Day 1 及び 85 において、30～300 mg/kg の用量範囲でブトリシランの肝臓中曝露量は用量の増加を下回って増加するか又はおおむね用量比例性が認められた。Tg-rasH2 WT マウス又は C57BL/6 マウスのいずれにおいても、肝臓中において明らかな蓄積性は認められなかった。Tg-rasH2 WT マウス及び C57BL/6 マウスのいずれにおいても、Day 1 及び 85 において、30～300 mg/kg の用量範囲でブトリシランの腎臓中曝露量におおむね用量比例性が認められた。Tg-rasH2 WT マウスでは、腎臓中においてブトリシランの蓄積性は認められなかった。C57BL/6 マウスでは、腎臓に軽微なブトリシランの蓄積が認められた。

ブトリシランを 300 mg/kg の用量で投与した Tg-rasH2 WT マウスにおいて、Day 85 の投与 336 時間後に血漿中濃度の低値が認められた例を除き、ブトリシランを 30 及び 300 mg/kg の用量で投与したとき、投与前（Day 85 のみ）、Day 1 及び 85 の投与 0.5、24 及び 336 時間後に血漿中ブトリシラン濃度にマウスの系統差は認められなかった。

Tg-rasH2 WT マウスにブトリシランを 300 mg/kg の用量で投与したとき、Day 1 の投与 336 時間後に、また、30 及び 300 mg/kg の用量で投与したとき、Day 85 の投与前及び投与 336 時間後に肝臓中ブトリシラン濃度の低値が認められた例を除き、ブトリシランを 30 及び 300 mg/kg の用量で投与したとき、投与前（Day 85 のみ）、Day 1 及び 85 の投与 0.5、24 及び 336 時間後に、肝臓中ブトリシラン濃度にマウスの系統差は認められなかった。Tg-rasH2 WT マウスにブトリシランを 30 及び 300 mg/kg の用量で投与したとき、Day 85 の投与前及び投与 336 時間後に腎臓中ブトリシラン濃度の低値が認められた例を除き、ブトリシランを 30 及び 300 mg/kg の用量で投与したとき、投与前（Day 85 のみ）、Day 1 及び 85 の投与 0.5、24 及び 336 時間後に、腎臓中ブトリシラン濃度にマウスの系統差は認められなかった。

結論として、雌雄 Tg-rasH2 WT マウス又は C57BL/6 マウスにブトリシランを 30、100 又は 300 mg/kg の用量で qM×4 回 SC 投与したときの忍容性はいずれの用量においても良好であった。ブトリシランに関連した病理組織学的変化が肝臓（肝細胞空胞化）及び SC 投与部位（マクロファージ浸潤、線維芽細胞空胞化）において、両系統のマウスですべての用量で認められた。これらの結果から、両系統のマウスに qM 投与したとき、ブトリシランの MTD は 300 mg/kg（検討した最高用量）超であった。300 mg/kg の用量で qM 投与したマウスにおける Day 85 でのブトリシランの血漿中 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値は Tg-rasH2 WT マウス（雌雄を合わせて）でそれぞれ 109 µg/mL 及び 1330 µg·h/mL、C57BL/6 マウス（雌雄を合わせて）ではそれぞれ 133 µg/mL 及び 609 µg·h/mL であった。

2.6.6.5.2.3 CD-1 マウスにおける SC 投与による 13 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験

（CTD: 4.2.3.4.2-3、[TTRSC02-DSM19-009]）

非 GLP の本 DRF 試験は CD-1 マウスにブトリシランを qM の投与レジメンで 13 週間投与したときの毒性を評価し、TK を測定する目的で実施した（試験番号[TTRSC02-DSM19-009]；[表 2.6.7-19]参照）。また、CD-1 マウスを用いた 2 年間投与がん原性試験の用量を決定する目的で実施した。

雌雄 Crl:CD1（ICR）マウス（投与開始時 6～7 週齢）を 4 群に割り付けた。マウスを第 1（対照群）、2、3 又は 4 群に割り付け、ブトリシランをそれぞれ 0、10、25 又は 50 mg/kg の用量で投与した。毒性試験では各群雌雄各 10 匹を用いた。TK 試験では第 1 群（対照群）では雌雄各 6 匹、第 2～4 群では雌雄各 39 匹のマウスを用いた。マウスにブトリシランを qM の投与レジメンで 13 週間計 4 回（投与期間中の Day 1、29、57 及び 85）、2 mL/kg の一定の容量で背部に SC 投与した。溶媒対照物質は 0.9%塩化ナトリウム注射液（USP、滅菌生理食塩液）とした。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、体重、摂餌量、皮膚の状態（Draize スコアリングシステム変法で評価）、臨床及び病理組織学的所見に基づいて行った。TK の評価のために血液サンプルを採取した。

雌雄マウスのいずれにおいても、血漿中曝露量は用量の増加に伴い増加した。マウスにおける TK パラメータの性差は 2 倍未満であり、雌では低値の傾向が認められた。Day 1 での雌雄マウスにおけるブトリシランの C_{max} は 10～25 mg/kg の間でおおむね用量に比例して増加し、25～50 mg/kg の間で用量比を上回って増加した。同様に、雌雄共に qM 投与したとき、Day 1 での $AUC_{0\text{-}t(last)}$は 10～50 mg/kg の間で用量比を上回って増加した。Day 85 での TK パラメータについても同様の傾向が認められた。25 及び 50 mg/kg の用量で投与した雌雄マウスの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$に反復投与による影響は認められなかった。最低用量（10 mg/kg）では、雌マウスの TK パラメータは Day 1 と比較して Day 85 でわずかに低かった。C_{max} の値に性差の明確な傾向は認められなかったが、$AUC_{0\text{-}t(last)}$ の値は雄よりも雌の方が低い傾向がみられた。

ブトリシランに関連した死亡は認められなかった。ブトリシランに関連した一般状態の所見、皮膚所見、体重、体重増加量又は摂餌量に変化は認められなかった。

ブトリシランに関連した軽微な血液化学的検査の所見として、25 mg/kg 以上の用量で投与した雄ではアルブミン濃度の低値（対照群から 8.1%）、10 mg/kg 以上の用量で投与した雌雄ではコレステロール濃度の軽度な低値（対照群から最大 61.4%）が認められたため、総たん白質濃度の軽微な低値（対照群から最大 11.5%）が認められた。病理組織学的変化との関連は認められなかった。血液学的検査において、ブトリシランに関連した影響は認められなかった。

ブトリシランに関連した病理組織学的変化が 10 mg/kg 以上の用量で投与したマウスの肝臓（雌で肝細胞グリコーゲンの増加、一部のマウスでは肉眼的肝臓の変色と関連する肝細胞の空胞化及び肝細胞の変性／壊死）及び SC 投与部位（空胞化マクロファージ）で認められた。ブトリシランに関連した死亡は認められず、これらの所見は重篤度が軽微であり、マウスの健康状態に影響は認められなかったことから、有害ではないと判断した。

結論として、雌雄 CD-1 マウスにブトリシランを 10、25 又は 50 mg/kg の用量で qM×4 回 SC 投与したときの忍容性は良好であり、50 mg/kg までの用量で用量制限毒性又は有害な影響は認められなかった。50 mg/kg の用量で投与したときの Day 85 でのブトリシランの血漿中 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$ の平均値は雄でそれぞれ 25.1 µg/mL 及び 59.2 µg·h/mL であり、雌でそれぞれ 23.6 µg/mL 及び 45.5 µg·h/mL であった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

ブトリシランの生殖発生毒性試験を完全なバッテリーで実施した。試験一覧を GLP 適合状況及び概要表のデータの所在箇所と共に表 2.6.6.6-1 に示す。

表 2.6.6.6-1 ブトリシランの生殖発生毒性試験一覧

Species and Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg)	GLP Status	Study Number (Tabulated Summary) CTD Location
Rat/Sprague Dawlay	SC	qw: Days 0, 7, 14 (premating) and qd: GD 6-17	0, 15, 50, 150 (qw) 0, 3, 10, 30 (qd)	GLP	TTRSC02-GLP16-013 (表 2.6.7-21) CTD: 4.2.3.5.1-1
Rat/Sprague Dawlay	SC	12 days	0, 3, 10, 30, 100 (qd)	Non-GLP	TTRSC02-DSM18-011 (表 2.6.7-22) CTD: 4.2.3.5.2-2
Rat/Sprague Dawlay	SC	Males: qw: prior to and during pairing (7 doses) Females: qw: prior to and during pairing and on GD 6 (4 to 5 doses)	0, 15, 30, 70 (qw)	GLP	TTRSC02-GLP18-005 (表 2.6.7-24) CTD: 4.2.3.5.1-2
Rat/Sprague Dawlay	SC	GD 6-17	0, 3[b], 10[b], 30 (qd)	GLP	TTRSC02-GLP18-013 (表 2.6.7-25) CTD: 4.2.3.5.2-2
Rabbit/New Zealand White	SC	GD 7-19	0, 3, 10, 30 (qd)	GLP	TTRSC02-GLP16-012 (表 2.6.7-23) CTD: 4.2.3.5.2-3
Rabbit/New Zealand White	SC	GD 7-19	0, 3, 10, 30 (qd)	GLP	TTRSC02-GLP18-014 (表 2.6.7-26) CTD: 4.2.3.5.2-4
Rat/Sprague Dawley	SC	GD 7, 13, 19 and LD 6, 12, 18	0, 5, 10, 20 (qd)	GLP	TTRSC02-GLP19-007 (表 2.6.7-27) CTD: 4.2.3.5.3-1

略号：Admin.＝投与；CTD＝コモン・テクニカル・ドキュメント；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；qd＝1 日 1 回；qw＝週 1 回；SC＝皮下

a 下線の用量＝無毒性量（NOAEL）

b 母動物に対する NOAEL は 10 mg/kg、胎児に対する NOAEL は 3 mg/kg であった。

2.6.6.6.1 受胎能及び初期胚発生に関する試験

2.6.6.6.1.1 雌ラットにおける SC 投与による生殖発生毒性用量設定及びトキシコキネティクス試験

（CTD: 4.2.3.5.1-1、[TTRSC02-GLP16-013]）

GLP 適合の本試験は雌ラットにブトリシランを交配期間中は qw の投与レジメンで、妊娠中（妊娠 6～17 日）は qd の投与レジメンで SC 投与したときの交尾及び受胎能への影響並びに母動物及び胚・胎児に対する毒性を評価し、TK の測定を行う目的で実施した（試験番号[TTRSC02-GLP16-013]；[表 2.6.7-21]参照）。

本試験では雌ラットの交尾行動、着床、性周期、一般的な受胎能及び胚・胎児発生に対するブトリシランに関連した影響が生じる可能性を評価した。ブトリシランはげっ歯類では薬理活性を示さないため、TTR、ビタミン A 及び T4 量の低下が交尾行動、着床、雌の性周期、一般的な受胎能及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検討するため、マウス／ラットに薬理活性を示すサロゲート分子（AD-59206）を qw 投与した。

雌ラット（投与開始時 12 週齢）にブトリシランを 15、50 若しくは 150 mg/kg（それぞれ第 2、3 若しくは 4 群）の用量で、AD-59206 を 30 mg/kg（第 5 群）の用量で、又は溶媒対照物質（第 1 群）を qw×3 回 SC 投与し、無処置の交配用雄ラットと交配させた。毒性試験では雌 10 匹/群を用いた。交配後、雌に溶媒対照物質（第 1 群）又はブトリシランを 3、10 若しくは 30 mg/kg（第 2、3 又は 4 群）の用量で妊娠 6～17 日に qd の投与レジメンで SC 投与した。第 5 群の雌には、AD-59206（30 mg/kg）を妊娠 6、12、17 日に 3 回追加で SC 投与した。投与容量は 2 mL/kg とした。同様の投与レジメンで各被験物質又は溶媒対照物質を投与した後、雌の別の群をサテライトラットとして用い、TK 試験用の血液サンプルを採取した。試験に割り付けた TK 試験用のラットはすべて妊娠 18 日に屠殺し、母動物の肝臓、腎臓、胎盤、胎児の肝臓及び胎児の全身（肝臓を除く）を採取した。本毒性試験に割り付けたラットはすべて妊娠 21 日に屠殺した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、摂餌量、臨床病理検査及び生殖エンドポイントに基づいて行った。TK 及び薬力学的評価（血清 TTR 濃度測定）のために血液サンプルを採取した。

C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$で評価したとき、母動物におけるブトリシランの血漿中曝露量は 3～30 mg/kg の用量で用量の増加に伴い増加した。用量を 3.3 倍（3 から 10 mg/kg）に増加させると、妊娠 6 日での C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$はそれぞれ 3.0 倍及び 2.8 倍に増加した。用量を更に 3.0 倍（10 から 30 mg/kg）に増加させると、C_{max} は 9.0 倍、$AUC_{0\text{-}t(last)}$は 20.1 倍に増加した。妊娠 17 日では、用量を 3.3 倍（3 から 10 mg/kg）に増加させると、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$はそれぞれ 2.5 倍及び 2.2 倍に増加し、更に 3.0 倍（10 から 30 mg/kg）に増加させると、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$はそれぞれ 11.6 倍及び 12.1 倍に増加した。妊娠ラットに AD-59206 を反復投与したとき、蓄積性は認められなかった。

妊娠 18 日において、ブトリシランを投与した母動物の肝臓及び腎臓サンプル中において、すべての用量でブトリシランが定量可能であった。低濃度のブトリシランが胎盤組織においても定量可能であった。母動物の肝臓、腎臓及び胎盤組織においてブトリシラン濃度は用量の増加に比例して増加した。ブトリシランを 3、10 及び 30 mg/kg の用量で投与したとき、ブトリシランの胎盤中濃度は母動物における肝臓中濃度のそれぞれ約 0.182、0.0413 及び 0.0149%であり、母動物における最高血

漿中濃度のそれぞれ 48.6、67.3 及び 30.8%であった。母動物の組織及び胎盤にブトリシランが検出されたにもかかわらず、胎児の肝臓及び残りのその他の体内においてブトリシランは LLOQ 未満であった。

AD-59206 を 30 mg/kg の用量で qw 投与したとき、AD-59206 は母動物の腎臓サンプル中では低濃度の定量可能なレベルであったが、母動物の肝臓、胎盤及び胎児組織では検出されなかった。

50/10 mg/kg の用量で投与した母動物 1 匹（第 3 群；動物番号 B36427）が妊娠 20 日に流産したため屠殺した以外は投与した雌の全例が予定された剖検時まで生存した。交配前の期間中、一般状態はすべての投与群でおおむね異常は認められず、観察された薄毛／脱毛は正常な背景データの範囲内であった。50/10 mg/kg 以上の用量で投与したとき、交配前及び／又は妊娠期に床敷の黄変が認められるケースがあった。150/30 mg/kg の用量で投与したとき、妊娠期にときに活動性低下が認められたが、偶発的と考えられた。妊娠期の一般状態観察所見は交配前の期間でみられた所見とほぼ一致していた。

全般的に各群の平均体重は交配前の期間中、すべての群を通じて同程度であった。150/30 mg/kg の用量で投与した群では、交配前の Day 7～11 及び Day 7～14 に断続的な体重減少が認められ、この期間の平均体重増加量は対照群と比較して有意に少なかった。交配前の全期間を通して、150/30 mg/kg の用量で投与した群は他のすべての群とは異なり、平均体重の増加を示さなかった。この所見はブトリシランと関連しており、有害所見と考えられた。150/30 mg/kg の用量で妊娠中に投与したラットの体重指標に軽度の影響が認められた。交配前の期間中に体重増加量に認められた影響のため、ラットの体重は妊娠初期の方が軽かったが、150/30 mg/kg の用量で投与した群では、対照群と比較して、体重増加のパターンに一貫性が認められなかった。妊娠 12～14 日においてのみ、平均体重増加量は対照群よりも有意に少なかったが、全般的に本群は体重増加量の低値の傾向がみられ、妊娠 21 日での群平均体重は対照群の 418 g と比較して、本群では 373 g と有意に低値であった（10.8%の減少）。平均体重増加量は qd の投与期間（妊娠 6～18 日）を通して、いずれの群においても有意な影響は認められなかったが、50/10 又は 150/30 mg/kg の用量で投与した群では、平均体重増加量は妊娠 6～21 日及び妊娠 0～21 日の間隔で有意に減少し、本所見は妊娠の経過に伴うわずかな影響の蓄積を示唆している。50/10 及び 150/30 mg/kg の用量で投与したときに認められた妊娠中の体重増加量の減少の程度は十分に高く（対照群の 18～26%減少）、ブトリシランに関連した影響であり、有害所見と考えられる。

交配前の期間中、摂餌量は投与による影響を受けなかった。150/30 mg/kg の用量で投与した群において摂餌量は妊娠 12～14 日の間隔の始めの時点で有意に減少し、この影響は残りの試験期間を通して持続した。また、摂餌量は 50/10 mg/kg の用量で投与したラットでのみ、妊娠 18～21 日の間隔で有意に減少した。これらの影響はブトリシランに関連した影響であると考えられたが、群間で若干のばらつきがみられた。

50/10 及び／又は 150/30 mg/kg の用量で投与したとき、ブトリシランに関連した血液学的影響（妊娠 18 日及び／又は妊娠 21 日での対照群からの変化率として示す）は、赤血球減少の増大及び炎症反応と一致していた。赤血球減少の増大と一致する影響として、赤血球パラメータの軽度な低値（赤血球数〔150/30 mg/kg 群で 17～22%〕、ヘモグロビン濃度〔150/30 mg/kg 群で 20～22%〕及び／又はヘマトクリット値〔150/30 mg/kg 群で 18～19%〕）に伴って、平均赤血球ヘモグロビン量

（50/10 及び 150/30 mg/kg 群でそれぞれ 5～6%及び 4%〔妊娠 18 日においてのみ〕）及び平均赤血球ヘモグロビン濃度（50/10 mg/kg 群で 2～3%及び 150/30 mg/kg 群で 3～4%）の軽微な低値並びに網赤血球絶対数（50/10 及び 150/30 mg/kg 群でそれぞれ 23%〔妊娠 18 日においてのみ〕及び 45～193%）及び網赤血球比率（50/10 及び 150/30 mg/kg 群でそれぞれ 22%〔妊娠 18 日においてのみ〕及び 76～193%）の軽度～中等度の高値が再生反応のエビデンスとしてみられた。白血球数（50/10 mg/kg 群で 53～126%及び 150/30 mg/kg 群で 189～286%）、絶対好中球数（50/10 mg/kg 群で 133～143%及び 150/30 mg/kg 群で 286～302%）、絶対単球数（50/10 mg/kg 群で 114～450%及び 150/30 mg/kg 群で 345～550%）の軽度～中等度の高値がみられ、絶対リンパ球数（50/10 mg/kg 群で 103%〔妊娠 21 日においてのみ〕及び 150/30 mg/kg で 121～258%）の中等度の高値、絶対好酸球数（50/10 mg/kg 群で 86%〔妊娠 21 日においてのみ〕及び 150/30 mg/kg 群で 25%～300%）の軽度の高値、絶対好塩基球数（150/30 mg/kg 群で 100%以上）及び大型非染色細胞数（50/10 mg/kg 群で 200%〔妊娠 21 日においてのみ〕及び 150/30 mg/kg 群で 233～450%）の軽微な高値がみられ、これらの所見は炎症反応と一致していた。

ブトリシランを 50/10 又は 150/30 mg/kg の用量で投与したとき、血液化学的検査及び血液凝固検査において、肝細胞機能の異常、肝細胞傷害並びに肝胆道系の病変及び炎症を示唆する有意な影響が認められた。肝機能の異常を示唆する影響として（対照群からの変化率）、総たん白量（50/10 mg/kg 群で 19～33%、150/30 mg/kg 群で 41～42%）、アルブミン量（50/30 mg/kg 群で 16～26%、150/30 mg/kg 群で 37～38%）及びグロブリン量（50/10 mg/kg 群で 24～38%、150/30 mg/kg 群で 48～52%）の軽度～中等度の低値、アルブミン：グロブリン比（50/10 mg/kg 群で 5～25%、150/30 mg/kg 群で 29～31%）の軽度の高値、フィブリノーゲン濃度（50/10 mg/kg 群で 44～71%、150/30 mg/kg で 60～79%）の軽度～顕著な低値、プロトロンビン時間（50/10 mg/kg 群で 8～68%、150/30 mg/kg で 28～50%）の軽微な延長、コレステロール濃度（50/10 mg/kg 群で 23～43%、150/30 mg/kg 群で 13～43%）の軽微な低値が認められた。AST 活性（50/10 mg/kg 群で 491～654%、150/30 mg/kg で 233～331%）の中等度の高値、ALT（50/10 mg/kg 群で 220～286%、150/30 mg/kg 群で 85～114%）及び ALP 活性（妊娠 21 日においてのみ 50/10 mg/kg 群で 37%、150/30 mg/kg 群で 67%）の軽度の高値及び総ビリルビン濃度（50/10 mg/kg 群で 600～1700%、150/30 mg/kg 群で 3600～5300%）の軽度～中等度の高値が肝細胞障害、肝胆道系病変及び／又は胆汁うっ滞を示唆する所見として認められた。カルシウム濃度（50/10 mg/kg 群で 5～7%、150/30 mg/kg 群で 7～12%）の軽度の低値はアルブミン濃度の低値による二次的な変化と考えられた。また、カリウム濃度（150/30 mg/kg 群で 6～20%）の軽度の高値、クレアチニン濃度（150/30 mg/kg 群で LLOQ 未満の値）の軽度の低値、トリグリセリド濃度（50/10 mg/kg 群で 85～88%、150/30 mg/kg 群で 79～88%）の中等度～顕著な低値も認められたが、機序は特定されなかった。

ブトリシランを 15、50 若しくは 150 mg/kg の用量で qw×3 回又は 3、10 若しくは 30 mg/kg の用量で妊娠 6～17 日に qd 投与したとき、交配前の Day 14 又は妊娠 21 日において、血清中 TTR 濃度の低下が認められず、ブトリシランはラットにおいて薬理活性を示さないことが確認された。AD-59206（ラットで薬理活性を示すサロゲート分子）を 30 mg/kg の用量で投与したとき、交配前の Day 14 及び妊娠 21 日において、血清中 TTR たん白質濃度は投与前の正常な濃度と比較して 95%超低下した。全般的にこれらのデータから、雌ラットにおいて AD-59206 は 30 mg/kg の用量で反復

SC 投与したときに各時点で薬理活性を示し、顕著な血清中 TTR たん白質濃度の低下作用を維持することが確認された。

ブトリシランのすべての用量で用量依存的ではないものの、交配前の Day 14 においてビタミン A 濃度の軽度の増加（対照群から 26～96%）がみられた。ブトリシランの投与は T4 の検査結果には影響を及ぼさなかった。想定したとおり、妊娠ラットでは妊娠 21 日において、対照群及びすべてのブトリシラン投与群で血清中 T4 濃度の低下が認められた（交配前の Day 0 の濃度から最大 69%）。AD-59206 に関連した影響として、T4 濃度（交配前の Day 14 の対照群から 67%及び妊娠 21 日では LLOQ 未満）の軽度～中等度の低値及びビタミン A 濃度（交配前の Day 14 及び妊娠 21 日の対照群からそれぞれ 82.7 及び 71.9%）の中等度の低値に限定された。これらの所見は AD-59206 により想定される薬理学的な TTR 低下作用と関連していた。

性周期パラメータはすべての群で同等であり、投与による影響は認められなかった。生殖パラメータはすべての群でほぼ同等であった。ブトリシランを 0/0、10/3 及び 30/10 mg/kg の用量で投与したすべての雌ラットが妊娠した。ブトリシランを 150/50 mg/kg の用量で投与した雌 9/10 匹が妊娠し、AD-59206 を 30 mg/kg の用量で投与した雌 8/10 匹が妊娠した。ブトリシランを 150/30 mg/kg の用量で投与した妊娠中の雌 1 匹（動物番号 B36445）ですべての同腹児が死亡したため、適切にデータを除外した。交尾、繁殖能及び受胎能の指標にブトリシラン又は AD-59206 に関連した影響は認められなかった。

剖検では、50/10 mg/kg 及び 150/30 mg/kg の用量で投与したそれぞれ 6/10 匹及び 8/10 匹の雌で肝臓の変色が認められた。前述した臨床病理学的変化から明らかなように、肝細胞機能の変化及び／又は肝細胞の傷害が示唆されることから、本所見はブトリシランの投与に関連した変化であると考えられた。150/30 mg/kg の用量で投与した生存胎児が認められない雌を除外した場合でも、150/30 mg/kg 群全体でブトリシランに関連した着床後胚損失（絶対値及び相対値）及び早期吸収胚の増加が認められた。本所見は 150/30 mg/kg の用量で投与した群の各同腹の平均生存胎児数の減少と関連していた。また、50/10 mg/kg 又は 150/30 mg/kg の用量で投与した群で妊娠子宮重量が減少したが、本所見はこれらの用量で認められた胎児重量の減少と一致していた。

胎児の外表の形態異常又は変異は認められなかった。胎児の内臓の評価に特記すべき所見はなく、一般的な背景データの範囲内の変動のみであり、これらの所見は用量反応性のエビデンスが認められないか、対照群でも認められたものであった。

結論として、ブトリシランを 50/10 mg/kg 又は 150/30 mg/kg の用量で投与した群において、母動物及び胎児に対する毒性のエビデンスが示された。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顕著に曝露されたにもかかわらず、胎児中のブトリシラン濃度は LLOQ（100 ng/g）未満であった。

サロゲート分子（AD-59206）は 30 mg/kg の用量で想定される薬理作用（TTR 濃度の低下及びビタミン A 濃度の低下並びに他の妊娠ラットで認められた低下よりもより顕著な T4 濃度の低下）を示した。これらの薬理作用にもかかわらず、AD-59206 の投与は受胎能、交尾、生殖の指標、胚・胎児発生に影響を及ぼさなかった。母動物が AD-59206 に全身曝露されたにもかかわらず、胎児への AD-59206 の曝露は検出されなかった。

2.6.6.6.1.2 ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する SC 投与試験及びトキシコキネティクス試験

（CTD: 4.2.3.5.1-2、[TTRSC02-GLP18-005]）

本試験は同居前から試験終了時（雄）又は妊娠初期（雌）までの期間の雌雄ラットにブトリシランを qw の投与レジメンで SC 投与したときの交尾及び受胎能に対する影響を評価し、TK を測定する目的で実施した（試験番号[TTRSC02-GLP18-005]；[表 2.6.7-24]参照）。本試験では生殖腺機能、交尾行動、着床、雌の性周期及び一般受胎能に対する潜在的影響の評価を行った。

成熟雌雄ラット（投与開始時約 10 週齢〔毒性試験用の雄〕、11 週齢〔TK 試験用の雄〕及び 12 週齢〔雌〕）にブトリシランを 0（0.9%塩化ナトリウム注射液）、15、30 又は 70 mg/kg の用量で SC 投与した。投与容量は 2 mL/kg とした。雄には交配前に 5 回（qw）、交配期間を通して qw 投与した。雄には屠殺前に計 7 回投与した。雌には交配前に 3 回（qw）、交配期間中に qw 及び妊娠 6 日に投与した。交尾が確認されなかった雌については、交配期間の後に投与を終了した。雌の全例に 4 回投与したが、例外として、同居 Day 7 以降に交尾が確認された雌には計 5 回投与した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、体重、摂餌量、肉眼的剖検、病理組織学的検査の結果に基づいて行った。交尾及び雌の妊娠の結果に基づいて、雌雄の生殖能を評価した。また、精子の分析は精子の運動性と濃度の評価によって行った。

ブトリシランに関連した死亡は認められなかった。

ブトリシランを 30 mg/kg の用量で投与した TK 試験用ラットの 1 匹（R0630；交配前の Day 9）に一般状態の不良のため、ブトリシランに関連しない死亡が認められ、予定していた試験終了前に屠殺した。このラットの一般状態観察では、前肢の被毛の薄毛化、腹部正中部の腫大、全身の蒼白化、活動性低下が認められた。剖検では脾臓の腫大が認められた。この所見は 1 匹のラットに限定されたため、ブトリシランに関連した変化ではないと判断した。その他のラットはいずれも予定した剖検時まで生存した。

試験終了時に各群において、ブトリシランに関連した平均体重及び体重増加量の減少が認められた。これらの統計学的に有意な体重増加量の減少は、30 mg/kg 以上の用量で投与した雄で試験期間を通して認められた。30 mg/kg 以上の用量で投与した雄では、対照群と比較して、試験終了時の群の平均体重が全体で 7.7%減少した。30 又は 70 mg/kg の用量で投与した雄では、試験終了時までに群の平均体重増加量が対照群と比較してそれぞれ 21 又は 19%減少した。各群の最終的な平均体重及び体重増加量の有意な減少が試験期間中及び試験終了時に認められたことから、これらの所見はブトリシランに関連した変化と考えられた。また、体重及び体重増加量の有意な減少は、70 mg/kg の用量で投与した雄でみられた断続的な摂餌量の減少と関連していた。

70 mg/kg 以上の用量で投与した雌では、交配前の Day 10～14 に統計学的に有意な体重増加量の減少が認められた。しかし、体重増加量の減少は 1 測定間隔においてのみ認められ、全試験期間で体重及び体重増加量が対照群の同時期と同程度であったことから、本所見はブトリシランに関連した変化ではないと判断した。

70 mg/kg の用量で投与した雄において、ブトリシランに関連した統計学的に有意ではあるものの有害ではない摂餌量の減少が認められた。この摂餌量の減少は交配前 Day 7～14 及び Day 14～21 に認められた。しかし、摂餌量の回復が交配前の Day 21 に始まり、残りの試験期間中は対照群の同時

期の量と同程度に回復した。最終的に、雄の摂餌量は試験終了時までに対照群の同時期の量と同程度に回復したことから、全体的に有害な影響は認められなかった。また、体重及び体重増加量の有意な減少は 70 mg/kg の用量で投与した雄でみられた断続的な摂餌量の減少と関連していた。

30 又は 70 mg/kg の用量で投与した雄において、ブトリシランに関連した器官重量の減少が認められた。30 mg/kg 以上の用量で投与したとき、前立腺の絶対及び相対重量（最終的な体重に対する）に有意な減少が認められた。30 mg/kg 以上の用量で投与したとき、対照群と比較して、前立腺の絶対重量は 20～23%減少し、前立腺の相対重量（最終的な体重に対する）は 13～17%減少した。30 mg/kg 以上の用量で投与したとき、ブトリシランに関連した軽微な前立腺分泌物の減少及び体重減少がみられたことから、前立腺重量の減少はブトリシランに関連した変化であると考えられた。これらの前立腺の変化は生殖能又は精子検査のパラメータに影響を及ぼさなかった。

15 mg/kg 以上の用量で投与した雄では、ブトリシランに関連した用量依存的な変色及び表面粗造を含む肝臓の肉眼的観察所見の増加が認められた。70 mg/kg の用量で投与した雌において、肝臓の変色の増加が認められた。これらの所見は用量反応性を示し、高用量で発現頻度が上昇したことから、ブトリシランに関連した変化であると考えられた。

一般状態、雌の体重及び体重増加量、雌の摂餌量、性周期又は受胎能、雌の器官重量、帝王切開パラメータ並びに精子の運動性又は精子濃度に対してブトリシランに関連した影響は認められなかった。

結論として、雌雄ラットにブトリシランを 15、30 又は 70 mg/kg の用量で qw の投与レジメンで SC 投与したとき、ブトリシランに関連した雌雄いずれかの生殖能又は初期胚発生に影響を及ぼさない有害ではない影響が認められた。これらのデータから、雌雄の生殖能及び初期胚発生に対するブトリシランの NOAEL は雌雄共に 70 mg/kg（検討した最高用量）であり、雄では交配期間の Day 14 での C_{max} が 19.6 µg/mL 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$が 135 µg·h/mL、雌では妊娠 6 日での C_{max} が 17.6 µg/mL 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$が 75.7 µg·h/mL であった。

2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1 雌ラットにおける 12 日間反復投与用量設定毒性試験

