2.6.1 緒言

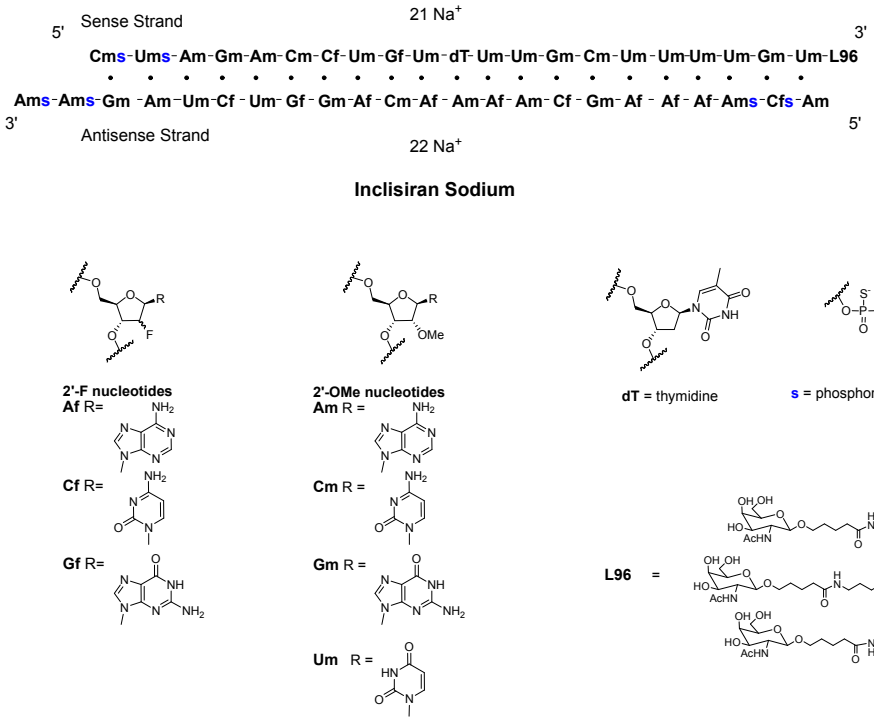
1 緒言

インクリシランは，プロ蛋白質転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型（PCSK9）の産生を阻害することにより，低比重リポ蛋白コレステロール（LDL-C）を低下させる低分子干渉 RNA（siRNA）である。インクリシランは，*PCSK9* mRNA を標的とした二本鎖の siRNA であり，*PCSK9* mRNA を切断して PCSK9 の減少を誘導する。PCSK9 は主に肝臓で発現し，低比重リポ蛋白受容体（LDLR）の減少に関与している。PCSK9 が LDLR に結合すると，LDLR は細胞内で分解され肝細胞表面に戻って再利用されないため，血流からの LDL-C のクリアランスを担う LDLR の量が減少して血中 LDL-C 濃度が上昇する（Mousavi et al. 2009）。インクリシランは PCSK9 の減少を誘導することで肝細胞表面の LDLR を増加させて，血中 LDL-C 濃度を低下させることから，高コレステロール血症（家族性を含む）や動脈硬化性心血管疾患（ASCVD）リスクの減少に対して治療効果が期待される。

2 薬物の名称及び構造式

インクリシラン製剤は，インクリシラン注射液（ALN-PCSSC 又は PCSSC），原薬はインクリシラン又はインクリシランナトリウム（コード名：ALN-60212，AD-60212，又は A05AL）と称される。インクリシランナトリウムの構造を Figure 2-1 に示す。

Figure 2-1 インクリシランナトリウムの構造



Af：アデニン 2'-F リボヌクレオチド，Cf：シトシン 2'-F リボヌクレオチド，Gf：グアニン 2'-F リボヌクレオチド，Am：アデニン 2'-OMe リボヌクレオチド，Cm：シトシン 2'-OMe リボヌクレオチド，Gm：グアニン 2'-OMe リボヌクレオチド，Um：ウラシル 2'-OMe リボヌクレオチド，L96：3 分岐型 GalNAc（N-アセチルガラクトサミン）

インクリシランナトリウムの分子式は $C_{529}H_{664}F_{12}N_{176}Na_{43}O_{316}P_{43}S_6$，分子量は 17,284.72 g/mol である。

なお，*in vitro* 試験での濃度はすべて遊離酸での表記であり，その他の非臨床試験では特に断わらない限りすべてナトリウム塩での表記とした。

3 薬理学的特性

インクリシランは，*PCSK9* 遺伝子を標的とした siRNA 治療薬であり，循環血中の LDL-C 濃度を低下させる。*PCSK9* 遺伝子のさまざまな変異（ナンセンス変異を含む）と ASCVD リスクとの関連が示唆されており，PCSK9 の機能欠損型変異を有する者は LDL-C 値が有意に低く，ASCVD リスクも低いことが報告されている（Cohen et al. 2006）。

インクリシランは，二本鎖（センス鎖 21 塩基長，アンチセンス鎖 23 塩基長）の siRNA であり，センス鎖には 3 分岐型の N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）が結合した構造を有している。本剤の安定性を高めるため，アンチセンス鎖の 5’及び 3’末端には，それぞれ 2 箇所のホスホロチオエート結合が含まれており，センス鎖の 5’末端には 2 箇所のホスホロチオエート結合が含まれる。また，修飾部分である GalNAc は肝細胞表面に高発現するアシアロ糖蛋白受容体（ASGPR）に結合するため，本剤はエンドサイトーシスにより肝臓特異的に取り込まれるよう設計されている。この機構によって本剤が肝細胞内に取り込まれたのち，RNA 干渉作用により *PCSK9* mRNA の分解が触媒され，PCSK9 の発現は持続的に低下する。PCSK9 は LDLR と結合しリソソームによる LDLR の分解を促進する役割を有することから，本剤の PCSK9 発現低下効果により肝細胞表面上の LDLR 量は増加し，LDLR による LDL-C の取り込みが促進される。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチンの長期投与により PCSK9 の合成亢進が示唆されていることから（Welder et al. 2010，横手 2017），本剤の併用による LDL-C 低下効果も期待される。以上より，インクリシランは新規モダリティを有する持続型 LDL-C 低下 siRNA 製剤として，肝細胞内に特異的に取り込まれ RNA 誘導サイレンシング複合体（RISC）を形成し，細胞内での代謝安定性が高く，標的遺伝子の mRNA の発現を持続的に抑制することから，長期間にわたり循環血中の LDL-C 低下効果をもたらすことが期待される。

4 効能効果・用法用量

（効能又は効果）

高コレステロール血症（家族性を含む）

ただし，以下のいずれも満たす場合に限る。

・心血管イベントの発現リスクが高い

・HMG-CoA 還元酵素阻害剤で効果不十分，又は HMG-CoA 還元酵素阻害剤による治療が適さない

（用法及び用量）

通常，成人にはインクリシランナトリウムとして 1 回 300 mg を初回，3 ヵ月後に皮下投与し，以降 6 ヵ月に 1 回の間隔で皮下投与する。

5 参考文献

[Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, et al. (2006)] Sequence variations in *PCSK9*, low LDL, and protection against coronary heart disease. N Engl J Med; 354:1264-72.

[Mousavi SA, Berge KE, Leren TP (2009)] The unique role of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 in cholesterol homeostasis. J Intern Med; 266:507-19.

[Welder G, Zineh I, Pacanowski MA, et al. (2010)] High-dose atorvastatin causes a rapid sustained increase in human serum PCSK9 and disrupts its correlation with LDL cholesterol. J Lipid Res; 51(9):2714-21.

[横手幸太郎 (2017)] 動脈硬化予防を目指す生活習慣病の管理. 日本内科学会雑誌; 106(3):484-9.

2.6.2 薬理試験の概要文

目　次

目　次 2
表 一 覧 3
図 一 覧 3
略号一覧 4
1 薬理試験の概要文 6
1.1 まとめ 6
2 効力を裏付ける試験 7
2.1 *In vitro* 活性と選択性 7
2.2 作用機序の検討 8
2.3 *In vivo* 薬理作用 10
2.3.1 ヒト *PCSK9* 遺伝子導入マウスに対するインクリシランの薬理作用 10
2.3.2 サルに対するインクリシランの薬理作用及び臨床に向けた用法用量検討 11
3 副次的薬理試験 19
3.1 オフターゲット活性の解析 19
3.2 標的外組織での RISC への結合 23
4 安全性薬理試験 23
4.1 *In vivo* 安全性薬理試験 23
5 薬力学的薬物相互作用試験 24
6 考察及び結論 25
7 参考文献 26

表 一 覧

Table 2-1 サルにおけるインクリシランの PK/PD 相関 18
Table 3-1 インクリシランのアンチセンス鎖に関する潜在的オフターゲット候補遺伝子....20
Table 3-2 センス鎖に関するオフターゲット候補遺伝子....22

図 一 覧

Figure 2-1 インクリシランの肝臓特異的な送達機構及び RNA 干渉作用 9
Figure 2-2 *hPCSK9* Tg マウスに対するインクリシランの hPCSK9 低下効果....10
Figure 2-3 カニクイザルにインクリシランを単回投与したときの血漿中 PCSK9 濃度及び血清中 LDL-C 値....12
Figure 2-4 カニクイザルにインクリシランを Q2W，QM，又は Q2M 投与したときの血漿中 PCSK9 濃度及び血清中 LDL-C 値....14
Figure 2-5 カニクイザルにインクリシランを QM 投与したときの血漿中 PCSK9 濃度及び血清中 LDL-C 値....16
Figure 2-6 カニクイザルにインクリシランを Q3M 投与したときの血漿中 PCSK9 濃度及び LDL-C 値....17

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
Ago	argonaute	アルゴノート
ASGPR	asialoglycoprotein receptor	アシアロ糖蛋白受容体
AUC0-t	area under the drug plasma concentration-time curve from time 0 to the time of the last measurable concentration	0 時間から濃度測定可能な最終時点までの血漿中薬物濃度-時間曲線下面積
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	相補的デオキシリボ核酸
Cmax	maximal drug plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ECG	electrocardiogram	心電図
ED_{50}	half maximal effective dose	50%有効量
ED_{80}	80% effective dose	80%有効量
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫測定法
GalNAc	N-acetylgalactosamine	N-アセチルガラクトサミン
hPCSK9	human PCSK9	ヒト PCSK9
HDL-C	high density lipoprotein-cholesterol	高比重リポ蛋白コレステロール
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
IV	intravenous	静脈内
LDL-C	low density lipoprotein-cholesterol	低比重リポ蛋白コレステロール
LDLR	low density lipoprotein receptor	低比重リポ蛋白受容体
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information	米国国立生物工学情報センター
NOEL	no observed effect level	無作用量
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	プロ蛋白質転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型
PD	pharmacodynamics	薬力学
PK	pharmacokinetics	薬物動態
Q2M	every other month	2 ヵ月に 1 回
Q2W	once every 2 weeks	2 週に 1 回
QM	once monthly	月 1 回
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	定量的ポリメラーゼ連鎖反応
QTc	QT interval corrected for heart rate	心拍数補正 QT 間隔
RISC	RNA-induced silencing complex	RNA 誘導サイレンシング複合体
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RNAi	RNA interference	RNA 干渉
RT	reverse transcription	逆転写
SC	subcutaneous	皮下
siRNA	small interfering RNA	低分子干渉 RNA
SNP	single nucleotide polymorphism	一塩基多型
TRBP	trans-activation response (TAR)-RNA binding protein	TRBP：trans-activation response (TAR)-RNA 結合蛋白

