TABLE OF CONTENTS

略号一覧表 2
2.6.1 緒言 3
1 薬理学的特性及び化学構造 3
2 効能・効果及び用法・用量 3

略号一覧表

略号又は用語	定義（英語）	定義（日本語）
ATTR-CM	Transthyretin amyloid cardiomyopathy	トランスサイレチン型心アミロイドーシス
ATTRv	Variant transthyretin amyloidosis	遺伝性トランスサイレチン型アミロイドーシス
ATTRwt	Wild-type transthyretin amyloidosis	野生型トランスサイレチン型アミロイドーシス
RBP	Retinol Binding Protein	レチノール結合タンパク
T4	Thyroxine	サイロキシン
T119M	Variant with substitution of methionine for threonine at amino acid 119 of Transthyretin protein	トランスサイレチンタンパクの第 119 位のメチオニンがスレオニンに置換した変異体
TTR	Transthyretin	トランスサイレチン
TTRv	Transthyretin variant	変異型トランスサイレチン

2.6.1 緒言

1 薬理学的特性及び化学構造

アコラミジスは、トランスサイレチン型心アミロイドーシス（ATTR-CM）の治療薬として開発中の低分子トランスサイレチン（TTR）安定化剤である。

TTR（プレアルブミンとも呼ばれる）は、肝臓で産生される進化的によく保存されたホモ 4 量体タンパク質であり、血液中のサイロキシン（T4）及びレチノール結合タンパク質（RBP）-レチノール（ビタミン A）複合体の担体の一つである（Monaco et al., 1995）。TTR は、健康成人において 2～3 日の半減期を示す最も豊富な血漿タンパク質の 1 つである（Keller, 2019）。トランスサイレチン型アミロイドーシス（ATTR）では、加齢に伴う（野生型 ATTR［ATTRwt］に至る）、又は頻度は低いが TTR 遺伝子変異（遺伝性 ATTR［ATTRv］）によるタンパク質の構造的不安定性の傾向により、 4 量体 TTR が不安定な単量体 TTR に解離する。不安定な単量体 TTR は正しく折りたたまれず、凝集する傾向がある。これらの凝集体は生理学的クリアランスを受ける代わりに、病理学的に組織、特に心臓及び末梢神経にアミロイド線維として沈着する。

アコラミジスは、2 つの T4 結合部位に結合する際、アミロイド形成の律速段階である四量体 TTR の単量体への解離を妨げる疾患抑制性変異型 TTR 遺伝子変異体（TTRv）T119M の安定化作用を模倣する特徴的な結合様式により TTR を安定化させる（Miller, 2018）。

アコラミジス塩酸塩（アコラミジス塩酸塩として製剤に配合されている原薬）の分子式は C15H17FN2O3·HCl であり、分子量は遊離塩基が 292.31 g/mol、塩酸塩が 328.77 g/mol である。アコラミジス塩酸塩の構造式を Figure 1 に示す。

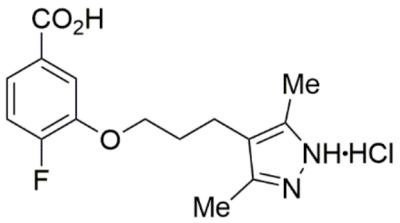


Figure 1: アコラミジス塩酸塩の構造式

2 効能・効果及び用法・用量

[効能・効果]

トランスサイレチン型心アミロイドーシス（野生型及び遺伝性）

[用法・用量]

通常、成人にはアコラミジス塩酸塩として 1 回 800mg を 1 日 2 回経口投与する。

TABLE OF CONTENTS

略号一覧表 5
2.6.2 薬理試験の概要文 8
1 まとめ 8
2 効力を裏付ける試験 12
2.1 In vitro 薬理試験 12
2.1.1 精製 TTR を用いた検討 12
2.1.1.1 蛍光偏光法 12
2.1.1.2 等温滴定熱量測定 14
2.1.1.3 表面プラズモン共鳴 16
2.1.1.4 マイクロスケール熱泳動 17
2.1.2 血漿又は血清サンプル中 TTR を用いた検討 19
2.1.2.1 蛍光プローブ排除アッセイ 19
2.1.2.2 ウェスタンブロット（イムノブロット） 25
2.1.3 変異型 TTR を用いた in vitro 安定化試験のまとめ 29
2.1.4 結晶構造 31
2.1.4.1 疾患抑制性変異 TTRv T119M による TTR 四量体の安定性増加 31
2.1.4.2 T119M による TTR 安定化の構造的変化 31
2.1.4.3 アコラミジスの V122I 結合時に誘導される T119M 様の安定的立体構造 32
2.1.4.4 アコラミジスで誘導される野生型 TTR の安定的構造 32
2.2 In vivo 薬理試験 34
2.2.1 イヌを用いたアコラミジスの PK/PD 相関の検討 34
2.2.2 イヌの 7 日間反復投与毒性試験サンプルを用いた PK/PD の検討 35
2.2.2.1 サルへの単回静脈内投与又は経口投与による PK/PD の検討 36
3 副次的薬理試験 37
3.1 代謝物、立体異性体、不純物の薬理作用 38
3.1.1 代謝物の薬理作用 38
3.1.2 立体異性体の薬理作用 39
4 安全性薬理試験 39
4.1 In vitro 安全性薬理試験 40
4.1.1 HEK293 細胞の hERG カリウムチャネル電流に対するアコラミジスの影響（GLP 非適用） 40
4.1.2 HEK293 細胞の hERG カリウムチャネル電流に対するアコラミジスの影響（GLP 適用） 40
4.2 In vivo 安全性薬理試験 40
4.2.1 中枢神経系に及ぼす影響 41
4.2.2 呼吸器系に及ぼす影響 41
4.2.3 心血管系に及ぼす影響 42
4.3 安全性薬理試験のまとめ 43
5 薬力学的薬物相互作用 43

6 考察及び結論 43
7 参考文献 43

LIST OF TABLES

Table 1: 精製ヒト TTR に対するアコラミジスの相互作用の速度論的パラメーター 16
Table 2: 精製ヒト TTR に対するアコラミジスの結合親和性 18
Table 3: 各種 TTR 変異型に対するアコラミジス及びタファミジスの標的結合率（FPE アッセイ 1 時間） 29
Table 4: 変異型 TTR 四量体に対するアコラミジス及びタファミジスの安定化作用（酸解離誘発不安定化） 30
Table 5: アコラミジスの in vitro 副次的薬理試験一覧 37
Table 6: 安全性薬理試験一覧 40
Table 7: ラットの中枢神経系安全性薬理試験のデザイン 41
Table 8: ラットの呼吸器系安全性薬理試験のデザイン 41

LIST OF FIGURES

Figure 1: TTR 遺伝子型と表現型 12
Figure 2: 蛍光偏光プローブ 2 の化学構造 13
Figure 3: 蛍光偏光法による TTR への結合親和性の検討 13
Figure 4: 等温熱量測定法によるアコラミジスと TTR の結合エネルギー特性評価 15
Figure 5: アコラミジスと精製ヒト TTR 複合体形成時の結合速度論的表面プラズモン解析 17
Figure 6: 標識 TTR とアコラミジス複合体形成時のマイクロスケール熱泳動 18
Figure 7: 共有結合プローブの化学構造 19
Figure 8: 蛍光プローブ排除アッセイによるヒト血清中 TTR への結合及び安定化作用の用量反応性の評価 20
Figure 9: アコラミジスの TTR への結合に対する血清タンパク質の影響 21
Figure 10: 蛍光プローブ排除アッセイによる様々なリガンドの TTR への結合力と安定化作用の比較 22
Figure 11: FPE の時間経過 23
Figure 12: アコラミジス（2、5、10 μM）添加 1 時間後の FPE%で示される標的占有率 24
Figure 13: アコラミジス添加後の FPE 反応速度定数 25
Figure 14: 血漿中の野生型 TTR の酸解離に対するアコラミジスの用量に応じた安定化作用 26
Figure 15: 野生型 TTR に対するアコラミジス、タファミジス、ジフルニサールの安定化作用の比較 26
Figure 16: 酸解離条件下のホモ接合型及びヘテロ接合型 V122I ATTRv-CM 患者の血漿中 V122I TTR に対するアコラミジスの安定化作用 27
Figure 17: T60A TTR に対するアコラミジスの安定化作用を示すウェスタンブロッティングの結果 28
Figure 18: 野生型 TTR、ホモ/ヘテロ V122I、T60A 変異体に対するアコラミジスの安定化作用の比較 28
Figure 19: V122I 変異型 TTR に結合したアコラミジスの結晶構造 33
Figure 20: アコラミジスの野生型 TTR 結合モデル 33
Figure 21: イヌへのアコラミジス投与後の TTR 占有率と血漿中薬物濃度の相関 34
Figure 22: 7 日間反復投与毒性試験のイヌ血清におけるアコラミジスの TTR への結合 35
Figure 23: カニクイザルへの経口投与後の血清中のアコラミジスによる TTR 占有率 36
Figure 24: 4 種の細胞株を用いたアコラミジスの細胞生存率への影響の検討 37
Figure 25: 蛍光偏光法によるアコラミジス及び主要代謝物アコラミジス-AG の TTR への結合評価 38
Figure 26: アコラミジス及びアコラミジス-AG による TTR 安定化作用（ウエスタンブロッティング） 39

略号一覧表

略語又は用語	定義（英語）	定義（日本語）
A97S	Variant with substitution of serine for alanine at amino acid 97 of Transthyretin protein	トランスサイレチンタンパク質の第97 位のアラニンがセリンに置換した変異体
Acoramidis-AG	Acoramidis acylglucuronide/Acoramidis-β-D-glucuronide	アコラミジスアシルグルクロン酸抱合体（アコラミジス-AG）
ATTR	Transthyretin amyloidosis	トランスサイレチン型アミロイドーシス
ATTR-CM	Transthyretin amyloid cardiomyopathy	トランスサイレチン型心アミロイドーシス
ATTR-PN	Transthyretin amyloid polyneuropathy	トランスサイレチン型アミロイドポリニューロパチー
ATTRv	Variant transthyretin amyloidosis	遺伝性トランスサイレチン型アミロイドーシス
ATTRv-CM	Variant transthyretin amyloid cardiomyopathy	遺伝性トランスサイレチン型心アミロイドーシス（家族性心アミロイドーシス）
ATTRwt	Wild-type transthyretin amyloidosis	野生型トランスサイレチン型アミロイドーシス
ATTRwt-CM	Wild-type transthyretin amyloid cardiomyopathy	野生型トランスサイレチン型心アミロイドーシス
AUC	Area under the curve	濃度時間曲線下面積
C_{max}	Maximum concentration	最高血漿中濃度
COX	Cyclooxygenase	シクロオキシゲナーゼ
D38A	Variant with substitution of alanine for aspartic acid at amino acid 38 of Transthyretin protein	トランスサイレチンタンパク質の第38 位のアスパラギン酸がアラニンに置換した変異体
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
ECG	Electrocardiography	心電図
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
F64L	Variant with substitution of leucine for phenylalanine at amino acid 64 of Transthyretin protein	トランスサイレチンタンパク質の第64 位のフェニルアラニンがロイシンに置換した変異体
FP	Fluorescence Polarization	蛍光偏光
FPE	Fluorescent Probe Exclusion	蛍光プローブ排除
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
hERG	Human ether-a-go-go-related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
ICH	International Council for Harmonisation of	医薬品規制調和国際会議

略語又は用語	定義（英語）	定義（日本語）
	Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	
ITC	Isothermal Titration Calorimetry	等温滴定熱量測定
KCl	Potassium chloride	塩化カリウム
L58H	Variant with substitution of histidine for leucine at amino acid 58 of Transthyretin protein	トランスサイレチンタンパクの第 58 位のロイシンがヒスチジンに置換した変異体
Lys	Lysine	リジン
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3 (4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド
MST	Microscale Thermophoresis	マイクロスケール熱泳動
NOEL	No observed effect level	無影響量
P24S	Variant with substitution of serine for proline at amino acid 24 of Transthyretin protein	トランスサイレチンタンパクの第 24 位のプロリンがセリンに置換した変異体
PD	Pharmacodynamics	薬力学的作用
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
QRS	group of electrocardiogram waves comprising the Q, R, and S waves	-
QT	time interval between Q wave and T wave in the heart's electrical cycle	-
QTc	corrected QT interval	補正 QT 間隔
λ_{em}		
λ_{ex}		
RBP	Retinol binding protein also called RBP4	レチノール結合タンパク
SD	Standard deviation	標準偏差
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
Ser	Serine	セリン
SPR	Surface Plasmon Resonance	表面プラズモン共鳴
T_4	Thyroxine	サイロキシン
T60A	Variant with substitution of alanine for threonine at amino acid 60 of Transthyretin protein	トランスサイレチンタンパクの第 60 位のスレオニンがアラニンに置換した変異体
T119M	Variant with substitution of methionine for threonine at amino acid 119 of Transthyretin protein	トランスサイレチンタンパクの第 119 位のスレオニンがメチオニンに置換した変異体
$T\Delta S_1$		

略語又は用語	定義（英語）	定義（日本語）
TTR	Transthyretin	トランスサイレチン
TTRv	Transthyretin variant	変異型トランスサイレチン
TTRwt	Transthyretin wild type	野生型トランスサイレチン
[redacted]	[redacted]	[redacted]
V122I	Variant with substitution of isoleucine for valine at amino acid 122 of TTR protein	TTR タンパクの第 122 位のバリンがイソロイシンに置換した変異体
V30M	Variant with substitution of methionine for valine at amino acid 30 of TTR protein	TTR タンパクの第 30 位のバリンがメチオニンに置換した変異体
WB	Western blot	ウェスタンブロット
WI		
WT	Wild type	野生型
Y114C	Variant with substitution of cysteine for tyrosine at amino acid 114 of TTR protein	TTR タンパクの第 114 位のチロシンがシステインに置換した変異体

2.6.2　薬理試験の概要文

1　まとめ

アコラミジス塩酸塩（ALXN2060 又は AG10）は、トランスサイレチン（TTR）型心アミロイドーシス（ATTR-CM）の経口治療薬として開発中の、強力かつ選択性の高い低分子トランスサイレチン安定化薬である。アコラミジスは、疾患抑制性変異型 TTR（TTRv）T119M の安定化作用を模倣する TTR との特徴的な結合様式により TTR を安定化させる（Miller, 2018）。本概要文では、ATTR-CM の背景、TTR 安定化仮説の根拠と関連する標的の検証、TTR の詳細な構造特性、並びにアコラミジスの開発を支持する非臨床薬理試験の成績を示す。

トランスサイレチン型アミロイドーシス（ATTR）は TTR の不安定化により引き起こされる全身性の疾患である。TTR 解離により二量体が生成され、それが単量体となり、ミスフォールディングと凝集によりオリゴマーと不溶性アミロイド線維が形成される。このような TTR アミロイド凝集体はさまざまな組織に沈着し、細胞毒性を示し、組織の機能特性を妨げて臨床症状を引き起こす。最も衰弱性の臨床症状として感覚運動性及び自律神経性多発性ニューロパチー、及び浸潤性拘束型心筋症が挙げられ、治療せずに放置すると、ニューロパチーか心筋症のいずれが優勢であるかにかかわらず進行性で致死的な状態に至る。ATTR は、野生型 TTR（TTRwt）又は TTRv アミロイドタンパク質のいずれかの凝集体の細胞外蓄積によって引き起こされる。

TTR 四量体は、サイロキシン（T_4）及びレチノール結合タンパク（RBP）-レチノール複合体の担体であり、血中を循環する T_4 の 10%～15%が TTR と結合していると推定されている（Palha, 2002）。甲状腺結合グロブリンと血清アルブミンが T_4 の主要な輸送担体であるため、T_4 の輸送担体としての TTR には余剰がある。TTR は T_4 の前駆体であるサイログロブリンよりも T_4 に対する結合親和性が低く、アルブミンよりもはるかに低濃度（アルブミン 600 µM に対して～5 µM）で存在するため、生理的条件下では T_4 の補助的な担体として利用されていると考えられている（Schreiber, 2002）。ピボタル第 3 相 AG10-301 試験において、アコラミジス投与により血清遊離 T_4 値の低下がみられ、その変化率は中央値で-9.63%（プラセボ 3.9%）、平均値で-8.28%（プラセボ 4.25%）であった。遊離 T_4 値の低下は僅かであったため安全性上の問題とは評価されなかった。これらは、TTR 安定化薬であるタファミジスでの成績と一致しており、遊離 T_4 値の低下は臨床的に甲状腺機能障害との関連もみられなかった。