（CTD: 4.2.3.5.2-1、[TTRSC02-DSM18-011]）

雌ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する試験を組み合わせた初期の DRF 試験（試験番号[TTRSC02-GLP16-013]）において、ブトリシランを妊娠中に qd 投与することにより、母動物への毒性を誘発した（2.6.6.6.1.1 項参照）。追加で実施した本 DRF 試験は雌ラットにブトリシランを qd の投与レジメンで SC 投与（計 12 回）したときの潜在的な毒性学的影響を更に評価する目的で実施した（試験番号[TTRSC02-DSM18-011]；[表 2.6.7-22]参照）。本試験の結果は、GLP 適合のラットにおける胚・胎児発生に関する試験（試験番号[TTRSC02-GLP18-013]；2.6.6.6.2.2 項参照）での用量設定に用いた。

非妊娠雌ラット（投与時約 12 週齢）を 5 つの別々の用量群（5 匹/群）に無作為に割り付けた。第 1 群には滅菌 0.9%塩化ナトリウム注射液（対照物質）を投与した。第 2、3、4 及び 5 群にはブトリ

シランをそれぞれ 3、10、30 及び 100 mg/kg の用量で投与した。すべての動物に 5 mL/kg の容量で qd×12 日間連日 SC 投与した。投与開始日を Day 1 とした。

30 mg/kg 以上の用量で投与したときに、最小毒性量の設定基準を超えることが示唆される臨床病理学的変化がみられたため、第 1～3 群の動物の生死、連日の一般状態、体重、血清化学的検査、剖検時の肉眼的観察、器官重量（肝臓）及び肝臓の病理組織学的評価を本試験の一部として評価した。

すべてのラットが Day 13 の予定していた剖検時まで生存した。ブトリシランに関連した死亡又は一般状態に対する影響は認められなかった。

ブトリシランの投与により、体重及び体重増加量に有害な影響は認められなかった。試験期間全体（Day 1～試験終了時）を通じて、対照群及びブトリシラン投与群の最終的な体重及び体重増加量の差は 10%未満であった。

ブトリシランを 3 mg/kg の用量で投与したラットでは、対照群と比較して AST の軽微な高値（46%）が認められた。

ブトリシランを 10 mg/kg の用量で投与したラットでは、対照群と比較して ALT（687%）及び AST（476%）の中等度の高値並びにアルブミン（11%）の軽微な高値が認められた。

ブトリシランを 30 mg/kg の用量で投与したラットでは、ALP の軽微な高値（104%）、ALT（639%）及び AST（564%）の中等度の高値、総ビリルビンの顕著な高値（2211%）、トリグリセリド（45%）及びコレステロール（59%）の軽微な低値が認められた。また、対照群と比較してアルブミンの軽微な低値（11%）並びにグロブリン（35%）及び総たん白質（21%）の中等度の低値が認められ、アルブミン：グロブリン比の中等度の高値（35%）が認められた。

ブトリシランを 100 mg/kg の用量で投与したラットでは、ALP の軽微な高値（151%）、ALT（552%）及び AST（611%）の中等度の高値、総ビリルビンの顕著な高値（3027%）、カルシウムの軽微な低値（10%）並びに血中尿素窒素（26%）、クレアチニン（15%）、グルコース（23%）及びコレステロール（38%）の軽微な低値が認められた。また、対照群と比較して、アルブミンの軽度の低値（16.2%）並びに総たん白質（31%）及びグロブリン（49%）の顕著な低値が認められ、その結果として、アルブミン：グロブリン比の顕著な高値（68%）が認められた。

ブトリシランを 10（49 及び 46%）、30（32 及び 36%）及び 100 mg/kg（18 及び 27%）の用量で投与したとき、ブトリシランに関連した肝臓の絶対及び相対（体重に対する）重量の増加が認められた。この重量変化は病理組織学的変化の肝細胞空胞化と関連していた。

ブトリシランを 10 mg/kg 以上の用量で投与したラットのほとんどで肝臓の淡色化が認められ、中等度～顕著な肝細胞空胞化と関連していた。100 mg/kg 群の 2 匹では肝臓表面の異常が認められた。

ブトリシランを 3 及び 10 mg/kg の用量で投与したラットにおいて（これらの用量でのみ評価）、ブトリシランに関連した病理組織学的変化が肝臓で認められ、軽微～顕著な肝細胞空胞化、軽微な単細胞壊死及び軽微～軽度の混合細胞浸潤及び／又はクッパー細胞の肥大／過形成の発現頻度及び／又は程度の用量依存的な上昇が認められた。3 及び 10 mg/kg 群では、有糸分裂像の軽微な増加が低頻度で認められたが、用量依存的ではなかった。また、3 又は 10 mg/kg 群の少数のラット（クッパー細胞）でときに軽微な色素の蓄積が認められた。

結論として、非妊娠雌ラットにブトリシランを qd×12 日間連日反復 SC 投与したとき、用量依存的な肝毒性が認められた。10 mg/kg 群で認められた一連の肉眼的及び病理組織学的変化、器官重量変化及び／又は血清化学的変化は軽度の肝毒性と一致しており、30 mg/kg 以上の用量で投与した群で認められた所見は中等度の肝毒性と一致していた。

2.6.6.6.2.2 ラットにおける SC 投与による胚・胎児発生に関する試験及びトキシコキネティクス試験

（CTD: 4.2.3.5.2-2、[TTRSC02-GLP18-013]）

主要な本試験は器官形成期（妊娠 6～17 日）の妊娠ラットにブトリシランを qd の投与レジメンで SC 投与したときのブトリシランの母動物及び子宮内への毒性並びに胚・胎児発生に対する影響を評価する目的で実施した（試験番号[TTRSC02-GLP18-013]；[表 2.6.7-25]参照）。また、ブトリシランの TK の測定も行った。

交配した雌ラット（投与開始時 11～12 週齢）にブトリシランを 3、10 又は 30 mg/kg の用量で妊娠 6～17 日に qd の投与レジメンで SC 投与した。対照群には溶媒対照物質として 0.9%塩化ナトリウム注射液（USP）を投与した。毒性試験は雌 22 匹/群とし、対照群に 3 匹、ブトリシランの TK 試験群に 9 匹を追加で用いた。ラットに 2 mL/kg の容量で投与した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、体重、摂餌量、剖検及び帝王切開後の所見に基づいて行った。剖検時の肉眼的観察により影響がみられたラット及び対照群（参考のため）の肝臓、腎臓、膵臓及び胃について病理組織学的評価を行った。TK の評価のために血液サンプルを採取した。

C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$で評価したブトリシランの曝露量は 3～30 mg/kg の用量で用量の増加に伴い増加した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の増加は 3～10 mg/kg の用量ではおおむね用量比例性を示し、10～30 mg/kg の用量では用量比を上回って増加した。妊娠ラットにブトリシランを反復投与したとき、血漿中に蓄積性は認められなかった。

ブトリシランに関連した早期死亡例及び切迫屠殺例は認められなかった。

一般状態に対してブトリシランに関連した有害な影響は認められなかった。10 又は 30 mg/kg の用量で投与した群では、床敷の変色（黄色）が認められた。床敷の変色の理由は不明であった。しかし、本所見は 10 及び 30 mg/kg の用量で投与した群のみで認められたことから、ブトリシランに関連した変化ではあるが、有害所見ではないと判断した。

10 mg/kg 以上の用量で投与したとき、ブトリシランに関連した体重及び／又は体重増加量の減少が認められた。体重増加量の一過性の減少が初回投与後に認められたが、最も顕著な減少は投与期間の後半に認められ、実際の体重減少は妊娠 18～21 日に認められた。10 mg/kg の用量で投与したときの体重／体重増加量の減少の程度は比較的小さく、試験期間中の発現頻度は低かったことから、ブトリシランに関連した変化ではあるが、有害所見ではないと判断した。30 mg/kg の用量で投与したときの体重／体重増加量の減少は対照群より最大で 45%少なく（妊娠 6～21 日）、一貫して投与期間の後半に認められた。これらのことから、30 mg/kg の用量で投与したときの体重／体重増加量の減少はブトリシランに関連した変化であり、有害所見であると考えられた。10 mg/kg 以上の用量で投与したとき、ブトリシランに関連した摂餌量の減少が認められ、本所見はこれらの用量で

みられた体重への影響と関連していた。10 mg/kg の用量で投与したときの摂餌量の減少は投与期間の後（妊娠 18～21 日）のみに認められ、30 mg/kg の用量で投与したときには妊娠 12～21 日に認められた。

10 mg/kg 以上の用量で投与したときにブトリシランに関連した肉眼的観察所見が認められた。主な所見は膵臓のゼラチン状変化であり、30 mg/kg 群の 13/22 匹（59%）で認められた。これ以外の観察所見として、30 mg/kg 群で子宮内容物の異常、肝臓の変色（10 mg/kg 以上の群）、腎臓の変色（30 mg/kg）が認められた。これらの所見は主に高用量群で発現頻度が高いため、ブトリシランに関連した変化であると考えられた。3 及び 10 mg/kg の用量で投与したとき、肉眼的観察で胃の変色がそれぞれ 1/21 匹及び 2/22 匹に認められたが、高用量では認められなかったことから、ブトリシランに関連した所見ではないと判断した。

肝臓、膵臓、腎臓及び胃の肉眼的観察所見が認められたため、所見がみられたラット及び対照群（参考のため）の組織について病理組織学的評価を行った。ブトリシランに関連した病理組織学的変化は、10 mg/kg 以上の群で肝臓、膵臓及び腎臓で認められた。10 mg/kg の用量で投与したときの肝臓における病理組織学的変化として、中等度の肝細胞空胞化／変性、軽微～軽度の肝細胞肥大及び軽微～中等度の個々の肝細胞壊死が認められ、30 mg/kg の用量で投与したときの肝臓の病理組織学的変化として、中等度の限局性／多巣性肝細胞壊死、軽微～中等度の出血、肝細胞有糸分裂の軽微～軽度の増加、軽微な混合細胞浸潤及びクッパー細胞における軽微な好塩基性顆粒が認められた。肝臓におけるこれらの病理組織学的変化は、変色した肝臓の肉眼的所見と関連している可能性が高いと考えられる。ブトリシランに関連したその他の病理組織学的変化として、30 mg/kg の用量で投与したときに膵臓（軽度～中等度の間質浮腫、軽微又は軽度の脂肪細胞壊死及び脂肪組織における混合細胞浸潤）及び腎臓（尿細管細胞上皮における蓄積、硝子滴変性、軽微な空胞化及び軽微な好塩基性顆粒並びに尿細管腔における軽微な色素沈着）に認められた。膵臓の間質性浮腫は膵臓のゼラチン状変化の肉眼的所見とおおむね関連していた。

妊娠率にブトリシランによる影響は認められなかった。溶媒対照物質又はブトリシランを 3、10 又は 30 mg/kg の用量で投与したラットの妊娠率はそれぞれ 95、100、100 及び 100%であった。また、TK 試験用の全群ですべてのラットが妊娠した。

平均黄体数、着床数又は着床前胚損失率に対するブトリシランの影響は認められなかった。
30 mg/kg の用量で投与した 4/22 匹（18%）が帝王切開前にケージ内で早期分娩した。本所見はブトリシランに関連した有害な影響と考えられた。早期及び後期吸収胚数並びに死亡胎児数の増加、その結果として着床後胚損失の増加によって示されたように、胚・胎児生存率は 30 mg/kg 群で低下した。本所見は更に帝王切開時の生存胎児数減少という結果と関連していた。10 又は 30 mg/kg の用量で投与したとき、ブトリシランに関連した影響として、調整した平均胎児体重の用量依存的な減少が認められた（同時期の対照群をそれぞれ 10 又は 26%下回る）。本所見に関連して、30 mg/kg の用量で投与したとき、平均妊娠子宮重量の減少が認められた（対照群と比較して 35%）。
30 mg/kg 群ではこれらの影響は母動物への毒性／ストレスに起因する二次的な変化の可能性が考えられる。

いずれの用量においても、ブトリシランに関連した胎児の外表、内臓及び骨格の形態異常は認められなかった。30 mg/kg 群でブトリシランに関連したいくつかの骨格変異が認められた。変異の発

現頻度の増加は肋骨（結節状及び／又は波状）、頭頂骨（不完全骨化）及び胸骨分節（未骨化）で認められた。これら 4 種類の骨格変異の発現頻度の上昇はブトリシランに関連する変異と考えられたが、これらの変化がラットの成長又は発達に影響を及ぼすことは予測されないため、有害所見ではないと判断した。30 mg/kg の用量で投与したときに認められた骨格変異は、母動物に対する毒性／ストレスに起因する二次的な変化の可能性が高いと考えられる。

結論として、妊娠ラットにブトリシランを 30 mg/kg までの用量で妊娠 6～17 日に qd の投与レジメンで SC 投与したとき、ブトリシランに関連した影響として、10 mg/kg 以上の用量で胎児への毒性が、30 mg/kg の用量で母動物への毒性が認められた。なお、30 mg/kg 以下の用量ではブトリシランに関連した胎児の形態異常は認められなかった。30 mg/kg の用量で母動物の体重及び／又は体重増加量、摂餌量、病理組織学的変化並びに生殖能に対する有害な影響（早産及び着床後胚損失の増加）が認められたことから、母動物に対する NOAEL は 10 mg/kg（妊娠 17 日での C_{max} は 0.883 µg/mL、$AUC_{0\text{-}t(last)}$は 4.82 µg·h/mL）であった。10 mg/kg 以上の用量で有害な胎児体重の減少が認められたことから、胎児に対する NOAEL は 3 mg/kg であった（母動物への曝露量は妊娠 17 日での C_{max} は 0.264 µg/mL、$AUC_{0\text{-}t(last)}$は 1.27 µg·h/mL）。

2.6.6.6.2.3 雌ウサギにおける SC 投与による生殖発生毒性用量設定及びトキシコキネティクス試験

（CTD: 4.2.3.5.2-3、[TTRSC02-GLP16-012]）

GLP 適合の本試験は主要な生殖発生毒性試験での用量設定のために、妊娠ウサギにブトリシランを器官形成期（妊娠 7～19 日）に qd の投与レジメンで SC 投与したときの母動物及び子宮内への毒性を評価し、TK を測定する目的で実施した（試験番号[TTRSC02-GLP16-012]；[表 2.6.7-23]参照）。バイオインフォマティクス評価では、ブトリシランがウサギに薬理活性を示すことは予測されないが、本試験の一部としてウサギでの薬理活性を評価した。

交配した雌 New Zealand White ウサギ（投与開始時 8 ヵ月齢）にブトリシランを 3、10 又は 30 mg/kg の用量で妊娠 7～19 日に qd の投与レジメンで SC 投与した。対照群には溶媒対照物質として、0.9%塩化ナトリウム注射液（USP）を投与した。毒性試験に雌 8 匹/群、TK 試験に雌 3 匹/群を用いた。ウサギには 1 mL/kg の容量で投与した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、体重、摂餌量、剖検及び帝王切開後の所見に基づいて行った。TK の評価のために血液及び組織サンプルを採取した。

C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$で評価したときのブトリシランの曝露量は、妊娠 7 日において 3.41～30 mg/kg、妊娠 19 日において 3～30 mg/kg の用量で、用量の増加に伴い用量比を上回って増加した。妊娠 7 日では用量を 2.9 倍（3.41 から 10 mg/kg へ）に増加させると、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値はいずれも 5.5 倍に増加した。更に 3.0 倍（10 から 30 mg/kg へ）に増加させると、C_{max} 又は $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値はそれぞれ 5.1 又は 6.9 倍に増加した。妊娠 19 日では、用量を 3.0 倍（3 から 10 mg/kg へ）に増加させると、C_{max} 又は $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値はそれぞれ 3.6 又は 6.3 倍に増加した。更に 3.0 倍（10 から 30 mg/kg へ）に増加させると、C_{max} 又は $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値はそれぞれ 6.1 又は 6.5 倍に増加した。妊娠ウサギにブトリシランを反復投与したときに蓄積性は認められなかった。

ブトリシランはすべての用量で母動物の肝臓及び腎臓において定量可能であった。10 又は 30 mg/kg（3 mg/kg では LLOQ 未満）の用量で投与した雌の胎盤組織で低濃度のブトリシランが定量可能であった。肝臓を除いた胎児の全身及び胎児の肝臓でブトリシランの濃度は LLOQ 未満であり、ブトリシランが母動物へ曝露されたとき、ブトリシランは胎児へ移行しないことが示された。

ブトリシランを 3、10 又は 30 mg/kg の用量で妊娠 7～19 日に qd 投与したとき、予測したとおり、妊娠 20 日において、対照群と比較して肝臓中 TTR 転写物濃度の有意な低下は認められなかった。全般的に、これらのデータからブトリシランはウサギにおいて薬理活性を示さないことが確認された。

すべてのウサギが予定剖検時まで生存し、妊娠が確認され、生存胎児を有した。

対照群を含むすべての群で、一般状態に一貫して特記すべき所見は認められなかった。

血液学的検査、血液凝固検査又は血液化学的検査の結果にブトリシランに関連した影響は認められなかった。

平均体重はすべての用量群でほぼ同程度であった。対照群でも隔離期間に平均体重の減少が認められたが、その後は速やかに回復した。高用量（30 mg/kg）で投与したウサギの全投与期間の平均体重増加量は 101.1 g（対照群の 23%）であったのに対し、対照群では 131.0 g であった。体重増加のパターンは群間で一貫していなかったが、本所見はブトリシランに関連するものと考えられた。しかしながら、重篤度が低いため、有害ではないと判断した。

摂餌量はすべての群を通じてほぼ同程度であったが、30 mg/kg の用量で投与したウサギでは摂餌量がやや少ない傾向が認められた。この影響は軽微であり（投与間隔全体で 10%未満）、いずれの投与間隔でも統計学的有意差は認められなかったことから、有害所見ではないと判断した。

帝王切開パラメータはすべての群で同等であり、ブトリシランの投与による影響は認められなかった。内臓及び外表の形態異常は認められなかった。観察された変異は背景データの範囲内と考えられたため、ブトリシラン投与に関連する変化ではないと考えられた。

結論として、妊娠ウサギにブトリシランを最高用量（30 mg/kg）で妊娠 7～19 日に qd の投与レジメンで SC 投与したとき、体重指標及び摂餌量に軽度の有害ではない影響が認められたのみであった。30 mg/kg（検討した最高用量）以下の用量では、帝王切開パラメータ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、妊娠中の胎児へのブトリシランの曝露は認められなかった。

2.6.6.6.2.4 ウサギにおける SC 投与による胚・胎児発生に関する試験及びトキシコキネティクス試験

（CTD: 4.2.3.5.2-4、[TTRSC02-GLP18-014]）

主要な本試験は妊娠ウサギにブトリシランを器官形成期（妊娠 7～19 日）に qd の投与レジメンで SC 投与したときの母動物及び子宮内への毒性並びに胚・胎児発生に対する影響を評価する目的で実施した（試験番号[TTRSC02-GLP18-014]；[表 2.6.7-26]参照）。また、ブトリシランの TK を測定した。

交配した雌 New Zealand White ウサギ（投与開始時 5～7 ヵ月齢）にブトリシランを 3、10 又は 30 mg/kg の用量で妊娠 7～19 日に qd の投与レジメンで SC 投与した。対照群には溶媒対照物質として 0.9%塩化ナトリウム注射液（USP）を投与した。毒性試験では雌 22 匹/群、TK 試験では雌 3 匹/群を用いた。ウサギには 1 mL/kg の容量で投与した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、体重、摂餌量、剖検及び帝王切開後の所見に基づいて行った。TK の評価のために血液サンプルを採取した。

C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値から評価したブトリシランの曝露量は 3 から 30 mg/kg への用量の増加に伴い増加した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値は用量比を上回って増加した。3 mg/kg の用量で反復投与したとき、血漿中に蓄積性は認められなかった。10 及び 30 mg/kg の用量で反復投与したとき、妊娠 7 日と比較して妊娠 19 日では C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値が軽度に高くなったが、これらの差はおおむね 2 倍以下であった。

本試験では、ブトリシランに関連した早期死亡例及び切迫屠殺例は認められず、全例が予定剖検時まで生存した。

一般状態に対して、ブトリシランに関連した所見は認められなかった。

体重、体重増加量及び摂餌量に対して、ブトリシランに関連した影響は認められなかった。

ブトリシランを 0、3、10 又は 30 mg/kg の用量で投与したウサギの妊娠率はそれぞれ 95、100、100 及び 100%であった。また、すべての群の TK 試験用のすべてのウサギが妊娠した。

ブトリシランに関連した肉眼的観察所見は認められず、帝王切開パラメータへの影響も認められなかった。胎児の外表、内臓又は骨格の形態異常若しくは変異はいずれの用量においても認められなかった。

結論として、妊娠ウサギにブトリシランを 3、10 又は 30 mg/kg の用量で妊娠 7～19 日に qd の投与レジメンで SC 投与したとき、一般状態又は肉眼的観察所見、母動物の体重増加量又は摂餌量にブトリシランに関連した影響は認められなかった。胚・胎児の生存、胎児の重量、外表、内臓及び骨格形態に影響は認められなかった。母動物及び胎児に対する影響が認められなかったことから、母動物及び生殖発生に対する NOAEL は 30 mg/kg であった（妊娠 19 日での C_{max} は 12.9 µg/mL、$AUC_{0\text{-}t(last)}$は 67.4 µg·h/mL）。

2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

2.6.6.6.3.1 ラットにおける SC 投与による出生前及び出生後の発生に関する試験

（CTD: 4.2.3.5.3-1、[TTRSC02-GLP19-007]）

本試験は妊娠中及び授乳中の母ラットにブトリシランを着床から離乳まで SC 投与したときの影響を評価し、F_1 世代の成熟、生殖機能及び神経行動学的発達を評価する目的で実施した（試験番号[TTRSC02-GLP19-007]；[表 2.6.7-27]参照）。

交配した雌ラット（投与開始時 11～12 週齢）を 4 群に割り付け、妊娠 7、13、19 日、授乳 6、12、18 日の妊娠 7 日～授乳 18 日に計 6 回（毒性試験用のラット）又は妊娠 7、13、19 日及び授乳 6、12 日の妊娠 7 日～授乳 12 日の計 5 回（TK 試験用のラット）投与した。ラットに 2 mL/kg の容量で肩甲骨の部位に SC 投与した。溶媒対照物質として 0.9%塩化ナトリウム注射液（USP、滅菌生

理食塩液）を投与した。ブトリシランの用量は第 1、2、3 及び 4 群でそれぞれ 0、5、10 及び 20 mg/kg とした。毒性試験用ラットとして 24 匹/群を用いた。TK 試験用ラットとして、対照群（第 1 群）に 3 匹、第 2～4 群に 9 匹/群を用いた。

毒性試験用ラットの F_1 出生児について成熟期まで観察を継続し、成長、性的発達、自発運動、聴覚性驚愕反射、学習及び記憶並びに生殖能について評価した。

毒性の評価は動物の生死、一般状態、体重、摂餌量、生殖に関する指標、神経行動学的評価、剖検及び帝王切開後の所見に基づいて行った。F_0 母動物（TK 試験用ラット）から授乳 12 日に、F_1 出生児から生後 12 日に採血し、TK の評価を行った。

- F_0 世代

母動物ではブトリシランに関連した死亡又は一般状態の所見は認められなかった。

妊娠中及び授乳期間中の平均体重増加量、平均体重及び摂餌量にブトリシランに関連した影響は認められなかった。

自然分娩又は同腹児数にブトリシランに関連した影響は認められなかった。また、剖検時に肉眼的観察所見又は器官重量への影響は認められなかった。

C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$ で評価したとき、母動物における授乳 12 日でのブトリシランの曝露量は 5 から 20 mg/kg への用量の増加に伴って増加した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$ の増加は $AUC_{0\text{-}t(last)}$ を除くとおおむね用量比例性を示し、5～10 mg/kg では用量比を明らかに上回り、10～20 mg/kg ではおおむね用量比例性を示した。5 mg/kg 群ではブトリシラン濃度は投与 2 時間後を経過しても測定不能であった。

- F_1 世代

F_1 世代において、ブトリシランに関連した死亡又は一般状態の所見は認められなかった。

雌雄の成熟期又は妊娠中の平均体重増加量、平均体重又は摂餌量に対して、ブトリシランに関連した影響は認められなかった。

雌雄の性的発達指標又は性周期に対して、ブトリシランに関連した影響は認められなかった。

雌雄の神経行動学的評価に対して、ブトリシランに関連した影響は認められなかった。

生殖に関する指標、器官重量、肉眼的観察所見、帝王切開パラメータに対して、ブトリシランに関連した影響は認められなかった。

出生児の血漿中ブトリシラン濃度はいずれも LLOQ 未満であった。

結論として、交配した雌ラットにブトリシランを 5、10 又は 20 mg/kg の用量で妊娠 6～20 日に SC 投与（計 6 回）したとき、ブトリシランに関連した死亡、一般状態又は母動物の平均体重増加量、平均体重若しくは摂餌量への影響は認められず、忍容性は良好であった。これらのデータから、母動物に対する NOAEL は 20 mg/kg であり、授乳 12 日での母動物の曝露量は 2.59 µg/mL 及び 8.61 µg·h/mL（それぞれ C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$）であった。F_1 世代において、出生児の成長、神経行動学的機能又は生殖機能を含み出生から成熟までの期間を通して、ブトリシランに関連した毒性は認められなかった。これらのことから、出生児の生存及び成長に対する NOAEL も 20 mg/kg であった。F_1 世代の出生児の血漿中のブトリシラン濃度（生後 12 日）はいずれも LLOQ 未満であった。

2.6.6.6.4 新生児を用いた試験

幼若動物を用いたブトリシランの毒性試験は実施しなかった。ATTR アミロイドーシスは主に成人に発症する（典型的には 30～50 歳以上で発症）。欧州医薬品庁小児委員会より、ブトリシランに対して本製品特有の小児に対する治験計画の免除が認められた（EMEA-002425-PIP01-18 - P/0015/2019）。小児集団（0～18 歳）のすべての部分集団は、当該医薬品が明らかな治療上の有益性を示さないという理由から臨床試験が実施不可能であり、免除の対象となっている。ブトリシランはトランスサイレチン型アミロイドーシスの治療薬として希少疾病用医薬品開発指定（米国番号 18-6376）を受けているため、米国の小児に関する要件は免除された。

2.6.6.7 局所刺激性試験

（CTD: 4.2.3.2-2、[TTRSC02-GLP15-026]；CTD: 4.2.3.2-3、[TTRSC02-GLP15-040]）
（CTD: 4.2.3.2-5、[TTRSC02-DSM15-027]；CTD: 4.2.3.2-6、[TTRSC02-GLP15-025]）
（CTD: 4.2.3.2-7、[TTRSC02-GLP15-039]）

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。しかしながら、マウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験において、ブトリシランが SC 投与部位で皮膚刺激性を示す可能性を評価するため、一般状態観察、Draize スコアリング変法による評価及び注射部位の病理組織学的評価を行った。非臨床試験で用いたこれらの動物種に投与した投与液中ブトリシラン濃度は、多くの場合、臨床で使用する Good Manufacturing Practices（GMP）製剤に用いる予定のブトリシラン濃度（50 mg/mL）を上回っていた。これらの試験において、投与部位に有害な所見は認められなかった。

GLP 適合のラットの 13 週間反復投与毒性試験（試験番号[TTRSC02-GLP15-026]；2.6.6.3.1.2 項参照）において、初回投与又は最終投与後に、投与部位においてブトリシランに関連した皮膚の所見は認められなかった。投与液中のブトリシラン濃度は 12、40 及び 120 mg/kg 群でそれぞれ 6、20 及び 60 mg/mL であった。12 mg/kg 以上の用量で投与したとき、SC 投与部位に可逆性の軽微～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が認められた。ラットにおける 6 ヵ月間反復投与毒性試験（試験番号[TTRSC02-GLP15-040]；2.6.6.3.1.3 項参照）では、50 mg/kg/回以上の用量で投与したとき、Day 197 にごく軽度の浮腫及び／又は紅斑が認められた。投与液中のブトリシラン濃度は 15、50 及び 150 mg/kg でそれぞれ 7.5、25 及び 75 mg/mL であった。これらの影響はおおむね投与約 4 時間後に認められた。これらの所見はブトリシランの投与に関連すると考えられたが、本質的に軽微で一過性であったため、有害とは判断しなかった。15 mg/kg 以上の用量では、SC 投与部位に軽微～軽度なマクロファージ浸潤が認められた。

サルを用いた 13 週間投与探索的 DRF 試験（試験番号[TTRSC02-DSM15-027]；2.6.6.3.2.1 項参照）では、100 又は 300 mg/kg の用量で投与したサルの投与部位において、用量依存的なごく軽度～中等度の一過性の浮腫が認められたが、ブトリシランに関連した皮膚刺激性の所見が認められたのは、投与期間の Day 1 のみであった。投与液中ブトリシラン濃度は 100 及び 300 mg/kg でそれぞれ 66.7 及び 200 mg/mL であった。浮腫は投与 4 時間後までに消失し、有害とは判断しなかった。

100 mg/kg 以上の用量では、SC 投与部位の 1 ヵ所以上で好酸球及び／又はマクロファージの軽微な浸潤が認められ、ときに空胞化が認められるか又は好塩基性顆粒が認められた。

サルを用いた 13 週間（試験番号[TTRSC02-GLP15-025]；2.6.6.3.2.2 項参照）及び 9 ヵ月間（試験番号[TTRSC02-GLP15-039]；2.6.6.3.2.3 項参照）投与試験では、サルにブトリシランを 30、100 及び 300 mg/kg の用量でそれぞれ 20、66.7 及び 200 mg/mL の濃度で SC 投与（1.5 mL/kg）した。いずれの試験においても、初回投与又は最終投与後に投与部位にブトリシランに関連した皮膚の所見は認められなかった。9 ヵ月間投与試験では、30 mg/kg 以上の用量で SC 投与部位に空胞化マクロファージの軽微な蓄積が認められた。

2.6.6.8 その他の毒性試験

ブトリシランを用いて実施したその他の毒性試験の一覧を

表 2.6.6.8-1 に示す。

表 2.6.6.8-1 その他の毒性試験

Species and Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Concentration	GLP Status	Study Number (Tabulated Summary) CTD Location
Human whole blood	*In vitro*	20-24 hours	4 μg/mL	Non-GLP	TTRSC02-DSM15-045 (表 2.6.7-28) CTD: 4.2.3.7.2-1

略号：Admin.＝投与；CTD＝コモン・テクニカル・ドキュメント；GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準

2.6.6.8.1 抗原性試験

（CTD: 4.2.3.2-3、[TTRSC02-GLP15-040]；CTD: 4.2.3.2-7、[TTRSC02-GLP15-039]）

ブトリシランを用いた抗原性試験は実施しなかった。ラットの 6 ヵ月間（試験番号 TTRSC02-GLP15-040；[表 2.6.7-10]参照）及びサルの 9 ヵ月間（試験番号 TTRSC02-GLP15-039；[表 2.6.7-13]参照）反復投与毒性試験において、ADA の影響をバリデーションされた方法で評価した。ADA はいずれの動物種においても、ブトリシランの TK 又は毒性に影響を及ぼさず、サルにおけるブトリシランの薬理作用にも影響を及ぼさなかった。

ラットでは（試験番号[TTRSC02-GLP15-040]；2.6.6.3.1.3 項参照）、検査したすべてのサンプルは ADA 陰性であった。

サルでは（試験番号[TTRSC02-GLP15-039]；2.6.6.3.2.3 項参照）、計 8/32 例で ADA 陽性反応が認められ、すべての抗体価は 100 以下であった。対照群のサルの 1 例を含む 3 例でベースライン（投与前）の時点で陽性が認められ、既存の交差反応抗体の存在が示唆された。30 mg/kg の用量で投与