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
Tg	transgenic	遺伝子導入

1 薬理試験の概要文

1.1 まとめ

インクリシラン（ALN-PCSSC 又は別名 ALN-60212 と表記される）は，プロ蛋白質転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型（PCSK9）の mRNA を標的とした二本鎖の低分子干渉 RNA（siRNA）である。センス鎖には 3 分岐型の N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）が結合した構造を有している。また，修飾部分である GalNAc は肝細胞表面に高発現するアシアロ糖蛋白受容体（ASGPR）に結合するため，本薬はエンドサイトーシスにより肝臓特異的に取り込まれるよう設計されている。本薬が肝細胞内に取り込まれたのち，本薬の作用機序である RNA 干渉（RNAi）作用を利用して *PCSK9* mRNA の分解が触媒され，PCSK9 蛋白質の発現は持続的に低下する。PCSK9 は低比重リポ蛋白受容体（LDLR）と結合し，リソソームによる LDLR の分解を促進する役割を有することから，本薬の PCSK9 発現低下効果により肝細胞表面上の LDLR 量は増加し，LDLR による低比重リポ蛋白コレステロール（LDL-C）の取り込みが促進される。

原発性高脂血症や家族性高コレステロール血症では，スタチン系薬剤等既存の経口剤の効果が不十分な症例もみられる。インクリシランはスタチン治療下で効果不十分な患者及びスタチン不耐の患者を対象として開発された。通常，成人にはインクリシランナトリウムとして 1 回 300 mg を初回及び 3 ヵ月後に皮下投与し，以降 6 ヵ月に 1 回の間隔で皮下投与する。

インクリシランの薬理試験として，ヒト *PCSK9*（*hPCSK9*）mRNA に特異的な siRNA を特定するためのバイオインフォマティクス解析，作用機序の検討，及びヒト肝細胞を用いた *in vitro* 活性の評価，並びに *hPCSK9* 遺伝子導入（Tg）マウス及びカニクイザルを用いた *in vivo* 薬理試験を実施した。インクリシランのヌクレオチド配列は，ヒト及びカニクイザルの *PCSK9* 遺伝子に作用する配列部分と完全な相同性を示し，ラット及びマウスの *PCSK9* 遺伝子配列とは部分的に相同性を示す。そのため，インクリシランの *in vivo* 薬理活性の評価は主にサルで実施した。

インクリシランはサルへの皮下投与で強力かつ用量依存的な薬理活性を示し，血漿中 PCSK9 濃度と血清中 LDL-C 値を低下させた。サルにインクリシランを単回皮下投与したとき，血漿中 PCSK9 濃度は用量依存的に低下し，投与 20～30 日後に最も低下した。インクリシラン投与後，3 及び 6 mg/kg 群では投与 150 日後に血漿中 PCSK9 濃度は投与前値まで回復したが，最高用量の 10 mg/kg 群では投与 180 日後まで血漿中 PCSK9 濃度は低値のまま維持された。インクリシランの血中濃度と作用持続時間との間には時間差があり，サルにインクリシランを最高用量（6 mg/kg）で単回投与したとき，血漿中インクリシラン濃度は投与後約 24 時間以内に検出限界以下まで低下した。また，反復投与では血漿中 PCSK9 濃度及び血清中 LDL-C 値は投与 100 日後まで低値のまま維持された。

なお，最高用量（6 mg/kg）を初回投与後，1～6 mg/kg の用量を Q2W（2 週に 1 回），QM（月 1 回），又は Q2M（2 ヵ月に 1 回）の用法で維持投与しても，検討したいずれの用法用量でもタキフィラキシーの兆候は認められなかった。

副次的薬理試験でのバイオインフォマティクス解析では，20（うち 2 つは肝臓に発現せず）の遺伝子がインクリシランのオフターゲットと予測された。Hep3B 細胞を用いて，インクリシランの遺伝子発現抑制作用を検討したところ，オフターゲットと予測された遺伝子に対する発現抑制作用は弱く，IC_{50}はオンターゲット作用（PCSK9 低下効果）の 45 倍以上であった。なお，オフターゲットと予測されたが肝臓（Hep3B 細胞）での発現がみられなかった 2 つの標的である SULF1 及び FAM196B とインクリシランの細胞内への取り込みに関与する ASGPR との共発現解析の結果から，ヒトの肝臓以外の組織においてもインクリシランが SULF1 及び FAM196B にオフターゲット作用を示す可能性は低いと考えられた。また，サルの毒性試験で得られた心臓組織検体を用いた RNA 誘導サイレンシング複合体（RISC）結合アッセイ試験結果から，インクリシランは PCSK9 を発現していない標的外組織では RISC に結合しない可能性が高いことが示された。したがって，インクリシランが標的外の mRNA に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

In vitro hERG 試験は，インクリシランのような核酸医薬品の評価に適切な試験系ではないことから，当該試験は実施しなかった。テレメトリー装着カニクイザルを用いた安全性薬理試験では，インクリシラン投与による心電図（ECG），血圧，呼吸数，及び体温への影響は認められなかった。また，サルを用いた 4 週間，15 週間，及び 40 週間反復投与毒性試験の一部として実施した神経学的評価では，インクリシラン投与に関連する中枢神経系への影響は認められなかった。

2 効力を裏付ける試験

2.1 *In vitro* 活性と選択性

インクリシランの創薬過程では，*hPCSK9* mRNA に特異的な siRNA を特定するためのバイオインフォマティクス解析及び Hep3B 細胞を用いた *in vitro* 試験を実施した[Table 2.6.3.1-BIO14020]。なお，ヒトとサルの *PCSK9* mRNA 配列は完全に一致する。

バイオインフォマティクス解析のツールとして[redacted]種の siRNA からなるライブラリーを作製した。これらは，各々[redacted]箇所，化学修飾の異なる配列モチーフからなるユニークな遺伝子配列を有していた。トランスフェクション試薬（RNAiMax）を用いて Hep3B 細胞に各 siRNA（100 pmol/L，n = 2～4）を導入し，24 時間後に *PCSK9* mRNA レベルを測定した。対照として非特異的 siRNA 導入細胞を用いた。

その結果，100 pmol/L で約 70%の *PCSK9* mRNA の低下を示した[redacted]を選択した。[redacted]，[redacted]，その siRNA を[redacted]と名付けた。[redacted]をリード化合物としてさらなる化学修飾を施し，[redacted]種の siRNA を合成した。これらの siRNA を用いて 3 度の *in vitro* スクリーニングを実施した結果，[redacted]，[redacted]（[redacted]）[redacted]（[redacted]）[redacted]安定性の向上と活性の維持が確認され，インクリシラン（ALN-60212）が選択された。これまで 2 回試験を実施し，イン

クリシランの *PCSK9* mRNA 低下効果の IC_{50} は 2.5 pmol/L 及び 218 pmol/L であった[Table 2.6.3.1-BIO14020]，[Table 2.6.3.1-BIO14019]。なお，2 試験の IC_{50} の違いは試験の目的（14020 試験は ALN-60212 の選択，14019 試験はオフターゲット作用の分析）が異なることや段階希釈濃度のポイント数と n 数，細胞株の違い等によるものと考えられた。

米国国立生物工学情報センター（NCBI）のヒトの一塩基多型（SNP）のデータベース（NCBI dbSNP Build 132）を用いて，*hPCSK9* を網羅する領域（NCBI GeneID：255738）である一番染色体（nucleotide record NT_032977.9）のヒトゲノムアセンブリ GRCh37 の解析を実施し，インクリシラン結合部位に生じる可能性のある SNP の同定を行った。インクリシランは，*PCSK9* mRNA 参照配列（RefSeq）のエクソン 12 の 3525 から 3548 番目のヌクレオチドを標的として認識するが，バイオインフォマティクス解析から本領域に遺伝子多型は認められなかった[Table 2.6.3.1-BIO14041]。

さらにインクリシランの標的領域を含む *PCSK9* 部位の増幅と塩基配列の決定を[redacted]人のドナーから得られたさまざまな DNA サンプルを用いて行った。なお，これらの DNA サンプルは[redacted]。本 DNA サンプルには，[redacted]含まれていた。

[redacted]の解析で示された *hPCSK9* mRNA の配列は，SNP データベースから見出された *hPCSK9* mRNA の配列と同様，インクリシランの標的領域内で 100%保存されていたことから，インクリシランがさまざまな地域や民族が保有する *hPCSK9* mRNA に対して抑制作用を示し，PCSK9 を減少させることが示唆された。

2.2 作用機序の検討

siRNA によって引き起こされる RNAi 作用は，元来，細胞に備わっている遺伝子発現抑制の自然な過程である。合成 siRNA は，3’末端に 2～4 塩基のオーバーハング構造を有する 19～25 塩基対の二本鎖オリゴヌクレオチドである。siRNA の二本鎖のうち一方はアンチセンス鎖（又はガイド鎖）と呼ばれ，もう一方はセンス鎖（又はパッセンジャー鎖）と呼ばれる。アンチセンス鎖は，標的である相補的 mRNA に結合することにより作用を発揮する。siRNA は細胞質内へ放出されると，RISC と呼ばれる酵素複合体に取り込まれる。RISC 内でアンチセンス鎖がその標的 mRNA に結合して mRNA を触媒的に切断することにより，mRNA にコードされている蛋白質の産生が阻害される（Elbashir et al. 2001）。