TTR はホロ型 RBP の主要な担体である。TTR の RBP 結合部位は T_4（及びアコラミジス）結合部位と直交しているため、RBP の TTR への結合は T_4 結合部位へのアコラミジス等の低分子化合物の結合による影響を受けない可能性がある（Monaco, 1995）。結晶構造解析では、TTR 四量体あたり 2 つの RBP 結合部位の存在が示されている。しかし、通常の生理的条件下では、TTR 四量体と RBP 複合体の結合は化学量論的に肝細胞での合成と循環血中濃度（～5 µM 対 2 µM）により決定され、循環血中での結合は 1：1 が主体である。AG10-301 試験において、アコラミジス投与により血清 RBP 値の低下がみられ、その変化率は中央値で-30.35%（プラセボ-0.14%）、RBP 絶対値で-15.2 mg/L（プラセボ-0.1 mg/L）であった。血清 RBP 値の低下は安全性上の問題とは評価されなかった。血清 RBP 値の低下はタファミジスでもみられ、タファミジス 20 mg と 80 mg で用量反応性を示したが、臨床的にレチノール輸送低下や視力障害との関連もみられていない（Vyndaqel-EPAR, 2020; Vyndaqel-FDA-CDER, 2019）。

アコラミジスの TTR 四量体への結合は、天然のリガンドである T_4 と同じ結合部位を利用している。TTR 四量体の安定化を伴うこの結合様式は、疾患抑制性 TTRv である T119M に由来する。TTR 四量体を安定化する TTRv T119M と不安定化する病原性 TTRv V30M の両方を共遺伝する複

合ヘテロ接合個体は、ATTR から保護される。遺伝子組換え T119M タンパク質を用いた生化学的検討や TTRwt 及び TTRv V30M との比較により、T119M TTR ホモ四量体は単量体サブユニットへの解離時に TTRwt 及び TTRv V30M とは異なる遷移状態を有することが示され、その解離速度は TTRwt 又は TTRvV30M よりも 100 倍以上遅かった（Hammarstrom, 2001）。ATTR の原因である TTR 四量体の単量体への解離を防止する目的で、TTRv T119M の構造をモチーフとしたアコラミジスが開発された。

アコラミジスの薬理作用と作用機序について in vitro 及び ex vivo で検討した。アコラミジスによる TTR 安定化の効力と選択性を、精製 TTR タンパク質、健康成人及び遺伝性トランスサイレチン型心アミロイドーシス（ATTRv-CM）被験者由来の血清、血漿サンプルを用いて検討した。ATTR の動物モデルはヒトの表現型（線維の組織沈着）を再現しないため、アコラミジスの薬理試験には使用しなかった。例えば、病原性 TTRv V30M を過剰発現するマウスモデルでは、多発性ニューロパチーの表現型を十分に再現できないうえ、患者でみられるような線維性 TTR 沈着も検出されず、神経学的障害もみられない。また、本モデルでは TTR の沈着は皮膚や消化管では強く浸透性が高いが、標的臓器である末梢神経系ではそれほどみられない。したがって、アコラミジスの薬効薬理試験では、遺伝子改変動物を用いず、一般に使用されている実験動物の血清を用いた in vitro 試験や in vivo での薬物動態（PK）／薬力学（PD）試験を実施した。

精製 TTR に対するアコラミジスの結合について蛍光偏光（FP）法、等温滴定熱量測定（ITC）法、表面プラズモン共鳴（SPR）法、マイクロスケール熱泳動（MST）法、及び結晶構造解析を用いて検討した。生理的緩衝液中での TTR への結合評価から、2 つの T_4 結合部位に対するアコラミジスの高い結合親和性が示された。また、SPR 解析でのアコラミジスの TTR からの解離速度定数が小さかったことは、アコラミジス-TTR 四量体複合体の持続性が高く、アコラミジスの効果がより長く持続する可能性を示している。TTRv V122I は ATTR-CM の主な病原性変異体であるが、アコラミジスと TTRv V122I との複合体の共結晶化、及びアコラミジスと TTRwt の複合体モデリングの結果、アコラミジスは、T_4 結合部位の内腔の奥深くに位置する T_4 結合部位の上端で荷電した Lys15 及び Lys15'残基と 2 つの塩を形成すること、また、結合空洞の反対側で TTR の隣接する単量体サブユニットである Ser117 及び Ser117'残基と 2 つの水素結合を形成することが明らかになった。後者の知見は、他の TTR 安定化薬と異なるアコラミジスの特徴であり、アコラミジスは構造的に疾患抑制性 TTRv T119M の T_4 結合部位にみられる Ser117 残基と Ser117'残基との結合様式を模倣して設計されているため、特に重要である。

血清及び血漿を用いたアコラミジスの効力を裏付ける薬理試験は、2 つの方法を用いて in vitro で実施された。最初の方法は、蛍光プローブ排除（FPE）アッセイである。本法は血清中の TTR 結合部位への結合占有率を測定する高感度で特異的な方法で、検討には健康成人由来のプール血清、及び野生型トランスサイレチン型アミロイドーシス（ATTRwt）又は遺伝性トランスサイレチン型アミロイドーシス（ATTRv）被験者検体由来の血清を用いた。もうひとつは、ウエスタンブロット（WB）を用いたイムノブロットによるもので、血漿中の TTR 安定化を検討した。酸解離により TTR 二量体又は単量体形成を誘発し、その形成速度を WB により定量することで TTR 四量体の持続性を評価した。

FPE アッセイにおいて、アコラミジスは低濃度（1.25 μM）から特異的かつ用量反応的な効果を示した。FPE アッセイでは、TTR の T_4 結合部位に選択的に結合する共有結合プローブを用いた。本プローブの結合により TTR の T_4 結合部位が修飾され蛍光強度の増加が誘発されるが、この増加はリガンド（例えば、アコラミジス）による競合的な標的結合によって抑制される。FPE アッ

セイの結果は、タファミジスなどの他の安定化薬で評価された TTR 四量体の安定化効果と密接な相関があることが報告されている。FPE アッセイにおいて、約 10 μM のアコラミジスで最大効果がみられたが、本濃度は、血清中の TTR の 2 つの T_4 結合部位の両方に結合するのに十分な濃度である。また、血清タンパク質の存在下での検討で、TTR に対するアコラミジスの親和性は、天然リガンドである T_4 や血清アルブミンよりも高かった。

WB アッセイは、健康成人由来のプール血漿と野生型トランスサイレチン型心アミロイドーシス（ATTRwt-CM）患者及び ATTRv-CM 患者の血漿を用いて実施された。アコラミジスは、その治療目標トラフ濃度の 10 μM において TTR 四量体を完全に安定化させ、60 を超える被験者サンプルの 18 種類の TTR 変異に対しほぼ完全な安定化作用を示した。

比較のため用いたタファミジスが、承認された最大用量で報告されている最高血中濃度（26 μM）及びトラフ濃度（16 μM）（Ji, 2023）で被験者血漿サンプルに添加されたが、アコラミジスは治療目標トラフ濃度の 10 μM で、最高血中濃度のタファミジス（49 ± 14%）及びトラフ濃度のタファミジス（36 ± 13%）よりも高い標的結合率（トラフ：93 ± 14%）を示した。また、酸解離不安定化後の WB 解析において、A97S、D38A、F64L、L58H、P24S、Y114C 等のまれな変異体もアコラミジス添加によりほぼ完全に安定化された。同一サンプルを用いたタファミジスとの効力比較で、最高血中濃度におけるタファミジスよりも、治療目標トラフ濃度におけるアコラミジスの安定化作用の方が有意に強かった（$p < 0.0001$）。アコラミジスの効果は様々な不安定化変異体にわたって維持され、V122I 変異型に対するアコラミジスの効果は、安定化率の比較でタファミジスよりも約 2 倍優れていた。以上の in vitro 試験成績に加え、AG10-301 試験（モジュール 2.7.3）において、アコラミジスを投与した ATTR-CM 患者でも TTR のほぼ完全な安定化（90%以上）が確認された。疾患の機序及び TTR 不安定化と臨床症状の重症度との関連から、以上の成績は、アコラミジスが ATTRv 患者に対して、変異型の種類とは関係なく有効な治療薬となる可能性を示唆している。

アコラミジスの TTR 安定化作用が in vitro で確認されたことから、アコラミジス経口投与後のイヌ及びサルの血清サンプルを用いて、薬物動態学（PK）/薬力学（PD）相関について検討した。その結果、アコラミジスの血漿中薬物濃度と FPE アッセイで評価された TTR 安定化作用との間に相関が認められた。本アッセイ法は、その後、健康成人及び ATTR-CM 患者における標的結合率及び TTR 安定化の評価にも使用された。臨床試験から得られた ex vivo データから、野生型及び変異型の TTR を用いた非臨床 in vitro 試験成績の妥当性が確認され、FPE 及び WB アッセイの両方で、アコラミジスのほぼ完全な TTR 安定化作用の持続が証明された。

副次的薬理試験において、アコラミジスは 100 μM の濃度で [redacted]（[redacted] 社）パネルの受容体、酵素、及びイオンチャンネルに対してオフターゲット活性を示さなかった。さらに、ジフルニサルのようないくつかの TTR リガンドとは異なり、アコラミジス（10 μM）は甲状腺ホルモン核内受容体に結合せず、シクロオキシゲナーゼ（COX-1 又は COX-2）への有意な阻害はみられなかった。アコラミジスは、4 つの哺乳類細胞株（Hep3B、Jurkat、MCF7、Hela）に対して細胞毒性及び増殖抑制作用を示さなかった。

安全性薬理試験において、アコラミジスは 1000 mg/kg まで単回投与しても、ラットの中枢神経系及び呼吸器系に影響を及ぼさなかった（8355819 試験、8355820 試験）。アコラミジスの心血管系に及ぼす影響について in vitro 及び in vivo で検討した。ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネルに対して有意な阻害は示さなかった。GLP 非適用下での hERG チャネル阻害作用の検討では、50%を越える阻害はみられなかった（100 μM で 12.9%阻害）。GLP 適用の hERG パッチク

ランプアッセイにおいて阻害率が 50%を越える hERG 電流阻害はみられなかった（アコラミジス 10 μM での阻害率 3.2%、50 μM で 2.1%）。hERG 電流阻害作用の IC_{50}（50 μM 以上）と AG10-301 試験の PK/PD サブスタディで観察された最高血中濃度（12,300 ng/mL、投与 28 日目、投与後 1 時間、95%信頼区間の上限）での非結合型アコラミジス画分との比較で、33 倍を超える安全域が示された。アコラミジス塩酸塩の動力学的溶解速度は、パッチクランプ試験の媒体である生理食塩水中では、胃液中と比べて 115 倍以上遅い。このことは、in vitro でより高濃度のアコラミジスを用いる際の課題となる可能性がある。また、イヌのテレメトリー試験では、アコラミジスの最高血中濃度（12,300 ng/mL、投与 28 日目、投与後 1 時間、95%信頼区間の上限）の 30.7 倍を超える血中濃度で QT 間隔に影響を及ぼさないことが示された。In vitro 及び in vivo 試験並びに臨床試験の総合的な成績から、アコラミジスは心臓の再分極に対する臨床的な影響を示さないと考えられる。

肝細胞を用いた in vitro 代謝物プロファイリング成績から、アコラミジス-β-D-グルクロン酸抱合体（アコラミジスアシルグルクロン酸抱合体［アコラミジス-AG］）が主要な代謝物として同定された。アコラミジス-AG は、アコラミジスを投与されたラット、イヌ及びサルの血漿サンプル中の主要な代謝物としても検出された。アコラミジス-AG の薬理作用を、FP 法及び WB により評価した。その結果、FP 法では、ヒト TTR に対するアコラミジス-AG の結合親和性（K_{app}：1102 nM）は、アコラミジス（K_{app}：241 nM）より低いことが示された。ヒト血漿を用いた WB アッセイにおいて、アコラミジス-AG は、プールされたヒト血漿中の TTRwt に対する安定化作用の比較で、アコラミジスの 24%～34%の活性しか示さなかった。さらに、代謝物の血漿中濃度が低い（^{14}C ヒト ADME 試験［AG10007 試験］に基づく総放射能濃度時間曲線下面積［AUC］の 7.64%）ことから、生理的条件下での TTR の効果に対するアコラミジス-AG の実際の寄与は低いと考えられる。

以上のように、複数の動物種を用いた in vitro 及び in vivo 試験成績からアコラミジスの標的に対する薬理作用が明らかになった。生化学的試験により、様々な生物種の TTR に対するアコラミジスの感受性と選択性が確立されている。アコラミジスの薬理作用はイヌとサルにおいて用量依存的であり、幅広い曝露量で PK/PD 相関を検討することができる。ラット及びイヌを用いた安全性薬理試験成績から、臨床においてアコラミジスは中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に影響を及ぼす可能性は低いことが示唆された。

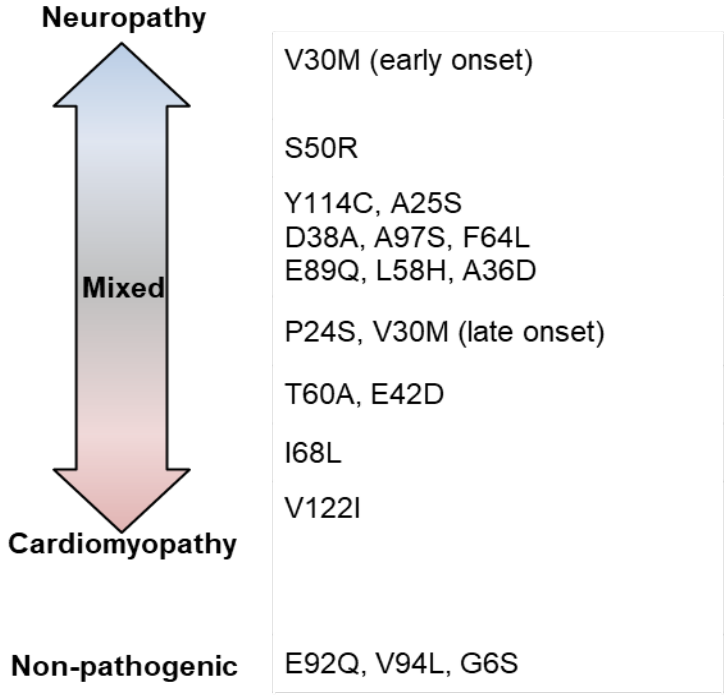
これらの成績から、アコラミジスの TTR への結合機序、並びに血清中及び血漿中の TTRwt、TTRv の四量体への安定化作用が示され、被験者の治療を可能とする適切な曝露量が確立された。

2　効力を裏付ける試験

2.1　In vitro 薬理試験

アコラミジスの TTR に対する結合性と特異性について確認する目的で、TTR の天然リガンドである T_4 との TTR 結合部位での相互作用について in vitro で検討した。生理学的条件下での薬物の効力を予測するために、血漿タンパク質（添加又は血漿／血清中）の存在下で相互作用について検討した。また、アコラミジスの交差反応性と結合特性について、TTRwt 並びに複数の遺伝子型及び表現型の TTRv を用いて検討した（Figure 1）。

Figure 1:　　TTR 遺伝子型と表現型



Source: NC-363

2.1.1　精製 TTR を用いた検討

精製 TTR に対するアコラミジスの結合について以下の方法で検討した：1）FP 法、2）ITC 法、3）SPR 法、4）MST 法、5）線維形成アッセイ、6）サブユニット交換アッセイ