した群の 2/8 例で ADA 陽性反応が認められた。これらのサルのうち 1 例は、投与前の時点でのみ抗体価 50 を示し、他の 1 例は Day 253 のみに抗体価 50 を示した。100 mg/kg の用量で投与した群の 5/8 例で ADA 陽性反応が認められた。1 例のサルは投与前の期間に抗体価 100 を示し、Day 29 には抗体価 50 を示したが、Day 253 には陰性となり、2 例目は Day 253 のみで抗体価 50 を示した。100 mg/kg の用量で投与した群の残りの 3 例は、Day 253 のみで抗体価が 50 を示した。300 mg/kg の用量で投与した群では ADA 陽性反応は認められなかった。ADA 抗体価はいずれも 100 以下で低値と考えられ、ブトリシランの PD、TK 及び毒性に対する ADA の影響は認められなかった。

2.6.6.8.2 免疫毒性試験

ブトリシランを用いた免疫毒性試験は実施しなかった。ブトリシランの薬理学的特性、すなわち TTR の低下が免疫機能に影響を及ぼす可能性は示されていない。また、反復投与毒性試験の所見を評価し、ブトリシランが免疫毒性を示す可能性を検討した。これらの試験において、感染症の発症頻度の増加は認められず、白血球減少／白血球増加、顆粒球減少／顆粒球増加、リンパ球減少／リンパ球増加と一致する血液学的変化も認められず、免疫系器官重量及び／又は組織学的変化も認められなかった。ラットを用いた生殖発生毒性 DRF 試験（2.6.6.6.1.1 項参照）で認められた総白血球数及び白血球分画数の増加は、qd の過度の投与スケジュールでみられた肝毒性に続く二次的な炎症反応を示唆するものであった。サルのリンパ節並びにラット及びサルの SC 投与部位における空胞化マクロファージは被験物質の蓄積を示唆している可能性が高く[3]、有害ではないと考えられる。エビデンスの重み付け評価に基づき、ブトリシランが免疫毒性を示す可能性を更に検討する必要性はないと判断した。

ブトリシランが免疫刺激作用を示す可能性を *in vitro* でのヒト全血アッセイ（試験番号 TTRSC02-DSM15-045；[表 2.6.7-28]；2.6.6.8.2.1 項参照）及びサルを用いた探索的反復投与毒性試験（試験番号 TTRSC02-DSM15-027；[表 2.6.7-8]；2.6.6.8.2.2 項参照）の一部として検討した。これらの試験で所見が認められなかったことから、ブトリシランは免疫刺激作用を示さないと考えられる。

2.6.6.8.2.1 *In vitro* ヒト全血アッセイにおけるサイトカイン産生誘導作用の評価

（CTD: 4.2.3.7.2-1、[TTRSC02-DSM15-045]）

本試験は *in vitro* ヒト全血アッセイにおいて、サイトカイン反応を測定することにより、ブトリシランが免疫刺激作用を示す可能性を検討する目的で実施した（試験番号[TTRSC02-DSM15-045]；[表 2.6.7-28]参照）。

新鮮な全血サンプル（4 例のドナー）にブトリシランを 4 μg/mL の濃度で DOTAP 試液を用いて遺伝子導入し、37°C で 20～24 時間インキュベートした。血漿中での免疫刺激作用をインターロイキン（IL）-1β、インターロイキン-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 及び腫瘍壊死因子-α（TNF-α）を含む 8 種類のサイトカインのマルチプレックス解析キットで測定することにより評価した。4 例のドナーのサンプルで測定したブトリシランに対する反応の個別値及び平均値は、8 種類すべてのサイトカインについて溶媒対照群の 2 倍以下であった。

このように、ブトリシランは測定したサイトカイン／ケモカインパラメータに対して産生誘導作用を示さなかった。

2.6.6.8.2.2 サルにおけるサイトカイン産生誘導作用の評価

（CTD: 4.2.3.2-5、[TTRSC02-DSM15-027]）

本 DRF 試験では、サルにブトリシランを qM×4 回反復 SC 投与したときの毒性評価として、サイトカイン産生誘導作用を評価した（試験番号[TTRSC02-DSM15-027]；[表 2.6.7-28]；2.6.6.3.2.1 項参照）。

血漿中サイトカイン濃度を Day 1 及び 85 の投与前及び投与後に測定した。ブトリシランを投与したサルにおいて、同時期の対照群のサルと比較して、血漿中サイトカイン（G-CSF、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子〔GM-CSF〕、インターフェロン〔IFN〕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〔MCP〕-1、MIP-1α、MIP-1β、CD40 リガンド、トランスフォーミング増殖因子〔TGF〕-α、TNF-α、血管内皮細胞増殖因子〔VEGF〕を含む）濃度に変化は認められなかった。

2.6.6.8.3 作用機序に関する試験

ブトリシランを用いた作用機序に関する試験は実施しなかった。作用機序に関する評価項目はラット（試験番号[TTRSC02-DSM15-028]及び[TTRSC02-GLP16-013]）、ウサギ（試験番号[TTRSC02-GLP16-012]）及びサル（試験番号[TTRSC02-DSM15-027]）を用いた探索的 DRF 試験並びにサルを用いた GLP 適合の反復投与毒性試験（試験番号[TTRSC02-GLP15-025]及び[TTRSC02-GLP15-039]）に含めて検討した。ラット及びウサギでは、ブトリシランは薬理活性を示さないことが確認された。主要な（TTR）及び副次的な（T4 及びビタミン A）薬理作用をサルにおける反復投与毒性試験及びラットにおけるサロゲート分子 AD-59206 を用いた反復投与毒性試験で評価した。サルにおいてブトリシランが免疫刺激作用を示す可能性を評価（血漿中サイトカイン濃度を測定することにより評価）した。

2.6.6.8.4 依存性試験

ブトリシランを用いた依存性試験は実施しなかった。ブトリシランは主に肝臓に取り込まれ、他の組織でははるかに少量しか検出されない。分子量は約 17,000 ダルトンであり、ブトリシランは分子量が大きいため、血液脳関門を介して受動的に通過することはないと予想される。このことは、ラットを用いた定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験において、[^{3}H]-ブトリシランが血液脳関門を通過しなかったことにより裏付けられている（[2.6.4.4.4.7]項「[^{3}H]-ブトリシランを用いた定量的全身オートラジオグラフィー」参照）。脳組織を用いた試験は実施しなかったが、ブトリシランを神経細胞へ能動的に取り込む既知のトランスポーター、受容体又はイオン開口型チャネルは確認されていない。ブトリシランは分子量が大きいため、これらの機序を介して神経細胞へ侵

入する可能性は低く、中枢神経系（CNS）の神経細胞がブトリシランに曝露される可能性は低いと考えられた。これらのことから、神経伝達物質に関する試験は実施しなかった。

ラットの反復投与毒性試験において、ブトリシランに関連した CNS 活性の変化を示唆する一般状態の行動学的変化は認められなかった。神経学的評価は GLP 適合のサルにおける 13 週間（試験番号 TTRSC02-GLP15-025；[表 2.6.7-12]参照）及び 9 ヵ月間（試験番号 TTRSC02-GLP15-039；[表 2.6.7-13]参照）反復投与毒性試験の一部として実施し、ブトリシランに関連した神経行動学的所見は認められなかった。神経学的影響に対する無影響量（NOEL）は検討した最高用量の 300 mg/kg であった。これらの理由から、追加の非臨床薬物弁別試験、自己投与試験及び身体依存性試験は実施しなかった。

2.6.6.8.5 代謝物に関する試験

ブトリシランの代謝物に関する毒性試験は実施しなかった。ブトリシランを 50 mg の用量でヒトに単回投与したとき、特定されている主要な血中代謝物は認められなかった（[2.6.4.5.2.4]項「ヒト血漿及び尿中の *in vivo* における代謝物の検討」参照）。ブトリシランは安定性及び効力を高め、及び／又は免疫刺激作用を減弱させるために、2′-*O*-メチル（2′-OMe）及び 2′-デオキシ-2′-フルオロ（2′-F）を含むリボース糖の 2′位で修飾されたヌクレオチドで構成されている。2′-OMe 修飾と異なり、2′-F 修飾が自然に起こることは確認されていない。9 つの 2′-F 修飾を含むブトリシランなどの siRNA がエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによって細胞内で代謝されると、個々の修飾ヌクレオシド及び／又はヌクレオチドが生成され、内因性の一部として細胞内に貯蔵されるか又は排出される可能性が考えられる。ALN-51547、ブトリシラン及び個々のヌクレオシドを用いて一連の包括的な *in vitro* 及び *in vivo* 安全性評価を実施し、安全性に関する懸念はないことが確認されている[5]。また、ブトリシランに用いられている化学修飾は以前に承認されている GalNAc-siRNA の医薬品で用いられている化学修飾と同様であることは留意すべきである。

2.6.6.8.6 不純物に関する試験

ブトリシランの不純物に関する試験は実施しなかった。非臨床毒性試験に用いた原薬及び製剤バッチの不純物プロファイルは、臨床試験に用いられた原薬及び製剤の不純物プロファイル並びに市販製剤での使用が予定されている原薬の不純物プロファイルと同等であった。個々の不純物について検討するための追加試験は不要と考えられた。ブトリシランの不純物プロファイルは予定されているブトリシランの被験物質の規格（[3.2.S.3.2]「不純物」及び[表 2.6.7-6]参照）に詳細に記載されている。毒性試験に用いた製剤及び原薬のバッチ番号（必要に応じて）を本概要文の表 2.6.6.1-1 に記載した。

2.6.6.8.7 その他の試験

2.6.6.8.7.1 光毒性に関する試験

ブトリシランの光毒性に関する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」（2013 年 11 月 13 日付ステップ 4 版）の適用範囲は、ガイドライン 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。

ブトリシランは GalNAc を結合させたオリゴヌクレオチド二重鎖であり、UV-B の波長のより短い領域の 259 nm に光の吸収のピークを有する核酸に典型的な吸収スペクトルのパターンを示す。UV-A の波長の領域には光の吸収がなく、限定されている。ブトリシランは UV-B の波長のより短い領域に光の吸収が認められるが、この特性はオリゴヌクレオチド化学の既知の吸収スペクトルと一致する。また、ラットへの[^{3}H]-ブトリシランの単回 SC 投与による QWBA 試験（試験番号 TTRSC02-DSM17-009；[表 2.6.5-10]及び[2.6.4.4.4.7]項「ラットにおける[^{3}H]-ブトリシランを用いた定量的全身オートラジオグラフィー」参照）において、皮膚又は眼に広く分布しなかったことが示されている。

2.6.6.9 考察及び結論

ブトリシランの包括的パッケージの毒性試験をマウス、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、ATTR アミロイドーシス患者に対して予定しているブトリシランを 25 mg の最大推奨臨床用量（MRHD）で q3M の投与レジメンで SC 投与する治療的使用の妥当性が裏付けられている。

2.6.6.9.1 ブトリシランの一般毒性

ゲノムに種差があるため、ブトリシランは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。薬理学的に意義のある動物種（サル）では、反復投与毒性試験において qM の投与レジメンで SC 投与したとき、NOAEL は 300 mg/kg（検討した最高用量）であった。毒性に関しては、ラットが最も感受性の高い動物種であるが、ラットにおけるブトリシランの毒性学的プロファイルは、投与頻度の増加に起因する累積曝露量の影響を受ける。ブトリシランを qM の投与レジメンで SC 投与したとき、有害な影響は認められず、長期反復投与毒性試験（試験番号 TTRSC02-GLP15-040）での NOAEL は検討した最高用量（150 mg/kg）であった。対照的に、初期の DRF 試験及び主要なラット胚・胎児発生に関する毒性 DRF 試験（それぞれ試験番号 TTRSC02-GLP16-013 及び TTRSC02-GLP18-013）では、ブトリシランを 10 mg/kg 以上の用量で妊娠中に 12 日間連続投与したときに、肝毒性が認められた。作用機序の面から、ラットにおけるブトリシランの肝毒性の原因は完全には解明されていないが、siRNA 及び／又は代謝物の細胞内蓄積、オフターゲット作用及び／又は内因性 RNAi 経路の障害が関与している可能性が考えられる。Janas ら（2018）[6] は siRNA-GalNAc 結合化合物のツールキットを用いて、RNAi を介したシードハイブリダイゼーションに基づくオフターゲット作用がラットにおける肝毒性の主要な促進因子であることを示した。これらの知見をヒトでのハザード同定と関連付けると、ゲノムの種差によりラットとヒトの間でブトリシラン

の潜在的オフターゲット作用に膨大な相違が存在する可能性が想定される。実際、ヒトにおいて予測されているブトリシランのオフターゲット活性は低い（[2.6.2.3.1]項「*In vitro* 副次的薬理試験」参照）。また、qd の投与レジメンで投与したときに認められたラットでの肝毒性が、予定している q3M（すなわち 12 週間に 1 回）の臨床投与スケジュールで到達する治療濃度と比較して極めて過大な曝露量で認められたことは重要な点である。MRHD は q3M の投与レジメンで 25 mg であり、これは 0.42 mg/kg（ヒトの体重を 60 kg と仮定して）に相当し、q3M に標準化すると 0.005 mg/kg/day に相当する。この点を考慮すると、胚・胎児発生に関する毒性試験における 10 mg/kg の用量で qd 投与したときのヒト等価用量（HED）は、標準化した MRHD の 323 倍に相当する。

ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験において、雄ラットでは 15 mg/kg 以上、雌ラットでは 150 mg/kg、雄サルでは 30 mg/kg 以上及び雌サルでは 300 mg/kg の用量で、投与期間中に体重増加量の減少（ラットでは対照群から最大 23%、サルでは対照群から最大 36%）が認められた。ラットでは、体重増加量の減少は摂餌量の減少とおおむね関連していた。体重増加量の減少は、いずれの動物種においても試験期間中にすべての動物の体重が維持されるか又は増加し、動物の全身状態に全般的な影響が認められなかったことから、有害ではないと判断した。病理組織学的検査では、ブトリシランに関連した影響のほとんどは、ブトリシランを取り込む主要な器官である肝臓で認められた。要約すると、ラットにブトリシランを qM の投与レジメンで短期又は長期反復投与したとき、ブトリシランに関連した肝細胞における所見として、空胞化、有糸分裂の増加、個々の肝細胞壊死の増加、細胞変化巣及び巨大核が認められた。サルにブトリシランを qM の投与レジメンで長期反復投与したとき、肝臓での所見としてクッパー細胞及び／又は肝細胞に好塩基性顆粒が認められた。また、ラットの近位尿細管において、ときに空胞化を伴う好塩基性顆粒が認められた。ラット及びサルにおいて、SC 投与部位に空胞化マクロファージが認められ、ラットでは混合炎症細胞も共に認められた。ラット及びサルでは、ブトリシランを投与したときに、リンパ節においても空胞化マクロファージが認められた。

2.6.6.9.2 標的器官の要約

マウス及びサルにブトリシランを qM の投与レジメンで SC 投与したとき、標的器官毒性は認められなかった。前述したように（2.6.6.9.1 項参照）、ラットにおける肝毒性は投与頻度（qd vs qM）と関連していた。ブトリシランを qM 投与したとき、肝臓、腎臓、投与部位及びリンパ節でブトリシランに関連した非有害所見が認められた。サルにおける 13 週間及び 9 ヵ月間投与試験の両試験（試験番号 TTRSC02-GLP15-025 及び TTRSC02-GLP15-039）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、予想したとおり、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して低下作用が維持された。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、ERG、VEP 及び眼の病理組織検査は正常であった。サルにおける T4 のマイナーな輸送担体としての TTR の役割と一致して、両試験で血清中 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。

DRF 試験及び主要な胚・胎児発生毒性試験（試験番号 TTRSC02-GLP16-013、TTRSC02-DSM18-011 及び TTRSC02-GLP18-013）において、雌ラットにブトリシランを qd×12 日間連続 SC 投与したとき、肝毒性が認められた。

ブトリシランに関連した所見は、Tg-rasH2 WT マウスを用いた試験（試験番号 TTRSC02-DSM18-031）では副腎に、雌ラットを用いた主要な胚・胎児発生に関する試験（試験番号 TTRSC02-GLP18-013）では膵臓に、受胎能及び初期胚発生に関する試験（試験番号 TTRSC02-GLP18-005）では雄ラットの前立腺に認められた。

以下に、ブトリシランに関連した所見を記載する。

2.6.6.9.2.1 肝臓

ブトリシランは主に肝細胞の細胞表面に発現する ASGPR を介して siRNA が肝細胞に特異的に取り込まれるように GalNAc リガンドを siRNA と結合させ、肝臓へ特異的に送達されるように設計されている。本設計と一致して、ブトリシランは主に肝臓に分布した（[2.6.4.4]項「分布」参照）。マウス、ラット及びサルを用いて実施した反復投与毒性試験において、ブトリシランを qM の投与レジメンで SC 投与したとき、肝臓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。胚・胎児発生に関する毒性試験では、妊娠雌ラットにブトリシランを qd の投与レジメンで妊娠中に投与したとき、又は DRF 試験では非妊娠雌ラットにブトリシランを qd×12 日間連日投与したときに用量制限肝毒性が認められた。

C57BL/6 マウス及び Tg-rasH2 WT マウスにブトリシランを qM×4 回 SC 投与したとき、肝臓における所見として、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 C57BL/6 マウスのみでみられた ALT の軽微な高値（2.5 倍以下）と関連しており、また、肝重量の増加と関連している可能性が高いと考えられた（30 mg/kg の用量での C57BL/6 マウスの雌雄合計の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値はそれぞれ 9.96 µg/mL 及び 36.1 µg·h/mL）。Tg-rasH2 WT マウスにブトリシランを qM の投与レジメンで 3 回 SC 投与するその後の試験において、高用量での肝臓における所見として、500 mg/kg 以上の用量で軽微～中等度の肝細胞空胞化及び軽微～中等度の肝細胞肥大／腫大が認められ、これらの所見は 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認められた肝重量の増加、用量非依存性の ALT の高値（最大 122%）及び 1500 mg/kg の用量で投与した雄で認められた ALP の高値（33%）と関連していた（500 mg/kg の用量で投与したときの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$はそれぞれ 103 µg/mL 及び 435 µg·h/mL）。CD-1 マウスにブトリシランを qM×4 回 SC 投与したときの肝臓における所見として、10 mg/kg 以上の用量で軽微～中等度の肝細胞空胞化、25 mg/kg の用量で投与した雌雄各 1 匹に軽度な変性／壊死、10 mg/kg 以上の用量で投与した雌に肝細胞グリコーゲンの軽微～中等度の増加が認められ、これらの所見は肝重量又は臨床病理学的変化とは関連が認められなかった（10 mg/kg の用量での雌雄合計の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値はそれぞれ 2.12 µg/mL 及び 4.35 µg·h/mL）。

ラットにおける 13 週間投与試験において、ブトリシランを qM×4 回 SC 投与したとき、肝臓におけるブトリシランに関連した所見として、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

有糸分裂像の軽微な増加、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 の用量で投与したときに軽微な好塩基性肝細胞変化巣の増加（雌のみ）が認められた（試験番号 TTRSC02-GLP15-026；[表 2.6.7-9]参照）。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、40 mg/kg 以上の用量で投与した雄、120 mg/kg の用量で投与した雌では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 ヵ月間反復投与毒性試験においてブトリシランを qM 投与したとき、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像の増加、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 mg/kg 以上の用量で投与した雌で軽微～軽度の好塩基性細胞変化巣並びに 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；[表 2.6.7-10]参照）。肝臓での所見は、13 週間投与試験と比較して、6 ヵ月間投与試験で全般的に発現頻度及び／又は程度が上昇した。その後に実施した非 GLP のラットにおける探索的毒性試験では、雌ラットにブトリシランを qM×7 回又は q3M×3 回 6 ヵ月間 SC 投与し、その後 3 ヵ月間の回復期間を設けた（試験番号 TTRSC02-DSM17-011；[表 2.6.7-11]参照）。
50 mg/kg の用量で qM×7 回又は 10 mg/kg 以上の用量で q3M×3 回投与したとき、試験の主な期間終了時に、軽微～軽度の両染性及び／又は好塩基性の細胞変化巣並びに軽微～軽度の有糸分裂像の増加が認められた。5 mg/kg 以上の用量で qM×7 回又は 50 mg/kg の用量で q3M×3 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 q3M×3 回（累積投与量は 150 mg/kg）投与したラットと比較して、50 mg/kg の用量で qM×7 回（累積投与量は 350 mg/kg）投与したラットの方が高く、また、10 mg/kg の用量で q3M×3 回（累積投与量は 30 mg/kg）投与したラットと比較して 5 mg/kg の用量で qM×7 回（累積投与量は 35 mg/kg）投与したラットの方が高かった。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、非臨床試験で検討した他のすべての動物種では認められなかった。6 ヵ月間反復投与試験（試験番号 TTRSC02-GLP15-040；[表 2.6.7-10]参照）において、ラットでのブトリシランに関連した肝臓に対する影響の NOAEL は 150 mg/kg であり（Day 197 での雌雄を合わせた C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値はそれぞれ 29.1 μg/mL 及び 331 μg·h/mL）、本用量は qM 投与で評価した最高用量であった。

雌ラットを用いた初期の生殖発生毒性 DRF 試験（試験番号 TTRSC02-GLP16-013；[表 2.6.7-21]参照）では、妊娠 21 日に肝毒性を示唆する臨床病理学的変化が認められた（病理組織学的評価は実施しなかった）。50 又は 150 mg/kg の用量で交配前に qw×3 回投与した雌及び 10 又は 30 mg/kg の用量で妊娠中に qd×12 回投与した雌において、それぞれ肝機能の異常を示唆する臨床病理学的変化（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）及び肝細胞障害、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）が認められた。15 mg/kg（qw×3 回）の用量で投与した後に 3 mg/kg（qd×12 回）の用量

で投与した雌では、肝臓に所見は認められなかった。その後、非妊娠雌ラットを用いて病理組織学的検査を含めた DRF 試験を実施した（試験番号 TTRSC02-DSM18-011；[表 2.6.7-22]参照）。本試験ではラットに qd×12 回投与し、Day 13 に臨床病理検査及び病理組織学的検査を実施した。3 mg/kg の用量で投与したとき、AST の軽微な高値が認められた。10、30 及び 100 mg/kg の用量で投与したとき、ALT、AST、ALP 及び総ビリルビンの用量依存的な高値並びにトリグリセリド、コレステロール、グルコース、アルブミン、グロブリン、総たん白質、カルシウム、尿素窒素及びクレアチニンの低値が認められた。10 mg/kg 以上の用量で投与したとき、肝重量の増加が認められたが、本所見は病理組織学的変化の肝細胞空胞化と関連していた。3 及び 10 mg/kg の用量で投与したとき（評価した用量のみで）、肝臓での病理組織学的評価の所見として、軽微～顕著な肝細胞空胞化、軽微な単細胞壊死、軽微～軽度の混合細胞浸潤及び／又はクッパー細胞の肥大／過形成が認められた。クッパー細胞において、軽微な色素沈着に伴って、有糸分裂像の軽微な増加も認められた。本所見と関連して、10 mg/kg の用量で投与したときに認められた病理組織学的所見及び臨床病理学的所見は軽度の肝毒性と一致しており、30 mg/kg 以上の用量で投与したときに認められた所見は中等度の肝毒性を示唆していると結論付けられた。GLP 適合の主要なラット胚・胎児発生に関する試験では、妊娠雌ラットにブトリシランを 0、3、10 又は 30 mg/kg の用量で妊娠 6～17 日に qd 投与した（試験番号 TTRSC02-GLP18-013；[表 2.6.7-25]参照）。ブトリシランを 10 mg/kg 以上の用量で投与したときに、ブトリシランに関連する所見として、中等度の肝細胞空胞化／変性、軽微～軽度の肝細胞肥大及び軽微～中等度の個々の肝細胞壊死が認められ、30 mg/kg の用量で投与したときには、肝臓での追加所見として、中等度の限局性／多巣性肝細胞壊死、軽微～中等度の出血、軽微～軽度の肝細胞有糸分裂増加、軽微な混合細胞浸潤及びクッパー細胞における軽微な好塩基性顆粒が認められた。主要な試験では、母動物に対する毒性の NOAEL は 10 mg/kg/日であった。

サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験において、ブトリシランを qM×4 回投与したとき、ブトリシランに関連した肝臓での所見として、100 mg/kg 以上の用量でクッパー細胞において軽微～軽度の好塩基性顆粒が認められた（試験番号 TTRSC02-GLP15-025；[表 2.6.7-12]参照）。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 ヵ月間反復投与毒性試験では、ブトリシランを qM×11 回 SC 投与したとき、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／又は肝細胞において、軽微～軽度の好塩基性顆粒が認められた（試験番号 TTRSC02-GLP15-039；[表 2.6.7-13]参照）。これらの試験において、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ず、肝臓における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、おそらくブトリシランの蓄積を示唆していると考えられる[3, 7]。9 ヵ月間反復投与試験（試験番号 TTRSC02-GLP15-039；[表 2.6.7-13]参照）において、肝臓への影響の NOAEL は 300 mg/kg と考えられ（Day 253 での雌雄合計の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の平均値はそれぞれ 71.7 μg/mL 及び 1170 μg·h/mL）、本用量は評価した最高用量であった。

2.6.6.9.2.2 腎臓

ラットにおける 13 週間反復投与毒性試験において、ブトリシランを qM×4 回 SC 投与したとき、40 mg/kg 以上の用量で腎近位尿細管上皮細胞の細胞質に軽微～中等度の好塩基性顆粒が認められたが、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ことから（試験番号 TTRSC02-GLP15-026；[表 2.6.7-9]参照）、尿細管上皮細胞はこれらの顆粒を細胞質から除去する能力を有することが示された。ラットにおける 6 ヵ月間反復投与毒性試験では、ブトリシランを 50 mg/kg 以上の用量で qM×8 回 SC 投与したとき、尿細管細胞質に軽微～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；[表 2.6.7-10]参照）。本所見は反復投与後に進行しなかった。関連する臨床病理学的所見も、腎機能への影響を示唆する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。妊娠雌ラットにブトリシランを 0、3、10 又は 30 mg/kg（qd×12 回）の用量で投与したとき、30 mg/kg の用量で腎臓での所見として、尿細管細胞における中等度の硝子滴蓄積、軽度の空胞化及び軽微な好塩基性顆粒並びに尿細管腔における軽微な色素沈着が認められた（試験番号 TTRSC02-GLP18-013；[表 2.6.7-25]参照）。

ブトリシランを含む RNAi 治療薬は、糸球体を介して濾過され、近位尿細管上皮によって部分的に再吸収される[8]。近位尿細管で認められた細胞質の好塩基性顆粒は、ヘマトキシリン染色されたブトリシランを示唆している可能性が高い[3, 7, 8]。siRNA の近位尿細管細胞（PTC）への再吸収の機構は完全には解明されていない。機能的 ASGPR は近位尿細管で発現しているというエビデンスがあるが[9]、腎臓における *ASGPR1* の発現は肝臓と比較して低く、腎臓での siRNA 濃度が比較的高いことから、他の取り込み機構が存在している可能性が考えられる。*In vitro* において、メガリン及びキュビリン阻害剤はラット及びヒト PTC への siRNA の非定型の取込みを低下させた。*In vivo* では、ラットのキュブリンをノックダウンすると、ラット PTC への siRNA の取込みが低下したことから、メガリン及びキュビリンスカベンジャー受容体が少なくとも部分的にはラット PTC への siRNA の再吸収に関与することが示唆された[10]。ラット PTC において、再吸収後に RNAi を介して活性を示すエビデンスは存在していない（未発表のデータ）。非臨床試験で用いた他の動物種で有害性がなく、類似の所見が認められないことを考慮すると、本所見のヒトへの関連性は明確ではない。

2.6.6.9.2.3 SC 投与部位

マウスにおいて、ブトリシランを 10 mg/kg 以上の用量で SC 投与したとき、投与部位において軽微～軽度又は中等度の空胞化マクロファージの浸潤が認められ（試験番号 TTRSC02-DSM16-032、TTRSC02-DSM18-031 及び TTRSC02-DSM19-009）、30 mg/kg 以上の用量ではときに軽微～中等度の線維芽細胞の空胞化を伴っていた（試験番号 TTRSC02-DSM16-032）。ラットにおける 13 週間投与試験において、ブトリシランを 12 mg/kg 以上の用量で qM×4 回 SC 投与したとき、試験終了時に注射部位において軽微～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、局所刺激性との関連は認められなかった。同様に 6 ヵ月間投与試験においても、ラットにブトリシランを qM×8 回 SC 投与したとき、15 mg/kg 以上の用量で投与部位において軽微～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いと考えられた。ブトリシランを 50 mg/kg 以上の用量で投与したとき、最終投与 4 時間後に SC 投与部位において、雌雄共に一過性のごく軽度の浮腫（Draize スコアは 1）及び／又は雌にごく軽度の紅斑（Draize スコアは 1）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）。サルにおける 13 週間投与試験では、ブトリシランを qM×4 回 SC 投与したとき、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 SC 投与部位に空胞化マクロファージの軽微な蓄積が認められたが、局所刺激性との関連はない又は有害ではないと考えられた（試験番号 TTRSC02-GLP15-039）。これらの所見は有害とは考えられず、正常な貪食反応を反映していると考えられた。

2.6.6.9.2.4 リンパ節

マウスではブトリシランを qM×3 回投与したとき、500 mg/kg 以上の用量でリンパ節に軽微～軽度の空胞化マクロファージの浸潤が認められた（試験番号 TTRSC02-DSM18-031）。ラットでは 13 週間投与試験において、ブトリシランを qM×4 回投与したとき、雌では 12 mg/kg 以上の用量で、雄では 40 mg/kg 以上の用量で鼠径リンパ節に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）。サルではブトリシランを qM×4 回投与したとき、すべての用量で雌雄の各種リンパ節において軽微～軽度のマクロファージ空胞化が認められた（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。9 ヵ月間投与試験では、ブトリシランを qM×11 回投与したとき、すべての用量でいくつかのリンパ節に軽微～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又は臨床的・臨床病理学的関連が認められず、反復投与によっても進行せず、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た。

2.6.6.9.2.5 副腎

雌 Tg-rasH2 WT マウスにおいて、ブトリシランを 1000 mg/kg 以上の用量で qM×3 回投与したとき、軽微～軽度の被膜下細胞過形成が認められた（試験番号 TTRSC02-DSM18-031）。対照群でも認められたが、1000 mg/kg 以上の用量で重篤度が軽度に増加したことから、本所見はブトリシランに関連した変化と考えられた。本所見は Tg-rasH2 マウスによくみられる自然発生的所見であるため、意義は不明であった[2]。

2.6.6.9.2.6 膵臓

ブトリシランを qM の投与レジメンで反復 SC 投与したマウス、ラット及びサルにおいて、膵臓に所見は認められなかった。対照的に主要な胚・胎児発生に関する毒性試験（試験番号 TTRSC02-GLP18-013）において、30 mg/kg（qd×12 回）の用量で投与した妊娠中の雌ラットでは、軽度～中等度の間質浮腫、軽微又は軽度の脂肪細胞壊死、脂肪組織における混合細胞浸潤が認められた。間質性浮腫は「全体的に透明のゼラチン状」の肉眼的所見と関連していた。本試験では臨床病理学的

評価は行わず、膵臓の浮腫の原因は不明であったが、血清たん白質／アルブミンの低値が本所見に関与している可能性が考えられる[11]。これらの両パラメータの低値は、記述したとおり、ラットにブトリシランを 30 mg/kg の用量で qd×12 日間連日投与したとき、認められた所見である（試験番号 TTRSC02-DSM18-011）。

2.6.6.9.2.7 前立腺

ブトリシランを qM の投与レジメンで SC 投与したマウス、ラット及びサルにおいて、前立腺に所見は認められなかった。受胎能及び初期胚発生に関する試験（試験番号 TTRSC02-GLP18-005）において、ラットにブトリシランを 30 mg/kg 以上の用量で qw の投与レジメンで SC 投与したとき、ブトリシランに関連した前立腺の絶対及び相対（体重に対する）重量の減少（最大 23%）が認められた。前立腺重量の減少は、30 mg/kg 以上の用量で病理組織学的検査により認められた前立腺分泌物の軽微な減少及び 30 mg/kg 以上の用量で認められた体重減少と関連がみられたことから、ブトリシランに関連した所見であると考えられた。これらの前立腺の変化は、受胎能又は精子パラメータに影響を及ぼさなかった。