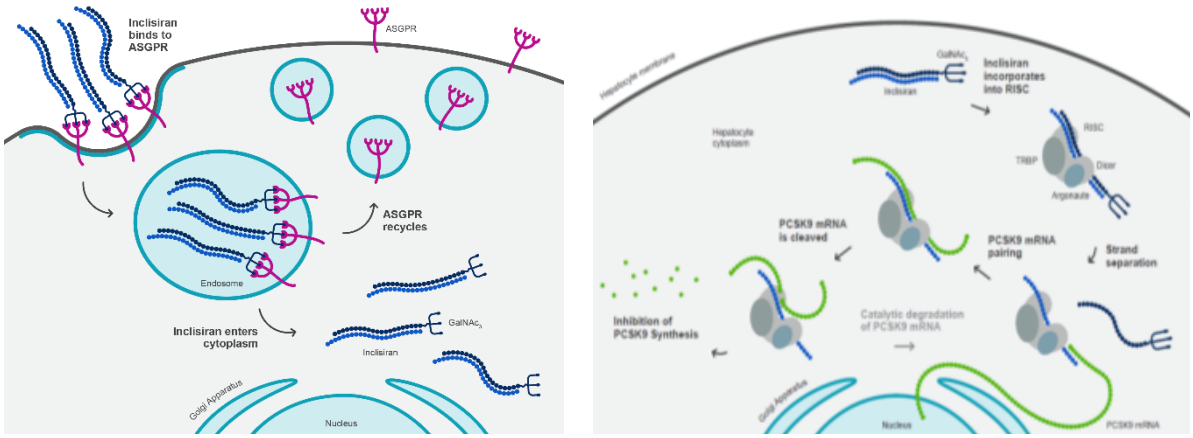
インクリシランはセンス鎖に 21 個，アンチセンス鎖に 23 個のヌクレオチドを有する siRNA であり，アンチセンス鎖の 3’末端に 2 塩基のオーバーハングを有する。インクリシランのアンチセンス鎖は，RISC 内で *hPCSK9* mRNA に結合して mRNA を触媒的に切断することにより，PCSK9 の発現を抑制する。PCSK9 は LDLR に結合してリソソームでの分解を促進することにより，肝細

胞での LDLR の発現量を制御している。LDLR が分解されると循環血中 LDL-C 値が上昇するが，インクリシラン投与により PCSK9 の産生が抑制されると，肝細胞での LDLR 発現量が増加し LDL-C のクリアランスが上昇するため，血中 LDL-C 値が低下する。

未修飾の siRNA を全身投与した場合，血漿中から速やかに消失し，組織へ十分な分布を示さないため，標的組織の細胞への siRNA の取込みを促進するさまざまな化学修飾が行われる。化学修飾の手法として，標的組織への分布と受容体を介した細胞への取込みを促進させる低分子リガンドを siRNA に結合させる方法がある（Soutschek et al. 2004）。インクリシランは，ASGPR を介して肝細胞に取り込まれるように糖鎖リガンドの GalNAc を結合させている。ASGPR は，ガラクトース（Gal）又は GalNAc 残基の糖蛋白質を認識して結合する C 型レクチン受容体ファミリーのメンバーである（Ashwell and Morell 1974）。ASGPR は肝細胞の表面に高密度（1 細胞あたり 50 万～120 万コピー）で発現しており（Baenziger and Fiete 1980，Schwartz et al. 1980），脱シアル化したアシアロ糖蛋白質を肝細胞に取り込むことにより血中からの消失を促進する（Geffen and Spiess 1992）。ASGPR はアシアロ糖蛋白質を肝細胞に取りこんだ後，細胞表面にリサイクルされる。ASGPR は肝細胞に高レベルで発現していること，アシアロ糖蛋白質の取込みを複数回媒介できること，及びリガンド特異性を有することから，ASGPR を利用した薬物送達法は，肝臓を標的とする医薬品や遺伝子を効率よく肝臓に送達するために広く利用されている（Wu et al. 2002）。

ASGPR を利用した薬物送達法を用いたインクリシランの肝臓特異的な送達機構及び RNAi 作用を Figure 2-1 に示す。インクリシランの修飾部分である GalNAc は肝細胞表面に高発現する ASGPR に結合するため，本薬はエンドサイトーシスにより肝臓特異的に取り込まれるよう設計されている。この機構によって本薬が肝細胞内に取り込まれたのち，RNAi 作用を利用して *PCSK9* mRNA の分解が触媒され，PCSK9 の発現は持続的に低下する。

Figure 2-1　　インクリシランの肝臓特異的な送達機構及び RNA 干渉作用



左図）インクリシランは，その化学的修飾部分である GalNAc の肝細胞上の ASGPR への結合を介して，エンドサイトーシスにより肝細胞内に特異的に取り込まれる。その後，エンドソーム内に取り込まれたインクリシランは細胞質内に徐々に放出され，ASGPR が細胞表面上にリサイクルされる。

右図）細胞質内に放出されたインクリシランは RISC に取り込まれ，RNA 二本鎖がほどかれて解離したアンチセンス鎖が *PCSK9* mRNA の相補的な配列を認識し，*PCSK9* mRNA のコピーが順次切断され，肝臓での PCSK9 発現は持続的に低下する。

ASGPR：アシアロ糖蛋白質受容体，GalNAc：N-アセチルガラクトサミン，mRNA：メッセンジャーリボ核酸，RISC：RNA 誘導サイレンシング複合体，TRBP：trans-activation response (TAR)-RNA 結合蛋白

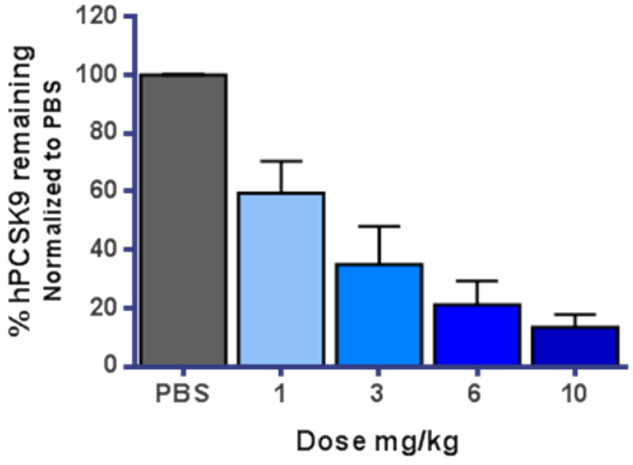
2.3 *In vivo* 薬理作用

2.3.1 ヒト *PCSK9* 遺伝子導入マウスに対するインクリシランの薬理作用

インクリシランの *in vivo* 薬理作用を検討する目的で，*hPCSK9* 遺伝子導入（Tg）マウスを用いて hPCSK9 低下効果を評価した[Table 2.6.3.1-BIO14048]。hPCSK9 をマウスの肝臓で発現させた *hPCSK9* Tg マウスを作製した。*hPCSK9* cDNA のクローニングには[redacted]及び[redacted]を用い，[redacted]した。交雑には C57BL/6 マウスを用いた。本 Tg マウスには *hPCSK9* 遺伝子が導入されているものの依然としてマウスの PCSK9 が発現しているため，インクリシランにより *PCSK9* mRNA レベルが低下しても血清中脂質パラメータの変化を適切に評価できない。そのため，本試験ではインクリシラン投与後に血清中の hPCSK9 濃度を測定し，薬理作用を評価した。

hPCSK9 Tg マウスにインクリシランを 1，3，6，又は 10 mg/kg の用量で単回皮下投与した。対照として溶媒（PBS）を投与した。投与直前（Day 0）及び Day 10 に眼窩静脈から採血し，血清分離後，hPCSK9 特異的 ELISA により血清中 hPCSK9 濃度を測定した。その結果，インクリシランの用量増加に伴う hPCSK9 濃度の低下が認められ（Figure 2-2），得られたデータから hPCSK9 低下効果の ED_{50} 及び ED_{80} は 2 及び 6 mg/kg と推定された。

Figure 2-2 *hPCSK9* Tg マウスに対するインクリシランの hPCSK9 低下効果



Source: Table 2.6.3.1-BIO14048

hPCSK9 Tg マウスにインクリシランを 1，3，6，又は 10 mg/kg の用量で単回皮下投与した（n = 4 又は 5/群）。対照として溶媒（PBS）を投与した（n = 2）。投与直前（Day 0）及び Day 10 に眼窩静脈から採血し，血清分離後，hPCSK9 特異的 ELISA により血清中 hPCSK9 濃度を測定した。