2.1.1.1　蛍光偏光法

光波は、その振動の強度と角度によって特徴付けられる。蛍光偏光（FP）法では、偏光フィルターにより一定の角度で振動する光の成分を分離し偏光させ、偏光された光は、入射光に合わせて整列した分子を励起する。蛍光発光が吸収より時間的に遅れているため、蛍光体の拡散によって励起光と発光光の位置関係が変化する。In vitro 試験系では、同じ偏光の光を吸収・放出する蛍光体の割合が測定される。小さな蛍光色素分子は溶液中でより高い周波数で回転するため、蛍光偏光はより低くなる。したがって、小さな蛍光色素が大きなタンパク質に結合することで、周波数が下がり、偏光の測定値が増加する。この原理を利用して、FP 法では小分子とタンパク質の結合を測定することが可能である。

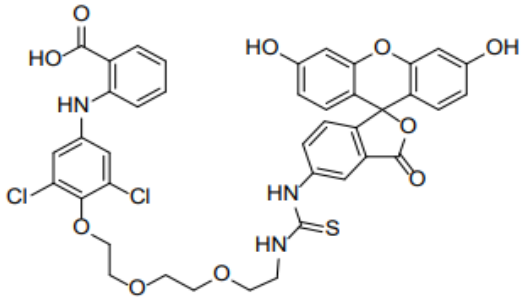
FP プローブ 2 を用いた蛍光偏光法により、緩衝液中でのアコラミジスの結合親和性を評価した（Figure 2）。FP プローブ 2（2-（(3，5-ジクロロ-4-（2-（2-（2-（3-（3'，6'-ジヒドロキシ-3-オキソ-3H-スピロ［イソベンゾフラン-1．9'-キサンテン］-5-イル）チオウレイド）エトキシ）エトキシ）フェニル）アミノ）安息香酸）は、既知の TTR リガンドを短いリンカーを用いてフルオレセインイソチオシアネート（FITC）に結合させた複合体である。FP プローブ 2 に組み込まれた TTR リガンドは、ジクロフェナクのヒアルロン酸誘導体である（Wiseman, 2005）。結合は FP 信号の増加によって測定される（λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 525 nm）。FP シグナルの変化は、TTR との会合に伴う蛍光リガンドの回転速度の低下に比例する（Alhamadsheh, 2011）。

FP アッセイの結果、pH7.0 で TTR の T_4 結合ポケットへのプローブの結合が確認された。FP プローブ 2（Figure 2）は、TTR の T_4 結合部位に高い親和性で結合する（K_{d1} = 13 nM 及び K_{d2} = 100 nM）。アコラミジス等の TTR リガンドは、FP プローブ 2 に競合し T_4 結合ポケットへの結合を置換するため、TTR に対するアコラミジスの親和性は、TTR の結合部位からの FP プローブの置換により測定した。

FP プローブ 2 含有 TTR アッセイ緩衝液（10 mM リン酸塩、pH 7.0、100 mM KCl、1 mM EDTA）に、アコラミジス（0.006 µM～12.5 µM）を室温で添加し、FP 信号（λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 525 nm）を測定した。

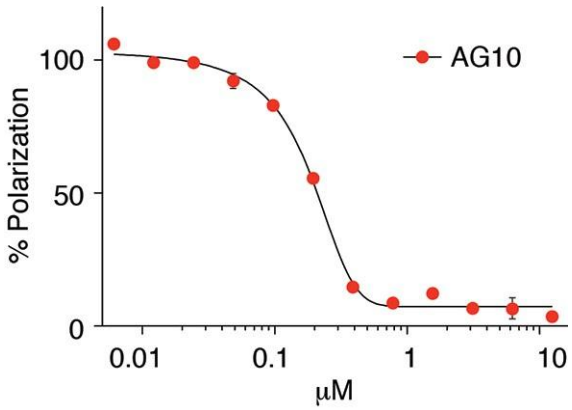
その結果、アコラミジスはヒト TTR に高い親和性を示した（K_{app} = 193 nM; R^2 = 0.994）（3 回測定による平均値）（Figure 3）。

Figure 2: 蛍光偏光プローブ 2 の化学構造



Source: NC-[redacted]-0003, (Wiseman, 2005; Alhamadsheh, 2011)

Figure 3: 蛍光偏光法による TTR への結合親和性の検討



Dose responsive suppression of FP probe binding by increasing concentrations (6 nM to 12.5 µM) of acoramidis after 6 hours of incubation. Representative results (Mean ± SD) from three independent experiments are shown.
Source: [redacted] 20[redacted]-001 (Penchala, 2013)

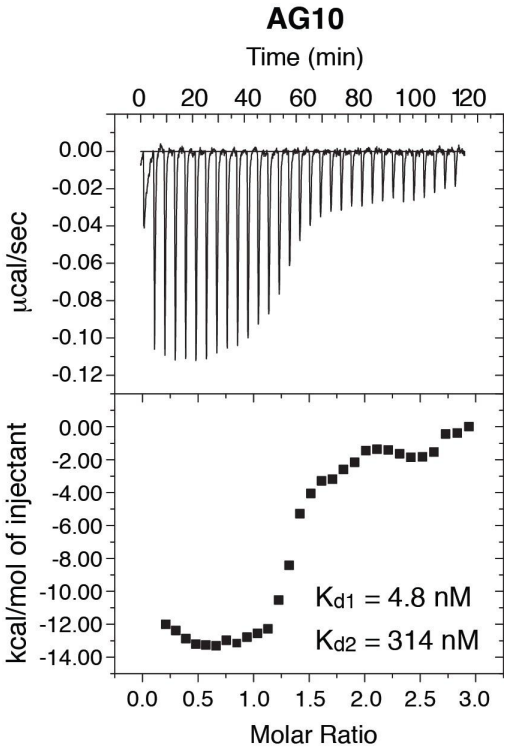
2.1.1.2 等温滴定熱量測定

公表情報から、TTR とその生理学的リガンドである T_4 間の相互作用には、負の協同性を有する 2 つの結合部位が関与していることが示唆されていた（Ferguson, 1975; Cheng, 1977）。Marchesini らによって報告されているように、2 つの結合部位の解離定数には数桁の異なる大きな差（K_{d1}=9.2 nM、K_{d2}=5.3 μM）がみられている（Marchesini, 2006）。等温滴定熱量測定（ITC）法では，低分子化合物が蛋白と相互作用する際に放出または吸収する熱量を測定し，結合定数や結合様式の検討が可能である。本法では、受容体-リガンド相互作用をトレーサーやカップリング反応による複雑さを伴うことなく評価可能である。実際には、受容体分子へのリガンドの滴定を実施し、各濃度のリガンド添加時に交換される熱量を測定する。リガンドの濃度が受容体の飽和に近づくにつれ、熱交換の量は双曲線的に減少する。各添加時に交換される熱量の増加分をリガンドの濃度に対してプロットすると熱量増加による滴定曲線が得られ、質量作用の法則を用いて化学量論組成と平衡定数を算出可能である。全体の熱量はエンタルピーを表し、また、エントロピーは Gibbs の式から計算可能であることから、分子間相互作用の熱力学的プロファイルを評価できる。

アコラミジスの TTR（TTRwt）への結合を ITC 法で評価した。反応チャンバー内の TTR 溶液に一定量のアコラミジス溶液を添加して滴定を実施した。TTR の飽和が進むにつれて、混合時に放出される熱量は徐々に減少する。熱量滴定は VP-ITC 熱量計で行った。25 μM アコラミジス溶液をリン酸緩衝液（pH7.4、100 mM KCl、1 mM EDTA、2.5% DMSO 含有）で調製し、2 μM の TTR を含む ITC セル内で滴定した。滴定の前に、全てのサンプルを 10 分間脱気した。TTR がリガンドで完全に飽和するまで、37 回アコラミジス（各 8.0 μL）を ITC セル（25℃）に注入した（Figure 4）。ブランクを差し引いた後のサーモグラムを積分すると、2 つの相互作用部位が負の協同性を示すモデルに適合する熱量増加滴定曲線が得られた。データ解析には、MicroCal ORIGIN 5.0 ソフトウェアの ITC データ解析モジュールを用い、調整可能なパラメーター（K_{d1}、ΔH_1、$T\Delta S_1$、K_{d2}、ΔH_2、及び $T\Delta S_2$）を考慮した非線形最小二乗法で解析を実施した（［Penchala, 2013］；[redacted] 20[redacted]-002 試験）。

Marchesini らの報告（Marchesini, 2006）と同様、TTR の 2 つの T_4 結合部位は負の協同性（K_{d1} = 10 nM, K_{d2} = 1 μM）を有していることが確認されている（Sekijima, 2005）。アコラミジスの TTR への結合を解析したところ、高い結合親和性が示され、アコラミジスが負の協同性をもって TTR と結合していることが確認された（K_{d1} = 4.8 nM 及び K_{d2} = 314 nM）。アコラミジスの結合はほとんどがエンタルピー的に駆動される（ΔH_1 = -13.60 kcal/mol 及び $T\Delta S_1$ = -2.26 kcal/mol）。同様の結合機序が、タファミジスと TTR の相互作用について報告されており（Bulawa, 2012）、2 つの結合部位が確認されている（K_{d1} = 3 nM 及び K_{d2} = 278 nM）が、熱力学的パラメーターの分析から、25℃におけるタファミジスの TTR への結合はエンタルピーとエントロピーに等しく起因することが示された。対照的に、アコラミジスの結合はほとんどエンタルピーによって駆動された。さらに、タファミジスはアコラミジスに比べてより血漿タンパク結合率が高かった。したがって、所定の血中薬物濃度であれば、アコラミジスの方がより多く TTR に結合する。同様の比較は、TTR 安定化の反応の場として血清又は血漿を用いた試験でも示されている（アコラミジス、タファミジス、並びにジフルニサルの TTR 安定化作用の比較については Figure 15 を参照のこと）。

Figure 4: 等温熱量測定法によるアコラミジスと TTR の結合エネルギー特性評価



Calorimetric titration of AG10 against TTR. Raw data (top) and integrated heats (bottom) from the titration of TTRwt (2 µM) with AG10 (25 µM).
Source: [redacted] 20[redacted]-002

TTRwt に対するアコラミジスの結合親和性に加えて、TTRv V122I に対するアコラミジスの結合の負の協同性について TTR サブユニット交換アッセイにより確認した。本アッセイにより TTRv V122I に対するアコラミジスの結合定数を決定したが、TTR の 2 つの T_4 結合部位間の協同性にいても本アッセイを用いて検討されている（Penchala, 2013）。サブユニット交換アッセイは TTR の動的な四量体化平衡に基づいており、四量体は常に会合と解離の過程にある。本アッセイにおいて、非標識ホモ四量体と FLAG 標識ホモ四量体の混合物は緩やかにホモ四量体とヘテロ四量体に分布し平衡に達するが、このプロセスは、TTR の 2 つの T_4 結合部位のいずれか、あるいは両方に結合する TTR 安定化薬によって阻害され、四量体は安定化される。阻害の程度は TTR 安定化薬が結合していない TTR の割合に依存し、安定化薬と TTR の相互作用の解離定数に依存する。

遺伝子組み換え TTRv V122I の非標識ホモ四量体と FLAG 標識ホモ四量体を、それぞれ 0.225 µM（総 TTR 濃度は 0.45 µM）で、アコラミジス（TTR 四量体に対して 0～2 モル当量）存在下で混合した。サブユニット交換速度は、アコラミジス非存在下での完全な交換に必要な時間である 32～48 時間にわたって測定した。その結果、アコラミジス濃度の増加によりサブユニットの交換率は徐々に低下し、サブユニット交換データ解析により 2 つの解離定数（K_{d1} = 6.2 ± 2.0 nM 及び K_{d2} = 139 ± 80 nM）が算出された（Penchala, 2013）ことから、アコラミジスが野生型だけでなく V122I 変異でも負の協同性をもって TTR と結合していることが確認された。

2.1.1.3 表面プラズモン共鳴

TTR とアコラミジスの複合体形成の速度論的解析を表面プラズモン共鳴（SPR）法により実施した。デキストランリンカーを介してチップ表面に結合した TTR と液相間のアコラミジスの分布から、結合速度論と複合体の安定性を評価した。TTR は、N-ヒドロキシスクシンイミド/1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド処理によりセンサーチップ CM-5 とカップリングさせた。液相には 0.05% Tween-20 及び 2% DMSO 含有リン酸緩衝液（pH7.4）を用い、25℃で実施した。

SPR の結果、種々の濃度のアコラミジスの添加により屈折率の増加がみられ、増加率はアコラミジスの結合量に比例した。定常状態に達した後、アコラミジスを含まない移動相でシステムを洗浄したときの屈折率の減衰から解離速度定数を求めた。ラングミュア吸収等温式を用いたデータ解析の結果、TTR-アコラミジス複合体の解離定数が得られた（Figure 5）。また、指数関数的速度方程式への回帰により解離（k_{off}）および結合速度定数（k_{on}）が得られた（Table 1）。なお、データ解析には、Biacore ソフトウェアを使用した。

アコラミジスの TTR への結合の平衡解離定数（K_d）の算出には各種速度論的パラメーターを使用した。その結果、アコラミジスは TTR に速やかに結合し、緩やかに遊離されたことから、アコラミジスの TTR への高親和性が裏付けられた。一般に、二分子反応速度の上限は拡散によって設定され、およそ 10^7 M^{-1} s^{-1} と報告されているが、TTR-アコラミジスの会合速度定数はそれに近似していた。治療条件下での TTR の血中濃度（5 μM）は解離定数（16 nM）を 2 対数桁上回っていることから、体内での反応は定常状態にあり、全ての TTR はアコラミジスによって飽和しているものと推測される。アコラミジスの解離速度定数は小さいことから、アコラミジス-TTR 四量体複合体の持続性は高く、効果がより長く持続する可能性がある。事実、アコラミジスの TTR への結合速度定数はタファミジス（アコラミジスの約 54%）より高く、TTR への滞留時間もタファミジスの約 4 倍長かった（NC-365 試験）。

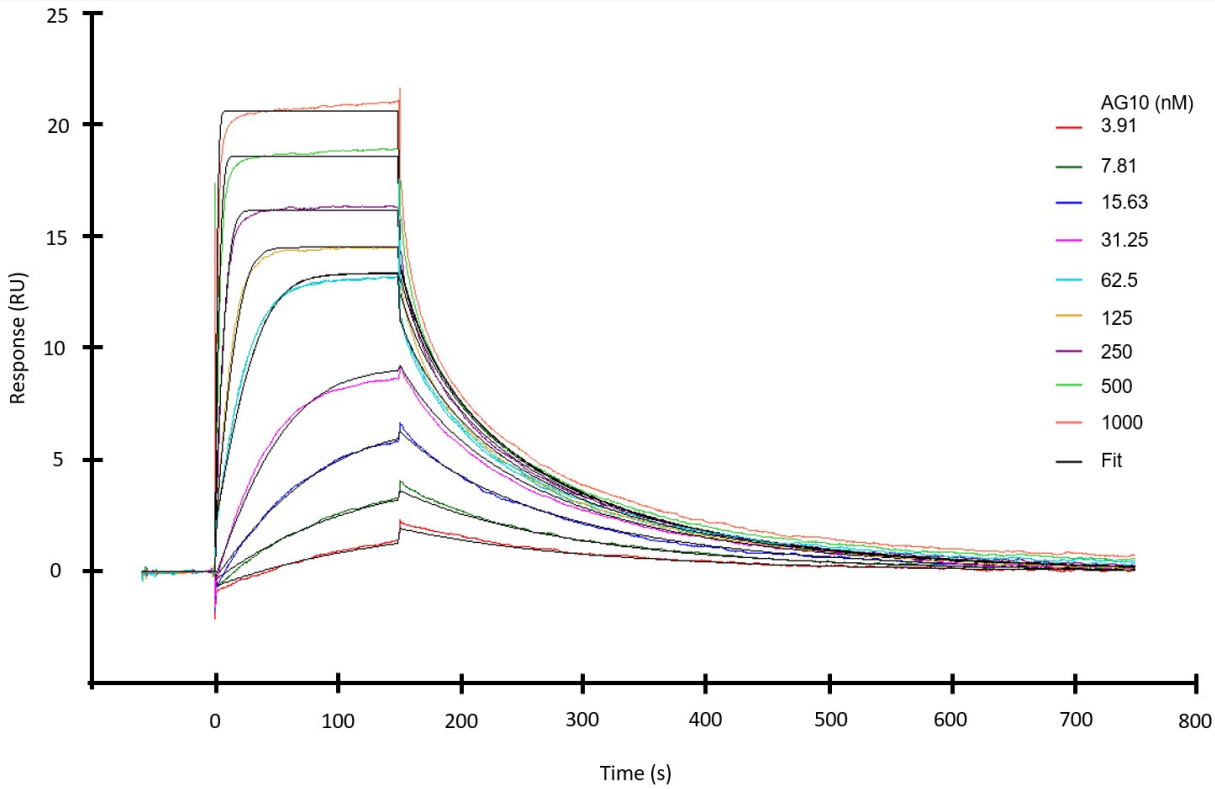
以上のように、TTR 四量体とアコラミジスの複合体形成の速度論的パラメーターは、タファミジスよりも優れており、アコラミジスによる TTR 安定化作用がより優れていることが示された。