2.6.6.9.3 ブトリシランの遺伝毒性及びがん原性

ブトリシランの GLP 適合の遺伝毒性試験（細菌を用いた復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験及びラット骨髄における小核試験）を ICH S2（R1）で示された限界用量までの用量／濃度で実施し、結果はいずれも陰性であった。これらのデータはブトリシランが遺伝毒性及び染色体異常誘発性をいずれも有していないことを示している。

Sprague Dawley ラットにおける 2 年間投与がん原性試験が完了した。ブトリシランはラットにおいて、検討した最高用量（雄に 15 mg/kg の用量で qM 又は q3M 投与及び雌に 25 mg/kg の用量で qM 又は q3M 投与）でがん原性を示さなかった。雄ラットに 15 mg/kg（q3M）の用量で、雌ラットに 25 mg/kg（q3M）の用量で投与したときの AUC に基づく曝露量の安全域は、それぞれ MRHD でのヒトにおける曝露量の 18 及び 29 倍であった。臨床投与スケジュールである q3M に標準化したとき、雄ラットに 15 mg/kg（qM）の用量で、雌ラットに 25 mg/kg（qM）の用量で投与したときの AUC に基づく曝露量の安全域は、それぞれ MRHD でのヒトにおける曝露量の 57 及び 52 倍であった。CD-1 マウスを用いた 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。

2.6.6.9.4 ブトリシランの生殖発生毒性

ラットにおいて 2 つの生殖発生 DRF 試験を実施し、親動物に軽微な毒性を発現する最高用量を特定し、臨床的及び／又は病理組織学的エンドポイントを評価した。初期の試験では、雌ラットにブトリシランを 0、15、50 又は 150 mg/kg（qw×3 回）の用量で無処置の雄との同居前に qw の投与レジメンで SC 投与した（試験番号 TTRSC02-GLP16-013）。ブトリシランを 0、3、10 又は 30 mg/kg（qd×12 回）の用量で妊娠 6～17 日に SC 投与した。交尾、受胎能、胚・胎児発生に対する潜在的

な有害なあらゆる影響を評価するために十分な曝露量を確保する目的で、ブトリシランを交配前はqw、妊娠中は qd の投与レジメンで投与した（q3M の臨床投与頻度とは対照的に）。同居させる前に別の群の雌ラットに対して、ラットに薬理活性を示すサロゲート分子（AD-59206）を 30 mg/kg の用量で qw×3 回、その後、妊娠 6、12 及び 17 日に投与し、薬理作用（TTR、ビタミン A、T4 濃度の低下）による影響を評価した。50/10 及び 150/30 mg/kg の用量で投与したとき、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（母動物に対する毒性による二次的な毒性）が認められた（2.6.6.9.2.1 項参照）。催奇形性のエビデンスは認められず、受胎能及び／又は交配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、胎児では定量可能な曝露は認められなかった。T4 の濃度は対照群を含むすべての群で低下し（交配前の Day 0 から妊娠 21 日に最大-69%）、これは妊娠ラットで予想された変化であり、ブトリシラン投与に起因する変化ではなかった。サロゲート分子を 30 mg/kg の用量で投与したとき、胎児に曝露は認められなかったが、母動物では曝露が認められ、予想されたとおり、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 LLOQ 未満）及びビタミン A（72%以上）濃度の低下が認められた。受胎能、交尾、生殖に関する指標又は胚・胎児発生に対する影響は認められなかった。これらの結果は、ラットでは TTR、ビタミン A 及び T4 の低下が交尾、受胎能、妊娠、胚・胎児発生及び出生前・出生後の発生に影響を及ぼさないことが確認されたラットで薬理活性を示すパチシランのサロゲート分子を用いた以前の試験結果と一致していた（ONPATTRO®米国添付文書〔2018〕[12] 参照）。これらのことから、ラットで薬理活性を示すサロゲート分子はブトリシランのその後の生殖発生毒性試験には用いなかった。

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において、成熟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 SC 投与した（試験番号 TTRSC02-GLP18-005）。雄には交配前及び交配期間中に qw×7 回投与した。雌には交配前及び交配期間中に qw 投与し、交尾が確認された場合は妊娠 6 日に 1 回投与した（qw×4 又は 5 回）。雄ではブトリシランに関連した最終的な体重減少（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 及び 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、生殖能又は精子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、病理組織学的所見としてみられた腺房／導管における分泌物質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あるが、これらのラットで認められた体重増加量の減少による二次的な所見である可能性も考えられる [13]。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では、妊娠雌ラットにブトリシランを 0、3、10 又は 30 mg/kg の用量で妊娠 6～17 日に qd 投与した（試験番号 TTRSC02-GLP18-013）。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及び体重増加量の減少が認められ、30 mg/kg では有害と考えられた。これらの変化は 10 mg/kg 以上の用量でみられた摂餌量の減少と関連していた。10 mg/kg 以上の用量で投与したとき、剖検時に母動物の肝臓、腎臓及び膵臓に肉眼的観察所見が認められたため、これらの組織を病理組織学的に評価した結果、ブトリシランに関連した所見が認められた（それぞれ 2.6.6.9.2.1、2.6.6.9.2.2 及び 2.6.6.9.2.6 項参照）。30 mg/kg の

用量では、生殖に関する有害な所見として、早産の発現頻度上昇（母動物の 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、着床数又は着床前胚損失に影響は認められなかった。胎児の外表及び内臓の評価に影響は認められず、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、胸骨分節の未骨化などが認められた。これらの変異はげっ歯類で一般的にみられる所見であり、ラットの成長及び発達に影響を及ぼすことは予想されず、母動物毒性に起因する二次的な変化である可能性が高いため、有害所見ではないと判断した[14]。30 mg/kg の用量で母動物の体重及び／又は体重増加量並びに摂餌量の有害な減少及び病理組織学的変化が認められたことから、ラットにおける母動物に対する毒性の NOAEL は 10 mg/kg である。本試験では、qd 投与したのに対し、臨床での投与頻度は q3M（すなわち 12 週間に 1 回）であることに留意する必要がある。MRHD は q3M の投与レジメンで 25 mg であり、これは 3 ヵ月当たり 0.42 mg/kg（ヒトの体重を 60 kg と仮定して）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 HED は標準化した MRHD の 323 倍に相当する。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。

ウサギの胚・胎児発生に関する DRF 試験では、妊娠ウサギにブトリシランを 0、3、10 又は 30 mg/kg の用量で妊娠 7～19 日に qd 投与した（試験番号 TTRSC02-GLP16-012）。30 mg/kg では有害ではない軽度の体重及び摂餌量の減少が認められた。30 mg/kg 以上の用量では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、妊娠中に胎児への曝露は認められなかった。

GLP 適合の主要なウサギにおける胚・胎児発生に関する試験では、妊娠ウサギにブトリシランを 0、3、10 又は 30 mg/kg の用量で妊娠 7～19 日に qd 投与した（試験番号 TTRSC02-GLP18-014）。いずれの用量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、ウサギの母動物及び生殖発生に対する NOAEL は 30 mg/kg である。母動物及び生殖発生に対する 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、19 日、授乳 6、12、18 日に SC 投与した。ラットにおける胚・胎児発生に関する試験において、qd 投与したときに誘発された毒性を考慮して、ほぼ qw の投与スケジュールを用いた。母動物の死亡率、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、ラットにおける母動物に対する NOAEL は 20 mg/kg である。F_1 世代において、出生児の発育、神経行動学的発達又は生殖能を含む出生から成熟までの期間を通して、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、出生児の生存及び成長に対する NOAEL も 20 mg/kg であった。F_1 出生児（生後 12 日）の血漿中のブトリシラン濃度はいずれも LLOQ 未満であった。

2.6.6.9.5 その他の毒性試験

ラット及びサルの反復投与試験において、局所刺激性を Draize スコアリング変法により、検討した最高用量まで評価した。ブトリシランの臨床使用予定濃度である 50 mg/mL を超える 200 mg/mL の濃度まで局所刺激性の所見は認められなかった。

ブトリシランが免疫原性を示す可能性は低い。ラット及びサルの 6 ヵ月間及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験において、ブトリシランを qM 投与したときの ADA の影響について評価した。6 ヵ月間投与試験において（試験番号 TTRSC02-GLP15-040）、血中に ADA が認められなかったことから明らかなように、ラットにおいてブトリシランは反復投与により免疫原性を示さなかった。サルでは、ブトリシランの長期投与後に 30（2/8 例）及び 100 mg/kg（5/8 例）の用量でのみ ADA が検出され、対照物質又はブトリシランの投与前に、一部の動物（3/32 例）で既存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）。一貫した一時的反応は認められず、すべての抗体価は低かった（100 以下）。ブトリシランの 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。ブトリシランを用いて実施した反復投与毒性試験及び *in vitro* 免疫刺激試験において所見が認められなかったことから、ブトリシランは免疫刺激作用及び免疫毒性を示さないと考えられる。

ブトリシランの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の懸念はないことが示されている。

代謝物及び不純物の安全性については、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適切に対応した。

2.6.6.9.6 全身曝露量の比較に基づくブトリシランの安全域

ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験におけるブトリシランの TK データ（AUC 及び C_{max}）を表 2.6.6.9-1 に示す。安全域は非臨床試験で特定された NOAEL での C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$の値を正常な健康被験者にブトリシランを 25 mg（ヒトの体重を 60 kg と仮定すると 0.42 mg/kg の用量に相当）の用量で単回投与したときの血漿中曝露量と比較することにより算出した（[ALN-TTRSC02-001]試験「健康被験者を対象とした SC 投与による第 1 相無作為化単盲検プラセボ対照単回漸増用量、安全性、忍容性、薬物動態及び薬力学 ALN-TTRSC02 試験」参照）。HED に基づく安全域も示した。また、q3M 投与した患者のデータとの比較において、qM 投与した動物で到達した全身及び肝臓中の累積曝露量を補正するため、投与間隔で調整した AUC を用いて安全域の計算値を算出したことに留意すべきである。投与スケジュールが異なるため、HED に基づく安全域を計算するための動物での用量も補正した。

NOAEL での安全域から、ブトリシランは良好な安全性プロファイルを有することが裏付けられている。

表 2.6.6.9-1　反復投与毒性試験で用いた用量及び臨床用量での全身曝露量の比較に基づく安全域

Study	Dose (mg/kg)	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·h/mL)	Exposure Margin for 25 mg Clinical Dose		
				Based on C_{max}[a] (μg/mL)	Based on $AUC_{0\text{-}t(last)}$[b] (μg·h/mL)	Based on HED[c] (mg/kg)
Rat[d] (repeat dose, 26 week)	15	1.53	8.91	16×	29×	17×
	50	7.33	43.8	74×	143×	58×
	150 (NOAEL)	29.1	331	296×	1084×	173×
Monkey[e] (repeat dose; 39 week)	30	8.53	86.0	87×	282×	69×
	100	29.1	479	296×	1569×	230×
	300 (NOAEL)	71.7	1170	729×	3832×	691×

略号：$AUC_{0\text{-}t(last)}$ ＝投与後から最終濃度測定時点までの AUC；C_{max}＝最高（血漿中）濃度；HED＝ヒト等価用量；NOAEL＝無毒性量；T_{max} ＝最高血漿中濃度到達時間

a：C_{max}＝0.0984 μg/mL；ALN-TTRSC02-001 臨床試験、Day 1、25 mg 投与レジメン（1 回目投与後）から入手。

b：$AUC_{0\text{-}t(last)}$＝0.916 μg·h/mL；ALN-TTRSC02-001 臨床試験、Day 1、25 mg 投与レジメン（1 回目投与後）から入手。非臨床試験で用いた動物種（月 1 回〔qM〕）及びヒト（3 ヵ月に 1 回〔q3M〕）における投与レジメンの相違を補正するため、非臨床試験での曝露量に 3 を乗じた。

c：HED＝25 mg（ヒトの体重を 60 kg と仮定して 0.42 mg/kg）。業界向けガイダンス「成人健康志願者を対象とした治療のための早期臨床試験における最大安全開始用量の推定」（FDA、2005 年 7 月）に概説されているとおり、HED は標準化した非臨床試験の用量（qM から q3M への用量を換算のために 3 を乗じる）を用いて、また、動物種の体表面積に基づく適切な換算係数（すなわちラットでは 6.2、サルでは 3.1）を乗じることにより算出した。

d：C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$のデータは Day 197 での雌雄合計の値を示した（TTRSC02-GLP15-040）。

e：C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t(last)}$のデータは Day 253 での雌雄合計の値を示した（TTRSC02-GLP15-039）。

2.6.6.9.7　総括

ブトリシランの予定されている治療的使用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。ブトリシランを qM の投与スケジュールで投与したとき、非臨床試験では毒性標的器官は認められなかった。しかしながら、過度の投与スケジュール（妊娠中に qd 投与）により、妊娠ラットの肝臓及び膵臓に有害な所見が認められた。ブトリシランは Sprague Dawley ラットにおいて、変異原性又は染色体異常誘発作用を示さず、がん原性を示さなかった。ブトリシランは免疫刺激作用又は免疫毒性を示す可能性もないと考えられる。生殖発生、胚・胎児、出生後の発生に関する評価では、ブトリシランの曝露による直接的な影響は認められなかったが、ラットにおける胚・胎児

発生に関する試験では、妊娠期間中の qd の投与スケジュールに起因する母体への毒性／ストレスに起因する二次的な変化と考えられる有害な影響が複数認められた。

結論として、非臨床毒性試験の結果から、ブトリシランは ATTR アミロイドーシスの治療のためにヒトに 25 mg の用量で q3M の推奨投与レジメンで SC 投与することを支持する良好な安全性プロファイルを有することが示された。

2.6.6.10 図表

図表はいずれも本文中に示した。

2.6.6.11 参考文献一覧

1. Henry SP, Kim TW, Kramer-Stickland K, Zanardi TA, Fey RA, Levin AA. Toxicologic properties of 2'-*O*-Methoxyethyl chimeric antisense inhibitors in animals and man. In: Crooke ST, editors. Antisense drug technology. 2nd. Boca Raton: CRC Press; 2008. p.327-63.
2. 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;46:444-8.
3. Janas MM, Harbison CE, Perry VK, Carito B, Sutherland JE, Vaishnaw AK, et al. The Nonclinical Safety Profile of GalNAc-conjugated RNAi Therapeutics in Subacute Studies. Toxicol Pathol. 2018;46:735-45.
4. Pandher K, Leach MW, Burns-Naas LA. Appropriate use of recovery groups in nonclinical toxicity studies: value in a science-driven case-by-case approach. Vet Pathol. 2012;49:357-61.
5. Janas MM, Zlatev I, Liu J, Jiang Y, Barros SA, Sutherland JE, et al. Safety evaluation of 2'-deoxy-2'-fluoro nucleotides in GalNAc-siRNA conjugates. Nucleic Acids Res. 2019;47:3306-20.
6. Janas MM, Schlegel MK, Harbison CE, Yilmaz VO, Jiang Y, Parmar R, et al. Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity. Nat Commun. 2018;9:723.
7. Frazier KS. Antisense oligonucleotide therapies: the promise and the challenges from a toxicologic pathologist's perspective. Toxicol Pathol. 2015;43:78-89.
8. Lenz B, Braendli-Baiocco A, Engelhardt J, Fant P, Fischer H, Francke S, et al.. Characterizing Adversity of Lysosomal Accumulation in Nonclinical Toxicity Studies: Results from the 5th ESTP International Expert Workshop. Toxicol Pathol. 2018;46:224-46.
9. Seow YY, Tan MG, Woo KT. Expression of a functional asialoglycoprotein receptor in human renal proximal tubular epithelial cells. Nephron. 2002;91:431-8.

10. Jiang Y, Rogers A, Gu Y, Carito B, Gedman P, D'Angelo K, et al. Exploring the Mechanisms of Kidney Uptake of Oligonucleotides. In: Alnylam Pharmaceuticals, editors. TIDES. Cambridge; 2019. p.1.

11. Duncan JR, Prasse KW. Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology. Ames. 2nd. IA: Iowa State University Press; 1986. p.253-4.

12. Onpattro. Prescribing information. [homepage on the Internet]. Alnylam Pharmaceuticals; [cited 2018]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210922s000lbl.pdf.

13. Vidal JD, Mirsky ML, Colman K, Whitney KM, Creasy DM. Reproductive System and Mammary Gland. Toxicologic Pathology: Nonclinical Safety Assessment. Boca Raton: CRC Press; 2013. p.717-830.

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

目次

2.6.7 毒性試験概要表 2
2.6.7.1 毒性試験一覧表 2
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表 8
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧 11
2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧 20
2.6.7.5 単回投与毒性試験 24
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 25
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 28
2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験 58
2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験 62
2.6.7.10 がん原性試験 64
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 84
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 99
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 104
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 114
2.6.7.15 新生児を用いた試験 119
2.6.7.16 局所刺激性試験 120
2.6.7.17 その他の毒性試験 121

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験一覧表

表 2.6.7-1 毒性試験一覧表

Overview					Test Article: Vutrisiran	
Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number Location in CTD
Single-Dose Toxicity						
No studies conducted						
Repeat-Dose Toxicity – Non-Pivotal						
Rat, Sprague Dawley	SC	13 weeks	0, 40, 120 (qM)	No	Alnylam	TTRSC02-DSM15-028 CTD: 4.2.3.2-1
Monkey, Cynomolgus	SC	13 weeks	0, 100, 300 (qM)	No	[redacted]	TTRSC02-DSM15-027 CTD: 4.2.3.2-5
Repeat-Dose Toxicity – Pivotal						
Rat, Sprague Dawley	SC	13 weeks	0, 12, 40, 120 (qM)	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP15-026 CTD: 4.2.3.2-2
Rat, Sprague Dawley	SC	6 months	0, 15, 50, 150 (qM)	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP15-040 CTD: 4.2.3.2-3
Rat, Sprague Dawley	SC	6 months	0, 5, 50 (qM); 10, 50 (q3M)	No	Alnylam	TTRSC02-DSM17-011 CTD: 4.2.3.2-4

表 2.6.7-1 毒性試験一覧表（続き）

Overview					Test Article: Vutrisiran	
Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number Location in CTD
Monkey, Cynomolgus	SC	13 weeks	0, 30, 100, 300 (qM)	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP15-025 CTD: 4.2.3.2-6
Monkey, Cynomolgus	SC	9 months	0, 30, 100, 300 (qM)	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP15-039 CTD: 4.2.3.2-7
Genotoxicity – *In Vitro*						
Reverse bacterial mutation assay in *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) and *Escherichia coli* (WP2 *uvr*A)	*In vitro* (plate incorporation method)	Incubation at 37°C for 52±4 hours	With and without S9 metabolic activation: 5.00, 16.0, 50.0, 160, 500, 1600, 5000 µg/plate	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP15-029 CTD: 4.2.3.3.1-1
Mammalian chromosomal aberration assay in cultured HPBLs	*In vitro*	Cells treated: 3 hours (±S9); 24 hours (-S9)	With and without S9 metabolic activation: 3.39, 4.84, 6.92, 9.89, 14.1, 20.2, 28.8, 41.2, 59.0, 84.0, 120, 172, 245, 350, 500 µg/mL	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP15-030 CTD: 4.2.3.3.1-2

表 2.6.7-1 毒性試験一覧表（続き）

Overview					Test Article: Vutrisiran	
Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number Location in CTD
Genotoxicity – *In Vivo*						
Rat, Sprague Dawley	SC	Single dose; harvest at 24 or 48 hours	M: 0, 500, 1000, 2000 F: 0, 2000	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP15-028 CTD: 4.2.3.3.2-1
Carcinogenicity – Non-Pivoral						
Mouse, Tg-rasH2 WT	SC	8 weeks	0, 500, 1000, 1500 (qM)	No	[redacted]	TTRSC02-DSM18-031 CTD: 4.2.3.4.2-1
Mouse, Tg-rasH2 WT and C57BL/6NTac	SC	12 weeks	0, 30, 100, 300 (qM)	No	[redacted]	TTRSC02-DSM16-032 CTD: 4.2.3.4.2-2
Mouse, CD-1	SC	13 weeks	0, 10, 25, 50 (qM)	No	[redacted]	TTRSC02-DSM19-009 CTD: 4.2.3.4.2-3
Carcinogenicity – Pivoral						
Rat, Sprague Dawley	SC	2 years	M: 0, 4.0, 7.5, 15 (qM); 15 (q3M) F: 0, 6.0, 12.5, 25 (qM); 25 (q3M)	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP18-003 CTD: 4.2.3.4.1-1

表 2.6.7-1 毒性試験一覧表（続き）

Overview					Test Article: Vutrisiran	
Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity – Non-Pivotal Studies						
Rat, Sprague Dawley	SC	**Vutrisiran:** PM: 3 doses; GD 6-17 **AD-59206:** PM: 3 doses; GD 6, 12, 17	**Vutrisiran:** PM: 0, 15, 50, 150 (qw); GD 6-17: 0, 3, 10, 30 (qd) **AD-59206:** PM: 30 (qw); GD 6, 12, and 17: 30 (qd)	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP16-013 CTD: 4.2.3.5.1-1
Rat, Sprague Dawley	SC	12 days	0, 3, 10, 30, 100 (qd)	No	Alnylam	TTRSC02-DSM18-011 CTD: 4.2.3.5.2-1
Rabbit, New Zealand White	SC	GD 7-19	0, 3, 10, 30 (qd)	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP16-012 CTD: 4.2.3.5.2-3

表 2.6.7-1 毒性試験一覧表（続き）

Overview					Test Article: Vutrisiran	
Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development (Pivotal)						
Rat, Sprague Dawley	SC	Prior to and during pairing, and on GD 6 (F only)	0, 15, 30, 70 (qw)	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP18-005 CTD: 4.2.3.5.1-2
Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development (Pivotal)						
Rat, Sprague Dawley	SC	GD 6-17	0, 3, 10, 30 (qd)	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP18-013 CTD: 4.2.3.5.2-2
Rabbit, New Zealand White	SC	GD 7-19	0, 3, 10, 30 (qd)	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP18-014 CTD: 4.2.3.5.2-4
Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Pre- and Postnatal Development (Pivotal)						
Rat, Sprague Dawley	SC	F_0: GD 7, 13, 19; LD 6, 12, 18	0, 5, 10, 20 (qd)	Yes	[redacted]	TTRSC02-GLP19-007 CTD: 4.2.3.5.3-1

表 2.6.7-1 毒性試験一覧表（続き）

Overview					Test Article: Vutrisiran	
Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number Location in CTD
Local Tolerance						
No dedicated studies conducted						
Other Toxicity Studies – Immunotoxicity						
Human whole blood	*In vitro*	Incubation for 20 to 24 hours	4 µg/mL	No	Alnylam	TTRSC02-DSM15-045 CTD: 4.2.3.7.2-1

Abbreviations: AD-59206=pharmacologically active mouse/rat surrogate; Alnylam=Alnylam Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, MA); [redacted]; CTD=common technical document; F=female; F_0=familial 0 (parent) generation; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; HPBL=human peripheral blood lymphocyte; LD=lactation day; M=male; PM=premating; q3M=once every 3 months; qd=once daily; qM=once monthly; qw=once weekly; SC=subcutaneous(ly); WT=wild type.

a Unless otherwise specified, for Repeat-Dose Toxicity, the highest no observed adverse effect level (NOAEL) is underlined.

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7-2 トキシコキネティクス試験の一覧表

Overview of Toxicokinetics Studies				**Test Article: Vutrisiran**	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)**	**GLP Compliance**	**Study Number Location in CTD**
Repeat-Dose Toxicity	Rat	SC	0, 40, 120 (qM)	Non-GLP	TTRSC02-DSM15-028 CTD: 4.2.3.2-1
	Rat	SC	0, 12, 40, 120 (qM)	GLP	TTRSC02-GLP15-026 CTD: 4.2.3.2-2
	Rat	SC	0, 15, 50, 150 (qM)	GLP	TTRSC02-GLP15-040 CTD: 4.2.3.2-3
	Rat	SC	0, 5, 50 (qM); 10, 50 (q3M)	Non-GLP	TTRSC02-DSM17-011 CTD: 4.2.3.2-4
	Monkey	SC	0, 100, 300 (qM)	Non-GLP	TTRSC02-DSM15-027 CTD: 4.2.3.2-5
	Monkey	SC	0, 30, 100, 300 (qM)	GLP	TTRSC02-GLP15-025 CTD: 4.2.3.2-6
	Monkey	SC	0, 30, 100, 300 (qM)	GLP	TTRSC02-GLP15-039 CTD: 4.2.3.2-7
Genotoxicity	Rat	SC	M: 0, 500, 1000, 2000 (single dose) F: 0, 2000 (single dose)	GLP	TTRSC02 GLP15-028 CTD: 4.2.3.3.2-1

表 2.6.7-2 トキシコキネティクス試験の一覧表（続き）

Overview of Toxicokinetics Studies				**Test Article: Vutrisiran**	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)**	**GLP Compliance**	**Study Number Location in CTD**
Carcinogenicity	Mouse	SC	0, 500, 1000, 1500 (qM)	Non-GLP	TTRSC02-DSM18-031 CTD: 4.2.3.4.2-1
	Mouse	SC	0, 30, 100, 300 (qM)	Non-GLP	TTRSC02-DSM16-032 CTD: 4.2.3.4.2-2
	Mouse	SC	0, 10, 25, 50 (qM)	Non-GLP	TTRSC02-DSM19-009 CTD: 4.2.3.4.2-3
	Rat	SC	M: 0, 4.0, 7.5, 15 (qM); 15 (q3M) F: 0, 6.0, 12.5, 25 (qM); 25 (q3M)	GLP	TTRSC02-GLP18-003 CTD: 4.2.3.4.1-1
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat	SC	**Vutrisiran**: PM:0, 15, 50, 150 (qw); GD 6-17: 0, 3, 10, 30 (qd) **AD-59206**: PM: 30 (qw); GD 6, 12, and 17: 30 (qd)	GLP	TTRSC02-GLP16-013 CTD: 4.2.3.5.1-1
	Rat	SC	0, 15, 30, 70 (qw)	GLP	TTRSC02-GLP18-005 CTD: 4.2.3.5.1-2
	Rat	SC	0, 3, 10, 30 (qd)	GLP	TTRSC02-GLP18-013 CTD: 4.2.3.5.2-2
	Rabbit	SC	0, 3, 10, 30 (qd)	GLP	TTRSC02-GLP16-012 CTD: 4.2.3.5.2-3

表 2.6.7-2 トキシコキネティクス試験の一覧表（続き）

Overview of Toxicokinetics Studies				**Test Article: Vutrisiran**	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)**	**GLP Compliance**	**Study Number Location in CTD**
	Rabbit	SC	0, 3, 10, 30 (qd)	GLP	TTRSC02-GLP18-014 CTD: 4.2.3.5.2-4
	Rat	SC	0, 5, 10, 20 (qd)	GLP	TTRSC02-GLP19-007 CTD: 4.2.3.5.3-1

Abbreviations: AD-59206=pharmacologically active mouse/rat surrogate; CTD=common technical document; F=female; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; M=male; PM=premating; q3M=once every 3 months; qd=once daily; qM=once monthly; qw=once weekly; SC=subcutaneous(ly).

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7-3 トキシコキネティクス試験成績（血漿中）の一覧

Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data								**Test Article: Vutrisiran**
Dose (mg/kg)	**Mouse**		**Rat**		**Rabbit**		**Monkey**	
	C_{max} (µg/mL)	**AUC (µg·h/mL)**	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC (µg·h/mL)**	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC (µg·h/mL)**	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC (µg·h/mL)**
Mean Plasma Vutrisiran C_{max} and AUC on Day 1								
3	-	-	0.266[a] 0.312[b]	0.458[a] 0.509[b]	0.620[c] 0.318[d]	2.04[c] 1.55[d]	-	-
4.0	-	-	0.642[u]	1.13[u]	-	-	-	-
5	-	-	0.292[e]	NC[e]	-	-	-	-
6.0	-	-	0.598[v]	1.42[v]	-	-	-	-
7.5	-	-	0.833[u]	2.27[u]	-	-	-	-
10	2.49[f]	4.52[f]	0.792[a] 1.00[b] 0.681[g]	1.26[a] 3.18[b] 2.83[g]	3.43[c] 1.84[d]	11.2[c] 7.28[d]	-	-
12	-	-	1.83[h]	4.37[h]	-	-	-	-
12.5	-	-	1.57[v]	5.08[v]	-	-	-	-
15	-	-	2.24[i] 3.08[u] 3.07[w]	7.26[i] 7.82[u] 8.46[w]	-	-	-	-
25	7.70[f]	15.8[f]	4.81[v] 5.04[x]	12.8[v] 12.4[x]	-	-	-	-

表 2.6.7-3 トキシコキネティクス試験成績（血漿中）の一覧（続き）

Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data								
	Test Article: Vutrisiran							
	Mouse		**Rat**		**Rabbit**		**Monkey**	
Dose (mg/kg)	**C_{max} (μg/mL)**	**AUC (μg·h/mL)**	**C_{max} (μg/mL)**	**AUC (μg·h/mL)**	**C_{max} (μg/mL)**	**AUC (μg·h/mL)**	**C_{max} (μg/mL)**	**AUC (μg·h/mL)**
30	8.15[j] 8.05[k]	98.0[j] 21.5[k]	7.10[a] 7.43[b]	25.4[a] 28.2[b]	17.4[c] 9.78[d]	76.7[c] 37.3[d]	10.9[l] 13.2[m]	64.0[l] 66.5[m]
40	-	-	8.73[h]	26.2[h]	-	-	-	-
50	21.0[f]	39.3[f]	6.20[e] 7.23[g] 13.2[i]	27.1[e] 29.4[g] 46.4[i]	-	-	-	-
100	29.1[k]	89.6[k]	-	-	-	-	25.1[l] 42.8[m] 34.6[n]	312[l] 433[m] 533[n]
120	-	-	29.0[h]	96.5[h]	-	-	-	-
150	-	-	42.4[i]	194[i]	-	-	-	-
300	94.3[j] 117[k]	1150[j] 386[k]	-	-	-	-	67.4[l] 90.9[m] 107[n]	1010[l] 1140[m] 3320[n]
500	-	-	102[o]	1220[o]	-	-	-	-
1000	-	-	173[o]	2150[o]	-	-	-	-
2000	-	-	267[o]	4370[o]	-	-	-	-

表 2.6.7-3 トキシコキネティクス試験成績（血漿中）の一覧（続き）

Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data							**Test Article: Vutrisiran**	
	Mouse		**Rat**		**Rabbit**		**Monkey**	
Dose (mg/kg)	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC (µg·h/mL)**	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC (µg·h/mL)**	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC (µg·h/mL)**	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC (µg·h/mL)**
Mean Plasma Vutrisiran C_{max} and AUC After the Last Dose								
3	-	-	0.253[a] 0.264[b]	1.33[a] 1.27[b]	0.629[c] 0.508[d]	1.47[c] 1.61[d]	-	-
4.0	-	-	0.419[u]	2.39[u]	-	-	-	-
5	-	-	0.259[e] 0.452[p]	3.26[e] 0.766[p]	-	-	-	-
6.0	-	-	0.876[v]	2.29[v]	-	-	-	-
7.5	-	-	0.847[u]	7.89[u]	-	-	-	-
10	2.12[f]	4.35[f]	0.640[a] 0.883[b] 0.828[g] 1.10[p]	2.87[a] 4.82[b] 4.33[g] 4.08[p]	2.26[c] 3.34[d]	9.27[c] 14.5[d]	-	-
12	-	-	1.64[h]	4.07[h]	-	-	-	-
12.5	-	-	1.60[v]	7.62[v]	-	-	-	-

表 2.6.7-3 トキシコキネティクス試験成績（血漿中）の一覧（続き）

Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data					**Test Article: Vutrisiran**			
	Mouse		**Rat**		**Rabbit**		**Monkey**	
Dose (mg/kg)	**C_{max} (μg/mL)**	**AUC (μg·h/mL)**	**C_{max} (μg/mL)**	**AUC (μg·h/mL)**	**C_{max} (μg/mL)**	**AUC (μg·h/mL)**	**C_{max} (μg/mL)**	**AUC (μg·h/mL)**
15	-	-	1.53[i] 2.51[q] 2.49[r] 1.77[u] 2.01[w]	8.91[i] 9.81[q] 7.76[r] 17.4[u] 16.6[w]	-	-	-	-
20	-	-	2.59[p]	8.61[p]	-	-	-	-
25	7.52[f]	17.8[f]	2.21[v] 2.54[x]	15.8[v] 26.9[x]	-	-	-	-
30	11.3[j] 9.96[k]	135[j] 36.1[k]	7.44[a] 8.11[q] 7.55[r] 6.13[b]	34.7[a] 42.4[q] 30.1[r] 29.1[b]	13.8[c] 12.9[d]	60.2[c] 67.4[d]	6.88[l] 8.53[m]	77.8[l] 86.0[m]
40	-	-	5.00[h] 10.5[s]	15.7[h] 75.7[s]	-	-	-	-

表 2.6.7-3 トキシコキネティクス試験成績（血漿中）の一覧（続き）

Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data								
Test Article: Vutrisiran								
	Mouse		**Rat**		**Rabbit**		**Monkey**	
Dose (mg/kg)	**C_{max} (μg/mL)**	**AUC (μg·h/mL)**	**C_{max} (μg/mL)**	**AUC (μg·h/mL)**	**C_{max} (μg/mL)**	**AUC (μg·h/mL)**	**C_{max} (μg/mL)**	**AUC (μg·h/mL)**
50	24.4[f]	55.4[f]	2.56[e] 7.90[g] 7.33[i]	18.0[e] 35.6[g] 43.8[i]	-	-	-	-
70	-	-	19.6[q] 17.6[r]	135[q] 75.7[r]	-	-	-	-
100	47.9[k]	157[k]	-	-	-	-	28.4[l] 29.1[m] 47.4[n]	345[l] 479[m] 425[n]
120	-	-	23.8[h] 24.1[s]	240[h] 235[s]	-	-	-	-
150	-	-	29.1[i]	331[i]	-	-	-	-
300	109[j] 133[k]	1330[j] 609[k]	-	-	-	-	60.1[l] 71.7[m] 82.8[n]	1360[l] 1170[m] 1570[n]
500	103[t]	435[t]	-	-	-	-	-	-
1000	165[t]	1040[t]	-	-	-	-	-	-
1500	207[t]	1060[t]	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7-3 トキシコキネティクス試験成績（血漿中）の一覧（続き）

Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data								
Test Article: Vutrisiran								
	Mouse		**Rat**		**Rabbit**		**Monkey**	
Dose (mg/kg)	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC (µg·h/mL)**	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC (µg·h/mL)**	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC (µg·h/mL)**	**C_{max} (µg/mL)**	**AUC (µg·h/mL)**

Abbreviations: - =not applicable; AUC=area under the concentration-time curve; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; NC=not calculable; q3M=once every 3 months; qM=once monthly; T_{max}=time to reach maximum concentration; WT=wild type.