値は溶媒対照群の hPCSK9 濃度を 100 としたときの割合（%，平均値 ± 標準偏差）

2.3.2 サルに対するインクリシランの薬理作用及び臨床に向けた用法用量検討

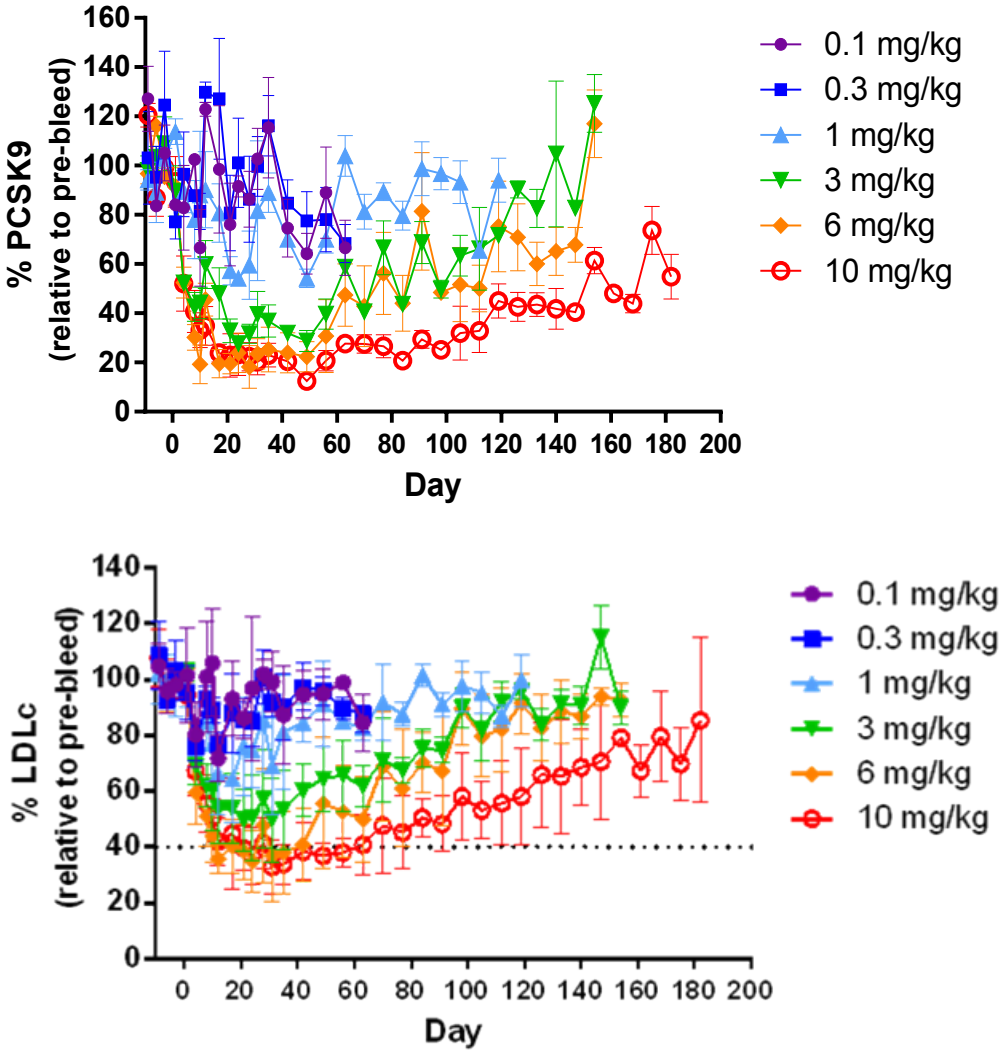
2.3.2.1 単回投与での薬理作用の検討

インクリシランの薬理作用及び効果をサルで確認する目的で，カニクイザルにインクリシランを単回投与し，血漿中 PCSK9 低下効果及び脂質低下効果を評価した[Table 2.6.3.1-20049640]。雌性カニクイザルにインクリシランを 0.1，0.3，1，3，6，及び 10 mg/kg の用量で単回皮下投与した後，経時的に採血し，血漿中 PCSK9 濃度並びに血清中総コレステロール，高比重リポ蛋白コレステロール（HDL-C），LDL-C，及びトリグリセリド値を測定した。また，同様に血漿中インクリシラン濃度を測定した。

その結果，インクリシランは 1 mg/kg 以上の用量で血漿中 PCSK9 濃度を用量依存的かつ持続的に低下させ，PCSK9 の低下と並行して血清中 LDL-C 値の低下が認められた（Figure 2-3）。1 mg/kg 投与群では PCSK9 及び LDL-C はそれぞれ 40%及び 30%低下し，投与後 1 ヵ月以内にいずれも投与前値まで回復した。3 mg/kg 以上の用量ではより著明な効果が認められ，1，3，6，及び 10 mg/kg 群で PCSK9 濃度が最も低下するまでの到達日数は，それぞれ Day 15，24，28，及び 49 であり，LDL-C 値が最も低下するまでの到達日数は，それぞれ Day 15，15，35，及び 31 であった。PCSK9 の最大低下率の平均は，1，3，6，及び 10 mg/kg 群で，各々，40，76.2，85，及び 88.3%であった。また，LDL-C の最大低下率の平均は，1，3，6，及び 10 mg/kg 群で，各々，33，52.4，69.6，及び 68.8%であった。6 mg/kg と 10 mg/kg の用量間で効力に違いは認められなかったことから，サルでのインクリシランの PCSK9 及び LDL-C 低下効果は 6 mg/kg で最大に達することが示された。一方，作用持続時間に関しては用量依存的な効果が認められ，3 及び 6 mg/kg 群では LDL-C 値が Day 100 までに，また，PCSK9 は Day 150 に投与前値まで回復したが，10 mg/kg 群では PCSK9 及び LDL-C 値が投与前値に戻る傾向を示したものの Day 180 まで投与前値よりも低値のまま維持された。

いずれの投与群も，HDL-C 及びトリグリセリド値に対してインクリシラン投与に関連した変化は認められなかった。3 mg/kg 以上の群では，総コレステロール値は LDL-C の低下を反映して最大 30%低下した。

Figure 2-3　カニクイザルにインクリシランを単回投与したときの血漿中 PCSK9 濃度及び血清中 LDL-C 値



Source: Table 2.6.3.1-20049640

雌性カニクイザル（n = 3/群）にインクリシランを 0.1，0.3，1，3，6，及び 10 mg/kg の用量で単回皮下投与（Day 1）した後，静脈血を経時的に採血し，血漿中 PCSK9 濃度を ELISA 法で，血清中 LDL-C を酵素比色法で測定した。投与開始前に 3 回の採血を実施し PCSK9 及び LDL-C の平均値を投与前値とした。

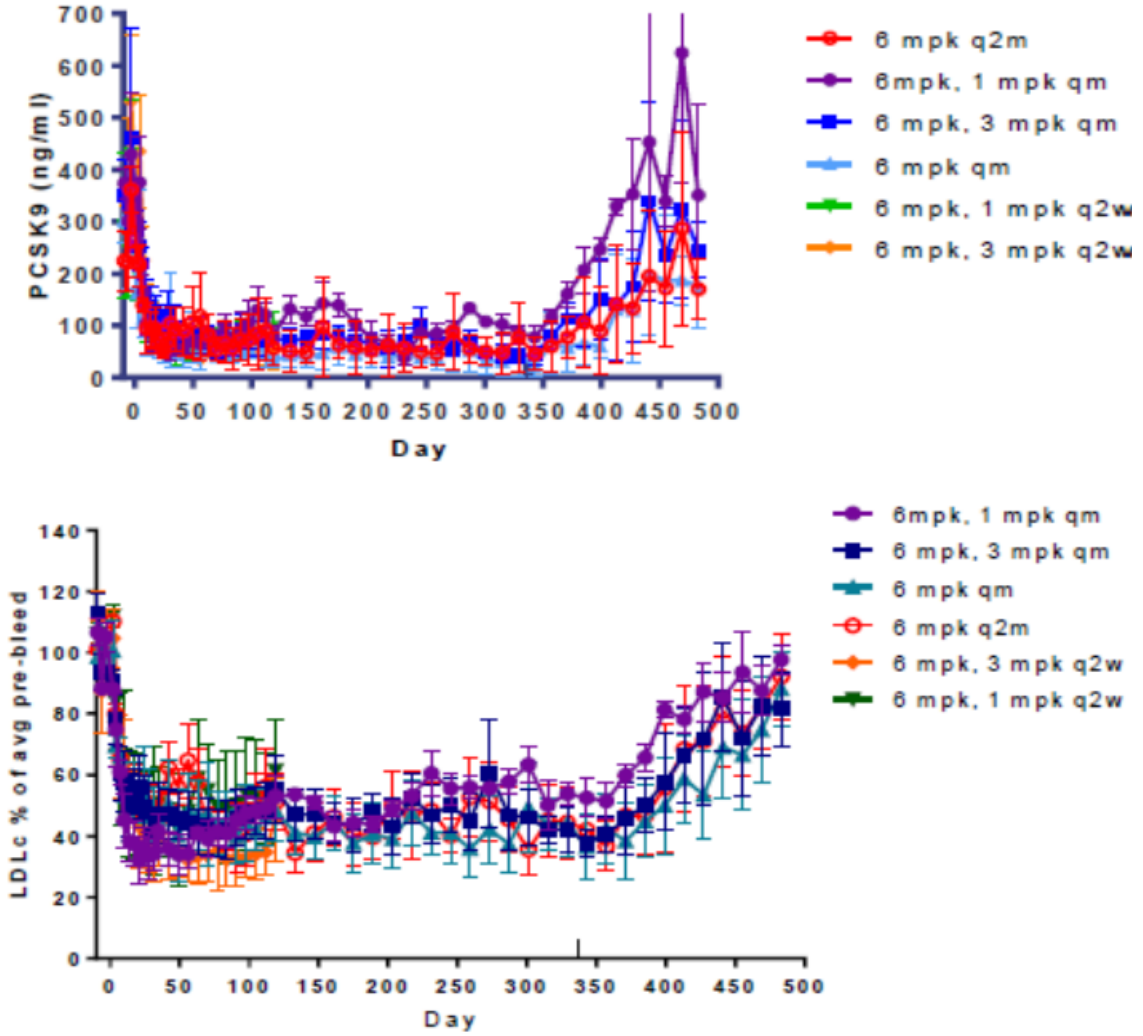
【上図】値は投与前の血漿中 PCSK9 濃度を 100 としたときの割合（%，平均値 ± 標準偏差，n = 3）。0.1 mg/kg 群と 3，6，及び 10 mg/kg 群との間に有意差（$p < 0.001$）が認められた（Tukey の多重比較検定）。

【下図】値は投与前の血清中 LDL-C 値を 100 としたときの割合（%，平均値 ± 標準偏差，n = 3）。0.1 mg/kg 群と 1，3，6，及び 10 mg/kg 群との間に有意差（$p < 0.001$）が認められた（Tukey の多重比較検定）。

2.3.2.2 反復投与での用法用量検討

インクリシランの反復投与での用法用量の検討を，PCSK9 及び LDL-C 低下効果を指標にカニクイザルを用いて行った[Table 2.6.3.1-20052053]。雌性カニクイザルにインクリシランを初回用量 6 mg/kg で皮下投与した後，Q2W（1 又は 3 mg/kg の用量で 2 週に 1 回，計 6 回皮下投与），QM（1，3，又は 6 mg/kg の用量で月 1 回，計 12 回皮下投与），若しくは Q2M（6 mg/kg の用量で 2 ヵ月に 1 回，計 6 回皮下投与），又は初回用量 10 mg/kg で皮下投与した後，Q3M（10 mg/kg の用量で 3 ヵ月に 1 回，計 3 回皮下投与）のいずれかの用法用量で投与，経時的に採血し，血漿中 PCSK9 濃度及び血清中 LDL-C 値を求めた。その結果，QM 投与群で PCSK9 濃度及び LDL-C 値の低下効果の用量依存的な持続がみられた。また，Q2W，QM，又は Q2M のいずれの投与群も血漿中 PCSK9 濃度及び血清中 LDL-C 値は投与前値と比較して低下し，Day 20 までに最大の低下率（PCSK9：93%，LDL-C：74%）を示し，約 1 年後の投与終了まで低値を示した。用法用量により PCSK9 濃度及び LDL-C 値の低下率に大きな違いはみられなかった（Figure 2-4）。

Figure 2-4　カニクイザルにインクリシランを Q2W，QM，又は Q2M 投与したときの血漿中 PCSK9 濃度及び血清中 LDL-C 値



Source: Table 2.6.3.1-20052053

雌性カニクイザル（n = 3/群）にインクリシラン（6 mg/kg）を単回皮下投与（Day 1）した後，Q2W（1 又は 3 mg/kg の用量で 2 週に 1 回，計 6 回皮下投与），QM（1，3，又は 6 mg/kg の用量で月 1 回，計 12 回皮下投与），又は Q2M（6 mg/kg の用量で 2 ヵ月に 1 回，計 6 回皮下投与）のいずれかの用法用量で投与した。静脈血を経時的に採血し，血漿中 PCSK9 濃度を ELISA 法で，血清中 LDL-C 値を酵素比色法で測定した。