Table 1: 精製ヒト TTR に対するアコラミジスの相互作用の速度論的パラメーター

Parameter	**AG10**	**Unit**
Association rate constant (k_{on})	$1.3 \pm 0.3 \times 10^6$	$M^{-1}s^{-1}$
Dissociation rate constant (k_{off})	0.02 ± 0.002	s^{-1}
Residence time (τ)	51 ± 5	s
Dissociation constant (K_d)	16 ± 2	nM
Replicates (n)	4	

mean ± SD
Source: NC-365

Figure 5: アコラミジスと精製ヒト TTR 複合体形成時の結合速度論的表面プラズモン共鳴解析



Source: NC-365

2.1.1.4 マイクロスケール熱泳動

SPR 法の代替として、マイクロスケール熱泳動（MST）法は分子間の親和性を解析できる熱力学的な方法である。さらに、TTR が固相化された SPR とは異なり、MST では溶液相での測定が可能である。なお、TTR の遊離システイン残基への標識は、TTR 安定化薬の結合部位に影響を与えない。

上述のように、MST では SPR とは対照的に、均一な試験系での解離定数の決定が可能である。MST では、温度勾配によるタンパク質の指向性移動が小分子の結合によって変化する。タンパク質の運動をモニターするために、タンパク質を蛍光標識する。遺伝子組み換え TTR では、対になっていない遊離システインが、[redacted] シリーズの熱泳動システム用にカスタマイズされたシステイン反応性標識 RED-Maleimide 2nd Generation を付与するのに適した部位である。RED-Maleimide 2nd Generation による TTR 標識は、製造業者の指示に従って行った。MST は [redacted]（[redacted] 社）を用い、標準的な実験ガイドに従って行った。

標識 TTR（20 nM）単独、又は標識 TTR（20 nM）とアコラミジス（0.3 nM～10 µM）との混合液をプレミアム MST キャピラリーに充填した。マイクロ泳動は、[redacted]（[redacted] 社, [redacted], Germany）を用いて標準的な手順で行い、データ解析は質量作用の法則を用いた T-jump fit により実施した。

遊離 TTR 及び TTR-アコラミジス複合体の時間経過に伴う熱泳動曲線を示す（Figure 6）。滑らかな曲線は、溶解度の問題によるアーチファクトがないことを示している。アコラミジスの濃度

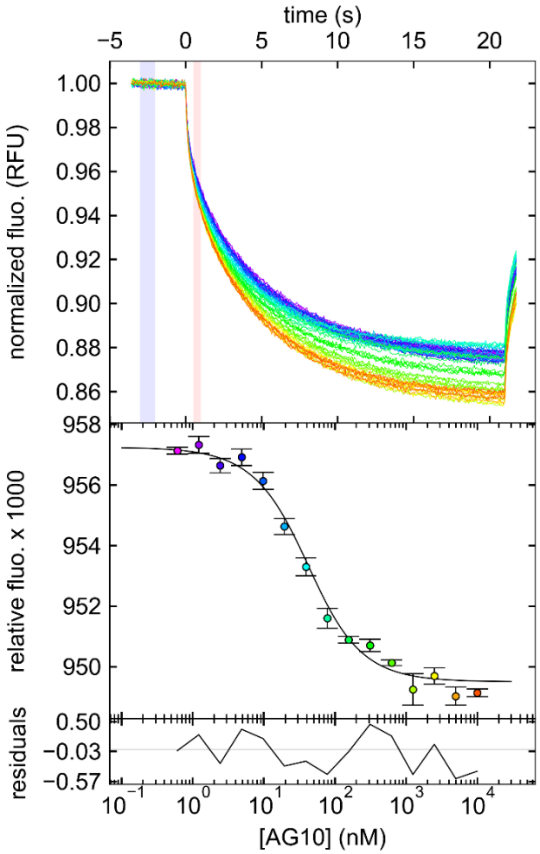
ごとの蛍光振幅の違いは、結果として生じる TTR-アコラミジス複合体の立体構造の違いを示唆している。Figure 6 で色分けした濃度範囲の蛍光変化を正規化し、対数ロジスティック曲線回帰により分析したところ、アコラミジスの解離定数（K_d）は 26 nM であった（Table 2）。TTR 四量体中の 4 つのシステイン残基は、T_4 結合に関与するアミノ酸残基の近くには位置していないため、アコラミジスと TTR の結合に影響を及ぼさない。報告書 NC-366 に示されているように、アコラミジスはタファミジスに比べて TTR に対する結合親和性が高かった。以上の MST の結果は ITC 及び SPR の結果と一致しており、アコラミジスはタファミジスよりも TTR への結合親和性が高いことが示された。

Table 2: 精製ヒト TTR に対するアコラミジスの結合親和性

	Mean ± SD **AG10**
Dissociation constant (K_d)	26 ± 7 nM
Replicates (n)	4

Source: NC-366

Figure 6: 標識 TTR とアコラミジス複合体形成時のマイクロスケール熱泳動



MST data and analyzed binding curves for the interaction between acoramidis and TTR. The top panel shows the thermophoretic time-traces with baseline and analysis windows shaded blue and red, respectively. The bottom panel shows the calculated response for each concentration of acoramidis along with the fitted binding model. Data traces and points are colored by acoramidis concentration which corresponds with the X-axis of the bottom panel.
Source: NC-366

上記 5 つの in vitro 試験成績に加えて、アコラミジスが pH 4.4 による酸解離から TTR 四量体を

保護して安定化させることが報告されており（Penchala, 2013）、解離後の単量体の凝集とそれに続くアミロイド線維の形成は、24 時間後の濁度の測定によって検出可能である。この線維形成アッセイにおいて、野生型 TTR と V122I TTR の両方がアコラミジスによって安定化された。

2.1.2 血漿又は血清サンプル中 TTR を用いた検討

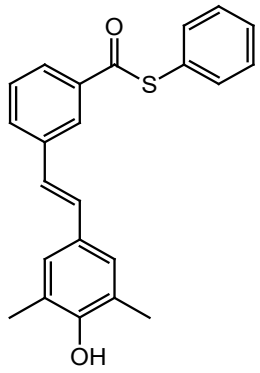
精製 TTR を用いた試験系に続いて、血漿タンパク質の存在下又はヒト血清及び血漿中の TTRwt 及び TTRv に対するアコラミジスの効果を以下の 2 つの方法で検討した。

1. TTR に結合しアミノ酸残基 Lys15 を共有結合的に修飾するフルオレセイン化リガンドを用いた蛍光プローブ排除（FPE）アッセイ
2. ウェスタンブロッティング（WB）を用いた TTR 四量体-RBP 複合体、TTR 四量体単独の定量

2.1.2.1 蛍光プローブ排除アッセイ

共有結合プローブは、TTR の T_4 結合部位に選択的に結合するスチルベン系発蛍光性化合物である。プローブ（(E)-S-フェニル 3-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルスチリル)ベンゾチオエート）は、それ自体は蛍光を発しないが、TTR に結合する際、アミノ酸残基 Lys15 の ε アミノ基に共有結合して修飾する。得られたコンジュゲートは、TTR と比較して顕著な蛍光を発する（Figure 7）（Choi, 2010a; Choi, 2011; Choi, 2010b）。

Figure 7: 共有結合プローブの化学構造



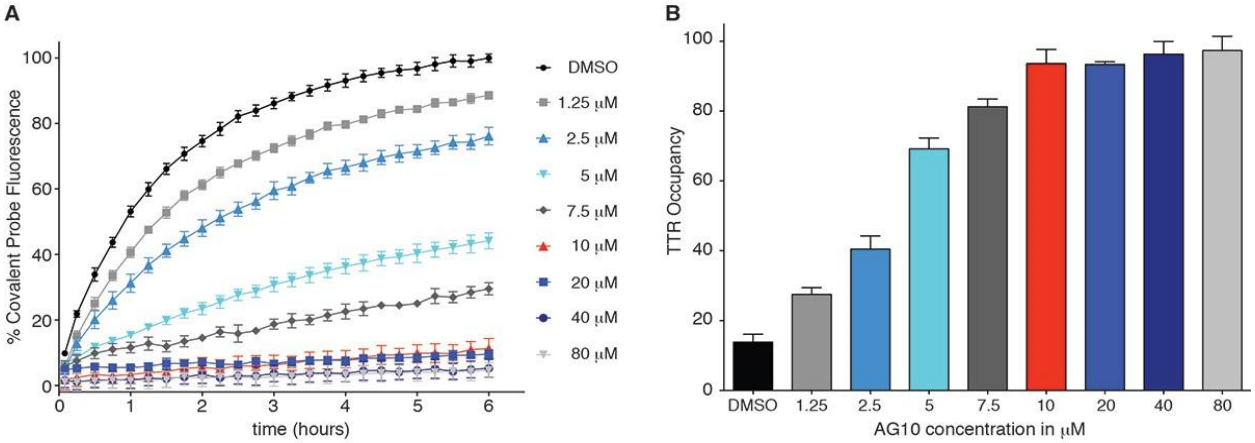
Probe

Source: NC-[redacted]-0001, S2 (Choi, 2011)

アコラミジス存在下での TTR 四量体に結合する共有結合プローブの蛍光強度は、血清中の TTR に対するアコラミジスの結合親和性及び選択性の指標となる（すなわち、プローブの蛍光強度が低いほど、TTR に対する結合力が強い）。ヒト血清をアコラミジス（1.25～80 μM）及び共有結合プローブ（3.6 μM）と混合し、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光（λ_{ex} = 328 nm, λ_{em} = 384 nm）強度を 10 分又は 15 分ごとに 25℃で 6 時間測定した。アコラミジスの対照には DMSO を用いた。

その結果、アコラミジスは用量反応的にヒト血清中 TTRwt に結合した（Figure 8）。なお、TTR 安定化薬による 3 時間の競合後に得られた TTR-共有結合プローブの蛍光の程度と、安定化薬の効果（TTR 占有）の間には線形的な相関がみられている（Choi, 2011）。

Figure 8: 蛍光プローブ排除アッセイによるヒト血清中 TTR への結合及び安定化作用の用量反応性の評価

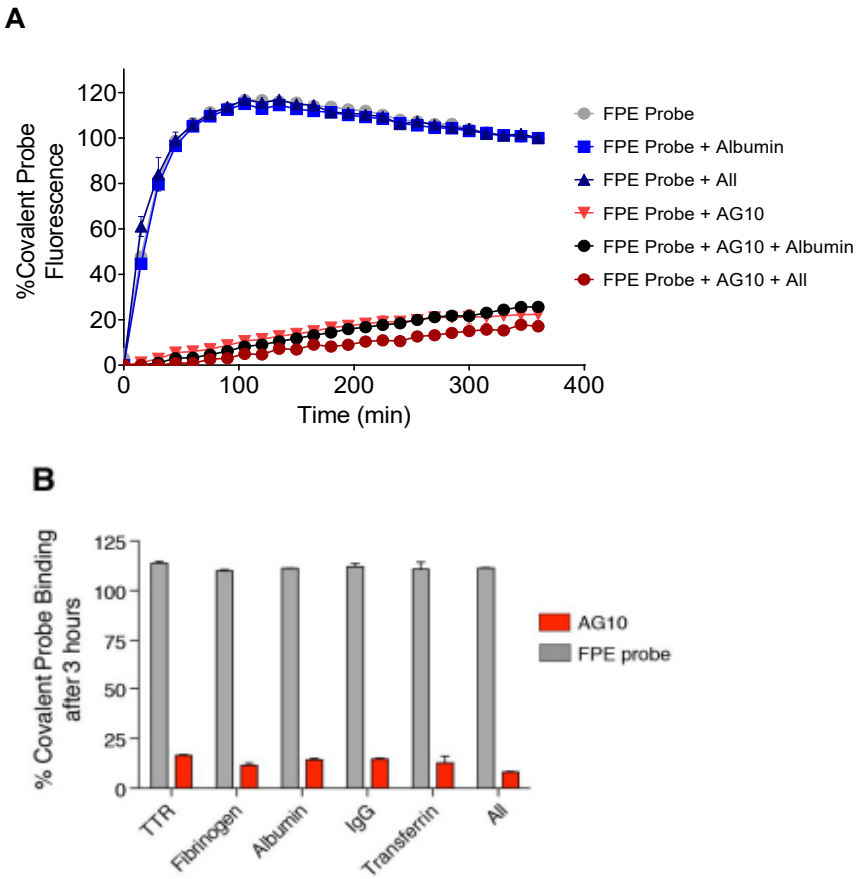


(A) Fluorescence change caused by modification of TTR by covalent probe monitored in the presence of probe alone (Control DMSO, black circles) or by increasing concentrations of AG10 (colors). (B) Percent occupancy of TTR in human serum by increasing concentrations of AG10 in the presence of covalent probe measured after 3 hours of incubation relative to probe alone. Each bar shows the mean (SD) of three replicates.
Source: NC-[redacted]-0001

試験に用いたプローブはヒト血漿中の TTR と化学選択性をもって反応する（Choi, 2010a; Choi, 2010b）。レジンと結合した抗 TTR ポリクローナル抗体を用いてヒト血漿から TTR を免疫学的に分離する前に、プローブをヒト血漿と 37℃で 24 時間インキュベーションした。高 pH でプローブ樹脂から TTR を解離させた後、TTR 単量体と共有結合したプローブ単量体の比率を HPLC で測定したところ、約 1:1 であった。また、複合体の質量分析により予想される TTR の質量が示された。

FPE アッセイは低分子 TTR 安定化薬による TTR 四量体への結合を測定するものであり、本質的にはプローブとの競合アッセイである。試験系の特異性を確認するため、血清タンパク質添加の影響について FPE アッセイで検討した。精製 TTR（5 μM）に加えて、4 種類の代表的な血液タンパク質を試験系に添加した。その結果、Figure 9 にみられるように、アルブミン、トランスフェリン、フィブリノゲン又は免疫グロブリン G（IgG）を添加しても、TTR へのプローブ結合に変化はみられず（パネル B のグレーのバー）、アコラミジスの結合への妨害はみられなかった。ATTR 被験者（ATTRv と ATTRwt の両方）の TTR 四量体を安定化させるため、アコラミジスはアルブミンのような高濃度の血清タンパク質の存在下で TTR に選択的に結合する。FPE アッセイ系自体による干渉がないことに加えて、アコラミジスの標的である TTR の T_4 結合部位に競合するアルブミンの干渉がみられなかったことから、アコラミジスによる TTR 安定化の様式が確認された。なお、臨床試験サンプルを用いた ex vivo FPE アッセイの成績は報告書 CLIN-000954 に要約されており、アコラミジスによる TTR のほぼ完全な安定化が持続していることが確認されている。