Note: C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ are reported to 3 significant figures, therefore, these numbers may differ slightly to those reported in their respective source documents due to rounding.

a Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (females) obtained on Gestation Days 6 and 17 from pregnant rats in [TTRSC02-GLP16-013]. Vutrisiran was administered once weekly for 3 doses prior to mating at 15, 50, or 150 mg/kg and once daily from GD 6-17 at 3, 10, or 30 mg/kg. b Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (females) obtained on Gestation Days 6 and 17 from pregnant rats in [TTRSC02-GLP18-013]. c Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (females) obtained on Gestation Days 7 and 19 from pregnant rabbits in [TTRSC02-GLP16-012]. On Gestation Day 7, the dose concentration for the 3-mg/kg dose group was out of specification, with a mean of 113.8% of the target. The actual dose (3.41 mg/kg) was used for toxicokinetic calculations. d Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (females) obtained on Gestation Days 7 and 19 from pregnant rabbits in [TTRSC02-GLP18-014]. e Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (females; qM×7 dosing) obtained on Days 1 and 169 from rats in [TTRSC02-DSM17-011]. f Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Days 1 and 85 from CD-1 mice in [TTRSC02-DSM19-009]. g Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (females; q3M×3 dosing) obtained on Days 1 and 169 from rats in [TTRSC02-DSM17-011]. h Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Days 1 and 85 from rats in [TTRSC02-GLP15-026]. i Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Days 1 and 197 from rats in [TTRSC02-GLP15-040]. j Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Days 1 and 85 from Tg-rasH2 WT mice in [TTRSC02-DSM16-032]. k Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Days 1 and 85 from C57BL/6Tac mice in [TTRSC02-DSM16-032]. l Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Days 1 and 85 from monkeys in [TTRSC02-GLP15-025]. m Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Days 1 and 253 from monkeys in [TTRSC02-GLP15-039]. n Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (females) obtained on Days 1 and 85 from monkeys in [TTRSC02-DSM15-027]. o Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (500 and 1000 mg/kg males; 2000 mg/kg combined sexes) obtained on Day 1 from rats in [TTRSC02-GLP15-028]. p Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (females) obtained on Lactation Day 12 from pregnant rats in [TTRSC02-GLP19-007]. q Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (males) obtained on Day 14 from rats in [TTRSC02-GLP18-005]. r Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (females) obtained on Gestation Day 6 from pregnant rats in [TTRSC02-GLP18-005]. s Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (males) obtained on Day 85 from rats in [TTRSC02-DSM15-028]. t Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Day 57 from Tg-rasH2 WT mice in [TTRSC02-DSM18-031]. u Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (males; qM) obtained on Days 1 and 169 from rats in [TTRSC02-GLP18-003]. v Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (females; qM) obtained on Days 1 and 169 from rats in [TTRSC02-GLP18-003]. w Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (males; q3M) obtained on Days 1 and 169 from rats in [TTRSC02-GLP18-003]. x Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (females; q3M) obtained on Days 1 and 169 from rats in [TTRSC02-GLP18-003].

表 2.6.7-4 トキシコキネティクス試験成績（肝臓中）の一覧

Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data			**Test Article: Vutrisiran**	
Dose (mg/kg)	**Mouse**		**Rat**	
	C_{max} (µg/g)	**AUC (µg·h/g)**	**C_{max} (µg/g)**	**AUC (µg·h/g)**
Mean Liver Vutrisiran C_{max} and AUC				
12	-	-	130[a]	14,900[a]
15	-	-	229[b]	26,200[b]
30	143[d]; 221[e]	26,300[d]; 23,800[e]	-	-
40	-	-	386[a]	60,800[a]
50	-	-	589[b]	68,800[b]
100	201[e]	35,000[e]	-	-
120	-	-	963[a]	147,000[a]
150	-	-	819[b]	159,000[b]
300	287[d]; 449[e]	51,800[d]; 63,700[e]	-	-
500	660[c]	11,800[c]	-	-
1000	787[c]	14,000[c]	-	-

表 2.6.7-4 トキシコキネティクス試験成績（肝臓中）の一覧（続き）

Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data			**Test Article: Vutrisiran**	
	Mouse		**Rat**	
Dose (mg/kg)	**C_{max} (µg/g)**	**AUC (µg·h/g)**	**C_{max} (µg/g)**	**AUC (µg·h/g)**
1500	817[c]	15,600[c]	-	-

Abbreviations: - =not applicable; AUC=area under the concentration-time curve; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; T_{max}=time to reach maximum concentration; WT=wild type.

a Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Day 85 from rats in [TTRSC02-GLP15-026].

b Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Day197 from rats in [TTRSC02-GLP15-040].

c Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Day 57 from Tg-rasH2 WT mice in [TTRSC02-DSM18-031].

d Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Day 85 from Tg-rasH2 WT mice in [TTRSC02-DSM16-032].

e Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Day 85 from C57BL/6Tac mice in [TTRSC02-DSM16-032].

表 2.6.7-5 トキシコキネティクス試験成績（腎臓中）の一覧

Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data			**Test Article: Vutrisiran**	
	Mouse		**Rat**	
Dose (mg/kg)	**C_{max} (µg/g)**	**AUC (µg·h/g)**	**C_{max} (µg/g)**	**AUC (µg·h/g)**
Mean Kidney Vutrisiran C_{max} and AUC				
12	-	-	11.1[a]	7570[a]
15	-	-	29.8[b]	12,000[b]
30	8.37[c]; 19.0[d]	1580[c]; 2290[d]	-	-
40	-	-	53.9[a]	25,600[a]
50	-	-	177[b]	80,200[b]
100	69.1[d]	8080[d]	-	-
120	-	-	288[a]	125,000[a]
150	-	-	730[b]	306,000[b]
300	114[c]; 212[d]	20,500[c]; 27,500[d]	-	-

Abbreviations: - =not applicable; AUC=area under the concentration-time curve; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; T_{max}=time to reach maximum concentration; WT=wild type.

a Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Day 85 from rats in [TTRSC02-GLP15-026].

b Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Day197 from rats in [TTRSC02-GLP15-040].

c Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Day 85 from Tg-rasH2 WT mice in [TTRSC02-DSM16-032].

d Data represent C_{max} and $AUC_{0\text{-}t(last)}$ (combined sexes) obtained on Day 85 from C57BL/6Tac mice in [TTRSC02-DSM16-032].

2.6.7.4 毒性試験：被験物質一覧

表 2.6.7-6 被験物質一覧（Vutrisiran）

Toxicology: Drug Substance					Test Article: Vutrisiran
Drug Product Batch/Lot Number	Analytical Method	Purity (%)	Specified Impurities (%)	Study Number	Type of Study
[redacted]	[redacted] 方法A*-HPLC[a]	99.4[a]	0.18[a]	TTRSC02-DSM15-028	13-week DRF repeat-dose toxicity in rats (non-GLP)
				TTRSC02-DSM15-027	13-week DRF repeat-dose toxicity in monkeys (non-GLP)
				TTRSC02-DSM15-045	*In vitro* cytokine induction in a human whole blood (non-GLP)
[redacted]	[redacted] LC/UV[b] [redacted] 方法A*-HPLC[c]	99.6[b] 99.7[c]	0.10[c]	TTRSC02-GLP15-026	13-week repeat-dose toxicity in rats with recovery (GLP)
				TTRSC02-GLP15-025	13-week repeat-dose toxicity in monkeys with recovery (GLP)
				TTRSC02-GLP15-029	Bacterial reverse mutation assay (GLP)
				TTRSC02-GLP15-030	Chromosome aberration assay (GLP)
				TTRSC02-GLP15-028	Mammalian erythrocyte micronucleus test in rats (GLP)
				TTRSC02-GLP16-013	DRF developmental toxicity in rats (GLP)
				TTRSC02-GLP16-012	DRF developmental toxicity in rabbits (GLP)

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7-6 被験物質一覧（Vutrisiran）（続き）

Toxicology: Drug Substance					Test Article: Vutrisiran
Drug Product Batch/Lot Number	Analytical Method	Purity (%)	Specified Impurities (%)	Study Number	Type of Study
[redacted]	[redacted] LC/UV[d] [redacted] 方法A*-HPLC[e]	99.7[d] 99.8[e]	0.00[e]	TTRSC02-GLP15-040	6-month repeat-dose toxicity in rats (GLP)
				TTRSC02-GLP15-039	9-month repeat-dose toxicity in monkeys (GLP)
				TTRSC02-DSM16-032	12-week DRF repeat-dose toxicity in mice (non-GLP)
				TTRSC02-DSM17-011	6-month repeat-dose toxicity in rats (non-GLP)
				TTRSC02-DSM18-011	12-day DRF repeat-dose toxicity in rats (non-GLP)
				TTRSC02-DSM18-031	8-week DRF repeat-dose toxicity in mice (non-GLP)
				TTRSC02-GLP18-005	FEED study in rats (GLP)
				TTRSC02-GLP18-013	EFD study in rats (GLP)
				TTRSC02-GLP18-014	EFD study in rabbits (GLP)
[redacted]	[redacted] LC/UV[f] [redacted] 方法A*-HPLC[g]	98.5[f] 97.7[g]	1.2[g]	TTRSC02-DSM19-009	13-week DRF repeat-dose toxicity in mice (non-GLP)
				TTRSC02-GLP19-007	PPND study in rats (GLP)

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7-6 被験物質一覧（Vutrisiran）（続き）

Toxicology: Drug Substance					Test Article: Vutrisiran
Drug Product Batch/Lot Number	Analytical Method	Purity (%)	Specified Impurities (%)	Study Number	Type of Study
[redacted]	[redacted] LC/UV[h] [redacted] 方法A*-HPLC[i]	99.5[h] 99.7[i]	0.00[i]	TTRSC02-GLP18-003	2-year carcinogenicity study in rats (GLP)

Abbreviations: DRF=dose range-finding; EFD=embryo-fetal development; FEED=fertility and early embryonic development; GLP=Good Laboratory Practice; 方法A*-HPLC=[redacted] high-performance liquid chromatography; LC/UV=liquid chromatography/ultraviolet; PPND=prenatal and postnatal development.

a Reported values based on Certificate of Testing issued on [redacted] 20[redacted].

b Reported values based on Certificate of Analysis issued on [redacted] 20[redacted].

c Reported values based on Certificate of Testing issued on [redacted] 20[redacted] and [redacted] 20[redacted]

d Reported values based on Certificate of Analysis issued on [redacted] 20[redacted].

e Reported values based on Certificate of Testing issued on [redacted] 20[redacted], [redacted] 20[redacted], [redacted] 20[redacted], [redacted] 20[redacted], and [redacted] 20[redacted].

f Reported values based on Certificate of Analysis issued on [redacted] 20[redacted].

g Reported values based on Certificate of Testing issued on [redacted] 20[redacted].

h Reported value based on Certificate of Analysis issued on [redacted] 20[redacted].

i Reported values based on Certificate of Testing issued on [redacted] 20[redacted].

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7-7 被験物質一覧（AD-59206）

Toxicology: Drug Substance					Test Article: AD-59206
Drug Product Batch/Lot Number	Analytical Method	Purity (%)	Specified Impurities (%)	Study Number	Type of Study
[redacted]	[redacted] LC/UV[a] [redacted] 方法A*-HPLC[b]	99.6[a] 99.3[b]	NR	TTRSC02-GLP16-013	DRF developmental toxicity in rats (GLP)

Abbreviations: AD-59206=pharmacologically active mouse/rat surrogate; DRF=dose range-finding; GLP=Good Laboratory Practice;方法A*-HPLC=[redacted]high-performance liquid chromatography; LC/UV=liquid chromatography/ultraviolet; NR=not reported.

a Reported values based on Certificate of Analysis issued on [redacted] 20[redacted].

b Reported values based on Certificate of Testing issued on [redacted] 20[redacted].

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.7.5 **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。

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

表 2.6.7-8 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies						**Test Article: Vutrisiran**	
Species/ Strain	**Method of Admin. (Vehicle)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Sex and No. Per Group**	**NOAEL (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number Location in CTD**
Rat/ Sprague Dawley	SC injection (Vehicle/Control 0.9% NaCl)	13 weeks	0, 40, 120 (qM)[a]	6M/group	120[b]	No DLTs at doses ≤120 mg/kg. Slight decreased BW gain (5% and 13%) at 40 and 120 mg/kg. Minimal-to-mild centrilobular and midzonal to multifocal mixed microvesicular and macrovesicular hepatocellular vacuolation at ≥40 mg/kg. Minimal basophilic granules in the proximal renal tubular epithelium at 120 mg/kg. Minimal-to-mild mononuclear infiltrates with vacuolated macrophages in SC injection sites at ≥40 mg/kg. **TK on Day 85 at 40 and 120 mg/kg, respectively:** Mean plasma C_{max}=10.5, 24.1 µg/mL $AUC_{0\text{-}t(last)}$=75.7, 235 µg·h/mL Mean liver concentration 427, 700 µg/g Mean kidney concentration 116, 433 µg/g	[TTRSC02-DSM15-028] CTD: 4.2.3.2-1

表 2.6.7-8 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies						**Test Article: Vutrisiran**	
Species/ Strain	**Method of Admin. (Vehicle)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Sex and No. Per Group**	**NOAEL (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number Location in CTD**
Monkey/ Cynomolgus	SC injection (Vehicle/Control 0.9% NaCl)	13 weeks	0, 100, 300 (qM)[c]	3F/group	300[d]	Mild dermal irritation (edema) was noted on Day 1 in animals dosed at ≥100 mg/kg. Microscopic findings in liver (basophilic granules in Kupffer cells and/or hepatocytes at 300 mg/kg), and injection sites (eosinophil and/or macrophage infiltrates, which occasionally were vacuolated or contained basophilic granules at ≥100 mg/kg) were minor and non-adverse. **TK on Day 85 at 100 and 300 mg/kg, respectively:** Mean plasma C_{max}=47.4, 82.8 µg/mL $AUC_{0\text{-}t(last)}$=425, 1570 µg·h/mL Mean liver concentration 1344, 2404 µg/g	[TTRSC02-DSM15-027] CTD: 4.2.3.2-5

表 2.6.7-8 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies						**Test Article: Vutrisiran**	
Species/ Strain	**Method of Admin. (Vehicle)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Sex and No. Per Group**	**NOAEL (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number Location in CTD**
						Mean kidney concentration 97.4, 430 µg/g	

Abbreviations: 0.9%NaCl=0.9% Sodium Chloride for Injection, USP; Admin.=administration; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BW=body weight; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; DLTs=dose-limiting toxicities; F=female; M=male; No.=number; NOAEL=no observed adverse effect level; qM=once monthly; SC=subcutaneous(ly); TK=toxicokinetic(s); T_{max}=time to reach maximum concentration; USP=United States Pharmacopeia.

a Animals were dosed once monthly on Days 1, 29, 57, and 85 at a volume of 5 mL/kg.

b A NOAEL was not identified in this study. The highest dose level (120 mg/kg) was identified as being well tolerated by male Sprague Dawley rats.

c Animals were dosed once monthly on Days 1, 29, 57, and 85 at a volume of 1.5 mL/kg.

d A NOAEL was not identified in this study. The highest dose level (300 mg/kg) was identified as being well tolerated by female cynomolgus monkeys.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

表 2.6.7-9 ラットにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats with a 12-week Recovery Phase					**Test Article: Vutrisiran**			
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley		**Duration of Dosing: 13 weeks**			**Study No.: [TTRSC02-GLP15-026]**			
Initial Age: 6 to 7 weeks		**Duration of Postdose: 12 weeks**			**Location in CTD: 4.2.3.2-2**			
Date of First Dose: 08 September 2015		**Method of Administration: SC injection**			**GLP Compliance: Yes**			
Special Features: Dermal irritation scoring		**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**						
No Observed Adverse Effect Level: 120 mg/kg								
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**12**		**40**		**120**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals								
Main Study	10	10	10	10	10	10	10	10
Recovery	5	5	5	5	5	5	5	5
Toxicokinetics	6	6	27	27	27	27	27	27
Toxicokinetics - Plasma:								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	2.28	1.37	10.7	7.51	38.8	26.4
Day 85	BLQ	BLQ	2.27	1.01	5.48	4.83	26.4	21.1
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	4.63	4.10	30.8	21.7	115	78.4
Day 85	BLQ	BLQ	4.85	3.30	16.6	14.8	267	69.0

表 2.6.7-9 ラットにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats with a 12-week Recovery Phase					**Study No.: TTRSC02-GLP15-026** **Location in CTD: 4.2.3.2-2**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**12**		**40**		**120**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Toxicokinetics - Liver:								
C_{max} (µg/g) Day 85	BLQ	BLQ	140	141	393	379	1020	906
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/g) Day 85	BLQ	BLQ	17,900	11,500	57,500	64,100	135,000	161,000
Toxicokinetics - Kidney:								
C_{max} (µg/g) Day 85	BLQ	BLQ	12.5	9.75	60.4	47.4	316	281
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/g) Day 85	BLQ	BLQ	8630	6310	25,800	25,300	129,000	121,000
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-	-	1[b]	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)[c] Day 85	531 g	309 g	1	-2	4	-2	-6	-3
Body Weight Change (g) Day 1 to 85	331	143	336	136	351	138	307	133
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7-9 ラットにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats with a 12-week Recovery Phase					**Study No.: TTRSC02-GLP15-026 Location in CTD: 4.2.3.2-2**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**12**		**40**		**120**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Dermal Irritation Scoring	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology								
Number Examined	10	10	10	10	10	10	9	10
Subcutaneous Injection Site D								
Discolored, dark red or red	0	0	0	0	0	1	1	0
Histopathology								
Number Evaluated	10	10	10	10	10	10	9	10
Kidney								
Basophilic granules								
Minimal	0	0	0	0	5	3	1	0
Slight	0	0	0	0	0	0	8	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	7

表 2.6.7-9 ラットにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats with a 12-week Recovery Phase					**Study No.: TTRSC02-GLP15-026** **Location in CTD: 4.2.3.2-2**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**12**		**40**		**120**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Liver								
Focus of alteration, basophilic								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2
Mitosis, hepatocyte, increased								
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	1
Necrosis, individual hepatocyte								
Minimal	0	0	0	0	0	0	5	0
Vacuolation, hepatocyte								
Minimal	0	0	0	0	4	0	3	4
Slight	0	0	0	0	2	0	5	0
Lymph Node, Inguinal								
Vacuolation, macrophages[d]								
Minimal	0	0	0	2	3	1	6	6
Subcutaneous Injection Site D								
Infiltrate, mixed cell								
Minimal	0	0	5	4	1	0	1	5
Slight	0	0	0	1	0	0	1	0

表 2.6.7-9 ラットにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats with a 12-week Recovery Phase					**Study No.: TTRSC02-GLP15-026** **Location in CTD: 4.2.3.2-2**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**12**		**40**		**120**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Vacuolation, macrophages Minimal	0	0	2	1	0	4	1	1
Postdose Evaluation:								
Number Evaluated	5	5	5	5	5	5	5	5
Body Weight Change (g) Recovery Day 1 to 83	145	54	122	64	170	62	126	67
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Number Evaluated	5	5	5	5	5	5	5	5
Liver								
Vacuolation, hepatocyte Minimal	0	0	0	0	4	0	2	2

表 2.6.7-9 ラットにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats with a 12-week Recovery Phase					**Study No.: TTRSC02-GLP15-026** **Location in CTD: 4.2.3.2-2**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**12**		**40**		**120**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Focus of alteration, basophilic								
Minimal	1	1	0	0	0	1	0	5

Abbreviations: - =no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL plasma; <100 ng/g liver or kidney); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; M=male; No.=number; SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration; USP=United States Pharmacopeia.

a Animals were dosed once monthly on Days 1, 29, 57, and 85 of the dosing phase at a volume of 2 mL/kg.

b One toxicity male was found dead on Day 14 of the dosing phase. No vutrisiran-related clinical observations or changes in body weight or food consumption were noted. Moderate liver necrosis was considered the cause of death. Inflammation with fibroplasia was observed in the thoracic cavity on the mesothelial surface of the sternum and heart sections. Liver necrosis was considered secondary to these thoracic findings, which were of unknown origin. This death was not considered vutrisiran-related because these microscopic observations were not observed in any other animals and the animal died 2 weeks after a single dose.

c For control(s), group mean is shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.

d Males given 0, 12, 40, and 120 mg/kg only had 9 inguinal lymph nodes examined for each group.

表 2.6.7-10 ラットにおける皮下投与による 6 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験

Report Title: ALN-TTRSC02: A 6-Month Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Sprague-Dawley Rats					**Test Article: Vutrisiran**			
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Duration of Dosing: 29 weeks**				**Study No.: [TTRSC02-GLP15-040]**			
Initial Age: 6 to 7 weeks	**Duration of Postdose: N/A**				**Location in CTD: 4.2.3.2-3**			
Date of First Dose: 14 January 2016	**Method of Administration: SC injection**				**GLP Compliance: Yes**			
Special Features: Dermal irritation scoring, ADA	**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**							
No Observed Adverse Effect Level: 150 mg/kg								
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals								
Main Study	15	15	15	15	15	15	15	15
Toxicokinetics	9	9	40	40	40	40	40	40
Toxicokinetics - Plasma:								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	2.37	2.11	16.4	10.5	48.1	37.7
Day 197	BLQ	BLQ	1.84	1.23	9.59	6.35	28.9	30.0
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	7.53	6.99	54.9	38.0	219	169
Day 197	BLQ	BLQ	10.8	7.04	58.1	29.6	399	155

表 2.6.7-10 ラットにおける皮下投与による 6 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 6-Month Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Sprague-Dawley Rats					**Study No.: TTRSC02-GLP15-040** **Location in CTD: 4.2.3.2-3**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Toxicokinetics - Liver:								
C_{max} (µg/g)								
Day 1	BLQ	BLQ	185	161	390	443	727	826
Day 197	BLQ	BLQ	218	241	557	621	689	949
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/g)								
Day 1	BLQ	BLQ	23,500	26,200	55,600	61,600	132,000	198,000
Day 197	BLQ	BLQ	27,100	25,200	64,200	73,300	139,000	178,000
Toxicokinetics - Kidney:								
C_{max} (µg/g)								
Day 1	BLQ	BLQ	10.5	8.37	73.0	69.9	185	251
Day 197	BLQ	BLQ	41.7	18.0	201	154	841	618
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/g)								
Day 1	BLQ	BLQ	4180	3670	22,100	23,300	64,600	95,800
Day 197	BLQ	BLQ	16,100	7850	83,500	76,900	259,000	354,000
Anti-drug Antibody (number confirmed positive)	0	0	0	0	0	0	0	0

表 2.6.7-10 ラットにおける皮下投与による 6 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 6-Month Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Sprague-Dawley Rats					**Study No.: TTRSC02-GLP15-040** **Location in CTD: 4.2.3.2-3**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	1[b]	0	1[b]	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)[c]								
Day 197	777 g	387 g	-9	0	-13*	+6	-18*	-5
Body Weight Change (g)								
Day 1 to 197	554	210	484	211	452*	230	421*	193
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Dermal Irritation Scoring Site D								
Day 197								
Edema, Very Slight[d]	0	0	0	0	4	0	8	9
Erythema, Very Slight[d]	0	0	0	0	2	2	0	2
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry								

表 2.6.7-10 ラットにおける皮下投与による 6 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 6-Month Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Sprague-Dawley Rats					**Study No.: TTRSC02-GLP15-040 Location in CTD: 4.2.3.2-3**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Day 198								
Total protein (g/dL)	-	8.7	-	8.3*	-	8.1*	-	8.0*
Albumin (g/dL)	4.2	5.9	4.2	5.7	4.5*	5.7*	4.5*	5.6*
Globulin (g/dL)	3.1	2.8	3.0	2.6	2.7*	2.4*	2.6*	2.4*
Albumin:globulin ratio	1.3	-	1.4	-	1.7*	-	1.8*	-
Calcium (mg/dL)	-	12.5	-	12.4	-	12.2*	-	12.3*
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Number Evaluated	15	15	15	15	15	15	14	15
Liver								
Vacuolation, hepatocyte								
Minimal	0	0	5	0	8	2	7	5
Slight	0	0	1	0	3	0	5	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0

表 2.6.7-10 ラットにおける皮下投与による 6 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 6-Month Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Sprague-Dawley Rats					**Study No.: TTRSC02-GLP15-040 Location in CTD: 4.2.3.2-3**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Mitosis, hepatocyte, increased								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	6
Karyomegaly, hepatocyte								
Minimal	0	0	0	0	1	0	3	8
Focus, cellular alteration, mixed cell								
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	0
Focus, cellular alteration, basophilic								
Minimal	0	0	0	0	1	9	0	13
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Focus, cellular alteration, eosinophilic								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	2
Kidney								
Vacuolation, tubule cell								
Minimal	0	0	0	0	2	0	4	2

表 2.6.7-10 ラットにおける皮下投与による 6 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 6-Month Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Sprague-Dawley Rats					**Study No.: TTRSC02-GLP15-040 Location in CTD: 4.2.3.2-3**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Basophilic granulates								
Minimal	0	0	0	0	14	15	1	0
Slight	0	0	0	0	0	0	13	14
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Subcutaneous Injection Site A								
Infiltrate, macrophages, vacuolated								
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	0
Subcutaneous Injection Site B								
Infiltrate, macrophages, vacuolated								
Minimal	0	0	1	1	3	9	8	8
Subcutaneous Injection Site C								
Infiltrate, macrophages, vacuolated								
Minimal	0	0	0	1	1	1	1	1

表 2.6.7-10 ラットにおける皮下投与による 6 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 6-Month Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Sprague-Dawley Rats					**Study No.: TTRSC02-GLP15-040 Location in CTD: 4.2.3.2-3**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**15**		**50**		**150**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Subcutaneous Injection Site D								
Infiltrate, macrophages, vacuolated								
Minimal	0	0	9	9	11	14	10	13
Slight	0	0	0	0	0	0	2	0

Abbreviations: - =no noteworthy findings; ADA=anti-drug antibody; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL plasma; <100 ng/g liver or kidney); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; M=male; N/A=not applicable; No.=number; SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration; USP=United States Pharmacopeia.

Note: *=p≤0.05 (ANOVA and Dunnett's test). Note: Statistically significant based on actual data, not on percent difference.

a Animals were dosed by SC injection into the dorsal region at a dose volume of 2 mL/kg, based on the most recently recorded scheduled body weight, on Days 1, 29, 57, 85, 113, 141, 169, and 197 of the dosing phase (total of 8 doses).

b One toxicity male administered 150 mg/kg died immediately after removal from its cage on Day 57 before dosing, the cause of death was undetermined, although, it was unlikely the death was vutrisiran-related. One toxicokinetic male administered 50 mg/kg died following dosing on Day 57; clinical observations included irregular respiration, twitching of the entire body, red oral discharge, and red skin on the nose. The clinical observations were not consistent with those immediately following a SC dose, and similar clinical observations had not been noted previously with vutrisiran; as such, this death was not considered to be vutrisiran-related.

c For control(s), group mean is shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.

d Numbers indicate number of animals noted with the finding, regardless of time point.