【上図】値は血漿中 PCSK9 濃度（ng/mL，平均値 ± 標準偏差，n = 3）の推移を示す。

【下図】値は投与前の血清中 LDL-C 濃度を 100 としたときの割合（%，平均値 ± 標準偏差，n = 3）。

以上，インクリシランの初回用量 6 mg/kg を投与した後，より低用量（1 又は 3 mg/kg）を維持投与しても，血漿中 PCSK9 濃度及び血清中 LDL-C 値が低値のまま持続することが示された。

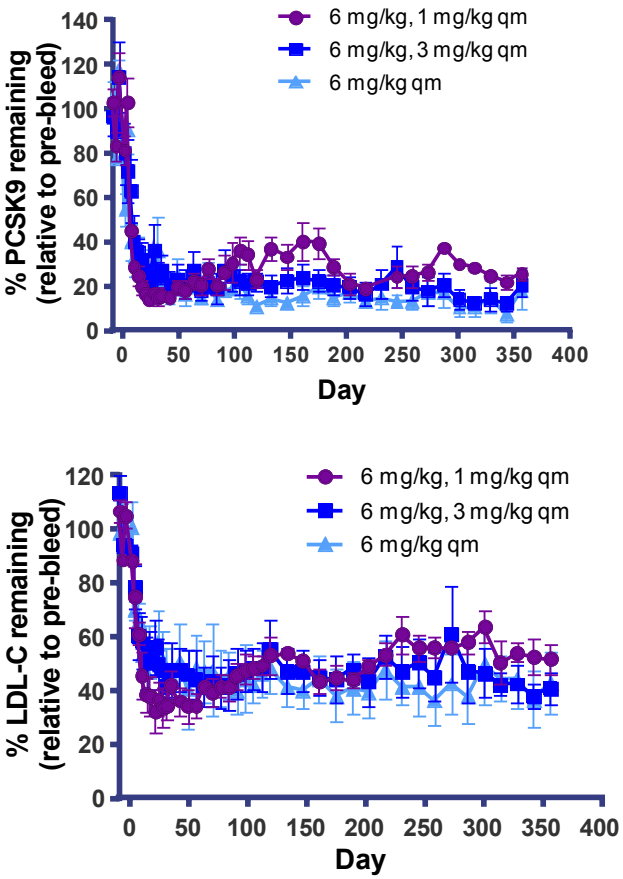
カニクイザルにインクリシランを初回用量 6 mg/kg で皮下投与した後，Q2W（1 又は 3 mg/kg の用量で 2 週に 1 回，計 6 回皮下投与）の用法用量で投与した群では，投与期間中に血漿中 PCSK9

濃度及び血清中LDL-C値は低下したものの，用量間で反応に差は認められなかった。また，Q2WとQM（月1回）投与の間で反応に差は認められなかったため，Day 119に薬力学的作用の評価を終了した。Q2Wで1 mg/kg及び3 mg/kgを投与した群では，Day 119の平均LDL-C値はそれぞれ59%及び46%であった。

QM投与後の血漿中PCSK9濃度及び血清中LDL-C値をFigure 2-5に示す。6 mg/kg初回投与後の1 mg/kg以上のQM投与により，単回投与試験と同様[Table 2.6.3.1-20049640]，血漿中PCSK9の低下と並行して血清中LDL-C値の低下がみられた。単回投与試験では，Day 100までにLDL-C値が投与前値付近まで回復したが（Figure 2-3），QM投与ではPCSK9及びLDL-C値が1年後まで低値で維持された。QM投与試験での投与をDay 337に終了したところ，PCSK9及びLDL-C値はDay 483の試験終了時までに投与前値の約80%まで回復した（データ未掲載）。

カニクイザルにインクリシランを初回用量6 mg/kgで皮下投与した後，Q2M（6 mg/kgの用量で2ヵ月に1回，計6回皮下投与）の用法用量で投与した群では，血漿中PCSK9及び血清中LDL-C値の低下はQ2W及びQM投与群と同程度であった。Q2M投与群では，次の投与前までにPCSK9濃度及びLDL-C値は部分的に回復した。試験終了時のDay 483では，LDL-C値は88%まで回復した。

Figure 2-5　カニクイザルにインクリシランを QM 投与したときの血漿中 PCSK9 濃度及び血清中 LDL-C 値



Source: Table 2.6.3.1-20052053

雌性カニクイザル（n = 3/群）にインクリシラン（6 mg/kg）を単回皮下投与（Day 1）した後，QM（1，3，又は 6 mg/kg の用量で月 1 回，計 12 回皮下投与）で投与した。静脈血を経時的に採血し，血漿中 PCSK9 濃度を ELISA 法で，血清中 LDL-C 値を酵素比色法で測定した。投与開始前に 3 回の採血（pre-bleed）を実施し PCSK9 及び LDL-C の平均値を投与前値とした。

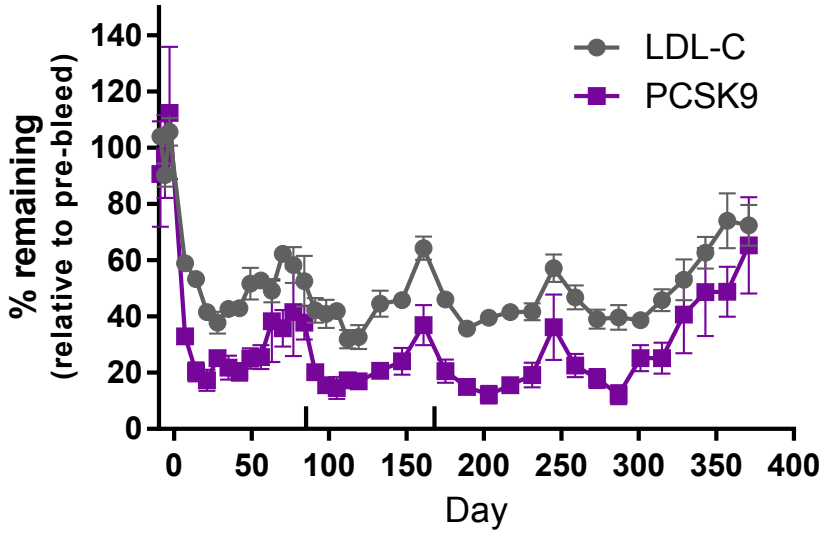
【上図】値は投与前（pre-bleed 時）の血漿中 PCSK9 濃度を 100 としたときの割合（%，平均値 ± 標準偏差，n = 3）。

【下図】値は投与前（pre-bleed 時）の血清中 LDL-C 値を 100 としたときの割合（%，平均値 ± 標準偏差，n = 3）。

Q3M（10 mg/kg）投与後の血漿中 PCSK9 濃度及び血清中 LDL-C 値を Figure 2-6 に示す。初回投与後，血漿中 PCSK9 及び血清中 LDL-C は低下したが，2 回目の投与前にはいずれも投与前値の 40%～60%まで回復した（Figure 2-6）。Day 253 で投与を終了し，Day 371 に採血を終了した。最終測定時の Day 371 に LDL-C 及び PCSK9 濃度の部分的回復が認められた（LDL-C 及び PCSK9 は投与前値の平均約 60%～70%まで回復）。

なお，検討したいずれの用法用量でもタキフィラキシーの兆候は認められなかった。

Figure 2-6　カニクイザルにインクリシランを Q3M 投与したときの血漿中 PCSK9 濃度及び LDL-C 値



Source: Table 2.6.3.1-20052053

雌性カニクイザル（n = 3/群）にインクリシラン（10 mg/kg）を単回皮下投与（Day 1）した後，Q3M（10 mg/kg の用量で 3 ヵ月に 1 回，計 3 回皮下投与）投与した。静脈血を経時的に採血し，血漿中 PCSK9 濃度を ELISA 法で，血清中 LDL-C 値を酵素比色法で測定した。投与開始前に 3 回の採血（pre-bleed）を実施し PCSK9 及び LDL-C の平均値を投与前値とした。

値は投与前の血漿中 PCSK9 濃度又は血清中 LDL-C 値を 100 としたときの割合（%，平均値 ± 標準偏差，n = 3）。

2.3.2.3　PK/PD 試験

カニクイザルを用いてインクリシランの PK/PD 試験を実施した[Table 2.6.3.1-8299434]。

雌雄のカニクイザルにインクリシラン 6 mg/kg を単回静脈内投与（雌雄各 2 例），又は 1，3，若しくは 6 mg/kg を単回皮下投与した（1 群雌雄各 4 例）。反復投与試験では，6 mg/kg を単回皮下投与した後，3 mg/kg を QM で計 3 回皮下投与し，もう一方の群には 3 mg/kg を Q2W で計 6 回皮下投与した。

インクリシランの曝露量と血漿中 PCSK9 及び血清中 LDL-C 低下効果を指標とした PK/PD 相関を Table 2-1 に示す。インクリシランを 6 mg/kg で単回静脈内投与したときの PCSK9 濃度及び LDL-C 値の最大低下率はそれぞれ 67%及び 34%であり，このときのインクリシランの Cmax 及び投与 4 時間後までの AUC0-t 値はそれぞれ 146 µg/mL 及び 26.4 h*µg/mL であった。

インクリシラン（1，3，又は 6 mg/kg）を皮下投与すると，用量増加とともに血漿中インクリシラン濃度の上昇と血漿中 PCSK9 濃度及び血清中 LDL-C 値の低下が認められた。6 mg/kg 群での PCSK9 及び LDL-C の最大低下率はそれぞれ 78%及び 50%であり，このときのインクリシランの Cmax 及び投与 8 時間後までの AUC0-t 値はそれぞれ 1.03 µg/mL 及び 6.53 h*µg/mL であった。3 mg/kg 単回投与でも 6 mg/kg 単回投与と同程度の PCSK9 及び LDL-C 低下率（それぞれ 73%及び

48%）が認められたが，3 mg/kg 群の Cmax 及び AUC0-t は 6 mg/kg 群の約半分であった。ただし，3 mg/kg 群の PCSK9 低下効果の持続時間は 6 mg/kg 群の 3 分の 1 であった。QM と Q2W 投与群で同程度の曝露量と PCSK9 及び LDL-C 低下率（それぞれ約 85%及び約 70%）が認められたことから，低頻度の投与でも同等の効果が得られることが示された。