Figure 9: アコラミジスの TTR への結合に対する血清タンパク質の影響



(A) Fluorescence change due to modification of purified human TTR (5 µM) by covalent probe monitored for 6 hours in the presence of probe alone (grey circles), probe plus albumin (600 µM) (blue squares), probe plus all [fibrinogen (5 µM), albumin (600 µM), IgG (70 µM), transferrin (25 µM)] (dark blue triangles); probe and AG10 (10 µM) (red triangles) or probe and AG10 plus albumin (black diamonds), probe and AG10 plus all [fibrinogen (5 µM), albumin (600 µM) IgG (70 µM), transferrin (25 µM)] (dark red circles). (B) Percentage of covalent probe binding to TTR (5 µM) in the presence of individual serum proteins [same concentrations as in Panel A] and/or AG10 (10 µM) measured after 3 hours of incubation, relative to probe alone. Each bar shows the mean (± SD) of duplicate replicates.
Source: NC-[redacted]-0001

血清中の TTR に選択的に結合するリガンドは、プローブと TTR の結合を低下させ、蛍光強度を減少させる。しかし、本アッセイはその選択性に加えて、TTR 結合部位、特に第 2 結合部位に対するプローブと被験物質の相対的な親和力にも依存する。第 2 結合部位へ親和性の重要性は、一般に $K_{d2} > K_{d1}$ であることを考慮している。

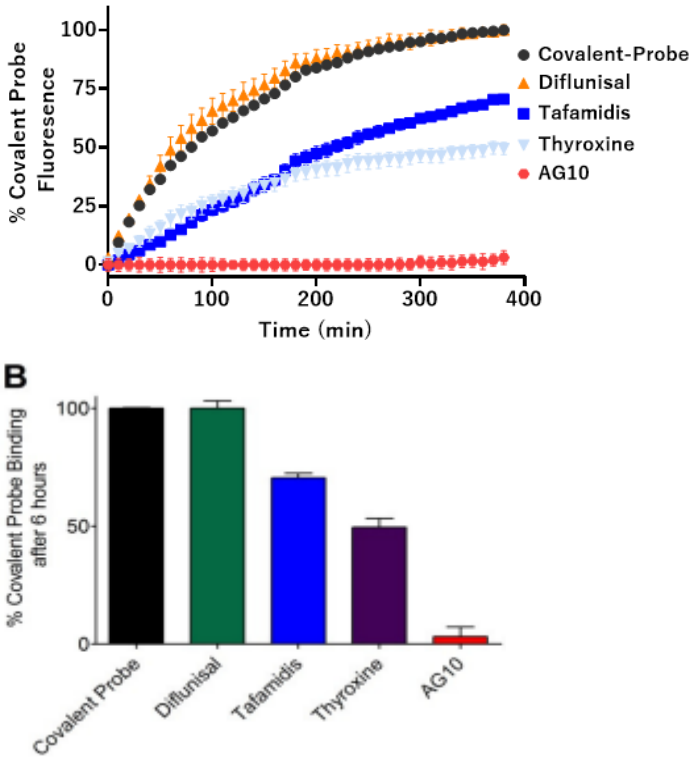
経験的に、インキュベーション 3 時間でのプローブ競合アッセイの結果は、体液由来の TTR と共免疫沈降する小分子の当量数など、他の選択性の検討結果（Penchala, 2013）とよく相関していることから、さまざまな TTR リガンドの相対親和性を共有結合プローブ蛍光アッセイで検討した。

リガンドとして、ジフルニサル（Sigma D3281）、タファミジス（University of Pacific 供与）、T_4（Sigma T2376）、及びアコラミジスを用い、濃度は全て 10 µM とした。TTR 共有結合プローブ（3.6 µM）の存在下でヒト血清と各リガンドをインキュベーションした結果、ジフルニサルの共有結合形成率が最も高く、対照比 95%以上のプローブ結合がみられた（Figure 10）。これは、TTRwt に対するジフルニサルの結合力が弱いという以前の報告（Purkey, 2001）と一致する。一方、本ア

ッセイにおける 6 時間後の残存プローブ結合率は、アコラミジスで 3.1 ± 2.9%、タファミジスで 70.5 ± 1.4%、及び T_4 で 49.5 ± 2.6%と、アコラミジスの TTRwt に対する結合力はタファミジスや T_4 よりも強かった（NC-[redacted]-0001 試験）。

Penchala らはまた、これらの結果を過去の共免疫沈降試験成績に外挿し、TTR に対するリガンドの選択性を推定した（例えば、化学量論値の範囲は、TTR 四量体当たりリガンドの 0 から 2 当量の範囲であり、0 は選択性がないことを示し、2 は両方の T_4 結合部位が結合されていることを示す）。TTR に対する化合物の選択性が低いほど、値は理論上の最大値 2 から低くなる。この外挿によると、FPE アッセイにおけるアコラミジスとタファミジスの残留プローブ結合率の大きな違い（例えば 3 時間後の残留プローブ結合率はそれぞれアコラミジスで 0 ± 2.5%、タファミジスで 44.2 ± 3 %）は、共免疫沈降試験（アコラミジスで～1.55、タファミジスで 0.81）ではやや小さい差に相当する。しかし、アコラミジスはタファミジスよりも血清中の TTR に選択的に結合することが重要で、アコラミジスのより高い選択性は、プール血清中 TTR 酸解離後の WB 解析による安定化アッセイによっても実証されている（Penchala, 2013）。

Figure 10: **蛍光プローブ排除アッセイによる様々なリガンドの TTR への結合力と安定化作用の比較**

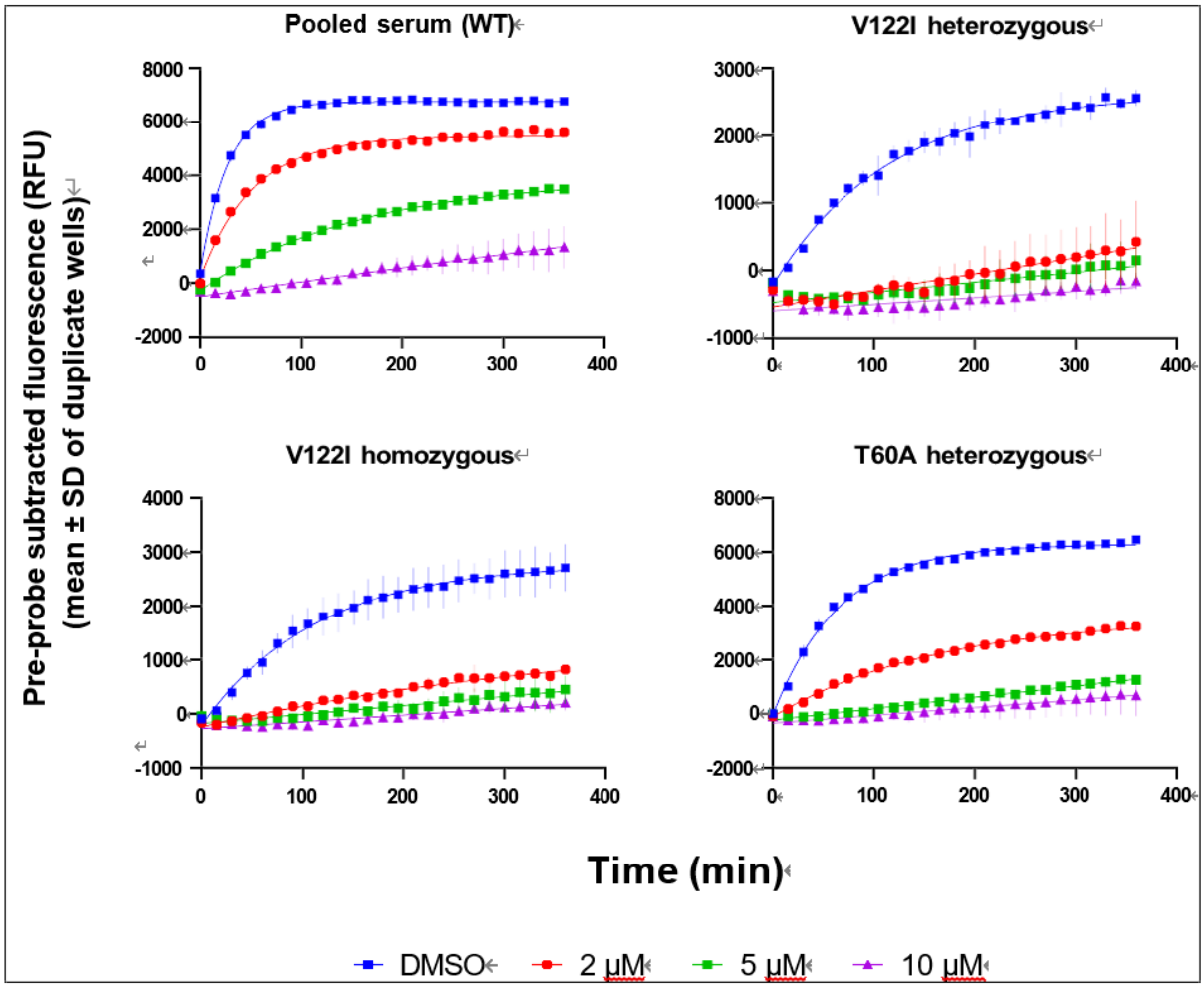


(A) Fluorescence change due to modification of TTRwt in human serum by covalent probe monitored for 6 hours in the presence of probe alone (black circles) or probe and TTR ligands (colors). (B) Percentage of residual probe binding to TTR in the presence of ligands measured after 6 hours of incubation, relative to probe alone. Each bar shows the mean (SD) of three replicates.
Source: NC-[redacted]-0001

精製タンパク質及びヒト血清中の TTRwt に対するアコラミジスの親和性及び選択性の確認に加えて、ATTRv-CM 被験者血清中の TTRv V122I 及び T60A に対するアコラミジスの選択的結合についても FPE アッセイによって評価した。なお、被験者のサンプルは AG10-301 臨床試験（NC-

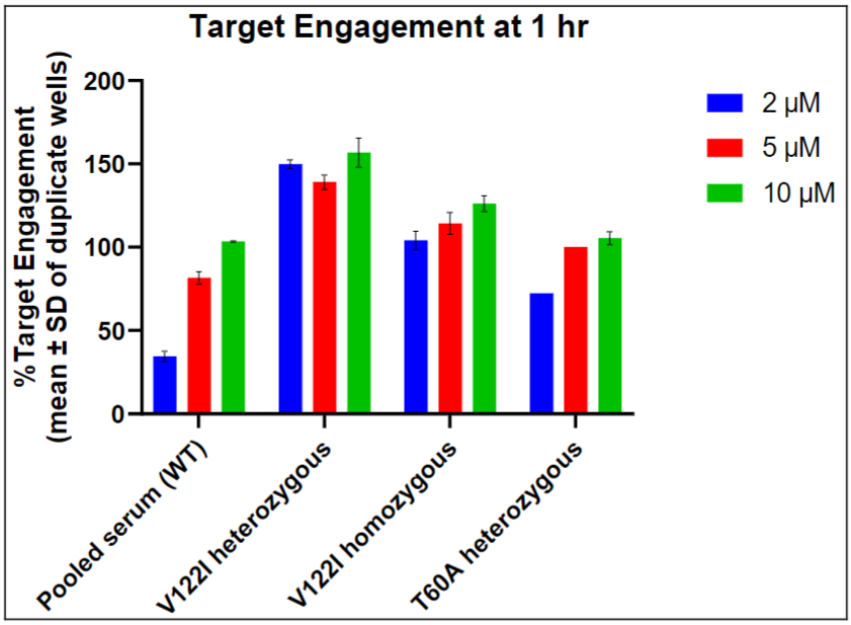
363 試験）のスクリーニング時に採取された。検討の結果、アコラミジスは、被験者血清中の TTRv に用量に応じて結合し、共有結合プローブ結合部位を占有することによって TTR を安定化させた（Figure 11、Figure 12、及び Figure 13）。

Figure 11: FPE の時間経過



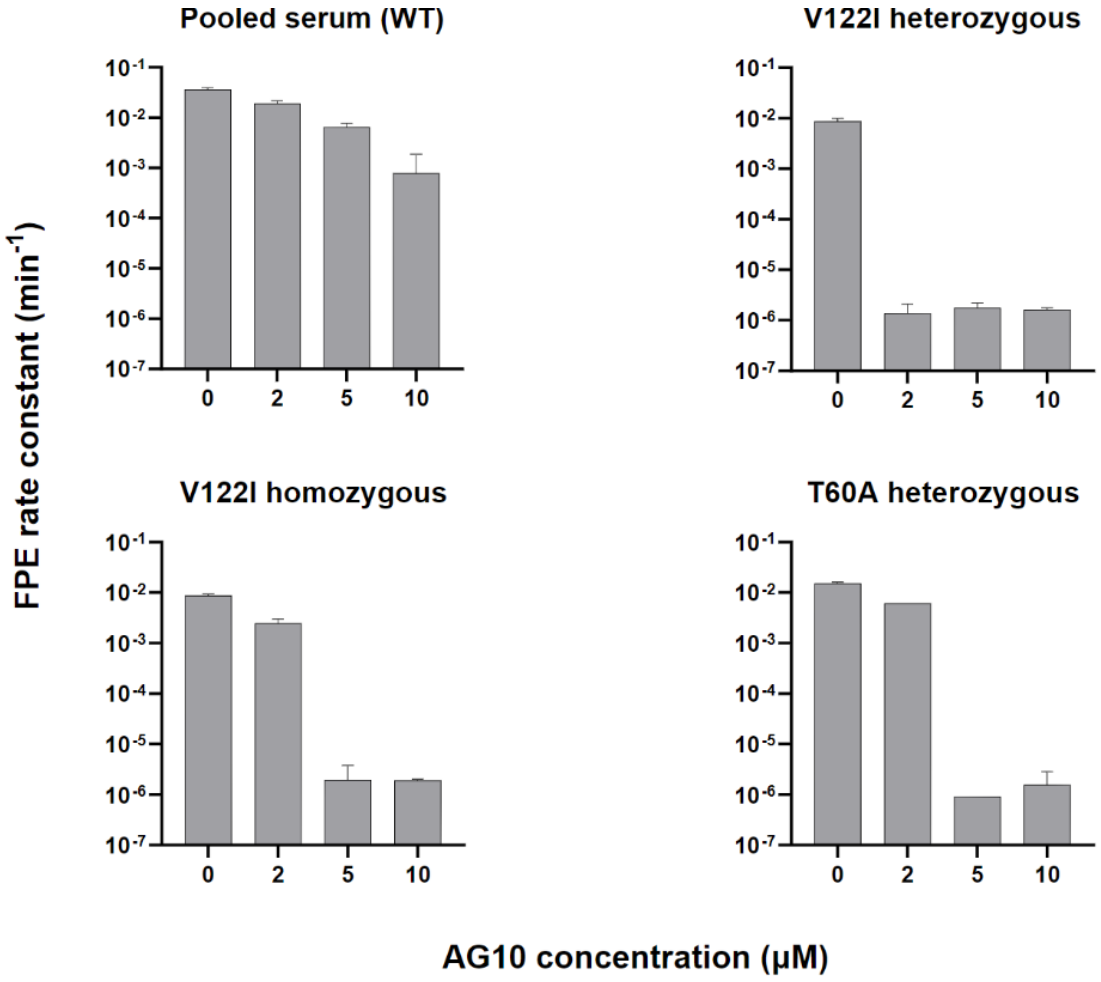
FPE was performed following in vitro addition of DMSO (blue squares), 2 µM (red circles), 5 µM (green squares), or 10 µM (violet triangles) AG10. Samples analyzed include pooled serum from healthy volunteer donors, as well individual participant serum samples with the following genotypes: V122I heterozygous, V122I homozygous, and T60A heterozygous. Mean and SD are shown.
Source: NC-363

Figure 12: アコラミジス（2、5、10 μM）添加 1 時間後の FPE%で示される標的占有率



AG10 concentrations: 2 μM (blue), 5 μM(red), 10 μM (green)
Samples analyzed include pooled serum from healthy adult volunteers, as well individual participant serum samples with the following genotypes: V122I heterozygous, V122I homozygous, and T60A heterozygous. Percent target occupancy calculated as described in Report NC-363.
Source: NC-363

Figure 13: アコラミジス添加後の FPE 反応速度定数



Samples analyzed include pooled serum, as well individual participant serum samples with the following genotypes: V122I heterozygous, V122I homozygous, and T60A heterozygous. FPE rate constant calculated as described in Report NC-363.
Source: NC-363