表 2.6.7-11 ラットにおける皮下投与による探索的 6 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験

Report Title: ALN-TTRSC02: A 6-Month Investigative Repeat Subcutaneous Dose Study With a 3-Month Recovery Phase to Determine the Effects of Dosing Schedule on Hepatic Foci Formation in Female Sprague Dawley Rats				**Test Article: Vutrisiran**	
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Duration of Dosing: 6 months**			**Study No.: [TTRSC02-DSM17-011]**	
Initial Age: 8 weeks	**Duration of Postdose: 3 months**			**Location in CTD: 4.2.3.2-4**	
Date of First Dose: 26 July 2018	**Method of Administration: SC injection**			**GLP Compliance: No**	
Special Features: None	**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**				
No Observed Adverse Effect Level: N/A					
Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**	**5 (qM×7)**	**50 (qM×7)**	**10 (q3M×3)**	**50 (q3M×3)**
Sex	**F**	**F**	**F**	**F**	**F**
Number of Animals					
Main Study	10	10	10	10	10
Recovery	6	6	6	6	6
Toxicokinetics - Plasma:					
C_{max} (µg/mL)					
Day 1	BLQ	0.292	6.196	0.681	7.227
Day 169	BLQ	0.259	2.559	0.828	7.901
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)					
Day 1	BLQ	NC	27.064	2.825	29.412
Day 169	BLQ	3.259	18.009	4.326	35.550
Liver Concentration (ng/g)					
Day170	BLQ	32,591	302,331	44,465	186,802

表 2.6.7-11 ラットにおける皮下投与による探索的 6 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 6-Month Investigative Repeat Subcutaneous Dose Study With a 3-Month Recovery Phase to Determine the Effects of Dosing Schedule on Hepatic Foci Formation in Female Sprague Dawley Rats				**Study No.: TTRSC02-DSM17-011** **Location in CTD: 4.2.3.2-4**	
Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**	**5 (qM×7)**	**50 (qM×7)**	**10 (q3M×3)**	**50 (q3M×3)**
Sex	**F**	**F**	**F**	**F**	**F**
Day254	BLQ	BLQ	3949	153	311
Kidney Concentration (ng/g)					
Day170	BLQ	4336	82,579	6714	69,436
Day254	BLQ	168	728	181	1166
Noteworthy Findings:					
Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-
Histopathology					
Number Evaluated	10	10	10	10	10

表 2.6.7-11 ラットにおける皮下投与による探索的 6 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 6-Month Investigative Repeat Subcutaneous Dose Study With a 3-Month Recovery Phase to Determine the Effects of Dosing Schedule on Hepatic Foci Formation in Female Sprague Dawley Rats				**Study No.: TTRSC02-DSM17-011** **Location in CTD: 4.2.3.2-4**	
Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**	**5 (qM×7)**	**50 (qM×7)**	**10 (q3M×3)**	**50 (q3M×3)**
Sex	**F**	**F**	**F**	**F**	**F**
Liver					
Foci of cellular alteration, basophilic					
Minimal	0	0	1	0	1
Foci of cellular alteration, amphophilic					
Minimal	0	0	1	0	0
Mild	0	0	0	0	1
Mitosis, hepatocyte, increased					
Minimal	0	0	1	1	1
Mild	0	0	0	1	1
Vacuolation, hepatocyte					
Minimal	2	1	3	1	1
Mild	1	0	0	1	0
Postdose Evaluation:					
Number Evaluated	6	6	6	6	6

表 2.6.7-11 ラットにおける皮下投与による探索的 6 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 6-Month Investigative Repeat Subcutaneous Dose Study With a 3-Month Recovery Phase to Determine the Effects of Dosing Schedule on Hepatic Foci Formation in Female Sprague Dawley Rats				**Study No.: TTRSC02-DSM17-011** **Location in CTD: 4.2.3.2-4**	
Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**	**5 (qM×7)**	**50 (qM×7)**	**10 (q3M×3)**	**50 (q3M×3)**
Sex	**F**	**F**	**F**	**F**	**F**
Histopathology					
Number Evaluated	6	6	6	6	6
Liver					
Foci of cellular alteration, basophilic					
Minimal	0	2	3	0	2
Foci of alteration, clear cell					
Minimal	1	0	1	0	0
Mitosis, hepatocyte, increased					
Minimal	0	0	0	1	1
Vacuolation, hepatocyte					
Minimal	0	2	2	2	1
Mild	1	0	1	0	0

Abbreviations: - =no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<10 ng/mL plasma; <100 ng/g liver or kidney); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; N/A=not applicable; NC=not calculable, only one time point concentration was above the lower limit of quantitation therefore $AUC_{0\text{-}t(last)}$ could not be accurately determined; No.=number; q3M=once every 3 months; qM=once monthly; SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration.

a Animals were dosed qM (on Days 1, 29, 57, 85, 113, 141, and 169) or q3M (on Days 1, 85, and 169) at a volume of 5 mL/kg.

表 2.6.7-12 サルにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase					**Test Article: Vutrisiran**			
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing: 13 weeks**			**Study No.: [TTRSC02-GLP15-025]**			
Initial Age: 30 to 47 months		**Duration of Postdose: 12 weeks**			**Location in CTD: 4.2.3.2-6**			
Date of First Dose: 10 September 2015		**Method of Administration: SC injection**			**GLP Compliance: Yes**			
Special Features: Dermal irritation scoring, PD, neurological examinations		**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**						
No Observed Adverse Effect Level: 300 mg/kg								
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals								
Main Study	5	5	5	5	5	5	5	5
Toxicokinetics - Plasma:								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	9.49	12.3	26.5	23.6	69.1	65.6
Day 85	BLQ	BLQ	7.41	6.22	27.7	29.0	60.6	59.6
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	66.3	61.6	336	288	1080	947
Day85	BLQ	BLQ	75.7	80.4	344	347	1040	1680
Liver Concentration (µg/g) - Combined Sexes								
Day86	BLQ		550		1248		1943	
Day169	BLQ		98.0		273		352	

表 2.6.7-12 サルにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase					**Study No.: TTRSC02-GLP15-025** **Location in CTD: 4.2.3.2-6**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Kidney Concentration (µg/g) - Combined Sexes								
Day86	BLQ		16.6		83.4		210	
Day169	BLQ		1.47		1.18		4.11	
Pharmacodynamics (Serum TTR) (µg/mL)								
Baseline TTR Predose Day -2	289.774	294.574	330.704	304.952	291.128	284.888	330.186	303.556
Baseline TTR Predose Day -1	333.708	273.832	314.388	290.162	278.738	303.870	296.482	314.928
Day 5 Predose	282.254	307.280	179.816†	161.036‡	162.632†	179.806‡	156.246‡	189.532‡
Day 85 Predose	250.314	283.316	5.450§	5.575‡	5.573	5.820‡	5.838§	5.638‡
Day 84 of Recovery Phase	299.930	281.170	5.600	6.110	6.110	5.525	3.985	6.050
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1[b]	1[c]	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption - Qualitative	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Dermal Irritation Scoring	-	-	-	-	-	-	-	-
Neurological Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Physical Examination	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7-12 サルにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase					**Study No.: TTRSC02-GLP15-025** **Location in CTD: 4.2.3.2-6**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry								
Thyroxine (µg/dL)								
Day 86	6.0	5.9	3.9*	3.4*	3.6*	3.9*	4.0*	4.6
Day 84 of Recovery Phase	6.1	5.6	4.0	3.1	2.3	2.7	2.7	4.2
Vitamin A (µg/mL)								
Day 85	0.29	0.36	0.04*	0.04*	0.06*	0.03*	0.04*	0.04*
Day 84 of Recovery Phase	0.28	0.24	0.05	0.06	0.06	0.06	0.07	0.06
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Number Evaluated[d]	3	3	3	4[e]	4[e]	3[f]	3	3

表 2.6.7-12 サルにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase					**Study No.: TTRSC02-GLP15-025** **Location in CTD: 4.2.3.2-6**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Liver								
Basophilic granules, Kupffer cell								
Minimal	0	0	0	0	3	2	1	1
Slight	0	0	0	0	0	1	2	2
Lymph Node, Axillary								
Vacuolation, macrophage								
Minimal	0	0	0	0	2	1	1	1
Slight	0	0	0	0	1	2	2	2
Lymph Node, Inguinal								
Vacuolation, macrophage								
Minimal	0	0	0	0	3	1	1	0
Slight	0	0	0	0	0	1	2	3
Lymph Node, Mandibular								
Vacuolation, macrophage								
Minimal	0	0	0	0	3	2	1	1
Slight	0	0	0	0	1	1	2	2

表 2.6.7-12 サルにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase					**Study No.: TTRSC02-GLP15-025** **Location in CTD: 4.2.3.2-6**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Lymph Node, Mesenteric								
Vacuolation, macrophage								
Minimal	0	0	1	2	0	0	0	0
Slight	0	0	0	1	2	3	1	0
Moderate	0	0	0	0	2	0	2	3
Postdose Evaluation:								
Number Evaluated	2	2	2	1	1	2	2	2
Histopathology								
Number Evaluated	2	2	2	1	1	2	2	2
Liver								
Basophilic granules, Kupffer cell								
Minimal	0	0	0	0	1	0	2	2
Lymph Node, Axillary								
Vacuolation, macrophage								
Minimal	0	0	0	0	0	2	0	2

表 2.6.7-12 サルにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase					**Study No.: TTRSC02-GLP15-025** **Location in CTD: 4.2.3.2-6**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Lymph Node, Inguinal Vacuolation, macrophage Minimal	0	0	0	0	0	1	0	2
Lymph Node, Mandibular Vacuolation, macrophage Minimal	0	0	0	0	0	1	0	2

表 2.6.7-12 サルにおける皮下投与による 13 週間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 13-Week Repeat Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Cynomolgus Monkeys with a 12-Week Recovery Phase					**Study No.: TTRSC02-GLP15-025** **Location in CTD: 4.2.3.2-6**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Lymph Node, Mesenteric								
Vacuolation, macrophage								
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0
Slight	0	0	1	1	0	2	2	2

Abbreviations: - =no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL plasma; <100 ng/g liver or kidney); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; M=male; No.=number; PD=pharmacodynamic(s); SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration; TTR=transthyretin; USP=United States Pharmacopeia.

Note: *=p≤0.05 (ANOVA and Dunnett's test). Statistically significant based on actual data (not on percent difference); †=mean serum TTR concentrations significantly different from control (Group 1) values (p≤0.01[Dunnett test]); ‡=mean serum TTR concentrations significantly different from control (Group 1) values (p≤0.001[Dunnett test]); §=mean serum TTR concentrations significantly different from control (Group 1) values (p≤0.05[Dunn test]).

a Animals were dosed once monthly on Days 1, 29, 57, and 85 of the dosing phase at a volume of 1.5 mL/kg.

b One female given 30 mg/kg was sacrificed before dosing on Day 57 of the dosing phase due to continued self-injury of the right upper arm following aggressive behavior by a cage mate. This unscheduled death was not considered vutrisiran-related because it occurred in the low-dose group and was as a consequence of initial aggressive behavior by a cage mate.

c One male given 100 mg/kg was sacrificed on Day 54 of the dosing phase with blood and mucus in its feces and a very low body temperature. Despite veterinary intervention, the condition of the animal continued to deteriorate before its sacrifice. Fecal culture indicated a heavy growth of campylobacter species. This unscheduled death was not considered vutrisiran-related because it occurred in the mid-dose group and similar findings were not noted for the high-dose group.

d Includes animals that were sacrificed at an unscheduled interval.

e n=3 animals examined for axillary and inguinal lymph nodes.

f n=2 animals examined for inguinal lymph nodes.

表 2.6.7-13 サルにおける 9 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験

Report Title: ALN-TTRSC02: A 9-Month Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Cynomolgus Monkeys					**Test Article: Vutrisiran**			
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing: 9 months**			**Study No.: [TTRSC02-GLP15-039]**			
Initial Age: 26 to 38 months		**Duration of Postdose: N/A**			**Location in CTD: 4.2.3.2-7**			
Date of First Dose: 14 January 2016		**Method of Administration: SC injection**			**GLP Compliance: Yes**			
Special Features: Dermal irritation scoring, ADA, PD, vitamin A, neurological examinations, ERG		**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**						
No Observed Adverse Effect Level: 300 mg/kg								
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals								
Main Study	4	4	4	4	4	4	4	4
Toxicokinetics - Plasma:								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	14.4	12.1	36.4	49.2	97.6	84.2
Day 253	BLQ	BLQ	9.16	7.91	24.7	33.4	71.4	72.1
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	71.1	61.8	427	440	1170	1100
Day 253	BLQ	BLQ	86.6	85.3	396	561	1180	1160
Liver Concentration (µg/g)								
Day 282	BLQ	BLQ	1007	962	2407	1896	3759	3105

表 2.6.7-13 サルにおける 9 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 9-Month Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Cynomolgus Monkeys					**Study No.: TTRSC02-GLP15-039** **Location in CTD: 4.2.3.2-7**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Kidney Concentration (µg/g)								
Day 282	BLQ	BLQ	13.6	12.8	85.8	89.0	277	327
Anti-drug Antibody (number confirmed positive)								
Predose	1	0	0	1	1	0	0	0
Day 29	0	0	0	0	1	0	0	0
Day253	0	0	0	1	1	3	0	0
Pharmacodynamics (Serum TTR) (µg/mL)								
Day 5	320.228	311.228	181.673†	151.023‡	147.015‡	145.538‡	146.053‡	153.165‡
Day 85	231.085	250.933	6.178	5.075	5.395§	4.913§	5.563§	5.400
Day169	264.805	262.700	5.743	4.520	4.978§	4.360	5.088§	5.590
Day 281	263.355	237.285	5.285	4.190§	4.520§	4.280§	4.708§	4.895
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)[b]								
Day 1	2.3 kg	2.6 kg	0	-8	0	-4	0	-8
Day 85	2.5 kg	2.6 kg	4	0	0	0	0	-4
Day 169	3.1 kg	3.0 kg	-6	0	-13	+3	-10	-10

表 2.6.7-13 サルにおける 9 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 9-Month Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Cynomolgus Monkeys					**Study No.: TTRSC02-GLP15-039** **Location in CTD: 4.2.3.2-7**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Day 281	3.4 kg	3.0 kg	-9	+3	-15	+7	-15	-7
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Dermal Irritation Scoring	-	-	-	-	-	-	-	-
Neurological Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Physical Examination	-	-	-	-	-	-	-	-
Electroretinography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry Day 281/282								
Thyroxine (µg/dL)	5.1	6.4	4.1	4.1*	3.9	3.4*	4.2	3.9*
Vitamin A (µg/mL)	0.676	0.574	0.063*	0.076*	0.065*	0.071*	0.063*	0.076*
Alkaline phosphatase (U/L)	560	293	487	248	738	513*	915*	472
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7-13 サルにおける 9 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 9-Month Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Cynomolgus Monkeys					**Study No.: TTRSC02-GLP15-039** **Location in CTD: 4.2.3.2-7**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Histopathology								
Number Evaluated	4	4	4	4	4	4	4	4
Liver								
Basophilic granules, hepatocyte								
Minimal	0	0	0	3	4	4	4	4
Basophilic granules, Kupffer cell								
Minimal	0	0	0	3	4	4	3	2
Slight	0	0	0	0	0	0	1	2
Lymph Node, Mandibular								
Infiltrate, macrophages, vacuolated								
Minimal	0	0	0	0	1	3	2	4
Lymph Node, Mesenteric								
Infiltrate, macrophages, vacuolated								
Minimal	0	0	4	2	4	3	3	2

表 2.6.7-13 サルにおける 9 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 9-Month Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Cynomolgus Monkeys					**Study No.: TTRSC02-GLP15-039** **Location in CTD: 4.2.3.2-7**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Slight	0	0	0	0	0	1	1	1
Lymph Node, Axillary								
Infiltrate, macrophages, vacuolated Minimal	0	0	1	1	1	4	4	4
Lymph Node, Inguinal								
Number Examined	4	4	4	4	4	3	4	4
Infiltrate, macrophages, vacuolated Minimal	0	0	0	0	3	2	4	4
Subcutaneous Injection Site A								
Infiltrate, macrophages, vacuolated Minimal	0	0	1	0	1	1	1	2
Subcutaneous Injection Site B								
Infiltrate, macrophages, vacuolated								

表 2.6.7-13 サルにおける 9 ヵ月間反復投与毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 9-Month Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics Study in Cynomolgus Monkeys					**Study No.: TTRSC02-GLP15-039** **Location in CTD: 4.2.3.2-7**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Minimal	0	0	0	1	3	0	2	1
Subcutaneous Injection Site C								
Infiltrate, macrophages, vacuolated Minimal	0	0	3	2	4	4	2	4
Subcutaneous Injection Site D								
Infiltrate, macrophages, vacuolated Minimal	0	0	0	1	1	1	2	4

Abbreviations: - =no noteworthy findings; ADA=anti-drug antibody; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL plasma; <100 ng/g liver or kidney); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; ERG=electroretinography; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; M=male; N/A=not applicable; No.=number; PD=pharmacodynamic(s); SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration; TTR=transthyretin; USP=United States Pharmacopeia.

Note: *=p≤0.05 (ANOVA and Dunnett's test). Statistical significance based on actual data (not on percent difference).

†=mean serum TTR concentrations significantly different from control (Group 1) value (p≤0.01 [Dunnett test]); ‡=mean serum TTR concentrations significantly different from control (Group 1) value (p≤0.001 [Dunnett test]); §=mean serum TTR concentrations significantly different from control (Group 1) value (p≤0.05[Dunn test]).

a Animals were dosed once monthly on Days 1, 29, 57, 85, 113, 141, 169, 197, 225, 253, and 281 of the dosing phase at a volume of 1 5 mL/kg.

b For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.

2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験

表 2.6.7-14 細菌を用いた復帰突然変異試験

Report Title: ALN-TTRSC02: Bacterial Reverse Mutation Assay		**Test Article: Vutrisiran**
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**No. of Independent Assays: 1**	**Study No.: [TTRSC02-GLP15-029]**
Strains: *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537); *Escherichia coli* (WP2 *uvr*A)	**No. of Replicate Cultures: 3**	**Location in CTD: 4.2.3.3.1-1** **GLP Compliance: Yes**
Metabolizing System: Aroclor™-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture: ~10^8**	**Date of Treatment: 07 October 2015**
Vehicle for Test Article: 0.9% NaCl	**Vehicle for Positive Control: Deionized water (sodium azide only); DMSO (all other PCs)**	
Treatment: Plate incorporation method, with final incubation of 52±4 hours at 37°C		
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Revertant Colony Counts (Mean±SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvr*A**
Without S9 Activation	0.9% NaCl	0	36 ± 4 N	97 ± 2 N	16 ± 7 N	22 ± 1 N M	25 ± 13 N
	Vutrisiran	5.00	35 ± 4 N	96 ± 9 N	13 ± 2 N	18 ± 10 N	19 ± 5 N
		16.0	32 ± 12 N	99 ± 13 N	11 ± 1 N	24 ± 4 N	25 ± 8 N
		50.0	34 ± 7 N	90 ± 12 N	13 ± 6 N	25 ± 9 N	20 ± 9 N
		160	38 ± 9 N	94 ± 5 N	11 ± 1 N M	30 ± 9 N	24 ± 5 N
		500	36 ± 1 N	88 ± 18 N	12 ± 5 N	27 ± 7 N	22 ± 4 N
		1600	34 ± 10 N	95 ± 6 N	12 ± 6 N	21 ± 5 N M	27 ± 8 N
		5000	34 ± 6 N	89 ± 6 N	13 ± 5 N M	27 ± 5 N	23 ± 6 N

表 2.6.7-14 細菌を用いた復帰突然変異試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Bacterial Reverse Mutation Assay			**Study No.: TTRSC02-GLP15-029** **Location in CTD: 4.2.3.3.1-1**				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Revertant Colony Counts (Mean±SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvr*A**
	sodium azide	2.0	-	1124 ± 30 N	711 ± 35 N	-	-
	ICR-191	2.0	-	-	-	375 ± 31 N	-
	4-nitroquinoline-N-oxide	1.0	-	-	-	-	325 ± 20 N
	2-nitrofluorene	1.0	162 ± 17 N	-	-	-	-
With S9 Activation	0.9% NaCl	0	28 ± 9 N	105 ± 16 N	15 ± 4 N	19 ± 7 N	28 ± 4 N
	Vutrisiran	5.00	38 ± 7 N	126 ± 14 N	9 ± 4 N M	18 ± 7 N	21 ± 6 N
		16.0	29 ± 6 N	113 ± 6 N	12 ± 3 N	15 ± 2 N	20 ± 8 N
		50.0	35 ± 9 N M	105 ± 10 N	13 ± 8 N	20 ± 7 N	22 ± 9 N
		160	39 ± 9 N M	107 ± 10 N	9 ± 3 N	20 ± 6 N	24 ± 5 N
		500	39 ± 2 N M	108 ± 16 N	15 ± 2 N	22 ± 5 N	29 ± 5 N
		1600	28 ± 2 N	116 ± 13 N	10 ± 5 N	24 ± 4 N	22 ± 4 N
		5000	34 ± 5 N	113 ± 5 N	16 ± 5 N	20 ± 3 N	23 ± 8 N
	benzo[a]pyrene	2.5	379 ± 13 N	-	-	-	-
	2-aminoanthracene	2.5	-	1791 ± 141 N	200 ± 13 N	189 ± 20 N	-
	2-aminoanthracene	25.0	-	-	-	-	421 ± 50 N

Abbreviations: 0.9% NaCl=0.9% Sodium Chloride for Injection, USP; CTD=common technical document; DMSO=dimethyl sulfoxide; GLP=Good Laboratory Practice; M=plate counted manually; N=normal background bacterial lawn; No.=number; PC=positive control; SD=standard deviation; USP=United States Pharmacopeia.

表 2.6.7-15 哺乳類細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

Report Title: ALN-TTRSC02: *In Vitro* Human Lymphocyte Chromosome Aberration Assay		**Test Article: Vutrisiran**
Test for Induction of: Chromosome aberrations	**No. of Independent Assays: 1**	**Study No.: [TTRSC02-GLP15-030]**
Strains: Primary human lymphocytes	**No. of Replicate Cultures: 2**	**Location in CTD: 4.2.3.3.1-2**
Metabolizing System: Aroclor™-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture: 300 (or ≥15 if >15% cells with aberrations)**	**GLP Compliance: Yes** **Date of Treatment: 04 November 2015**
Vehicle for Test Article: 0.9% NaCl	**Vehicle for Positive Control: Deionized water**	
Treatment: Continuous 24 hour without S9; pulse treatment 3 hour and recovery time 21 hour with and without S9		
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/mL)**	**Total Cells Analyzed**	**MIH (%)[a]**	**% Cells with Aberrations Excluding Gaps**	**Significance**	**%P+E (mean)**
Without S9 Activation (24-hour treatment)	0.9% NaCl	100 µL/mL	300	-	0.00	-	0.0
	Vutrisiran	245	300	16	0.00	NS	0.0
		350	300	34	0.00	NS	0.0
		500	300	30	0.33	NS	0.0
	Mitomycin C	0.300	105	63	57.1	P≤0.001	0.0
Without S9 Activation (3-hour treatment)	0.9% NaCl	100 µL/mL	300	-	0.00	-	0.0
	Vutrisiran	245	300	0	0.67	NS	0.3
		350	300	22	0.00	NS	0.0
		500	300	2	1.00	NS	0.0
	Mitomycin C	1.00	99	44	60.6	P≤0.001	0.0

表 2.6.7 15 哺乳類細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: *In Vitro* Human Lymphocyte Chromosome Aberration Assay						**Study No.: TTRSC02-GLP15-030** **Location in CTD: 4.2.3.3.1-2**	
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/mL)**	**Total Cells Analyzed**	**MIH (%)[a]**	**% Cells with Aberrations Excluding Gaps**	**Significance**	**%P+E (mean)**
With S9 Activation (3-hour treatment)	0.9% NaCl	100 µL/mL	300	-	0.00	-	0.0
	Vutrisiran	245	300	1	0.00	NS	0.0
		350	300	0	0.33	NS	0.0
		500	300	5	0.67	NS	0.0
	Cyclophosphamide	15.0	121	58	49.6	P≤0.001	0.3

Abbreviations: - =not applicable; 0.9% NaCl=0.9% Sodium Chloride for Injection, USP; CTD=common technical document; E=endoreduplication; GLP=Good Laboratory Practice; MI=mitotic index; MIH=mitotic index inhibition; NS=not significant; No.=number; P=polyploidy; USP=United States Pharmacopeia.

a MIH (%) = [1 - (mean MI_T/mean MI_C)] × 100% (where T=treatment and C=vehicle control).

2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験

表 2.6.7-16 ラットの骨髄細胞を用いた *in vivo* 小核試験

Report Title: ALN-TTRSC02: *In Vivo* Rat Bone Marrow Micronucleus Assay					**Test Article: Vutrisiran**		
Test for Induction of: Bone marrow micronuclei					**Study No.: [TTRSC02-GLP15-028]**		
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Treatment Schedule: Single dose**				**Location in CTD: 4.2.3.3.2-1**		
Age: 8 weeks	**Sampling Time: 24 and 48 hours postdose**				**GLP Compliance: Yes**		
Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes	**Method of Administration: SC injection**				**Date of Dosing: 10 November 2015**		
No. of Cells Analyzed/Animal: 4000	**Vehicle/Formulation: 0.9% NaCl (for vutrisiran); Deionized water (for positive control)**						
Special Features: Plasma TK							
Toxic/Cytotoxic Effects: No							
Genotoxic Effects: No							
Sex	**Male**					**Female**	
Dose (mg/kg)	**60[a] (CP; +control)**	**0**	**500**	**1000**	**2000**	**0**	**2000**
Number of Animals							
Main (24-h time point)	5	5	5	5	5	5	5
Main (48-h time point)	N/A	5	5	5	5	5	5
Toxicokinetics	N/A	3	9	9	9	3	9
Toxicokinetics – Plasma[b]:							
C_{max} (µg/mL)	N/A	-	102	173	293	-	241
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	N/A	-	1220	2150	5240	-	3230

表 2.6.7 16 ラットの骨髄細胞を用いた *in vivo* 小核試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: *In Vivo* Rat Bone Marrow Micronucleus Assay						**Study No.: TTRSC02 GLP15-028** **Location in CTD: 4.2.3.3.2-1**	
				Mean % PCEs		**Mean % MN-PCEs (±SD)**	
Test Article	**Dose (mg/kg)**	**No. of Males**	**Harvest Time (hours)**	**24-hour harvest**	**48-hour harvest**	**24-hour harvest**	**48-hour harvest**
0.9% NaCl	0	5	24 and 48	46.00	43.88	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.02
Vutrisiran	500	5	24 and 48	45.20	43.24	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.02
	1000	5	24 and 48	41.88	46.32	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.02
	2000	5	24 and 48	45.60	43.36	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.03
Cyclophosphamide[a]	60	5	24	40.52	-	1.06 ± 0.13*	-
				Mean % PCEs		**Mean % MN-PCEs (±SD)**	
Test Article	**Dose (mg/kg)**	**No. of Females**	**Harvest Time (hours)**	**24-hour harvest**	**48-hour harvest**	**24-hour harvest**	**48-hour harvest**
0.9% NaCl	0	5	24 and 48	45.56	44.84	0.04 ± 0.05**	0.04 ± 0.02
Vutrisiran	2000	5	24 and 48	45.20	45.32	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.03

Abbreviations: 0.9% NaCl=0.9% Sodium Chloride for Injection, USP; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CP=cyclophosphamide monohydrate (positive control); CTD=common technical document; GLP=Good Laboratory Practice; MN-PCE=micronucleated PCEs; N/A=not applicable; No.=number; PCEs=polychromatic erythrocytes; SC=subcutaneous(ly); SD=standard deviation; TK=toxicokinetic(s); T_{max}=time to reach maximum concentration; USP=United States Pharmacopeia.

Note: Dunnett's Test: *=Significantly different than the corresponding vehicle control, p≤0.001; **=Significantly different than the corresponding vehicle control, p≤0.05. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.

a Positive control animals (ie, CP-treated) received a single oral gavage dose approximately 24 hours before bone marrow harvest.

b Blood samples were collected from vutrisiran-treated animals at approximately 0.083, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, and 48 hours postdose on Day 1. Blood samples were collected from vehicle control animals at 1 hour postdose on Day 1. All values for the vehicle control group were below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL).

2.6.7.10 がん原性試験

表 2.6.7-17 Tg-rasH2 野生型マウスにおける皮下投与による 8 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験

Report Title: ALN-TTRSC02: An 8-Week Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in 001178-W (Wild Type) RasH2 Mice					**Test Article: Vutrisiran**			
Species/Strain: Mouse/Tg-rasH2 WT		**Duration of Dosing: 8 weeks**			**Study No.: [TTRSC02-DSM18-031]**			
Initial Age: 8 to 9 weeks		**Duration of Postdose: N/A**			**Location in CTD: 4.2.3.4.2-1**			
Date of First Dose: 24 September 2018		**Method of Administration: SC injection**			**GLP Compliance: No**			
Special Features: None		**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**						
No Observed Adverse Effect Level: 1500 mg/kg (MTD)								
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**500**		**1000**		**1500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals								
Main Study	10	10	10	10	10	10	10	10
Toxicokinetics	6	6	18	18	18	18	18	18
Toxicokinetics - Plasma:								
C_{max} (µg/mL)								
Day 57	BLQ	BLQ	112	94.7	181	161	235	179
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)								
Day 57	BLQ	BLQ	504	366	1330	600	1330	787
Toxicokinetics - Liver:								
C_{max} (µg/g)								
Day 57	BLQ	BLQ	650	670	836	738	773	860

表 2.6.7-17 Tg-rasH2 野生型マウスにおける皮下投与による 8 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: An 8-Week Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in 001178-W (Wild Type) RasH2 Mice					**Study No.: TTRSC02-DSM18-031** **Location in CTD: 4.2.3.4.2-1**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**500**		**1000**		**1500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·h/g) Day 57	BLQ	BLQ	11,800	11,800	13,900	14,100	13,900	17,300
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry								
Alanine aminotransferase (U/L)	50	42	111*	56	106*	90	84	43
Alkaline phosphatase (U/L)	76	-	85	-	86	-	101*	-
Globulin (g/dL)	1.6	1.3	1.3*	1.1*	1.2*	1.2	1.3*	1.1*
Cholesterol (mg/dL)	139	86	66*	54*	65*	51*	67*	52*
Albumin:Globulin (ratio)	2.3	2.9	2.9*	3.4	3.0*	3.0	2.7	3.3
Organ Weights								
Liver/gallbladder (%)[b]	1.61 g	1.19 g	128*	116*	124*	116*	121*	112
Body Weight Ratio (%)[b]	4.83	4.72	122*	112*	120*	112*	114*	110*

表 2.6.7-17 Tg-rasH2 野生型マウスにおける皮下投与による 8 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: An 8-Week Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in 001178-W (Wild Type) RasH2 Mice					**Study No.: TTRSC02-DSM18-031 Location in CTD: 4.2.3.4.2-1**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**500**		**1000**		**1500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Brain Weight Ratio (%)[b]	332	239	128*	115*	122*	115*	119*	114
Adrenal gland (%)[b]	0.0061 g	-	162*	-	169*	-	128	-
Body Weight Ratio (%)[b]	0.0183	-	159*	-	163*	-	122	-
Brain Weight Ratio (%)[b]	1.27	-	161*	-	165*	-	125	-
Gross Pathology								
Number Examined	10	10	10	10	10	10	10	10
Liver								
Discolored	0	0	9	8	8	3	8	4
Histopathology								
Liver								
Number Evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10
Vacuolation, hepatocyte								
Minimal	0	0	0	3	0	1	0	0
Slight	0	0	0	4	0	8	2	7
Moderate	0	0	10	3	10	1	8	3
Enlargement/swelling, hepatocellular								
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	0
Slight	0	0	1	0	0	3	4	0

表 2.6.7-17 Tg-rasH2 野生型マウスにおける皮下投与による 8 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: An 8-Week Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in 001178-W (Wild Type) RasH2 Mice					**Study No.: TTRSC02-DSM18-031** **Location in CTD: 4.2.3.4.2-1**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**500**		**1000**		**1500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Moderate	0	0	9	0	10	0	6	0
Lymph Node, Axillary								
Number Evaluated	6	7	4	7	7	8	7	9
Infiltrate, macrophages, vacuolated								
Minimal	0	0	2	1	2	4	0	3
Slight	0	0	0	0	3	4	7	4
Lymph Node, Inguinal								
Number Evaluated	8	7	6	9	6	8	7	8
Infiltrate, macrophages, vacuolated								
Minimal	0	0	4	7	3	5	4	5
Slight	0	0	2	0	3	1	2	0
Subcutaneous Injection Site								
Number Evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10
Infiltrate, macrophages, vacuolated								
Minimal	0	0	8	3	7	2	9	0
Slight	0	0	0	7	0	7	0	10
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0

表 2.6.7-17 Tg-rasH2 野生型マウスにおける皮下投与による 8 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: An 8-Week Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in 001178-W (Wild Type) RasH2 Mice					**Study No.: TTRSC02-DSM18-031 Location in CTD: 4.2.3.4.2-1**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**500**		**1000**		**1500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Adrenal Gland								
Number Evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10
Hyperplasia, subcapsular cell								
Minimal	0	5	0	4	0	3	0	2
Slight	0	3	0	5	0	6	0	8

Abbreviations: - =no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL plasma; 100 ng/g liver); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; M=male; MTD=maximum tolerated dose; N/A=not applicable; No.=number; SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration; USP=United States Pharmacopeia.

Note: *=p≤0.05 (ANOVA and Dunnett's test). Note: Statistically significant based on actual data, not on percent difference.

a Animals were dosed once monthly on Days 1, 29, and 57 of the dosing phase at a volume of 10 mL/kg.

b At the end of the dosing period. For control(s), group mean is shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.