PCSK9 の最大低下率は用量増加とともにわずかな上昇が認められ，1 及び 6 mg/kg の単回投与でそれぞれ 60%及び 78%，6 mg/kg の単回投与後の 3 mg/kg の Q2W 及び QM 投与でそれぞれ 84%及び 85%であった。一方，PCSK9 低下効果の持続時間に対しては用量による影響がより顕著に認められており，PCSK9 濃度が投与前値の 50%未満に維持された期間は，1，3，及び 6 mg/kg の単回投与群でそれぞれ投与後 7，28，及び 84 日間であり，用量増加とともに維持期間が延長された。Q2W 及び QM 投与群では最終投与後 84 日間であった。LDL-C 値が投与前値の 50%未満に維持された期間は，QM 及び Q2W 投与群でそれぞれ最終投与後 49 及び 56 日間であった。なお，血漿中インクリシラン濃度はすべての投与群で投与 24 時間後までに検出限界（20 ng/mL）以下になったことから，インクリシランの血中濃度と作用持続時間との間には時間的なずれがあることが示された。

Table 2-1　　サルにおけるインクリシランの PK/PD 相関

用量（mg/kg）及び例数	投与経路	Cmax (µg/mL)	AUC0-t (h*µg/mL)	血漿中 PCSK9 濃度		血清中 LDL-C 値	
				最大低下率 (%)	50%以上の低下効果の持続時間（日）	最大低下率 (%)	50%以上の低下効果の持続時間（日）
6（雄 2，雌 2）	IV	146	26.4	67	7	34	-
1（雄 4，雌 4）		0.137	0.741	60	7	30	-
3（雄 4，雌 4）		0.526	3.06	73	28	48	-
6（雄 4，雌 4）		1.03	6.53	78	84	50	1
6 / 3 QM[a]（雄 3，雌 3）	SC	0.478	2.60	84	154（最終投与後 84 日間）	67	112（最終投与後 49 日間）
6 / 3 Q2W[b]（雄 3，雌 3）		0.434	2.61	85	154（最終投与後 84 日間）	71	119（最終投与後 56 日間）

Source: Table 2.6.3.1-8299434

雌雄のカニクイザルにインクリシラン 6 mg/kg を単回静脈内投与（雌雄各 2 例），又は 1，3，若しくは 6 mg/kg を単回皮下投与（1 群雌雄各 4 例）した。反復投与試験では，6 mg/kg を単回皮下投与した後，3 mg/kg を QM で計 3 回皮下投与し，もう一方の群には 3 mg/kg を Q2W で計 6 回皮下投与した。

a：初回 6 mg/kg を投与後，3 mg/kg を月 1 回，計 3 回投与（6 / 3 mg/kg QM）

b：初回 6 mg/kg を投与後，3 mg/kg を 2 週に 1 回，計 6 回投与（6 / 3 mg/kg Q2W)

略号：IV：静脈内，SC：皮下，QM：月 1 回，Q2W：2 週に 1 回

-：50%に到達せず

3 副次的薬理試験

3.1 オフターゲット活性の解析

インクリシランにより阻害される可能性のある RNA を特定する目的で，「BruteForce」検索アルゴリズムを用いた *in silico* 解析を実施した（2022 年 10 月実施）[Table 2.6.3.1-BIO14019]。

ヒトゲノム参照配列（Gene）と全探索アルゴリズム「BruteForce」を用いてヒトトランスクリプトームのコンピュータ解析を実施した。「BruteForce」は Alnylam 社が開発した配列ベースの独自の検索アルゴリズムであり，siRNA の配列部分（アンチセンス鎖の 5’末端[redacted]位）が標的とする参照トランスクリプトームの可能性のある全配列のミスマッチ数及び位置に基づいて算出されるオフターゲットスコアを用いて，潜在的なオフターゲットを特定するためのアルゴリズムである。「BruteForce」検索アルゴリズムは，RISC 内の siRNA と mRNA の間でのミスマッチが多いほど，転写物の切断又はダウンレギュレーションといった相互作用の可能性が低いという前提に基づく。「BruteForce」検索では，参照トランスクリプトームとして NCBI RefSeq データセットは NM 及び XM_登録データを用いた。RefSeq トランスクリプトームには，成熟 mRNA，スプライシング，コーディング（NM_，XM_），及びノンコーディング（NR_）のデータが登録されている。XM_登録データはコード遺伝子としての存在やアノテーションが不明であることから，オフターゲット候補遺伝子に含めなかった。また，「BruteForce」検索アルゴリズムでは，[redacted]及び[redacted]，[redacted]，[redacted]。インクリシランのアンチセンス鎖の骨格となる[redacted]個のヌクレオチドと相補性を有するヒトゲノムの塩基配列を検索した。

相補性を示すアンチセンス鎖の領域によりオフターゲット活性を生じる可能性が異なるため，ミスマッチの位置や数の違いによりスコアが異なる様にオフターゲットスコア設定した。オフターゲットスコアはインクリシランのシード領域（アンチセンス鎖の 5'末端から[redacted]塩基の位置）の差が強調されるように重みづけがされており，シード領域である[redacted]位でミスマッチがみられた場合にはスコアは[redacted]，切断部位である[redacted]位のミスマッチは[redacted]，[redacted]位の領域のミスマッチは[redacted]とスコア化した。スコアが[redacted]の場合，標的特異的なオフターゲット活性を生じる可能性が有ると判断し，Hep3B 細胞を用いてオフターゲット活性を確認した。また，siRNA と mRNA の配列間でシード領域に[redacted]つのミスマッチとその他の位置でのミスマッチを[redacted]つ有すること，又はシード領域でのミスマッチがない場合は[redacted]位の領域に少なくとも[redacted]つのミスマッチを有することを保証するため，オフターゲットスコアのカットオフ値として≤[redacted]を設定した。スコアが[redacted]を超える場合には多数のミスマッチが含まれているため特異性なしと考え，オフターゲット活性の確認を実施しなかった。インクリシランのオフターゲット作用に関する *in silico* 評価では，NCBI のヒト RefSeq データセットで定義されるヒトトランスクリプトームのノンコーディング（NR_又は XR_登録データ）RNA（ncRNA）に相補する配列は以下の理由により含めなかった。配列，スプライス変異，及び最も重要な生物学的機能を含む RefSeq のノンコーディン

グ遺伝子のアノテーションの信頼性は，コーディング遺伝子と比べて低い。NM_及び XM_登録データと異なり，NR_登録データの大半は機能を有さない。全組織の相補的 DNA（cDNA）及び expressed sequence tag（EST）ライブラリーでの発現レベルの根拠に基づくと，細胞内の ncRNA に関して一貫して同定されたものは非常に少ない。近縁種間でも ncRNA の配列保存がみられないということは，ncRNA の多くがゲノムの偽性転写物由来であり，機能を有さないという仮説と一致する（Palazzo and Lee 2015）。さらに，大部分の ncRNA については既知の機能はなく，意図しないオフターゲット作用による毒性を予測することは不可能である。以上のことから，ヒト RefSeq データセットの NR_登録データに対して解析を実施していない。

バイオインフォマティクス解析の結果，20 の標的がオフターゲットと予測され（Table 3-1），Hep3B 細胞を用いて確認試験を実施した。Hep3B 細胞（2×10^4 cells/well）にインクリシラン（濃度範囲 37.5 fmol/L～10 nmol/L）をトランスフェクション試薬（RNAiMax）により導入し，24 時間後に細胞から RNA を抽出して cDNA リバーストランスフェクションキットを用いて cDNA を調製した。TaqMan®プローブを用いた qPCR により DNA 増幅を測定して，20 の標的に対するオフターゲット活性と *PCSK9* に対するオンターゲット活性を評価した。同一の検体で両作用を評価するため，内部標準としてヒトグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の RNA を用い，相対的 RNA レベルを測定した。対照として非特異的 siRNA を用い，測定は 2 回行った。

Table 3-1　　インクリシランのアンチセンス鎖に関するオフターゲット候補遺伝子

オフターゲット ID	オフターゲットスコア	ミスマッチ位置 [a]	アクセッション番号	候補遺伝子 [b]
ALN-60212 (Off-1)	[redacted]	[redacted]	NM_001173484.1	NEBL
ALN-60212 (Off-2)	[redacted]	[redacted]	NM_153252.4	BRWD3
ALN-60212 (Off-3)	[redacted]	[redacted]	NM_020466.4	LYRM2
ALN-60212 (Off-4)	[redacted]	[redacted]	NM_004515.3	ILF2
ALN-60212 (Off-5)	[redacted]	[redacted]	NM_021639.4	GPBP1L1
ALN-60212 (Off-6)	[redacted]	[redacted]	NM_178819.3	GPAT4 (AGPAT6)
ALN-60212 (Off-7)	[redacted]	[redacted]	NM_001100399.1	PDS5A
ALN-60212 (Off-8)	[redacted]	[redacted]	NM_001256798.1	NOL4L (C20orf112)
ALN-60212 (Off-9)	[redacted]	[redacted]	NM_020651.3	PELI1
ALN-60212 (Off-10)	[redacted]	[redacted]	NM_015170.2	SULF1
ALN-60212 (Off-11)	[redacted]	[redacted]	NM_000053.3	ATP7B
ALN-60212 (Off-12)	[redacted]	[redacted]	NM_000949.5	PRLR
ALN-60212 (Off-13)	[redacted]	[redacted]	NM_020782.1	KLHL42 (KLHDC5)
ALN-60212 (Off-14)	[redacted]	[redacted]	NM_001163438.1	SMIM10 (CXorf69)
ALN-60212 (Off-15)	[redacted]	[redacted]	NM_001129891.1	INSYN2B (FAM196B)
ALN-60212 (Off-16)	[redacted]	[redacted]	NM_001165974.1	UROC1
ALN-60212 (Off-17)	[redacted]	[redacted]	NM_004602.2	STAU1
ALN-60212 (Off-18)	[redacted]	[redacted]	NM_013261.3	PPARGC1A
ALN-60212 (Off-19)	[redacted]	[redacted]	NM_016166.1	PIAS1

オフターゲット ID	オフターゲットスコア	ミスマッチ位置 [a]	アクセッション番号	候補遺伝子 [b]
ALN-60212 (Off-20)	[redacted]	[redacted]	NM_001256099.1	CTHRC1

a ミスマッチ位置は，5'-3'方向のアンチセンス鎖に対して定義し，1 位はインクリシランのアンチセンス鎖の 5'-側ヌクレオチドの相補的な塩基に対応する。オフターゲットスコアは，[redacted]位のミスマッチの位置及び数に基づいて算出される。BruteForce アルゴリズムでは，[redacted]位と[redacted]位のミスマッチのスコアとして[redacted]を付与した。このため，[redacted]，[redacted]，[redacted]，[redacted]，及び[redacted]位は[redacted]。

b NCBI のデータベース（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/;2022 年 10 月 14 日アクセス）に収載されている遺伝子名であり，特に記載のない限りアクセッション番号に付記されたものを記載した。