TTRwt プール血清又は TTRv 被験者 3 検体の FPE アッセイから得られた 3 つのパラメーター（蛍光変化の時間経過、標的占有率、速度定数）はいずれもアコラミジスの効果の用量反応性を示している。

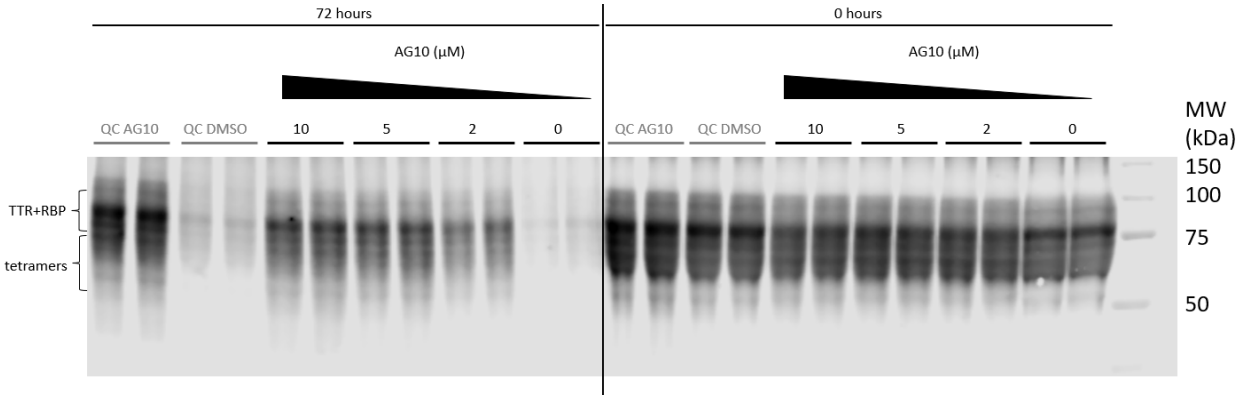
2.1.2.2 ウェスタンブロット（イムノブロット）

血漿サンプルを用いた WB 法により、TTR 四量体単独及び RBP との複合体の定量を行った。酸解離条件下での血漿 TTRwt 四量体の安定性を以下のように測定した。

アコラミジスのストック溶液から DMSO にて最終濃度 0～10 μM のアコラミジスを調整し、試験に用いた（最終 DMSO 濃度 2 v/v%）。アコラミジス存在下又は非存在下で、血漿サンプル 5 μL を酸性緩衝液（pH 3.8、3 mM 酢酸、100 mM 酢酸ナトリウム、100 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM ジチオスレイトール）95 μL に加えて酸性化した。酸性化したサンプルは、直ちにグルタルアルデヒド（最終濃度 2.5%）で 5 分間架橋し（t = 0 時間サンプル）、0.1 M NaOH 中で水素化ホウ素ナトリウム溶液により反応停止させるか、酸性化したサンプルを室温で 72 時間インキュベーションした後、同じ手順で架橋及び反応停止させた（t = 72 時間サンプル）。血漿サンプルをドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）用緩衝液で変性させた後、12%

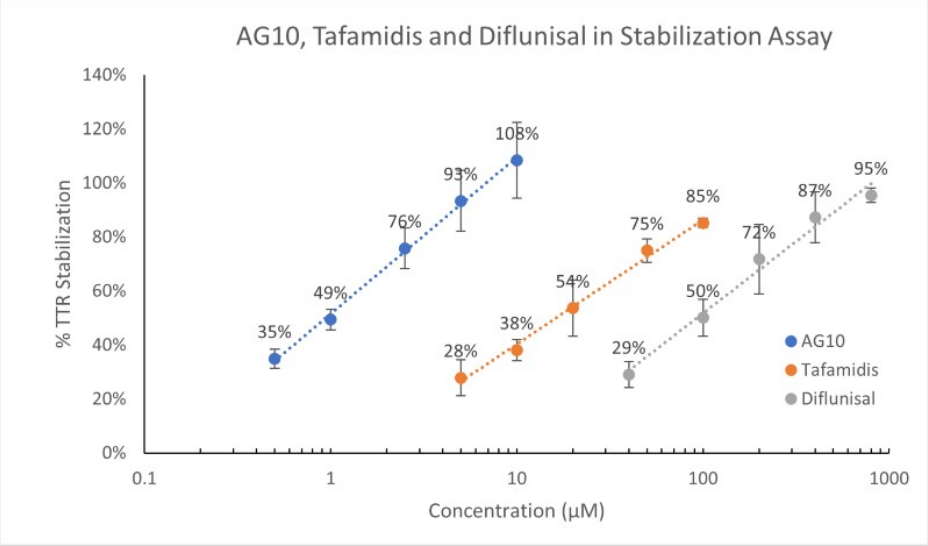
ゲルを用いて SDS-PAGE を行った。タンパク質は、抗 TTR 抗血清を用いて免疫ブロットし、Odyssey 赤外線イメージングシステムを用いて定量し、TTR 四量体%（t = 72 時間サンプルの割合を同等の t = 0 時間サンプルで割った値）として記録した。アコラミジスは酸解離された TTRwt を用量依存的に安定化させた（Figure 14）。TTRwt を含むプール血漿で検討した場合、TTRwt に対する安定化作用の効力は、アコラミジス＞タファミジス＞ジフルニサルの順であった（Figure 15）。

Figure 14: 血漿中の野生型 TTR の酸解離に対するアコラミジスの用量に応じた安定化作用



AG10 stabilization of TTRwt with or without RBP bound in acid-mediated denaturation for t = 72 hours compared to t = 0 as shown on WB image.
Source: NC-388

Figure 15: 野生型 TTR に対するアコラミジス、タファミジス、ジフルニサルの安定化作用の比較

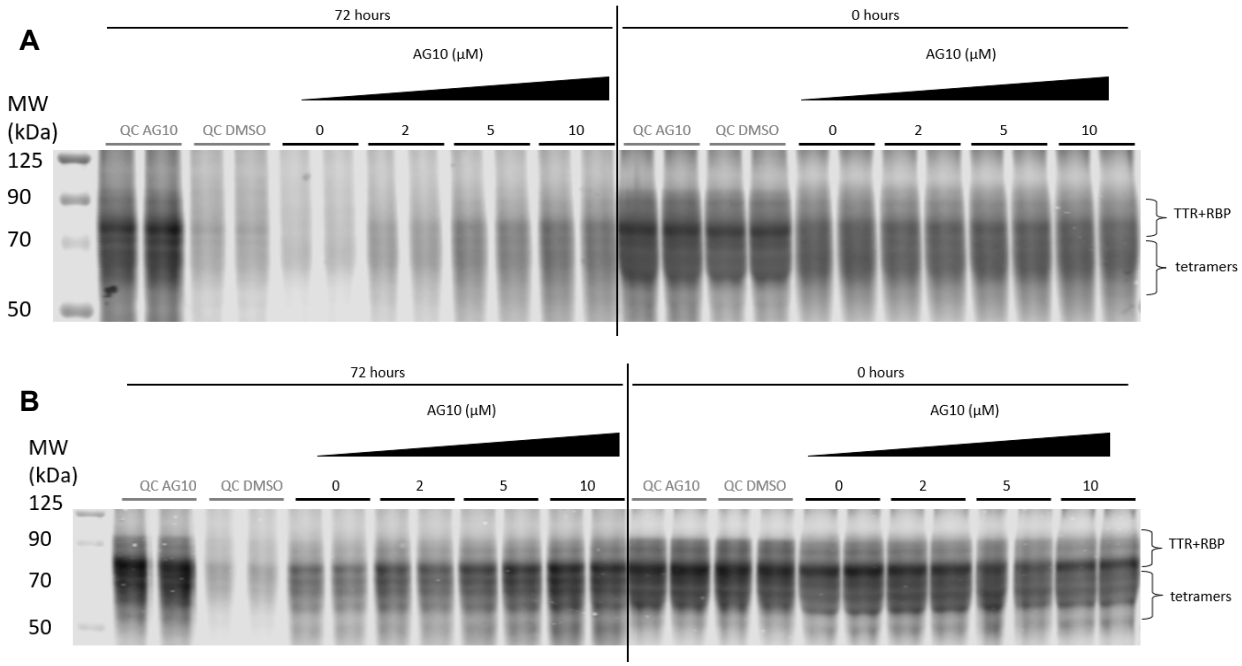


% TTR Stabilization is shown as mean ± SD. Tafamidis was purchased from Cayman Chemical, Diflunisal was purchased from Sigma.
Source: NC-[redacted]71

また、患者由来血漿サンプルを用いて、アコラミジスの存在下又は非存在下で TTRv を酸解離させて、アコラミジスの安定化作用についても検討した。その結果、アコラミジスはホモ接合個

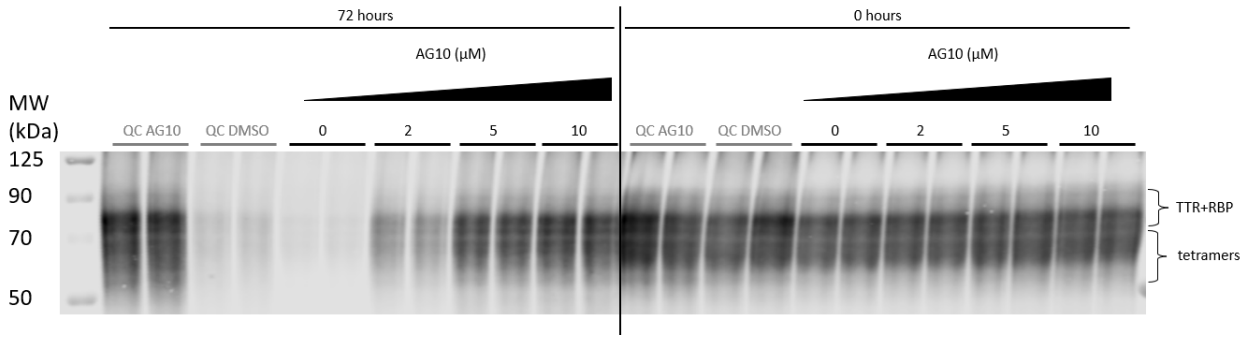
体及びヘテロ接合個体 V122I ATTRv-CM 被験者血漿中の V122I TTR の酸解離を防止し、安定化させた（Figure 16）。血漿サンプルを酢酸緩衝液（pH 4.0）中でアコラミジス（10 μM）又は溶媒（DMSO）と混合し、直ちに反応停止/架橋するか、72 時間インキュベーションした後に架橋させた後に SDS-PAGE 及び WB を実施した。Figure 16 中のパネル A には V122I ATTRv-CM ホモ接合体被験者血漿中の、また、パネル B にはヘテロ接合体被験者血漿中の TTR に対するアコラミジスの安定化作用の WB パターンを示す。TTR バンド（TTR 四量体及び RBP の有無を図中に示す）の強度を定量し、TTR 四量体の割合（%）として示した（Figure 18）。臨床試験サンプルを用いた WB データは報告書 CLIN-000954 に要約されており、アコラミジスによる TTR 安定化作用の持続が確認されている。

Figure 16: 酸解離条件下のホモ接合型及びヘテロ接合型 V122I ATTRv-CM 患者の血漿中 V122I TTR に対するアコラミジスの安定化作用



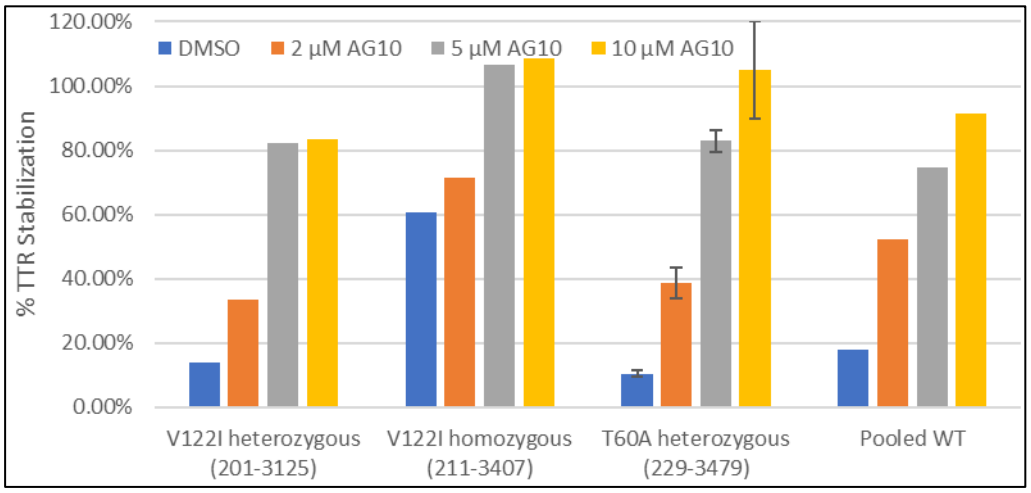
Panel A Homozygous V122I (201-3118): AG10 stabilization of homozygous V122I TTR with or without RBP bound in acid-mediated denaturation for t = 72 hours compared to t = 0 as shown on WB image.
Panel B Heterozygous V122I (211-3407): AG10 stabilization of heterozygous V122I TTR with or without RBP bound in acid-mediated dissociation for t = 72 hours compared to t = 0 as shown on WB image.
Source: NC-388

Figure 17: T60A TTR に対するアコラミジスの安定化作用を示すウェスタンブロッティングの結果



TTR tetramer in T60A variant (229-3479) plasma with or without RBP bound is stabilized by AG10 against acid-mediated dissociation in concentration dependent manner as shown by the image of the WB IR intensity.
Source: NC-388

Figure 18: 野生型 TTR、ホモ/ヘテロ V122I、T60A 変異体に対するアコラミジスの安定化作用の比較



The % TTR stabilization vs AG10 concentration plot shows that at AG10 at 5 μM is approaching optimal and 10 μM is at optimal stabilization from denaturation in plasma at 72 hours compared to t = 0. DMSO is the vehicle control, V122I (heterozygous and homozygous) are n = 1 blots. T60A is n = 3 blots with mean displayed and standard deviation for error bars.
Source: NC-388

TTRwt 及び TTRv V122I に加えて、ヘテロ接合性 T60A ATTRv-CM 被験者の血清中の TTRv T60A に対するアコラミジスの安定化作用について検討した。その結果、TTRwt 及びホモ及びヘテロ TTRv V122I を用いた検討と同じ条件下で、TTRv T60A に対する用量に応じた安定化作用が認められた（Figure 18）。なお、TTRv T60A に対するアコラミジスの安定化作用の WB パターンを Figure 17 に示す。

以上のように、アコラミジスによる TTRwt 及び病原性 TTRv に対する親和性、選択性、及び用量に応じた安定化作用が示された。アコラミジスの TTR に対する選択性は天然リガンドの T_4 を上回るものであった。アコラミジスが TTRwt と TTRv のいずれに対しても相互作用を示し、TTR 安定化作用を発揮したことは重要である。可溶性血漿 TTR の組成をヘテロ接合体の TTR アミロイド沈着組織と比較すると、血漿中の TTR は TTRv が全体の 3 分の 1 を占めるが、アミロイド線維内ではその比率が逆転し、3 分の 2 が TTRv となる（Dwulet, 1984）。したがって、TTRwt と TTRv の両方を強力に安定化するアコラミジスの能力は、TTR 安定化薬として非常に望ましい特性であ

る（Figure 1）。

2.1.3 変異型 TTR を用いた in vitro 安定化試験のまとめ

変異型 TTR 被験者由来血清サンプルの T_4 結合部位への結合について、アコラミジス（10 μM）添加 1 時間後の FPE%で示される標的占有率を指標に検討した。なお、対照薬としてタファミジスを用い、承認された最大用量で報告されている最高血中濃度（26 μM）及びトラフ濃度（16 μM）を使用した。その結果、アコラミジスは効果的に標的に結合し、12 個の固有の TTR 変異を含む 54 個の被験者血清サンプル全体での標的結合率は 103.42 ± 12.51%（平均値 ± 標準偏差［SD］）で、26 μM タファミジス（86.68 ± 12.83%、n = 46）及び 16 μM タファミジス（71.26 ± 13.58%、n = 41）（平均 ± SD）よりも高い標的結合率を示した（Table 3）。

Table 3: 各種 TTR 変異型に対するアコラミジス及びタファミジスの標的結合率（FPE アッセイ 1 時間）

Variant	Mean %Target Engagement (SD, n)[a]		
	AG10, 10 μM	Tafamidis, 26 μM	Tafamidis, 16 μM
G6S	99.81 (1.55, 2)	80.02 (5.99, 2)	61.96 (6.12, 2)
A25S	109.51	ND	ND
V30M	100.34	83.15	66.32
A36D	110.27	ND	ND
E42D	100.05	80.99	55.28
S50R	99.11	80.27	60.34
T60A	100.12 (1.77, 4)	82.32 (6.05, 4)	68.10 (8.92, 4)
I68L	99.18 (3.16, 7)	79.40 (5.28, 5)	63.95 (6.73, 5)
E89Q	96.44	76.66	55.48
E92Q	98.46	75.41	66.97
V94L	90.13	66.46	64.22
V122I	105.63 (15.31, 33)	90.96 (13.97, 29)	76.54 (14.83, 24)
Variant mean	103.42 (12.51, 54)	86.68 (12.83, 46)	71.26 (13.58, 41)
WT (Pooled serum)[b]	99.37 (1.77)	64.69 (5.52)	48.61 (6.43)

Abbreviations: A25S = alanine to serine substitution at 25th residue; A36D = alanine to aspartic acid substitution at 36th residue; E42D = glutamic acid to aspartic acid substitution at 42nd residue; E89Q = glutamic acid to glutamine substitution at 89th residue; E92Q = glutamic acid to glutamine substitution at 92nd residue; FPE = fluorescent probe exclusion; G6S = glycine to serine substitution at 6th residue; I68L = isoleucine to leucine substitution at 68th residue; ND = results for samples and conditions with insufficient sample volume for testing are not presented; S50R = serine to arginine substitution at 50th residue; SD = standard deviation; T60A = threonine to alanine substitution at 60th residue; V30M = valine to methionine substitution at 30th residue; V94L = valine to leucine substitution at 94th residue; V122I = valine to isoleucine substitution at 122nd residue; WT = wild type

[a]SD and n are not presented for results with only one participant sample.