表 2.6.7-18 Tg-rasH2 野生型及び C57BL/6 マウスにおける皮下投与による 12 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験

Report Title: ALN-TTRSC02: A 12-Week Subcutaneous Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic: Wild Type and C57BL/6NTac Mice		**Test Article: Vutrisiran**
Species/Strain: Mouse/Tg-rasH2 WT and C57BL/6	**Duration of Dosing: 12 weeks**	**Study No.: [TTRSC02-DSM16-032]**
Initial Age: 8 to 9 weeks	**Duration of Postdose: N/A**	**Location in CTD: 4.2.3.4.2-2**
Date of First Dose: 23 August 2016	**Method of Administration: SC injection**	**GLP Compliance: No**
Special Features: None	**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**	

No Observed Adverse Effect Level: >300 mg/kg (MTD)

Species/Strain	**Tg-rasH2 WT Mice**								**C57BL/6 Mice**							
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**		**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals																
Toxicity	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	10	10	10	10	10	10
Toxicokinetics	0	0	15	15	0	0	15	15	7	7	31	31	31	31	31	31
Toxicokinetics - Plasma:																
C_{max} (µg/mL)																
Day 1	N/A	N/A	11.4	4.85	N/A	N/A	108	81.1	BLQ	BLQ	7.49	8.60	32.5	25.7	102	132
Day 85	N/A	N/A	10.2	12.3	N/A	N/A	138	80.2	BLQ	BLQ	14.8	5.12	61.8	34.0	159	108

表 2.6.7-18 Tg-rasH2 野生型及び C57BL/6 マウスにおける皮下投与による 12 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 12-Week Subcutaneous Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic: Wild Type and C57BL/6NTac Mice									**Study No.: TTRSC02-DSM16-032** **Location in CTD: 4.2.3.4.2-2**							
Species/Strain	**Tg-rasH2 WT Mice**								**C57BL/6 Mice**							
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**		**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·h/mL)																
Day 1	N/A	N/A	138	58.4	N/A	N/A	1300	990	BLQ	BLQ	23.7	19.3	96.7	82.5	386	385
Day 85	N/A	N/A	122	148	N/A	N/A	1680	986	BLQ	BLQ	52.5	19.7	211	103	707	512
Toxicokinetics - Liver																
C_{max} (μg/g)																
Day 1	N/A	N/A	131	124	N/A	N/A	322	371	BLQ	BLQ	152	107	336	267	233	283
Day 85	N/A	N/A	132	154	N/A	N/A	281	293	BLQ	BLQ	224	218	205	198	444	454
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·h/g)																
Day 1	N/A	N/A	25,300	22,700	N/A	N/A	60,300	66,700	BLQ	BLQ	20,200	14,500	31,600	33,300	46,700	46,200
Day 85	N/A	N/A	24,500	28,100	N/A	N/A	51,000	52,500	BLQ	BLQ	22,700	24,900	39,800	30,300	69,500	58,000
Toxicokinetics - Kidney																
C_{max} (μg/g)																
Day 1	N/A	N/A	7.38	4.18	N/A	N/A	74.2	88.5	BLQ	BLQ	8.50	7.50	37.0	37.5	146	120

表 2.6.7-18 Tg-rasH2 野生型及び C57BL/6 マウスにおける皮下投与による 12 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 12-Week Subcutaneous Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic: Wild Type and C57BL/6NTac Mice									**Study No.: TTRSC02-DSM16-032 Location in CTD: 4.2.3.4.2-2**							
Species/Strain	**Tg-rasH2 WT Mice**								**C57BL/6 Mice**							
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**		**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Day 85	N/A	N/A	7.32	9.43	N/A	N/A	107	122	BLQ	BLQ	19.3	18.7	87.6	50.5	216	208
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·h/g)																
Day 1	N/A	N/A	760	859	N/A	N/A	9940	17,800	BLQ	BLQ	635	782	2920	4130	9670	13,200
Day 85	N/A	N/A	1550	1620	N/A	N/A	16,100	24,800	BLQ	BLQ	2330	2260	7880	8280	24,300	30,700
Noteworthy Findings:																
Died or Sacrificed Moribund	1[b]	0	0	1[b]	0	0	0	0	0	0	0	1[b]	1[b]	1[b]	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7-18 Tg-rasH2 野生型及び C57BL/6 マウスにおける皮下投与による 12 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 12-Week Subcutaneous Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic: Wild Type and C57BL/6NTac Mice									**Study No.: TTRSC02-DSM16-032** **Location in CTD: 4.2.3.4.2-2**							
Species/Strain	**Tg-rasH2 WT Mice**								**C57BL/6 Mice**							
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**		**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry																
Total protein (g/dL)	-	-	-	-	-	-	-	-	4.8	4.7	4.4*	4.3*	4.3*	4.3*	4.4*	4.4*
Albumin (g/dL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.5	-	3.3*	-	3.3*	-	3.3*
Globulin (g/dL)	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	1.2	1.1*	1.0	1.0*	1.0*	1.1*	1.1
Albumin:globulin (ratio)	-	-	-	-	-	-	-	-	2.4	3.0	3.1*	3.2	3.2*	3.5	3.0*	3.1
Cholesterol (mg/dL)	-	-	-	-	-	-	-	-	130	79	34*	31*	26*	26*	40*	31*
Triglycerides (mg/dL)	-	-	-	-	-	-	-	-	56	-	32*	-	37*	-	34*	-
Alanine aminotransferase (U/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	53	29	106*	70*	102*	73*	127*	65*
Calcium (mg/dL)	-	-	-	-	-	-	-	-	9.8	9.5	9.4*	9.1*	9.3*	9.3	9.5	9.7

表 2.6.7-18 Tg-rasH2 野生型及び C57BL/6 マウスにおける皮下投与による 12 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 12-Week Subcutaneous Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic: Wild Type and C57BL/6NTac Mice									**Study No.: TTRSC02-DSM16-032** **Location in CTD: 4.2.3.4.2-2**							
Species/Strain	**Tg-rasH2 WT Mice**								**C57BL/6 Mice**							
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**		**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Organ Weights																
Liver/gallbladder (%)[c]	1.6808 g	1.1376 g	119	119	117	118	119	139*	1.5785 g	1.1013 g	122*	127*	120*	112	126*	120*
Body Weight Ratio (%)[c]	4.9735	4.4660	115*	117*	116*	123*	121*	128*	5.0563	5.0019	120*	120*	123*	112*	125*	117*
Brain Weight Ratio (%)[c]	347.9858	227.6974	119	114	116	116	119	134	357.6535	234.6777	117	128*	114	111	120*	118*
Gross Pathology																
Number Examined	5	5	5	4	5	5	5	5	10	10	10	9	10	10	10	10
Liver																
Discoloration, tan	0	0	4	0	2	2	1	2	0	0	8	5	5	3	4	1
Histopathology																
Number Examined	5	5	5	4	5	5	5	5	10	10	10	10	10	10	10	10

表 2.6.7-18 Tg-rasH2 野生型及び C57BL/6 マウスにおける皮下投与による 12 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 12-Week Subcutaneous Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic: Wild Type and C57BL/6NTac Mice									**Study No.: TTRSC02-DSM16-032** **Location in CTD: 4.2.3.4.2-2**							
Species/Strain	**Tg-rasH2 WT Mice**								**C57BL/6 Mice**							
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**		**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Liver																
Vacuolation, hepatocyte																
Minimal	0	0	0	4[d]	0	2	0	2	0	0	1	5[e]	2	6	0	1
Slight	0	0	0	0	2	3	1	1	0	0	5	5	6	4	2	8
Moderate	0	0	5	0	3	0	4	2	0	0	4	0	1	0	8	1
Subcutaneous Injection Site																
Infiltrate, macrophage, vacuolated																
Minimal	0	0	0	2	1	1	2	1	0	1	1	5	3	4	3	4
Slight	0	0	0	2	1	1	0	1	0	0	0	4	0	3	0	4
Moderate	0	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0	1	0	1

表 2.6.7-18 Tg-rasH2 野生型及び C57BL/6 マウスにおける皮下投与による 12 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 12-Week Subcutaneous Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic: Wild Type and C57BL/6NTac Mice								**Study No.: TTRSC02-DSM16-032 Location in CTD: 4.2.3.4.2-2**							
Species/Strain	**Tg-rasH2 WT Mice**								**C57BL/6 Mice**							
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**		**0 (Control)**		**30**		**100**		**300**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Vacuolation, fibroblast																
Minimal	0	0	1	2	3	1	4	0	0	0	1	5	6	3	5	3
Slight	0	0	0	2	1	4	1	3	0	0	0	4	0	6	0	5
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Abbreviations: - =no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<10.0 ng/mL plasma; 100 ng/g liver or kidney); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; M=male; MTD=maximum tolerated dose; N/A=not applicable; No.=number; SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration; USP=United States Pharmacopeia.

Note: *=p≤0.05 (ANOVA and Dunnett's test). Note: Statistically significant based on actual data, not on percent difference.

a Animals were dosed once monthly on Days 1, 29, 57, and 85 of the dosing phase at a volume of 10 mL/kg. b One Tg-rasH2 WT toxicity female administered 30 mg/kg was found dead on Day 10 (cause of death was considered accidental). One C57BL/6 toxicity female administered 30 mg/kg died accidentally on Day 8 shortly after becoming trapped between the lixit hole in the cage and the lixit, and one C57BL/6 TK male and one C57BL/6 TK female administered 100 mg/kg were sacrificed on Days 64 and 53, respectively, due to marked skin lesions at several body locations, although none of these were at the dose site, and were unrelated to vutrisiran. One control Tg-rasH2 WT toxicity male was sacrificed on Day 1 after having a clonic convulsion, followed by clinical observations of limited use of the hind legs, labored respiration and hunched appearance; however, this animal was replaced. None of these deaths were related to vutrisiran. c At the end of the dosing period. For control(s), group mean is shown. For treated groups, percent difference from controls is shown. d Number includes 3 terminal sacrifice and 1 unscheduled death Tg-rasH2 WT toxicity females. e Number includes 4 terminal sacrifice and 1 unscheduled death C57BL/6 toxicity females.

表 2.6.7-19 CD-1 マウスにおける皮下投与による 13 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験

Report Title: ALN-TTRSC02: A 13-Week Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in CD-1 Mice					**Test Article: Vutrisiran**			
Species/Strain: Mouse/CD-1		**Duration of Dosing: 13 weeks**			**Study No.: [TTRSC02-DSM19-009]**			
Initial Age: 6 to 7 weeks		**Duration of Postdose: N/A**			**Location in CTD: 4.2.3.4.2-3**			
Date of First Dose: 25 July 2019		**Method of Administration: SC injection**			**GLP Compliance: No**			
Special Features: None		**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**						
No Observed Adverse Effect Level: 50 mg/kg (MTD)								
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**10**		**25**		**50**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals								
Main Study	10	10	10	10	10	10	10	10
Toxicokinetics	6	6	39	39	39	39	39	39
Toxicokinetics - Plasma:								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	2.92	2.19	8.37	7.16	25.0	23.7
Day 85	BLQ	BLQ	2.80	1.47	8.55	6.48	25.1	23.6
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)								
Day 1	BLQ	BLQ	4.69	4.35	17.8	13.1	40.4	36.3
Day 85	BLQ	BLQ	5.42	3.28	20.2	13.8	59.2	45.5
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	1[b]	0	1[b]
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7-19 CD-1 マウスにおける皮下投与による 13 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 13-Week Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in CD-1 Mice					**Study No.: TTRSC02-DSM19-009 Location in CTD: 4.2.3.4.2-3**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**10**		**25**		**50**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Dermal Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry								
Total protein (g/dL)	5.2	-	4.9	-	4.6*	-	4.7*	-
Albumin (g/dL)	3.7	-	3.5	-	3.4*	-	3.4*	-
Cholesterol (mg/dL)	223	128	142*	86*	86*	66*	99*	75*
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology								
Number Examined	10	10	10	10	10	9	10	10
Liver								
Discolored	0	0	1	0	0	0	1	0
Histopathology								
Number Evaluated	10	10	10	10	10	9	10	10

表 2.6.7-19 CD-1 マウスにおける皮下投与による 13 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 13-Week Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in CD-1 Mice					**Study No.: TTRSC02-DSM19-009** **Location in CTD: 4.2.3.4.2-3**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**10**		**25**		**50**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Liver								
Vacuolation, hepatocyte, centrilobular								
Minimal	0	0	1	3	2	2	2	5
Slight	0	0	4	3	1	5	4	5
Moderate	0	0	3	0	6	0	4	0
Glycogen, increased, hepatocytes								
Minimal	0	2	0	2	0	0	0	1
Slight	0	0	0	2	0	3	0	5
Moderate	0	0	0	4	0	4	0	4
Degeneration/necrosis, hepatocytes								
Slight	0	0	0	0	1	1	0	0

表 2.6.7-19 CD-1 マウスにおける皮下投与による 13 週間投与用量設定毒性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 13-Week Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity and Toxicokinetic Study in CD-1 Mice					**Study No.: TTRSC02-DSM19-009** **Location in CTD: 4.2.3.4.2-3**			
Monthly Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**		**10**		**25**		**50**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Subcutaneous Injection Site A								
Vacuolated macrophages, subcutis								
Minimal	0	0	0	4	2	6	2	4
Slight	0	0	0	0	0	2	0	5

Abbreviations: - =no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL plasma); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; M=male; MTD=maximum tolerated dose; N/A=not applicable; No.=number; SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration; USP=United States Pharmacopeia.

Note: *=p≤0.05 (ANOVA and Dunnett's test). Note: Statistically significant based on actual data, not on percent difference.

a Animals were dosed once monthly on Days 1, 29, and 57 of the dosing phase at a volume of 10 mL/kg.

b One toxicity female administered 25 mg/kg was sacrificed on Day 56 after being noted with a laceration on the tail and a sore on the neck (likely due to trauma). One toxicokinetics female administered 50 mg/kg was sacrificed on Day 84 after being noted with discolored blue dose site, piloerection, and pale ears. A necropsy was not conducted, per protocol. Neither death was considered vutrisiran related.

表 2.6.7-20 ラットにおける 2 年間皮下投与によるがん原性及びトキシコキネティクス試験

Report Title: ALN-TTRSC02: 105-Week Subcutaneous Injection Carcinogenicity Study, with Toxicokinetics, in Sprague-Dawley Rats										**Test Article: ALN-TTRSC02**
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Duration of Dosing: up to 97 weeks[a]**									**Study No.: [TTRSC02-GLP18-003]**
Initial Age: 6 to 7 weeks	**Method of Administration: SC injection into the dorsal region**									**Location in CTD: 4.2.3.4.1-1**
Date of First Dose: 19 Sep 2018 (males); 21 Sep 2018 (females)	**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP**									**GLP Compliance: Yes**
	Treatment of Controls: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)									
Basis for High-Dose Selection: The doses selected for this study were based on results of a previously conducted, 6-month toxicity study in Sprague Dawley rats ([TTRSC02-GLP15-040]). In males, a 9% decrease in body weight (relative to controls) was noted for those administered 15 mg/kg. Therefore, 15 mg/kg was selected as the high-dose level for males in this carcinogenicity study. In females, the high-dose level of 25 mg/kg in this carcinogenicity study was based on an estimated plasma exposure of >25x the human plasma exposure (based on area under the concentration-time curve [AUC]) at the proposed clinical dose.										
Special Features: None										
Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**	**0 (Control)**	**4.0 (Low)**	**6.0 (Low)**	**7.5 (Mid)**	**12.5 (Mid)**	**15 (High)**	**25 (High)**	**15 (High)**	**25 (High)**
Regimen	**qM**		**qM**		**qM**		**qM**		**q3M**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals										
Carcinogenicity at Study Start	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Toxicokinetic	4	4	10	10	10	10	10	10	10	10
Plasma Toxicokinetics:										
C_{max} (µg/mL)										
Day 1	BLQ	BLQ	0.642	0.598	0.833	1.57	3.08	4.81	3.07	5.04
Day 169	BLQ	BLQ	0.419	0.876	0.847	1.60	1.77	2.21	2.01	2.54

表 2.6.7-20 ラットにおける 2 年間皮下投与によるがん原性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 105-Week Subcutaneous Injection Carcinogenicity Study, with Toxicokinetics, in Sprague-Dawley Rats								**Study No.: TTRSC02-GLP18-003** **Location in CTD: 4.2.3.4.1-1**		
Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**	**0 (Control)**	**4.0 (Low)**	**6.0 (Low)**	**7.5 (Mid)**	**12.5 (Mid)**	**15 (High)**	**25 (High)**	**15 (High)**	**25 (High)**
Regimen	**qM**		**qM**		**qM**		**qM**		**q3M**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·h/mL)										
Day 1	NC	NC	1.13	1.42	2.27	5.08	7.82	12.8	8.46	12.4
Day 169	NC	NC	2.39	2.29	7.89	7.62	17.4	15.8	16.6	26.9
Noteworthy Findings:										
Died/Sacrificed Moribund[b]	40	40	38	38	44	38	46	46	43	47
Terminal Sacrifice (%)	34	33	38	37	30	38	27	23	28	27
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Masses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Pathology										
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7-20 ラットにおける 2 年間皮下投与によるがん原性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 105-Week Subcutaneous Injection Carcinogenicity Study, with Toxicokinetics, in Sprague-Dawley Rats							**Study No.: TTRSC02-GLP18-003** **Location in CTD: 4.2.3.4.1-1**			
Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**	**0 (Control)**	**4.0 (Low)**	**6.0 (Low)**	**7.5 (Mid)**	**12.5 (Mid)**	**15 (High)**	**25 (High)**	**15 (High)**	**25 (High)**
Regimen	**qM**		**qM**		**qM**		**qM**		**q3M**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Histopathology										
Number of Animals Examined	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Neoplastic Lesions	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Number of Animals Examined	59	60	60	60	60	60	59	60	60	60
Nonneoplastic Lesions										
Liver										
Pigment, increased Kupffer cells										
Minimal	2	1	1	2	3	2	7	8	6	3
Slight	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0

表 2.6.7-20 ラットにおける 2 年間皮下投与によるがん原性及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: 105-Week Subcutaneous Injection Carcinogenicity Study, with Toxicokinetics, in Sprague-Dawley Rats									**Study No.: TTRSC02-GLP18-003** **Location in CTD: 4.2.3.4.1-1**	
Dose (mg/kg)[a]	**0 (Control)**	**0 (Control)**	**4.0 (Low)**	**6.0 (Low)**	**7.5 (Mid)**	**12.5 (Mid)**	**15 (High)**	**25 (High)**	**15 (High)**	**25 (High)**
Regimen	**qM**		**qM**		**qM**		**qM**		**q3M**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Total Incidence	3	1	1	2	3	2	8	8	8	3

Abbreviations: - =no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the lower limit of quantitation (<20.0 ng/mL); C_{max}=maximum observed concentration; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; M=male; NC=not calculated; No.=number; qM=once monthly; q3M=once every 3 months, USP=United Sates Pharmacopeia.

a Animals were dosed once every 4 weeks (Groups 1 through 4) or once every 12 weeks (Group 5) at a dose volume of 2 mL/kg.

b No vutrisiran-related effect on survival was noted. The number of surviving animals in the control group reached 20 animals earlier than expected; therefore, surviving males were sacrificed during Week 99, and surviving females (controls, females administered 6 or 12.5 mg/kg qM, and females administered 25 mg/kg q3M) were sacrificed during Week 87. The survival of females administered 25 mg/kg qM decreased ahead of the other groups and resulted in the early scheduled sacrifice during Week 86.

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

表 2.6.7-21 ラットにおける生殖発生毒性用量設定試験

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Dose Range-Finding Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Female Rats				**Test Article: Vutrisiran**	
Design similar to ICH 4.1.1? Yes	**Duration of Dosing: Males: Not dosed; Females: PM: Days 0, 7, 14 (all groups); GD 6-17 (Groups 1-4); GD 6, 12, 17 (AD-59206)**			**Study No.: [TTRSC02-GLP16-013]**	
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Day of Mating: GD 0**			**Location in CTD: 4.2.3.5.1-1**	
Initial Age: 12 weeks	**Day of C-Section: GD 21**			**GLP Compliance: Yes**	
Date of First Dose: 19 May 2016	**Method of Administration: SC injection**				
Special Features: PD	**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP**				
No Observed Adverse Effect Level: N/A					
Weekly/Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**15/3**	**50/10**	**150/30**	**30 (weekly) AD-59206**
Number of Animals					
Toxicity	10	10	10	10	10
Toxicokinetics	3	9	9	9	9
Toxicokinetics - Plasma:					
C_{max} (µg/mL)					
GD 6	BLQ	0.266	0.792	7.10	3.86
GD 17	BLQ	0.253	0.640	7.44	1.79
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)					
GD 6	BLQ	0.458	1.26	25.4	10.7

表 2.6.7-21 ラットにおける生殖発生毒性用量設定試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Dose Range-Finding Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Female Rats				**Study No.: TTRSC02-GLP16-013** **Location in CTD: 4.2.3.5.1-1**	
Weekly/Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**15/3**	**50/10**	**150/30**	**30 (weekly) AD-59206**
GD 17	BLQ	1.33	2.87	34.7	6.58
$AUC_{0\text{-}2}$ (µg·h/mL)					
GD 6	BLQ	0.458	1.26	9.83	5.03
GD 17	BLQ	0.422	1.04	9.63	2.69
Tissue Concentration Analysis - GD 18 (µg/g)					
Maternal liver	BLQ	67.5	298	825	BLQ
Maternal kidney	BLQ	25.3	101	445	0.825
Placenta	BLQ	0.123	0.431	2.29	BLQ
Fetal liver	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Fetal tissue (without liver)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Pharmacodynamics - Serum TTR (µg/mL)					
Predose (Day 0)	147.45	170.27	163.87	177.33	221.16
PM Day 14	202.68	213.20	278.42	304.07	21.37
GD 21	170.20	186.57	206.67	235.72	0.00
Clinical Observations					
Excretion, discolored bedding	0	0	4	9	0
Behavior, hypoactive	0	0	0	2	0
Body Weight Gain (%)[a]					
PM Days 7 - 14	5.8 g	-58.6	-72.4	-287.9+r	-24.1

表 2.6.7-21 ラットにおける生殖発生毒性用量設定試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Dose Range-Finding Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Female Rats							**Study No.: TTRSC02-GLP16-013** **Location in CTD: 4.2.3.5.1-1**			
Weekly/Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**15/3**		**50/10**		**150/30**		**30 (weekly) AD-59206**	
PM Days 0 - 14	11.5 g		-22.6		-14.8		-101.7		+15.7	
GD 6 - 18	58.1 g		+9.8		+14.3		-9.8		+8.4	
GD 6 - 21	95.9 g		+2.8		-24.2*r		-35.3*r		+2.8	
GD 0 - 21	130.7 g		+3.6		-17.9*r		-26.5*r		+2.5	
Food Consumption (%)[a]										
GD 12-14	55.7 g		+1		0		-18+H		-4	
GD 14-16	51.3 g		+4		+5		-39*r		+1	
GD 16-18	33.4 g		+9		-2		-34#H		+5	
GD 18-21	65.1 g		-4		-25+r		-27*r		-4	
Clinical Pathology										
Hematology	**GD 18**	**GD 21**	**GD 18**	**GD 21**	**GD 18**	**GD 21**	**GD 18**	**GD 21**	**GD 18**	**GD 21**
Red Blood Cell (E6/µL)	6.89	5.66	6.96	5.68	7.03	5.22	5.72#r	4.43#r	7.09	5.55
Hemoglobin (g/dL)	13.3	10.7	13.2	10.5	12.9	9.4	10.7#r	8.3#r	13.8	10.5
Hematocrit (%)	39.9	32.8	40.1	32.3	39.6	29.3	32.9+r	26.6#r	41.6	32.2
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	19.4	18.8	19.0	18.6	18.3#H	17.9+H	18.6*H	18.7	19.5	18.9
Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (g/dL)	33.4	32.4	33.0	32.6	32.5+H	31.9	32.5+H	31.2#H	33.2	32.5
Reticulocyte Count (E3/µL)	316.1	259.5	338.9	205.2	388.4+r	259.4	459.5+r	759.9#r	315.2	222.2

表 2.6.7-21 ラットにおける生殖発生毒性用量設定試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Dose Range-Finding Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Female Rats							**Study No.: TTRSC02-GLP16-013** **Location in CTD: 4.2.3.5.1-1**			
Weekly/Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**15/3**		**50/10**		**150/30**		**30 (weekly) AD-59206**	
Reticulocyte Percentage	4.6	4.6	4.9	3.6	5.6*r	5.1	8.1#r	13.5#r	4.4	4.0
White Blood Cell Count (E3/µL)	7.79	7.65	7.57	6.79	11.89+r	17.27#r	22.51#r	29.52#r	7.60	6.83
Neutrophil (E3/µL)	2.98	3.49	3.11	3.29	7.23#r	8.14#r	11.50#r	14.02#r	3.28	3.19
Lymphocyte (E3/µL)	4.40	3.86	4.12	3.27	4.03	7.82*r	9.71#r	13.80#r	3.86	3.37
Monocyte (E3/µL)	0.22	0.20	0.22	0.15	0.47*r	1.10#r	0.98#r	1.30#r	0.25	0.19
Eosinophil (E3/µL)	0.16	0.07	0.09*r	0.06	0.11	0.13+r	0.20	0.28+r	0.17	0.07
Basophil (E3/µL)	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02+r	0.02+r	0.01	0.00
Large Unstained Cell Counts (E3/µL)	0.03	0.02	0.02	0.02	0.04	0.06+r	0.10#r	0.11#r	0.03	0.02
Coagulation	**GD 18**	**GD 21**	**GD 18**	**GD 21**	**GD 18**	**GD 21**	**GD 18**	**GD 21**	**GD 18**	**GD 21**
Fibrinogen (mg/dL)	229	350	210	352	129+H	103#r	92#H	74#r	243	311
Prothrombin Time (sec)	7.8	8.0	8.1	7.7*r	8.4+r	13.4#r	11.7#r	10.2#r	8.2	8.1
Serum Chemistry	**GD 18**	**GD 21**	**GD 18**	**GD 21**	**GD 18**	**GD 21**	**GD 18**	**GD 21**	**GD 18**	**GD 21**
Total Protein (g/dL)	6.4	5.5	6.4	5.3	5.2*r	3.7#H	3.8#r	3.2#H	6.5	5.3
Albumin (g/dL)	4.3	3.4	4.4	3.3	3.6	2.5#H	2.7#r	2.1#H	4.4	3.2
Globulin (g/dL)	2.1	2.1	2.1	2.0	1.6+r	1.3#H	1.1#r	1.0#H	2.1	2.1
Albumin: Globulin (ratio)	2.1	1.6	2.1	1.7	2.2	2.0#H	2.7	2.1#H	2.1	1.6
Cholesterol (mg/dL)	89	104	84	98	51#H	80*H	51#H	90	95	98

表 2.6.7-21 ラットにおける生殖発生毒性用量設定試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Dose Range-Finding Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Female Rats							**Study No.: TTRSC02-GLP16-013** **Location in CTD: 4.2.3.5.1-1**			
Weekly/Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**15/3**		**50/10**		**150/30**		**30 (weekly) AD-59206**	
Aspartate Aminotransferase (U/L)	129	89	192	111	763#r	671#r	429#r	384#r	136	85
Alanine Aminotransferase (U/L)	66	49	76	47	255#r	157#r	122+r	105#r	65	50
Alkaline Phosphatase (U/L)	62	30	62	30	62	41	59	50*H	64	30
Bilirubin (mg/dL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.7+r	1.8#r	5.4#r	3.7#r	0.1	0.1
Calcium (mg/dL)	10.2	9.7	10.3	9.3	9.7	9.0	9.0#r	9.0	10.4	9.3
Potassium (mmol/L)	4.9	5.0	5.0	5.0	5.1	5.0	5.9+r	5.3	5.1	4.9
Creatinine (mg/dL)	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	BLQ	BLQ	0.3	0.3
Triglyceride (mg/dL)	378	383	173+r	230	56#r	47#r	44#r	80#r	473	392
Thyroxine (µg/dL)										
PM Day 0	4.2		3.9		4.7		4.5		5.1	
PM Day 14	3.3		3.5		4.1		5.8+r		1.1x	
GD 21	1.6		1.2		1.7		2.3		ND	
Vitamin A (µg/mL)										
PM Day 0	0.2276		0.2777		0.2673		0.2588		0.2528	
PM Day 14	0.2416		0.3043*r		0.4725#r		0.3928#r		0.0417#r	
GD 21	0.1923		0.2551		0.2507		0.1986		0.0540+r	

表 2.6.7-21 ラットにおける生殖発生毒性用量設定試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Dose Range-Finding Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Female Rats				**Study No.: TTRSC02-GLP16-013 Location in CTD: 4.2.3.5.1-1**	
Weekly/Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**15/3**	**50/10**	**150/30**	**30 (weekly) AD-59206**
Reproductive Performance					
Mean No. Estrous Cycles (premating)	2.6	2.5	2.7	2.7	2.7
Mean Predose Cycle Length (days)	4.0	4.5	4.1	4.3	4.6
No. Pregnant Animals	10	10	10	9	8
No. with Total Litter Loss	0	0	0	1	0
No. Aborted	0	0	1[b]	0	0
Mean Number Corpora Lutea	14.6	15.3	16.8	14.7	15.9
Mean No. Implantation Sites	14.3	15.0	14.3	14.6	15.4
Mean % Preimplantation Loss	1.8	2.0	15.1	0.7	2.7
Mean No. Total Resorptions	0.3	0.5	1.0	4.2	0.6
Mean No. Live Fetuses	14	14.5	13.1	10.6	14.8
Mean % Post-implantation Loss	2.1	3.6	7.9	30.3	3.8
Uterine Weight (g)	98.0	103.5	80.0	70.7	104.0
Gross Pathology					
Liver-discolored	0	0	6	8	0
Fetal Evaluations					
Adjusted Mean Fetal Body Weight (g)	5.06	4.93	4.57	4.25*H	5.16

表 2.6.7-21 ラットにおける生殖発生毒性用量設定試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Dose Range-Finding Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Female Rats				**Study No.: TTRSC02-GLP16-013** **Location in CTD: 4.2.3.5.1-1**	
Weekly/Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**15/3**	**50/10**	**150/30**	**30 (weekly) AD-59206**
Fetal Anomalies					
Gross External	No vutrisiran-related findings				
Visceral Anomalies	No vutrisiran-related findings				

Abbreviations: AD-59206=pharmacologically active mouse/rat surrogate; AUC_{0-2}=area under the concentration-time curve from 0 to 2 hours postdose; $AUC_{0-t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL plasma; 100 ng/g for tissue concentration analyses; 0.2 mg/dL for serum creatinine); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; ICH=International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; N/A=not applicable; ND=no data; No.=number; PD=pharmacodynamic(s); PM=premating; SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration; TTR=transthyretin; USP=United States Pharmacopeia; x=sample size too small for analysis.

Note: +r=Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.01 level; #H=Dunnett Exact Homogeneous Test Significant at 0.001 level; #r=Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.001 level; +H=Dunnett Exact Homogeneous Test Significant at 0.01 level; *r=Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.05 level; *H=Dunnett Exact Homogeneous Test Significant at 0.05 level.

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

b One 50/10 mg/kg female (Animal B36427) aborted on gestation day 20 and was sacrificed according to the protocol.