オフターゲットと予測された 20 の標的のうち 2 つ（SULF1 及び FAM196B）は Hep3B 細胞での発現が認められず，UniGene データベースを用いた追加解析ではこの 2 つの標的が通常肝臓には発現していないことが確認された。その他の 18 のオフターゲットと予測された標的に対して，Hep3B 細胞を用いた検討結果から，オンターゲットである *PCSK9* に対する発現低下効果の IC_{50} と，オフターゲットと予測される標的に対する低下作用の IC_{50}の間には，いずれも 45倍以上の差があり，インクリシランは *PCSK9* に特異的であることが裏付けられた。インクリシランは，検討した最高濃度の 10 nmol/L で *PCSK9* を約 80%低下させたが，オフターゲットと予測された標的の発現にほとんど影響を及ぼさなかったことから，インクリシランが PCSK9 以外の蛋白質の発現に影響を及ぼす可能性は非常に低いと考えられた。また，qPCR で評価した潜在的オフターゲットと予測された 18 の標的遺伝子のミスマッチ数はさらに少なく，インクリシランの最高濃度（10 nmol/L）でも明らかな発現抑制は認められなかったことから，オフターゲットスコアのカットオフ値（≤[redacted]）は妥当と考えられた。

インクリシランは肝臓に指向性を示すため，SULF1 及び FAM196B はインクリシランによるオフターゲット作用を受けない遺伝子と考えられたものの，肝臓以外の組織における発現が報告されていることから，インクリシランの SULF1 及び FAM196B に対するオフターゲット作用について追加解析を実施した[Table 2.6.3.1-DIS R2120284]。なお，SULF1 は細胞外でヘパラン硫酸の 6-*O*-硫酸を分解する脱硫酸酵素である（Morimoto-Tomita et al. 2002）。また，FAM196B（遺伝子記号 INSYN2B）は中枢神経系に存在するがその機能については不明な蛋白質である（Uezu et al. 2016）。

ヒト，サル，ラット，及びマウス由来の組織を用い，マイクロアレイ法及び RNA Seq 法により SULF1 及び FAM196B と，インクリシランの肝細胞内への取り込みに関与する ASGPR のサブユニット ASGR1 及び ASGR2（Spiess 1990，Miller et al. 2018）遺伝子との共発現解析を実施した[Table 2.6.3.1-DIS R2120284]。マイクロアレイのデータベースにはノバルティス社の[redacted]（[redacted]及び[redacted]）及び[redacted]を，RNA Seq のデータベースには[redacted]（[redacted]），[redacted]（[redacted]），[redacted]（[redacted]），[redacted]，及び[redacted]を用いた。

その結果，腎組織，樹状細胞，単球では，ヒト，サル，ラット，及びマウスのいずれの種においても，ASGR1 又は ASGR2 と FAM196B あるいは SULF1 との共発現はみられなかった。

FAM196B の発現は，いずれの種の大部分の組織で総じて低かった。ヒトで ASGR1 と FAM196B の共発現がみられた組織は小脳のみであったが，^{14}C-インクリシランを用いたラット及びサルの組織分布試験では，インクリシランは中枢神経系でほとんど検出されなかった[2.4-4.3 項]。SULF1 はヒトのさまざまな組織で発現がみられ，インクリシランの非臨床安全性試験で用いたサル，ラット，及びマウスでも同様に認められた。ヒトでは ASGR1 又は ASGR2 と SULF1 との共発現がみられた組織は限定的であり，脳又は小脳，精巣，甲状腺，虫垂，胆嚢，及びリンパ節であった。サルでは小脳，胆嚢，胆管，及び乳腺で，ラットではアキレス腱，脂肪組織，食道，乳腺，半月板，筋肉，包皮腺，坐骨神経，皮膚，滑膜，及び尾腱で，マウスでは甲状腺で，それぞれ ASGR1 又は ASGR2 と SULF1 との共発現がみられた。しかしながら，SULF1 はインクリシランのアンチセンス鎖の[redacted]に対して[redacted]つのミスマッチ（[redacted]）が認められており[Table 2.6.3.1-BIO14019]，SULF1 のサイレンシングは起こり得ないと考えられる。また，これまでの試験では，ASGR1 又は ASGR2 と SULF1 の共発現が認められた組織に対してインクリシランがオフターゲット作用を示す可能性は示唆されていない。さらに，インクリシランは肝臓に対して特異的に取り込まれ，中枢神経系には分布せず，末梢での血中半減期は約 7 時間である[2.7.2-2.3 項]。そのため，共発現が認められた組織では，インクリシランの曝露は低いと考えられる。

以上のことから，インクリシランがヒトの肝臓以外の組織においても SULF1 及び FAM196B にオフターゲット作用を示す可能性は低いと考えられた。

本薬のセンス鎖のハイブリダイゼーション依存的オフターゲット作用について，完全長のセンス鎖について[redacted]のミスマッチを許容し，ヒト spliced RNA データベース（human spliced RNA, RefSeq curated on GRCh38/hg38.p13, D3G 22.02）を用いて GGGenome 解析を実施した。その結果，6 つのオフターゲット候補遺伝子（SYTL2，RPS6KB1，ABCC4，AP3B2，RBM18，及び LOC100287072）が特定された（Table 3-2）。これら 6 つの遺伝子は，インクリシランのセンス鎖に対して[redacted]のミスマッチ（[redacted]）を有しており，これらの遺伝子発現が阻害される可能性は極めて低い。

Table 3-2　センス鎖に関するオフターゲット候補遺伝子

遺伝子シンボル	遺伝子名称	オフターゲットスコア	ミスマッチ位置	ミスマッチ数	[redacted]
SYTL2	synaptotagmin like 2	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
RPS6KB1	ribosomal protein S6 kinase B1	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
ABCC4	ATP binding cassette subfamily C member 4	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

遺伝子シンボル	遺伝子名称	オフターゲットスコア	ミスマッチ位置	ミスマッチ数	[redacted]
AP3B2	adaptor related protein complex 3 subunit beta 2	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
RBM18	RNA binding motif protein 18	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
LOC100287072	ribosomal protein S6 kinase B1 pseudogene	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

GGGenome は，human spliced RNA RefSeq データベースに対する完全長のセンス鎖配列を用いて実施した。オフターゲットスコア [redacted] 以下で，新たに同定された潜在的なオフターゲット候補遺伝子を示す。

3.2 標的外組織での RISC への結合

ラット及びサルを用いた薬物動態試験で，インクリシランは広範な組織内分布を示し，毒性試験では心臓組織でも分布が認められた。標的外組織で認められたインクリシランの量は，標的器官である肝臓と比較して著しく少なかった（心臓組織中濃度は肝臓の 1/300～1/200 程度）が，インクリシランがこれらの標的外組織で RISC と結合する可能性も考えられるため，サルを用いた 4 週間反復投与用量設定試験で得られた心臓組織検体を用いて RISC 結合アッセイを実施した[Table 2.6.7.1-8297013]。

カニクイザル（n = 3/群）にインクリシランを 0（溶媒：注射用生理食塩液），30，100，又は 300 mg/kg の用量で週 1 回，4 週間皮下投与した。最終投与 24 時間後に心臓組織を採取した。

RISC 結合アッセイでは，Triton X-100 含有緩衝液中で心臓組織を超音波処理することにより 166.7 mg/mL のホモジネート懸濁液を調製した後，抗 Ago2 モノクローナル抗体を用いて RISC の必須構成要素である Ago2 蛋白質の免疫沈降を行い，共免疫沈降したインクリシラン及び miRNA を RT-qPCR で定量した。本アッセイでのインクリシランの検出限界は，0.08 ng/g 組織であった。定量の結果，インクリシランは Ago2 結合 RISC 中に検出されなかったことから，心臓組織で検出されたインクリシランは RISC に結合しないことが示された。したがって，PCSK9 を発現していない標的外組織ではインクリシランは RISC に結合しない可能性が高いと考えられる。

4 安全性薬理試験

4.1 *In vivo* 安全性薬理試験

インクリシランの心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討するため，テレメトリー装着サルを用いた皮下投与による安全性薬理試験を実施した[Table 2.6.3.1-8297017]。

1 群 4 匹の雄性カニクイザルに，インクリシランを 0（溶媒：注射用生理食塩液），10，50，及び 250 mg/kg の用量で Day 1，Day 15，及び Day 29 に皮下投与した。検査項目として，心拍数，収縮期，拡張期，及び平均動脈圧，並びに脈圧，ECG パラメータ（PR，QT，及び QTc 間隔並びに QRS 時間），呼吸数，及び体温を測定した。ECG データ，血圧，呼吸数，及び体温は投与の

90 分以上前から，少なくとも投与 25 時間後まで継続的に測定した。Day 1，Day 15，及び Day 29 の投与後約 6 及び 25 時間（テレメトリー測定終了後）にトキシコキネティクス（TK）測定用の血液試料を採取し，血漿中インクリシラン濃度を測定した。

全例が試験終了まで生存し，インクリシランの投与に起因する一般状態の変化は認められなかった。

ECG では，いずれの用量及び投与日でも PR，QT，及び QTc 間隔並びに QRS 時間に統計学的に有意な変化は認められず，ECG 波形の異常及び不整脈も認められなかった。投与期間中に偶発的な不整脈が認められたが，投与後時間との関連や用量依存性は認められず，インクリシランに起因するものではないと判断された。

心拍数，収縮期，拡張期，及び平均動脈圧，並びに脈圧へのインクリシラン投与による影響は認められなかった。Day 1，Day 15，及び Day 29 に心拍数の減少が認められたが，統計学的に有意なものではなく，用量との関連は認められなかったことから，インクリシラン投与に関連するものではないと判断された。

呼吸数及び体温にインクリシラン投与の影響は認められなかった。

投与後 6 時間の血漿中インクリシラン濃度は概ね用量に比例して増加し，概して投与後 25 時間でも検出可能であった。Day 1，Day 15，及び Day 29 での平均血漿中インクリシラン濃度は，10 mg/kg の用量で 958～1240 ng/mL，50 mg/kg で 7697～10337 ng/mL，250 mg/kg で 33808～37154 ng/mL であった。