[b]All WT results are from the same lot of pooled serum with 6 replicates per condition, SD is reported, n is not shown.

Source:NC-363

Table 4: 変異型 TTR 四量体に対するアコラミジス及びタファミジスの安定化作用（酸解離誘発不安定化）

Variant	WB Mean %Stabilization (SD, n)[a]			
	DMSO	AG10, 10 µM	Tafamidis, 16 µM	Tafamidis, 26 µM
G6S	28.27 (0.13, 2)	95.93 (10.67, 2)	39.16 (4.59, 2)	49.35 (4.37, 2)
A25S	20.88	115.43	46.47	68.06
V30M	26.31 (7.98,2)	103.28 (30.47,2)	37.47	66.51
A36D	50.54	104.20	66.29	79.70
E42D	24.14	109.63	46.08	63.57
S50R	12.37	66.84	21.38	30.51
T60A	22.93 (5.46, 4)	106.40 (21.25, 4)	33.44 (1.60, 3)	49.64 (8.33, 3)
I68L	21.38 (7.61, 7)	98.53 (9.39, 7)	39.34 (8.59, 7)	51.60 (8.00, 7)
E89Q	26.96	82.23	32.16	45.26
E92Q	25.89	107.21	38.49	62.76
V94L	25.96	92.79	64.19	67.37
V122I	24.86 (12.60, 36)	89.91 (11.93, 36)	33.93 (13.39, 33)	45.73 (14.13, 33)
A97S	19.69	95.87	27.05[c]	48.94[d]
D38A	11.92	103.03	ND	ND
F64L	6.02	105.76	ND	ND
L58H	10.46	107.54	ND	ND
P24S	11.44	113.17	ND	ND
Y114C	1.95	86.57	ND	ND
WT (Pooled plasma)[b]	21.75 (1.93, 7)	108.42 (13.98, 7)	38.15 (3.88, 7)[c]	74.98 (4.38, 7)[e]

Abbreviations: A25S = alanine to serine substitution at 25th residue; A36D = alanine to aspartic acid substitution at 36th residue; A97S = alanine to serine substitution at 97th residue; D38A = aspartic acid to alanine at 38th residue; E42D = glutamic acid to aspartic acid substitution at 42nd residue; E89Q = glutamic acid to glutamine substitution at 89th residue; E92Q = glutamic acid to glutamine substitution at 92nd residue; F64L = phenylalanine to leucine substitution at 64th residue; G6S = glycine to serine substitution at 6th residue; I68L = isoleucine to leucine substitution at 68th residue; L58H = leucine to histidine substitution at 58th residue; ND = not done due to insufficient sample or Tafamidis not available during analysis; P24S = proline to serine substitution at 24th residue; S50R = serine to arginine substitution at 50th residue; SD = standard deviation; T60A = threonine to alanine substitution at 60th residue; V30M = valine to methionine substitution at 30th residue; V94L = valine to leucine substitution at 94th residue; V122I = valine to isoleucine substitution at 122nd residue; WB = western blot; WT = wild type; Y114C = tyrosine to cysteine substitution at 114th residue
[a]SD and n are not reported for variants with only 1 sample.
[b]All WT results are from the same lot of pooled plasma with 7 replicates per condition.
[c]Concentration of tafamidis used: 10 µM.
[d]Concentration of tafamidis used: 40 µM.
[e]Concentration of tafamidis used: 50 µM.
Source: NC-388

また、酸解離誘発の TTR 不安定化の検討では、アコラミジスは、その治療目標トラフ濃度の 10 µM において、18 の固有の遺伝子型の TTR に対してほぼ完全な安定化作用を示した（Table 4）。最高血中濃度のタファミジスのとの比較においても、アコラミジスによる安定化率はタファミジスより有意に高かった。この結果はさまざまな不安定化変異を有する TTR に対しても維持され、

一般的な心筋症の V122I 変異型に対するアコラミジスの効果は、安定化率の比較でタファミジスよりも約 2 倍優れていた。疾患の発症機序や TTR 不安定化と重症度との関連性を考慮すると、以上の成績は、アコラミジスが遺伝子型変異に関係なく、ATTRv 患者に対して臨床的に特徴のある有効な治療法となる可能性を示唆している。

2.1.4 結晶構造

2.1.4.1 疾患抑制性変異 TTRv T119M による TTR 四量体の安定性増加

TTR 四量体の安定化を目標とするアコラミジスの構造設計は、疾患抑制性変異タンパク質である T119M TTR に由来する。疾患抑制性 TTRv T119M と病原性 TTRv V30M を共遺伝する複合ヘテロ接合個体は、ATTR の進行から保護されることが数十年前から知られてきた（Coelho, 1993）。これらの患者はトランスサイレチン型アミロイドポリニューロパチー（ATTR-PN）を発症しないか、疾患が比較的ゆっくりと進行する。上述のように、精製タンパク質を使用した in vitro 試験では、野生型 TTR 四量体と比較して T119M TTR 四量体では動力学的及び熱力学的安定性が向上していることが示されている（NC-740 試験）。T119M の速度論的安定化効果は、四量体の解離速度によって確認されており、四量体の解離速度定数は TTRwt で 1.68×10^{-2} hr^{-1} であったのに対し、TTRv T119M では 4.52×10^{-4} hr^{-1} で、解離速度に 37 倍の違いがみられた（Hammarstrom, 2002）。T119M の安定性は尿素変性試験でも確認されており、野生型 TTR 変性に必要な尿素の中間値は 3.4 M であったが TTRv T119M では 3.8 M であり、T119M は熱力学的にも野生型 TTR より安定であることが報告されている（Sekijima, 2005）。

TTRv T119M による安定性の向上は、病原性 TTRv である V30M によって引き起こされる不安定化を補うことが示されている。精製した T119M サブユニットと V30M サブユニットを用いた in vitro 試験では、T119M サブユニット 1 個と V30M サブユニット 3 個を含むキメラ TTR 四量体は完全な V30M 四量体と比較してアミロイド原性が 50%低いことが判明している（Hammarstrom, 2001）。T119M 四量体によるアミロイド疾患の抑制は V30M マウスモデルでさらに支持されており、T119M をコードした遺伝子をアデノ随伴ウイルスでマウス肝臓に導入したところ、モック処置マウスと比較して非線維性 TTR 凝集体が有意に減少した（Batista, 2014）。ヒトでは、T119M の疾患予防特性は、T119M と V30M の複合ヘテロ接合体で観察された（Coelho, 1993）。これとは別に、TTRv T119M のヘテロ接合体キャリアを含む集団研究では、T119M ヘテロ接合体キャリアはキャリアでないヒトと比較して血漿中 TTR 濃度が上昇し、それに関連して脳血管疾患のリスクが低下することが観察された（Hornstrup, 2013）。T119M の予防効果に関する同様の研究から、Greve らは TTR 四量体の不安定性が増すにつれて心不全のリスクが増加することを報告しており、そのリスクの大きさは T119M＜野生型（WT）＜V122I の順であった。本報告では、2 つの前向き研究において、TTR 四量体の循環血中濃度の低下で示される不安定性と心不全との関連性が示唆されている（Greve, 2021）。

2.1.4.2 T119M による TTR 安定化の構造的変化

TTRwt と TTRv T119M の構造を比較した結果、T119M は、Met119 残基と Tyr114、Ser117 と Ser117'間でそれぞれ新規水素結合を形成する幾何学的構造を有していることが明らかになった。TTRwt と TTRv T119M の違いは、Ser117 側鎖の配向の変化によって強調されている。Ser117 は TTR 四量体の中心に位置している。T_4 結合ポケットを横切る Ser117 側鎖の酸素間距離は、TTRwt 結晶構造（n＝5）の 5.5±0.2Å（平均値±SD）から、T119M 構造（n＝4）の 4.8±0.2Å（平均±SD）

に減少した。TTRv T119M のアミノ酸 M119 は、TTRwt の T119 とは異なり、T_4 結合チャネルを横切って伸長し、その結果、四量体内及び四量体内の 2 つの二量体間でより緊密な接触と静電相互作用をもたらす構造変化が生じる。TTRv T119M におけるこれらの新規水素結合は、野生型と比較して四量体の安定化に繋がるとされている（Sebastião., 2001; Miller, 2018）。

2.1.4.3 アコラミジスの V122I 結合時に誘導される T119M 様の安定的立体構造

アコラミジスと TTRv V122I の複合体は、1.18Å の分解能まで、その共結晶構造が解析されている（[RCSB PDB: 4HIQ; Penchala, 2013]、Figure 19）。T_4 結合部位内でのアコラミジスの特異的な結合は、水素結合と塩の広範なネットワークの形成に伴い優れた結合配向を示している。アコラミジスは、TTR 四量体の対称的な 2 つの T_4 結合ポケットの両方を完全に占有している。結合ポケット内でのアコラミジスの位置は対称的で、2 つの対称的な方向に対してそれぞれ 50%ずつの占有率を示した。なお、本検討では、TTRv V122I に対するアコラミジスの完全な占有が観察されたが、これは本結晶化条件では TTRv V122I とアコラミジスのいずれもが高濃度であったため、部分的に引き起こされた可能性も考えられる。V122I にアコラミジスが結合すると、Ser117 の位置は T119M 構造でみられるような立体構造にシフトし、T_4 結合ポケットを横切る Ser117 側鎖酸素の距離は 4.7 ± 0.1Å（平均値 ± SD）であったのに対し、T119M 構造では 4.8 ± 0.2Å と近似していた。

2.1.4.4 アコラミジスで誘導される野生型 TTR の安定的構造

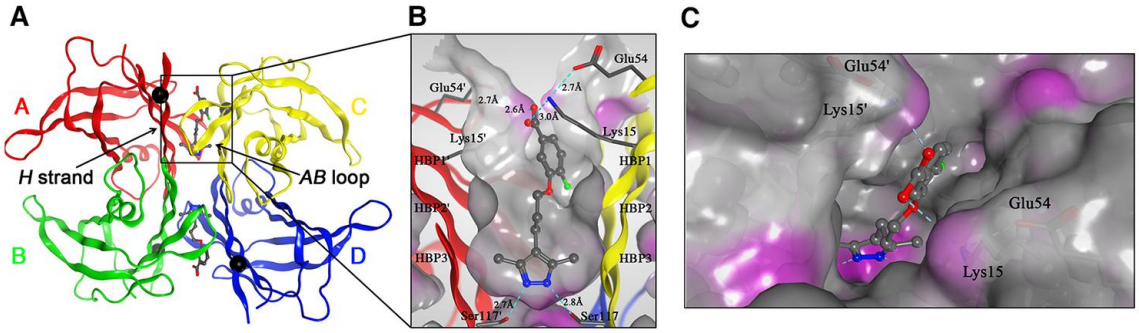
ヒトアポ TTRwt の 1.60Å 分解能での結晶構造（[RCSB PDB: 3CFM]、Figure 20）を用いて、ヒト TTRwt とアコラミジスの複合体モデルを作成した。ドッキングのための受容体構造は[redacted]（[redacted]）[redacted] を用いたモデリングにより求めた。結晶対称性を利用して完全な TTR 四量体を形成し、結晶水を除去した後、全ての回転異性体を一次配置に設定した。電荷的拘束の最小化は、amber 力場と電荷を用いて行った。TTR 四量体の T_4 結合ポケット周辺の結合部位についてドッキンググリッドを作成した。アコラミジスのリガンド調製は Gaussian'09 ソフトウェアを用いて行った。リガンド形状の最適化と自然結合軌道解析（NBO 解析）は、6-311+G(d)基底セットを持つハイブリッド密度汎関数法である B3LYP を用いて行った。また、アコラミジスのヒト TTRwt へのドッキングは、[redacted] ソフトウェアを用いて行った。その結果、300 のモデルが生成され、最も自由エネルギーの低いモデルが構造比較のために選ばれた。モデル化された TTRwt-アコラミジス構造は、TTRv T119M 結晶構造と比較して、Ser117 側鎖の相互作用ネットワークが類似しており、鎖間 Ser117 酸素距離はそれぞれ 5.0-5.1Å と 4.6-5.0Å であった。

TTRwt とアコラミジスの複合体モデルは、デオキシアコラミジスと複合体化した TTRwt の結晶構造（RCSB PDB: 3P3T; Penchala, 2013）と一致している。デオキシアコラミジスの化学構造は、ベンジル環にカルボン酸基がない以外はアコラミジスと同一である。ベンジル環は T_4 結合ポケットの外側に位置し、Ser117 とは相互作用を示さない。本構造では、鎖間 Ser117 酸素距離は 4.2-4.9Å であり、T119M 構造で観察された距離と一致している。

以上の結果は、TTRv T119M によって引き起こされる構造変化により TTR 四量体の熱力学的及び動力学的安定性が増大することを示しており、V30M/T119M 複合ヘテロ接合体と T119M ヘテロ接合体の罹患リスクの低下を説明できる可能性も考えられる。TTRv V122I とアコラミジスの複合体の結晶構造は、T119M と同様の T_4 結合ポケット周辺の立体構造を示し、アコラミジスの