表 2.6.7-22 非妊娠雌ラットにおける 12 日間投与用量設定毒性試験

Report Title: ALN-TTRSC02: A 12 Day Daily Dose Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity Study in Female Sprague Dawley Rats			**Test Article: Vutrisiran**		
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Duration of Dosing: 12 days**		**Study No.: [TTRSC02-DSM18-011]**		
Initial Age: 12 weeks	**Duration of Postdose: N/A**		**Location in CTD: 4.2.3.5.2-1**		
Date of First Dose: 25 April 2018	**Method of Administration: SC injection**		**GLP Compliance: No**		
Special Features: None	**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**				
No Observed Adverse Effect Level: Not determined					
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**	**100**
Sex	**F**	**F**	**F**	**F**	**F**
Number of Animals					
Main Study	5	5	5	5	5
Noteworthy Findings:					
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0
Body Weight	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Serum Chemistry					
Day 13					
Alanine Aminotransferase (U/L)	36.8	42.7	290.0	272.2	240.2
Aspartate Aminotransferase (U/L)	72.5	106.1	417.6	481.6	515.7
Albumin (g/dL)	3.54	3.71	3.91	3.15	2.97

表 2.6.7-22 非妊娠雌ラットにおける 12 日間投与用量設定毒性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 12 Day Daily Dose Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity Study in Female Sprague Dawley Rats				**Study No.: TTRSC02-DSM18-011 Location in CTD: 4.2.3.5.2-1**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**	**100**
Sex	**F**	**F**	**F**	**F**	**F**
Alkaline Phosphatase (U/L)	43.5	46.4	51.5	88.8	109.1
Total Bilirubin (mg/dL)	0.184	0.186	0.236	4.252	5.754
Calcium (mg/dL)	10.54	10.44	10.74	9.83	9.50
Blood Urea Nitrogen (mg/dL)	15.7	15.2	15.5	16.7	11.7
Cholesterol (mg/dL)	66.2	72.7	66.0	27.1	40.7
Creatinine (mg/dL)	0.414	0.412	0.414	0.394	0.352
Glucose (mg/dL)	136.8	150.3	164.2	130.2	105.5
Triglycerides (mg/dL)	42.0	56.7	48.5	23.1	44.1
Globulin (g/dL)	2.76	2.70	2.82	1.80	1.40
Albumin:Globulin Ratio	1.30	1.40	1.38	1.76	2.18
Total Protein (g/dL)	6.29	6.40	6.73	4.96	4.36
Organ Weights (%)[a]					
Liver	6.52 g	6.82	48.6	32.2	18.4
Organ Weight Ratios[a]					
Liver:Body Weight Ratio	2.70	5.46	46.1	35.6	27.5
Gross Pathology					
Liver					
Discoloration	0	0	3	5	5

表 2.6.7-22 非妊娠雌ラットにおける 12 日間投与用量設定毒性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 12 Day Daily Dose Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity Study in Female Sprague Dawley Rats				**Study No.: TTRSC02-DSM18-011 Location in CTD: 4.2.3.5.2-1**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**	**100**
Sex	**F**	**F**	**F**	**F**	**F**
Abnormal surface	0	0	0	0	2
Histopathology					
Number Evaluated	5	5	5	0	0
Liver					
Vacuolation, hepatocyte					
Minimal	3	4	0	N/A	N/A
Mild	0	1	0	N/A	N/A
Moderate	0	0	3	N/A	N/A
Marked	0	0	2	N/A	N/A
Necrosis, single cell					
Minimal	0	2	4	N/A	N/A
Mitotic figures, increased					
Minimal	0	2	1	N/A	N/A
Infiltration, mixed cell					
Minimal	0	2	1	N/A	N/A
Mild	0	0	4	N/A	N/A
Hypertrophy/hyperplasia, Kupffer cell					
Minimal	0	1	0	N/A	N/A

表 2.6.7-22 非妊娠雌ラットにおける 12 日間投与用量設定毒性試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A 12 Day Daily Dose Subcutaneous Injection Dose Range-Finding Toxicity Study in Female Sprague Dawley Rats				**Study No.: TTRSC02-DSM18-011 Location in CTD: 4.2.3.5.2-1**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**	**100**
Sex	**F**	**F**	**F**	**F**	**F**
Mild	0	0	5	N/A	N/A
Accumulation, pigment Minimal	0	1	1	N/A	N/A

Abbreviations: - = no noteworthy findings; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; N/A=not applicable; No.=number; SC=subcutaneous(ly); USP=United States Pharmacopeia.

a For control(s), group mean is shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.

表 2.6.7-23 ウサギにおける生殖発生毒性用量設定試験

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Dose Range-Finding Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Female Rabbits			**Test Article: Vutrisiran**	
Design similar to ICH 4.1.1? Yes	**Duration of Dosing: GD 7-19**		**Study No.: [TTRSC02-GLP16-012]**	
Species/Strain: Rabbit/New Zealand White	**Day of Mating: GD 0**		**Location in CTD: 4.2.3.5.2-3**	
Initial Age: 8 months	**Day of C-Section: GD 20**		**GLP Compliance: Yes**	
Date of First Dose: 12 May 2016	**Method of Administration: SC injection**			
Special Features: PD	**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP**			
No Observed Adverse Effect Level: N/A				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Number of Does				
Toxicity	8	8	8	8
Toxicokinetics	3	3	3	3
Toxicokinetics - Plasma:				
C_{max} (µg/mL)				
GD 7	BLQ	0.620[a]	3.43	17.4
GD 19	BLQ	0.629	2.26	13.8
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)				
GD 7	BLQ	2.04[a]	11.2	76.7
GD 19	BLQ	1.47	9.27	60.2
$AUC_{0\text{-}2}$ (µg·h/mL)				
GD 7	BLQ	0.969[a]	4.70	24.6
GD 19	BLQ	0.928	3.20	19.0

表 2.6.7-23 ウサギにおける生殖発生毒性用量設定試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Dose Range-Finding Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Female Rabbits			**Study No.: TTRSC02-GLP16-012 Location in CTD: 4.2.3.5.2-3**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Tissue Concentration Analysis - GD 20 (µg/g)				
Maternal liver	BLQ	287	1120	2160
Maternal kidney	BLQ	20.6	59.0	339
Placenta	BLQ	BLQ	0.315	1.65
Fetal liver	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Fetal tissue (without liver)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Pharmacodynamics - Normalized Liver *TTR* mRNA Levels	-	-	-	-
Noteworthy Findings:				
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Body Weight Gain (%)[b]				
GD 7-20	131.0 g	+9	+17	-26
Food Consumption	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-

表 2.6.7-23 ウサギにおける生殖発生毒性用量設定試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Dose Range-Finding Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Female Rabbits			**Study No.: TTRSC02-GLP16-012** **Location in CTD: 4.2.3.5.2-3**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Reproductive Performance				
No. Pregnant Animals	8	8	8	8
No. with Total Litter Loss	0	0	0	0
Mean No. Corpora Lutea	9.5	10.3	9.6	11.0
Mean No. Implantation Sites	8.4	9.3	8.5	10.0
Mean % Preimplantation Loss	13.4	8.4	15.0	8.4
Mean No. Total Resorptions	0.5	0.4	0.1	0.4
No. Dead Fetuses	0	0	0	0
Mean No. Live Fetuses	7.9	8.9	8.4	9.6
Mean % Post-implantation Loss	4.7	3.9	1.1	3.8
Gravid Uterine Weight (g)	461.5	528.1	472.4	526.0
Gross Pathology	No vutrisiran-related findings			
Fetal Evaluations				
Adjusted Mean Fetal Body Weight (g)	38.8	41.7	37.2	37.3
Fetal Sex Ratios (% males)	47.9	48.8	54.0	49.7

表 2.6.7-23 ウサギにおける生殖発生毒性用量設定試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Dose Range-Finding Developmental Toxicity and Toxicokinetic Study in Female Rabbits			**Study No.: TTRSC02-GLP16-012 Location in CTD: 4.2.3.5.2-3**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Fetal Anomalies				
Gross External	No vutrisiran-related findings			
Visceral Anomalies	No vutrisiran-related findings			

Abbreviations: - =no noteworthy findings; AUC_{0-2}=area under the concentration-time curve from 0 to 2 hours postdose; $AUC_{0-t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL plasma; 100 ng/g maternal liver, maternal kidney, fetal liver, or fetal tissue; 200 ng/g placenta); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; ICH=International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; mRNA=messenger RNA; N/A=not applicable; No.=number; PD=pharmacodynamic(s); SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration; TTR=transthyretin; USP=United States Pharmacopeia.

a On GD 7, the dose concentration was out of specification, with a mean of 113.8% of the target. Actual dose (3.41 mg/kg) was used for toxicokinetic calculations.

b For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

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

表 2.6.7-24 ラットにおける皮下投与による受胎能及び初期胚発生から着床までの試験並びにトキシコキネティクス試験

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Injection Study of Fertility and Early Embryonic Development to Implantation with Toxicokinetics in Rats			**Test Article: Vutrisiran**	
Design similar to ICH 4.1.1? Yes	**Duration of Dosing: M: 5 times (qw) prior to and throughout pairing (7 total doses) F: 3 times (qw) prior to pairing, qw throughout pairing, and on GD 6 (4 or 5 total doses)**		**Study No.: [TTRSC02-GLP18-005]**	
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Day of Mating: F: GD 0**		**Location in CTD: 4.2.3.5.1-2**	
Initial Age: M: 10 to 11 weeks; F: 12 weeks	**Day of C-Section: GD 13**		**GLP Compliance: Yes**	
Date of First Dose: M: 14 August 2018; F: 28 August 2018	**Method of Administration: SC injection**			
Special Features: None	**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**			
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Males: 70 mg/kg **F_0 Females:** 70 mg/kg				
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**15**	**30**	**70**
F_0 Males				
Number of Animals Toxicity Toxicokinetics	 22 3	 22 9	 22 9	 22 9

表 2.6.7-24 ラットにおける皮下投与による受胎能及び初期胚発生から着床までの試験並びにトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Injection Study of Fertility and Early Embryonic Development to Implantation with Toxicokinetics in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP18-005** **Location in CTD: 4.2.3.5.1-2**	
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**15**	**30**	**70**
Toxicokinetics - Plasma:				
C_{max} (µg/mL) Pairing Day 14	BLQ	2.51	8.11	19.6
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL) Pairing Day 14	BLQ	9.81	42.4	135
No. Evaluated	22	22	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations				
No. With Discolored Liver	0	10	15	19
No. With Rough Surface of the Liver	0	2	3	11
Absolute Prostate Gland Weight (%)[a]	1.4129 g	-	-20#H	-23#H
Prostate Gland Relative to Terminal Body Weight (%)[a]	0.2621	-	-13+H	-17#H
Minimally Decreased Secretion in Prostate Gland	2	1	6	11
Body Weight Gain (%)[a]				
PM Day 0-PP Day 0	179.9 g	-	-21#H	-19#H
PM Days 0-28	136.9 g	-	-24#H	-22#H
Terminal Body Weight (%)[a]	542 g	-	-7.7+H	-7.7+H
Food Consumption (%)[a]				
PM Days 7-14	202.2 g	-	-	-9.7*H
PM Days 14-21	206.5 g	-	-	-15#r

表 2.6.7-24 ラットにおける皮下投与による受胎能及び初期胚発生から着床までの試験並びにトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Injection Study of Fertility and Early Embryonic Development to Implantation with Toxicokinetics in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP18-005** **Location in CTD: 4.2.3.5.1-2**	
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**15**	**30**	**70**
Reproductive Performance				
No. of Males that Mated	20	21	19	19
No. of Fertile Males	17	21	18	18
F_0 Females				
Number of Animals				
Main Study	22	22	22	22
Toxicokinetics	3	9	9	9
Toxicokinetics - Plasma:				
C_{max} (µg/mL) GD 6	BLQ	2.49	7.55	17.6
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL) GD 6	BLQ	7.76	30.1	75.7
No. Evaluated	22	22	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0[b]	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations				
No. With Discolored Liver	0	0	0	6
Body Weight Gain	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-

表 2.6.7-24 ラットにおける皮下投与による受胎能及び初期胚発生から着床までの試験並びにトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Injection Study of Fertility and Early Embryonic Development to Implantation with Toxicokinetics in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP18-005** **Location in CTD: 4.2.3.5.1-2**	
Weekly Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**15**	**30**	**70**
Reproductive Performance				
Mean No. Estrous Cycles/14 days	2.2	2.2	2.6	2.1
No. of Females with Confirmation of Mating	22	22	22	21
No. of Pregnant Females	18	22	21	20
No. Aborted or with No Viable Fetuses	0	0	0	1
Mean No. Corpora Lutea	16.5	16.5	17.1	15.9
Mean No. Implantation Sites	14.7	14.8	14.5	14.8
Mean % Preimplantation Loss	9.3	10.2	14.1	9.2
Mean No. Early Resorptions	1.6	0.5	0.8	1.0
Mean No. Late Resorptions	0.0	0.0	0.0	0.0
Mean % Post-implantation Loss	10.5	3.1	6.6	10.9
Mean No. Live Fetuses	13.1	14.3	13.6	13.9

表 2.6.7-24 ラットにおける皮下投与による受胎能及び初期胚発生から着床までの試験並びにトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Injection Study of Fertility and Early Embryonic Development to Implantation with Toxicokinetics in Rats	**Study No.: TTRSC02-GLP18-005** **Location in CTD: 4.2.3.5.1-2**

Abbreviations: - =no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL plasma); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; F=female; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; ICH=International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; M=male; No.=number; PM=premating; PP=post-pairing; qw=once weekly; SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration; USP=United States Pharmacopeia.

Note: +H=Dunnett Exact Homogeneous Test Significant at 0.01 level; #H = Dunnett Exact Homogeneous Test Significant at 0.001 level; *H=Dunnett Exact Homogeneous Test Significant at 0.05 level; #r=Wilcoxon rank Sum Test Significant at 0.001 level.

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

b TK Animal R0630 (30 mg/kg) was sacrificed on PM Day 9 due to poor general condition. The clinical observations for this animal included thinning hair coat on the front feet; swollen midline abdomen; entire body pale; and hypoactivity. At necropsy, the animal was found with an enlarged spleen (width 1.5 cm, height 2.0 cm, and length 11 cm). This finding was noted in only 1 animal in the 30 mg/kg group and was not observed in the 70 mg/kg group. This finding was isolated to a single animal and therefore was considered not test article related.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

表 2.6.7-25 ラットにおける胚・胎児発生に関する試験及びトキシコキネティクス試験

Report Title: ALN-TTRSC02: A Subcutaneous Injection Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study in Rats			**Test Article: Vutrisiran**	
Design similar to ICH 4.1.3? Yes	**Duration of Dosing: GD 6-17**		**Study No.: [TTRSC02-GLP18-013]**	
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Day of Mating: GD 0**		**Location in CTD: 4.2.3.5.2-2**	
Initial Age: 11-12 weeks	**Day of C-Section: GD 21**		**GLP Compliance: Yes**	
Date of First Dose: 08 October 2018	**Method of Administration: SC injection**			
Special Features: None	**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**			
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 10 mg/kg F_1 Litters: 3 mg/kg				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Dams:				
Number of Animals				
Toxicity	22	22	22	22
Toxicokinetics	3	9	9	9
Toxicokinetics – Plasma:				
C_{max} (µg/mL)				
GD 6	BLQ	0.312	1.00	7.43
GD 17	BLQ	0.264	0.883	6.13

表 2.6.7-25 ラットにおける胚・胎児発生に関する試験及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A Subcutaneous Injection Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP18-013** **Location in CTD: 4.2.3.5.2-2**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (μg·h/mL)				
GD 6	BLQ	0.509	3.18	28.2
GD 17	BLQ	1.27	4.82	29.1
Reproductive Performance				
No. Pregnant	20	21	22	22
No. Misidentified (incorrect GD days assigned)	1	1	0	0
No. Premature Deliveries	0	0	0	4
No. with Total Litter Loss	0	0	1	2
Clinical Observations				
Excretion, Discolored bedding, yellow	0	0	2	9
Body Weight (%)[a]				
GD 15	312.5 g	-0.7	-0.3	-6.0*H
GD 16	323.2 g	-0.7	+0.6	-6.8+H
GD 17	338.8 g	-0.8	+0.3	-8.6#H
GD 18	354.3 g	-0.4	-0.5	-9.7#H
GD 21	370.1 g	-2.1	-7.5+r	-15.7#r
Body Weight Gain (%)[a]				
GD 6-21	125.4 g	-6.6	-21.2#r	-44.6#r

表 2.6.7-25 ラットにおける胚・胎児発生に関する試験及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A Subcutaneous Injection Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP18-013 Location in CTD: 4.2.3.5.2-2**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Food Consumption (%)[a]				
GD 12-15	79.9 g	+3.0	+2.0	-13.4*H
GD 15-18	89.4 g	-0.4	-1.2	-34.1#r
GD 18-21	61.7 g	-15.7	-43.9#H	-38.9#H
GD 6-18	316 g	+0.9	+1.1	-13.5
GD 6-21	377.7 g	-1.8	-6.2	-17.7
Necropsy Observations				
Macroscopic Observations				
Gelatinous pancreas	0	0	0	13
Abnormal uterine contents	0	0	0	4
Discolored liver	0	0	1	6
Discolored kidney	0	0	0	1
Microscopic Observations				
Liver (Number examined)	3	0	1	6
Hepatocyte vacuolation/degeneration				
Moderate	0	NE	1	6
Hepatocellular hypertrophy				
Minimal	0	NE	1	2
Slight	0	NE	0	4

表 2.6.7-25 ラットにおける胚・胎児発生に関する試験及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A Subcutaneous Injection Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP18-013 Location in CTD: 4.2.3.5.2-2**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Individual hepatocyte necrosis				
Minimal	0	NE	0	1
Slight	0	NE	1	1
Moderate	0	NE	0	1
Focal/multifocal hepatocyte necrosis				
Moderate	0	NE	0	3
Hemorrhage				
Minimal	0	NE	0	1
Slight	0	NE	0	2
Moderate	0	NE	0	1
Increased hepatocyte mitoses				
Minimal	0	NE	0	3
Slight	0	NE	0	1
Mixed cell infiltrates				
Minimal	0	NE	0	3
Basophilic granules in Kupffer cells				
Minimal	0	NE	0	3
Pancreas (Number examined)	5	0	0	14
Interstitial edema				

表 2.6.7-25 ラットにおける胚・胎児発生に関する試験及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A Subcutaneous Injection Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP18-013** **Location in CTD: 4.2.3.5.2-2**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Slight	0	NE	NE	9
Moderate	0	NE	NE	2
Adipocyte necrosis				
Minimal	0	NE	NE	2
Slight	0	NE	NE	2
Mixed cell infiltrates adipocytes				
Minimal	0	NE	NE	3
Slight	0	NE	NE	1
Kidney (Number examined)	1	0	0	1
Hyaline droplet accumulation, tubule cell				
Moderate	0	NE	NE	1
Vacuolation, tubule cell				
Slight	0	NE	NE	1
Basophilic granules in tubule cell				
Minimal	0	NE	NE	1
Pigment, tubules, lumen				
Minimal	0	NE	NE	1
Litters:				
No. Litters Evaluated	20	21	22	22

表 2.6.7-25 ラットにおける胚・胎児発生に関する試験及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A Subcutaneous Injection Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP18-013** **Location in CTD: 4.2.3.5.2-2**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Mean No. Live Fetuses	12.2	12.7	12.5	8.8*r
Mean No. Early Resorptions	0.4	0.4	0.3	1.9
Mean No. Late Resorptions	0.0	0.0	0.1	0.7
Fetal Sex Ratios (% males)	50.1	47.7	46.7	48.8
Mean No. Corpora Lutea	14.5	14.3	14.8	13.9
Mean No. Implantation Sites	12.5	13.1	13.4	12.3
Mean % Preimplantation Loss	12.5	7.3	8.9	10.8
Mean No. Dead Fetuses	0.0	0.0	0.5	0.9
Mean % Postimplantation Loss	2.9	3.1	7.3	28.0+r
Mean Gravid Uterine Weight (g)	95.7	97.7	93.3	62.6
Adjusted Mean Fetal Weights (g)	5.77	5.67	5.19+H	4.28#H
Fetal Anomalies:				
Gross External Anomalies	-	-	-	-
Fresh Visceral Anomalies	-	-	-	-
Skeletal Anomalies				
Number examined Litter/Fetus	20/123	21/134	22/143	19/108
Nodulated ribs[b]	0/0	0/0	0/0	3/4
Wavy ribs[b]	1/1	0/0	0/0	4/8
Incomplete ossification, parietal skull bone[b]	0/0	0/0	0/0	2/2

表 2.6.7-25 ラットにおける胚・胎児発生に関する試験及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A Subcutaneous Injection Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP18-013** **Location in CTD: 4.2.3.5.2-2**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Unossified sternebrae[b]	0/0	1/1	2/5	6/14

Abbreviations: - =no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL plasma); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; ICH=International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; NE=not examined; No.=number; SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration; USP=United States Pharmacopeia.

Note: *H=Dunnett Exact Homogeneous Test Significant at 0.05 level; +H=Dunnett Exact Homogeneous Test Significant at 0.01 level; #H=Dunnett Exact Homogeneous Test Significant at 0.001 level; *r=Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.05 level; +r=Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.01 level; #r=Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.001 level.

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

b Values represented as number of litters/number of fetuses with finding.

表 2.6.7-26 ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験及びトキシコキネティクス試験

Report Title: ALN-TTRSC02: A Subcutaneous Injection Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study in Rabbits			**Test Article: Vutrisiran**	
Design similar to ICH 4.1.3? Yes	**Duration of Dosing: GD 7 through 19**		**Study No.: [TTRSC02-GLP18-014]**	
Species/Strain: Rabbit/New Zealand White	**Day of Mating: GD 0**		**Location in CTD: 4.2.3.5.2-4**	
Initial Age: 5 to 7 months	**Day of C-Section: GD 29**		**GLP Compliance: Yes**	
Date of First Dose: 08 October 2018	**Method of Administration: SC injection**			
Special Features: None	**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**			
No Observed Adverse Effect Level: **F_0 Females:** 30 mg/kg/day **F_1 Litters:** 30 mg/kg/day				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Does:				
Number of Animals:				
Toxicity	22	22	22	22
Toxicokinetics	3	3	3	3
Toxicokinetics - Plasma:				
C_{max} (µg/mL)				
GD 7	BLQ	0.318	1.84	9.78
GD 19	BLQ	0.508	3.34	12.9
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)				
GD 7	BLQ	1.55	7.28	37.3
GD 19	BLQ	1.61	14.5	67.4

表 2.6.7-26 ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A Subcutaneous Injection Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study in Rabbits			**Study No.: TTRSC02-GLP18-014 Location in CTD: 4.2.3.5.2-4**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
No. Pregnant	21	22	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. Aborted	0	0	0	0
Females with Live Fetuses	21	22	22	22
Clinical Observations	-	-	-	-
Body Weight Gain	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-
Necropsy Observations				
Macroscopic Observations	-	-	-	-
Mean No. Corpora Lutea	11.3	10.9	10.4	10.0
Mean No. Implantations	10.1	9.8	9.3	8.8
Mean Gravid Uterine Weight (g)	534.0	501.1	510.2	488.3
Litters:				
Mean Live Fetuses (per litter)	9.4	9.2	9.0	8.4
Dead Fetuses	0.0	0.0	0.0	0.0
Mean No. Total Resorptions	0.7	0.5	0.3	0.4
Mean % Preimplantation Loss	10.6	9.9	10.2	12.2
Mean % Postimplantation Loss	6.2	5.1	2.6	4.2
Mean Adjusted Fetal Body Weight (g)	39.4	38.7	39.6	40.2

表 2.6.7-26 ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験及びトキシコキネティクス試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: A Subcutaneous Injection Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study in Rabbits			**Study No.: TTRSC02-GLP18-014 Location in CTD: 4.2.3.5.2-4**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Fetal Anomalies:				
Gross External	-	-	-	-
Visceral Anomalies	-	-	-	-
Skeletal Anomalies	-	-	-	-

Abbreviations: - =no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL plasma); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; ICH=International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; No.=number; SC=subcutaneous(ly); T_{max}=time to reach maximum concentration; USP=United States Pharmacopeia.

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

表 2.6.7-27 ラットにおける皮下投与による出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Injection Study of Effects on Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats			**Test Article: Vutrisiran**	
Design similar to ICH 4.1.2? Yes	**Duration of Dosing: GD 7, 13, 19; LD 6, 12, 18 (6 total doses) TK animals ceased dosing after LD 12**		**Study No.: [TTRSC02-GLP19-007]**	
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Day of Mating: GD 0**		**Location in CTD: 4.2.3.5.3-1**	
Initial Age: 11 to 12 weeks	**Method of Administration: SC injection**		**GLP Compliance: Yes**	
Date of First Dose: 28 June 2019	**Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (sterile saline)**			
Special Features: None	**Litters Culled/Not Culled: 4/20**			
No Observed Adverse Effect Level: **F_0 Females:** 20 mg/kg **F_1 Males:** 20 mg/kg **F_1 Females:** 20 mg/kg				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**5**	**10**	**20**
Number of Animals				
Toxicity	24	24	24	24
Toxicokinetics	3	9	9	9
F_0 Females:				
Toxicokinetics - Plasma: LD 12				
C_{max} (µg/mL)	BLQ	0.452	1.10	2.59
$AUC_{0\text{-}t(last)}$ (µg·h/mL)	BLQ	0.766	4.08	8.61

表 2.6.7-27 ラットにおける皮下投与による出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Injection Study of Effects on Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP19-007** **Location in CTD: 4.2.3.5.3-1**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**5**	**10**	**20**
No. Pregnant	23	23	23	24
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
F_0 Females:				
Body Weight	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-
Mean Duration of Gestation (days)	23.1	23.3	23.2	23.1
Organ Weights	-	-	-	-
F_1 Litters (Preweaning):				
No. Litters Evaluated	23	23	23	24
Toxicokinetics - Plasma: PND 12				
Mean Concentration (ng/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
No. of Total Litter Loss	0	0	0	2
Mean No. of Implantation Sites	14.00	14.00	13.65	13.46
Mean No. Pups Delivered	12.83	13.17	13.09	12.88
Mean No. Pups Alive/Litter Day 1	12.57	11.78	12.83	12.55
Mean No. Pups Alive/Litter Day 4 (Before Cull)	12.57	11.74	12.83	12.50
Mean No. Pups Alive/Litter Day 4 (After Cull)	8.00	7.52	8.00	8.00

表 2.6.7-27 ラットにおける皮下投与による出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Injection Study of Effects on Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP19-007 Location in CTD: 4.2.3.5.3-1**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**5**	**10**	**20**
Mean No. Pups Alive/Litter Day 21	7.91	7.52	7.96	7.91
Pup Body Weights	-	-	-	-
Mean % Male Pups Day 1	48	46	50	48
Pup Clinical Observations	-	-	-	-
Pup Necropsy Observations	-	-	-	-
Landmarks (Balanopreputial Cleavage/Vaginal Opening)	-	-	-	-
F_1 Males (Postweaning):				
No. Evaluated Postweaning Per Litter	20	20	20	20
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weights	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-
Locomotor Activity	-	-	-	-
Learning and Memory/Watermaze	-	-	-	-
Acoustic Startle	-	-	-	-
Mean Age of Belanopreputial Separation (days)	42.7	42.8	41.9	42.5
Mean No. Days Prior to Mating	2.5	2.3	2.7	2.1

表 2.6.7-27 ラットにおける皮下投与による出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Injection Study of Effects on Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP19-007 Location in CTD: 4.2.3.5.3-1**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**5**	**10**	**20**
No. of Males that Mated	18	19	17	20
No. of Fertile Males	17	18	16	19
Organ Weights	-	-	-	-
F_1 Females (Postweaning):				
No. Evaluated Postweaning	20	20	20	20
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weights	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-
Locomotor Activity	-	-	-	-
Learning and Memory/Watermaze	-	-	-	-
Acoustic Startle	-	-	-	-
Mean No. of Estrous Cycles	2.7	2.5	2.3	2.4
No. of Females with Confirmation of Mating	18	19	18	20
No. of Pregnant Females	18	19	19	19
Mean No. Corpora Lutea	17.7	16.4	17.5	17.4
Mean No. Implantation Sites	16.8	14.4	16.5	15.6
Mean % Preimplantation Loss	5.00	13.75*r	4.81	10.04

表 2.6.7-27 ラットにおける皮下投与による出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き）

Report Title: ALN-TTRSC02: Subcutaneous Injection Study of Effects on Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats			**Study No.: TTRSC02-GLP19-007** **Location in CTD: 4.2.3.5.3-1**	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**5**	**10**	**20**
Organ Weights	-	-	-	-
F_2 Litters:				
Mean No. Early Resorptions	0.7	1.0	1.2	0.7
Mean No. Late Resorptions	0.0	0.0	0.0	0.0
Mean % Post-implantation Loss	4.38	6.56	7.06	4.64
Mean No. Live Fetuses	16.1	13.4	15.3	14.9

Abbreviations: - = no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t(last)}$=area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration; BLQ=below the limit of quantitation (<20.0 ng/mL plasma); C_{max}=maximum observed concentration occurring at T_{max}; CTD=common technical document; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; ICH=International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; LD=lactation day; No.=number; PND=postnatal day; TK=toxicokinetic(s); T_{max}=time to reach maximum concentration; USP=United States Pharmacopeia.

Note: *r=Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.05 level.

2.6.7.15 新生児を用いた試験

新生児を用いた試験は実施しなかった。

2.6.7.16 局所刺激性試験

局所刺激性試験は実施しなかった。しかしながら、ラット及びサルにおける重要な反復投与毒性試験の一部として、ブトリシランが皮膚刺激性を有する可能性を評価した。表 2.6.7-9、試験番号 TTRSC02-GLP15-026；表 2.6.7-10、試験番号 TTRSC02 GLP15-040；表 2.6.7-12、試験番号 TTRSC02-GLP15-025；及び表 2.6.7-13、試験番号 TTRSC02-GLP15-039 参照。

2.6.7.17 その他の毒性試験

表 2.6.7-28 その他の毒性試験

Other Toxicity Studies					**Test Article: Vutrisiran**	
Species/Strain	**Method of Admin.**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Sex and No. Per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number Location in CTD**
Antigenicity						
Dedicated antigenicity studies have not been conducted with vutrisiran. Anti-drug antibodies (IgG/IgM) were evaluated in the 6-month rat and 9-month monkey pivotal studies. See 表 2.6.7-10, TTRSC02-GLP15-040 (rats) and 表 2.6.7-13, TTRSC02-GLP15-039 (monkeys).						
Immunotoxicity[a]						
Fresh human whole blood	*In vitro* (transfection with DOTAP)	20-24 h incubation at 37°C	4 µg/mL	4 donors	No significant induction of measured cytokine/chemokine parameters. Individual and mean responses to vutrisiran were less than or equal to 2-fold relative to the medium control for all 8 analytes (IL-1β, IL-1RA, IL-6, IL-8, G-CSF, IP-10, MIP-1α, TNF-α).	[TTRSC02-DSM15-045] CTD: 4.2.3.7.2-1
Monkey/ Cynomolgus	SC	13 weeks	0 (0.9% NaCl), 100, 300 (qM×4)	3F/group	There were no vutrisiran-related alterations to plasma cytokines (G-CSF, GM-CSF, IFN-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, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, CD40 ligand, TGF-α, TNF-α, VEGF) on Days 1 or 85.	[TTRSC02-DSM15-027] CTD: 4.2.3.2-5

表 2.6.7-28 その他の毒性試験（続き）

Other Toxicity Studies					**Test Article: Vutrisiran**	
Species/Strain	**Method of Admin.**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Sex and No. Per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number Location in CTD**
Mechanistic Studies						
Mechanistic studies have not been conducted with vutrisiran.						
Dependence						
Dependence studies have not been conducted with vutrisiran. There were no general behavioral changes in the pivotal repeat-dose rat studies (see 表 2.6.7-9, TTRSC02-GLP15-026; 表 2.6.7-10, TTRSC02-GLP15-040; 表 2.6.7-11, TTRSC02-DSM17-011) or neurobehavioral effects in the pivotal repeat-dose monkey studies (see 表 2.6.7-12, TTRSC02-GLP15-025; 表 2.6.7-13, TTRSC02-GLP15-039).						
Metabolites						
Metabolite toxicity studies have not been conducted with vutrisiran.						
Impurities						
Impurity studies have not been conducted with vutrisiran.						
Other						
Other toxicity studies, including evaluation of phototoxicity, have not been conducted with vutrisiran.						

Abbreviations: Admin.=administration; CTD=common technical document; DOTAP=N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate; F=female; G-CSF=granulocyte-colony stimulating factor; GM-CSF=granulocyte macrophage colony-stimulating factor; IFN=interferon; Ig=immunoglobulin; IL=interleukin; IL-1RA=interleukin-1 receptor antagonist; IP-10=interferon gamma-induced protein 10; MCP-1=monocyte chemoattractant protein-1; MIP=macrophage inflammatory protein; No.=number; qM=once monthly; SC=subcutaneous(ly); TGF-α=transforming growth factor-α; TNF-α=tumor necrosis factor-α; VEGF=vascular endothelial growth factor.

a Dedicated immunotoxicity studies have not been conducted with vutrisiran. However, the immunostimulatory potential was investigated in 2 studies (TTRSC02-DSM15-045 and TTRSC02-DSM15-027).