以上より，インクリシランの心血管系及び呼吸系に対する無作用量（NOEL）は，検討した最高用量の 250 mg/kg 以上と考えられた。

中枢神経系（CNS）に対するインクリシランの影響を評価するための独立した安全性薬理試験は実施しなかったが，サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験[2.6.6-3.3.2 項]，15 週間反復投与毒性試験[2.6.6-3.3.3 項]，及び 40 週間反復投与毒性試験[2.6.6-3.3.4 項]で神経学的評価を実施した。検査項目として，姿勢の反応（固有位置感覚，踏み直り反応），脊髄神経機能（筋緊張度，屈曲反射，及び会陰反射），及び脳神経への影響（頭部運動，頭部対称性，頭部筋緊張度，顎緊張度，眼の反応，眼の対称性，眼位，眼瞼反射，及び対光反射）を評価した。

いずれのパラメータでも検討した最高用量までインクリシラン投与に関連する影響は認められなかった。

以上より，インクリシランの中枢神経系への影響に対する NOEL は，4 週間及び 15 週間試験では検討した最高用量である 250 mg/kg 以上，40 週間試験では検討した最高用量である 300 mg/kg 以上と考えられた。

5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。しかし，臨床ではインクリシランはスタチンと併用投与される可能性があるため，インクリシランとアトルバスタチンとの併用投与による毒性

試験が実施された[Table 2.6.7.1-20110258]。本試験では，インクリシランとアトルバスタチンとの併用投与による PK/PD（血漿中 PCSK9 濃度及び血清脂質プロファイル）への影響についても検討した。その結果，インクリシランとアトルバスタチン併用投与時の PK/PD パラメータに単独投与時と比較して明らかな差は認められなかった。

6 考察及び結論

インクリシランは，3分岐型の GalNAcが結合した二本鎖siRNAであり，肝臓に特異的に送達され，PCSK9の発現を持続的に抑制することにより血清中LDL-Cを低下させるようデザインされている。インクリシランは Hep3B 細胞での PCSK9 の発現を抑制し（IC_{50}：2.5 pmol/L），*hPCSK9* Tg マウスへの単回投与で血清中 hPCSK9 濃度を低下させた（ED_{50}：約 2 mg/kg，ED_{80}：約 6 mg/kg）。

サルを用いた単回及び反復投与による用法用量の検討試験では，インクリシランは血漿中 PCSK9 濃度を用量依存的かつ持続的に低下させ，それと並行して血清中 LDL-C 値を低下させた。単回投与後，PCSK9 及び LDL-C が最も低下するまでの時間は約 20 日であり，最大低下するまでの時間に用量間で差は認められなかった。6 又は 10 mg/kg の単回投与で比較すると，PCSK9 及び LDL-C は 6 mg/kg の用量で最大の低下率を示したが，PCSK9 及び LDL-C 低下効果の持続時間は，最高用量の 10 mg/kg の方が長かった。反復投与試験での PCSK9 及び LDL-C の最大低下率はそれぞれ 93%及び 74%であり，単回投与試験で認められた低下率（96%及び 77%）と同程度であった。サルを用いた PK/PD 試験では，インクリシラン（1，3，又は 6 mg/kg）を皮下投与した際に用量の増加に伴う血漿中インクリシラン濃度の上昇と PCSK9 及び LDL-C の低下が認められた。サルにインクリシランを最高用量（6 mg/kg）で単回投与したとき，インクリシランの血漿中濃度は投与後約 24 時間以内に検出限界以下に達した。また，反復投与では PCSK9 及び LDL-C は投与 100 日後まで低値のまま維持され，インクリシランの血中濃度と作用持続時間との間には時間差が認められており，投与後の本薬の肝臓での積極的な取り込みが示唆された。

バイオインフォマティクス解析及び Hep3B 細胞を用いた *in vitro* 試験によるオフターゲット活性の評価，並びに Hep3B 細胞での発現がみられなかった 2 つのオフターゲット遺伝子とインクリシランの肝細胞内への取り込みに関与する ASGPR との共発現解析の結果から，インクリシランがオフターゲット遺伝子の転写に影響を及ぼす可能性は低く，インクリシラン投与によりオフターゲットに関連した副作用が生じる可能性は低いことが示された。

テレメトリー装着カニクイザルを用いた安全性薬理試験では，インクリシラン投与による一般状態，ECG パラメータ，血圧，呼吸数，及び体温への影響は認められなかった。また，サルを用いた反復投与毒性試験にて神経学的評価を実施し，中枢神経系へ及ぼす影響を検討したところ，インクリシラン投与による影響は認められなかった。

以上の薬理試験成績から，インクリシランは hPCSK9 発現低下効果により LDL-C を強力かつ持続的に低下させる高コレステロール血症の治療薬となり得ることが示された。サルを用いた薬理

試験では，さまざまな用法用量で 1 年間投与してもタキフィラキシーの兆候は認められず，投与終了後も効果が持続したことから，臨床では低頻度の投与で持続的な効果が得られるものと考えられた。

7 参考文献

[Ashwell G and Morell AG (1974)] The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol; 41:99-128.

[Baenziger JU and Fiete D (1980)] Galactose and N-acetylgalactosamine-specific endocytosis of glycopeptides by isolated rat hepatocytes. Cell; 22:611-20.

[Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001)] RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. Genes Dev; 15(2):188-200.

[Geffen I and Spiess M (1992)] Asialoglycoprotein receptor. Int Rev Cytol; 137B:181-219.

Gene http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/ (Accessed 13 September 2022) (available upon request)

[Miller CM, Tanowitz M, Donner AJ, et al. (2018)] Receptor-mediated uptake of phosphorothioate antisense oligonucleotides in different cell types of the liver. Nucleic Acid Ther; 28(3):119-27.

[Morimoto-Tomita M, Uchimura K, Werb Z, et al. (2002)] Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. J Biol Chem; 277(51):49175-85.

NCBI dbSNP Build 132 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi?view+summary=view+summary&build_id=132 (Accessed 13 September 2022) (available upon request)

Palazzo AF and Lee ES (2015) Non-coding RNA: what is functional and what is junk? Front Genet; 6:2. (available upon request)

[Schwartz AL, Rup D, Lodish HF (1980)] Difficulties in the quantification of asialoglycoprotein receptors on the rat hepatocyte. J Biol Chem; 255(19):9033-6.

[Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, et al. (2004)] Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. Nature; 432(7014):173-8.

[Spiess M (1990)] The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. Biochemistry; 29(43):10009-18.

[Uezu A, Kanak DJ, Bradshaw TWA, et al (2016)] Identification of an elaborate complex mediating postsynaptic inhibition. Science; 353(6304):1123-9.

[Wu J, Nantz MH, ZernMA (2002)] Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications. Front Biosci; 7:d717-25.

2.6.3 薬理試験概要表

目　次

目　次 2
略号一覧 3
2.6.3.1　薬理試験一覧表 4
2.6.3.2　効力を裏付ける試験 6
2.6.3.3　副次的薬理試験 6
2.6.3.4　安全性薬理試験 7
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 8

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
CNS	central nervous system	中枢神経系
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
hPCSK9	human PCSK9	ヒト PCSK9
IV	intravenous	静脈内
NOEL	no observed effect level	無影響量
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	プロ蛋白質転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型
PD	pharmacodynamics	薬力学
PK	pharmacokinetics	薬物動態
QTc	QT interval corrected for heart rate	心拍数補正 QT 間隔
SC	subcutaneous	皮下

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
効力を裏付ける試験					
> *In vitro* 薬理試験					
Identification of inclisiran	Hep3B cell line	*In vitro*	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14020]	4.2.1.1-1
Identify polymorphic variations in PCSK9 gene sequences surrounding the inclisiran targeting site	*In silico*	*In silico*	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14041]	4.2.1.1-2
> *In vivo* 薬理試験					
Pharmacodynamic evaluation of inclisiran in transgenic mice expressing the human PCSK9 (hPCSK9) gene following single SC administration	hPCSK9 transgenic mice (C57BL/6)	SC	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14048]	4.2.1.1-3
Pharmacodynamic evaluation of inclisiran in cynomolgus monkeys following single SC administration	Cynomolgus monkeys	SC	[redacted] (Reno, NV)	[20049640]	4.2.1.1-4
Pharmacodynamic evaluation of inclisiran in cynomolgus monkeys following repeat SC administration	Cynomolgus monkeys	SC	[redacted] (Reno, NV)	[20052053]	4.2.1.1-5
Pharmacokinetic / Pharmacodynamic relationships in cynomolgus monkeys following single IV and SC administration and repeat SC administration	Cynomolgus monkeys	SC	[redacted] (Madison, WI)	[8299434]	4.2.1.1-6

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
副次的薬理試験					
Off-target analysis of inclisiran	Hep3B cell line	*In silico* and *in vitro*	Alnylam Pharmaceuticals	[BIO14019]	4.2.1.2-1
Off-target analysis of inclisiran by cross-tissue analysis of mRNA expression	RNA microarray, RNA Seq	*In silico*	Novartis Pharma AG	[DIS R2120284]	4.2.1.2-2
安全性薬理試験 [a)]					
Cardiovascular and respiratory pharmacology in conscious male cynomolgus monkeys using telemetry	Cynomolgus monkeys	SC	[redacted], (Madison, WI)	[8297017]	4.2.1.3-1

hPCSK9: human proprotein convertase subtilisin / kexin type 9, CNS: central nervous system, IV: intravenous, SC: subcutaneous

a) CNS evaluations are included in the 4 week, 15 week and 40 week toxicology studies in cynomolgus monkeys [8302575], [8297016], and [5001352].

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

2.6.3.1 に記載

2.6.3.3　副次的薬理試験

2.6.3.1 に記載

2.6.3.4 安全性薬理試験

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
Cardiovascular and Respiratory	Cynomolgus monkeys	SC	10, 50, 250 on Days 1, 15 and 29	Male n = 4	No noteworthy findings for all measured cardiovascular or respiratory endpoints. There were no statistically significant effects on PR, QT or QTc intervals, QRS duration, heart rate, systolic, diastolic, mean arterial, or pulse pressures, or respiration rate at any time point in any dose group. The NOEL was ≥ 250 mg/kg, the highest dose tested.	Yes	[8297017]	4.2.1.3-1

GLP: Good Laboratory Practice, NOEL: no observed effect level, QTc: QT interval corrected for heart rate, SC: subcutaneous

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

Dedicated pharmacodynamic drug interaction studies have not been conducted in animals. However, because inclisiran is likely to be co-administered with statins in the clinic, a toxicology study was conducted to determine if co-administration of inclisiran and atorvastatin was associated with exacerbated toxicities compared to administration of either test article alone [Table 2.6.7.1-20110258]. The study also looked at the influence of co-administration of inclisiran and atorvastatin on PK and PD (PCSK9 levels and lipid profiles) parameters. The study did not reveal any marked differences in PK or PD parameters associated with administration of the combination of inclisiran and atorvastatin compared to administration of either inclisiran or atorvastatin alone.