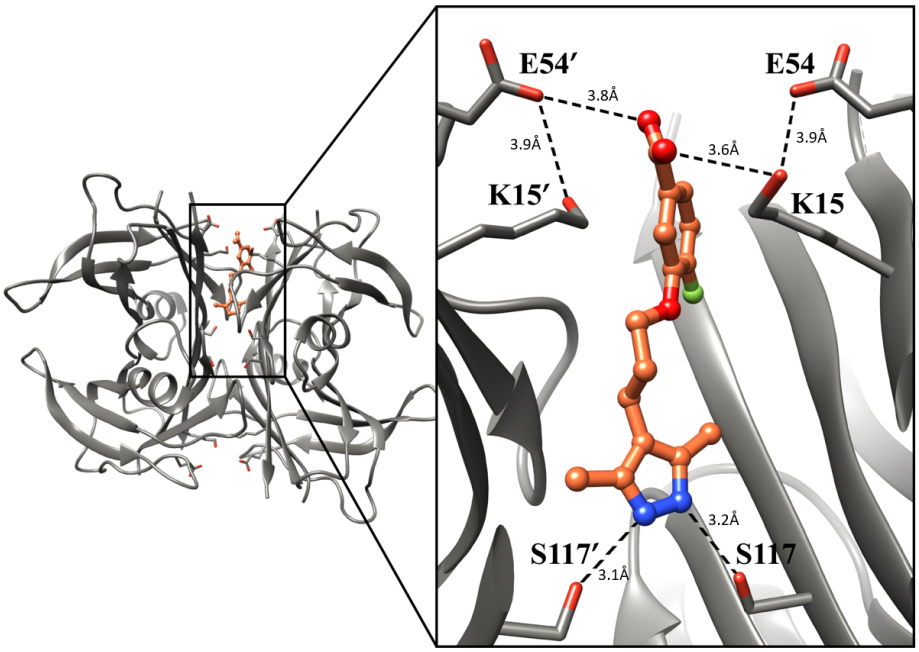
結合が四量体の安定性を向上させることを示唆している。TTRwt とアコラミジスの複合体モデル及び TTRwt とデオキシアコラミジスの複合体の結晶構造は、アコラミジスの結合によって引き起こされる立体構造変化が TTRv V122I だけでなく TTRwt にも適用可能であることを裏付けている。

Figure 19: V122I 変異型 TTR に結合したアコラミジスの結晶構造



(A) Quaternary structure of AG10 bound to V122I TTR shown as a ribbon representation with monomers colored individually and positions of each of the V122I variant residues shown as black spheres located on the H beta-strand which interacts with the adjacent AB-loop on the AC/BD interface. (B) AG10 in complex with V122I TTR. Close-up views of one of the two identical T4 binding sites with different colored ribbons for the two monomers of the tetramer composing the binding site. A "Connelly" molecular surface was applied to residues within 10 Å of ligand in the T4 binding pocket hydrophobic (grey), polar (purple). (C) Top view of the T4 binding pocket with AG10 bound, highlighting the change in pocket conformation upon ligand binding. The innermost halogen binding pockets (HBPs) 3 and 3′ are composed of the methyl and methylene groups of S117/117′, T119/119′, and L110/110′. HBPs 2 and 2′ are made up by the sidechains of L110/110′, A109/109′, K15/15′, and L17/17′. The outermost HBPs 1 and 1′ are lined by the methyl and methylene groups of K15/15′, A108/108′, and T106/106′. Hydrogen bonds shown in light blue dashed lines, with the atomic distances labeled in Å. Figure generated using the MOE, Chemical Computing Group, Montreal, Canada.
Source: NC-740

Figure 20: アコラミジスの野生型 TTR 結合モデル



Modeled quaternary structure of acoramidis bound to WT TTR with a close-up view of one of the two identical T4 binding sites. The TTR tetramer is shown as a ribbon representation. AG10 and interacting TTR sidechains are shown in stick representation with oxygen atoms colored red, nitrogen atoms colored blue, and fluorine atoms colored green. Relevant interactions are indicated with dashed lines and bond distances in angstroms.

Source: NC-740

2.2 In vivo 薬理試験

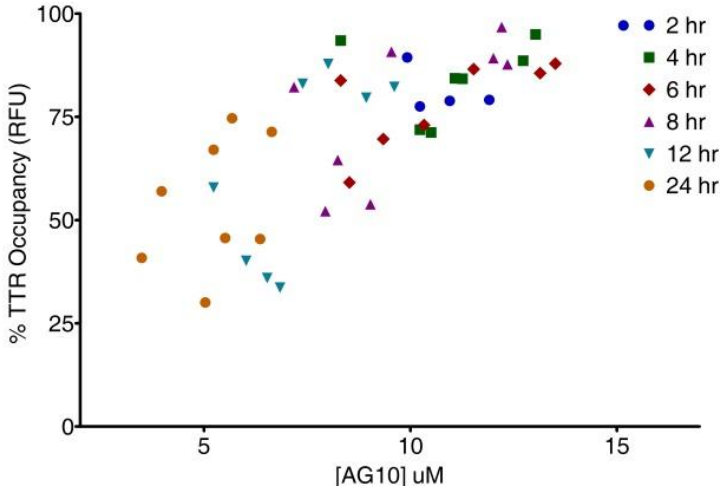
ラット TTR の塩基配列とヒト TTR との相同性は 85%で、127 アミノ酸残基のうち 22 アミノ酸残基が異なっている（Cody, 2002）が、タンパク質の機能領域である T_4 結合ドメインは完全に保存されている（Wojtczak, 2001）。さらに、TTR と T_4 の複合体の X 線解析構造には、ヒトとラットでわずかな違いしか認められなかった。これは、両種における T_4 と TTR の結合親和性（ヒトとラットの K_d は、各々、13.6 nM 及び 8.0 nM）が同程度であることと一致している（Navab, 1977; Chang, 1999; Marchesini, 2006）。したがって、ヒトとラットの TTR は機能的に同等であると考えられ、薬理試験及び毒性試験に使用される可能性がある。また、8350153 試験で報告されたように、ヒトの TTR に類似してイヌの TTR 四量体はアコラミジスによって安定化されるため、イヌは薬理試験及び毒性試験に使用する動物種として適している。

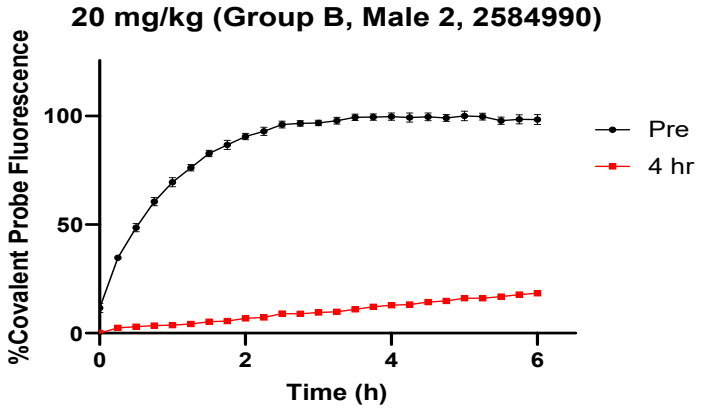
アコラミジスの投与によるイヌ TTR への結合について検討する目的で、単回及び反復経口投与試験を実施した。これらの試験では、低用量（5 及び 20 mg/kg）と高用量（50、100 及び 200 mg/kg/日）を用いて ex vivo で薬力学検討を実施した。

2.2.1 イヌを用いたアコラミジスの PK/PD 相関の検討

雌雄ビーグル犬（2～3 歳齢）を用いてアコラミジスの PK/PD 相関について検討した（EID-[redacted]01 試験）。なお、動物はナイーブでない、試験への使用経験のある個体を用い、雌雄各 2 例で 3 群、計 12 例を使用した。アコラミジスは 5 mg/kg 又は 20 mg/kg の用量で単回強制経口投与又はカプセル投与した。2 群（5 mg/kg 及び 20 mg/kg）には 0.5%メチルセルロースで調製した投与液を、また、他の 1 群にはカプセル剤（20 mg/kg）を単回経口投与し、採血後、血漿中薬物濃度を測定した。メチルセルロース投与液投与群では、投与前、投与 2、4、6、8、12 及び 24 時間後に血清サンプルを採取し、FPE アッセイにより TTR 占有率を算出した。その結果、血漿中アコラミジス濃度と TTR 占有率にはほぼ直線的な相関がみられ（Figure 21）、PK/PD 相関が確認された。

Figure 21: イヌへのアコラミジス投与後の TTR 占有率と血漿中薬物濃度の相関





Graphical representation of PK/PD relationship of concentration of AG10 vs. %TTR Occupancy following a single dose of AG10 (5 mg/kg [n = 4] or 20 mg/kg [n = 4]). %TTR occupancy was calculated at 3 hours of the 6-hour time course of the FPE assay.
Source: EID-[redacted]01

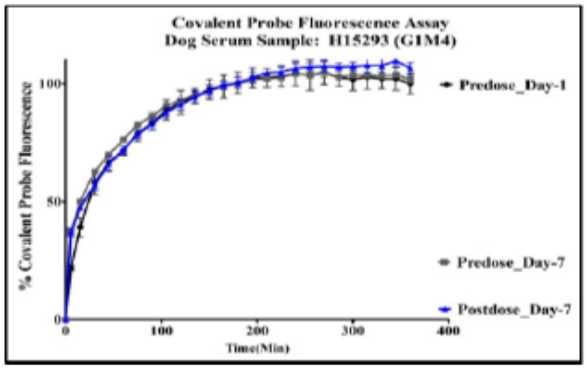
2.2.2 イヌの 7 日間反復投与毒性試験サンプルを用いた PK/PD の検討

雌雄ビーグル犬（5～6 ヵ月齢）を用いた 7 日間反復経口投与毒性試験のサンプル用いてアコラミジスの PK/PD について検討した（8350153 試験）。なお、使用した動物は使用経験のないナイーブな個体である。本試験はアコラミジス 3 用量（50、100、及び 200 mg/kg）で実施された。FPE アッセイの結果から、経口投与したアコラミジスはイヌ血清中の TTR と効果的に結合することが示された（Figure 22）。

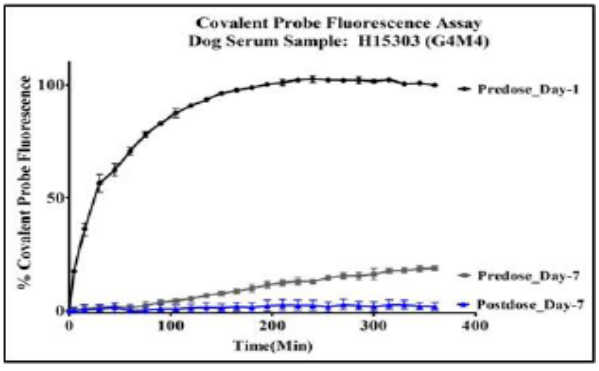
血漿中アコラミジス濃度が定常状態にある Day 7 では、投与前の TTR 占有率は 50 mg/kg/日で 41%、200 mg/kg/日で 71%であったが、投与 1 時間後の最高血漿中濃度（C_{max}）付近では、全ての投与群で 90%を越える TTR 占有率が得られた。また、アコラミジス投与量の増加により Day 7 の投与前血漿中アコラミジス濃度が高くなり、その結果、FPE アッセイでの血清中 TTR 占有率も上昇した。血漿中アコラミジスが 10 µM に満たない濃度で、TTR への完全な占有が認められた。

Figure 22: 7 日間反復投与毒性試験のイヌ血清におけるアコラミジスの TTR への結合

Group 1; Male (0 mg/kg/day), n = 3

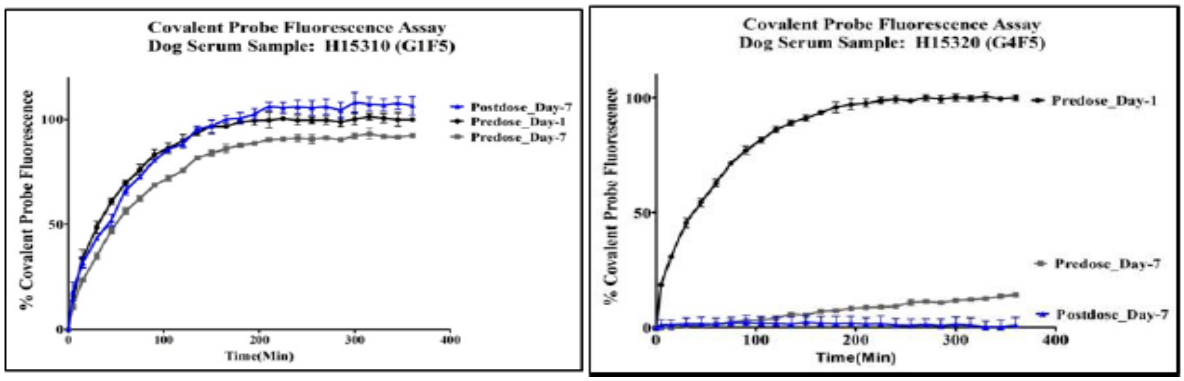


Group 4; Male (200 mg/kg/day), n = 3



Group 1; Female (0 mg/kg/day), n = 3

Group 4; Female (200 mg/kg/day), n = 3

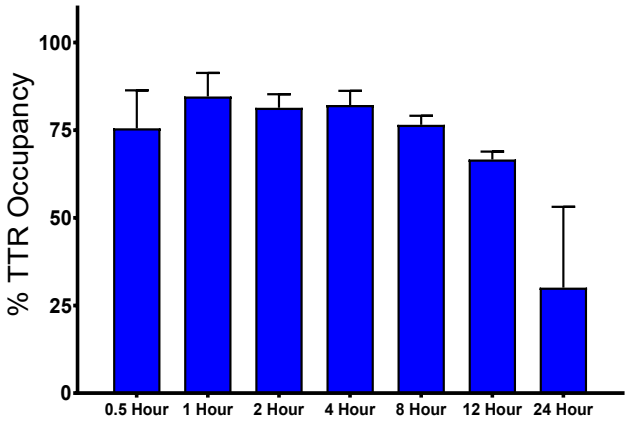


Note: Samples were taken: predose Day 1, predose Day 7, and postdose Day 7. Each time point shows the mean ± SD of three replicates.
Source: 8350153

2.2.2.1 サルへの単回静脈内投与又は経口投与による PK/PD の検討

成熟若齢又は成熟カニクイザル（体重：3.6～3.8 kg）を用いてアコラミジスの PK/PD 相関について検討した（8367761 試験）。3 例の雄性カニクイザルにアコラミジス 1 mg/kg を静脈内投与又は 5 mg/kg を経口投与した。静脈内投与と経口投与の間には 2 週間の休薬期間を設けた。投与前及び投与後約 0.083（静脈内投与のみ）、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72 及び 96 時間後に採血し、血漿中アコラミジス濃度を測定した。血清は FPE アッセイに用いた。その結果、経口投与したアコラミジスはサル血清中 TTR に効果的に結合した（Figure 23）。

Figure 23: カニクイザルへの経口投与後の血清中のアコラミジスによる TTR 占有率



Bar graph showing %TTR occupancy at 3 hours in serum from 3 male cynomolgus monkeys after oral dosing of AG10 at 5 mg/kg. Data are mean ± SD.
Source: 8367761

3 副次的薬理試験

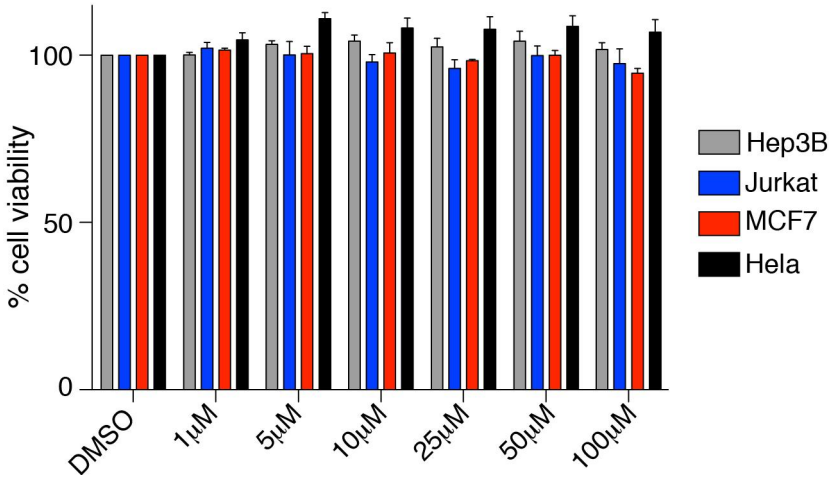
アコラミジス in vitro 副次的薬理試験の一覧を Table 5 に示す。

Table 5: アコラミジスの in vitro 副次的薬理試験一覧

Nonclinical Study	**AG10** **Dose and Concentration**	**Sponsor Reference**
Assessment for effects of AG10 on viability of cell lines	1, 5, 10, 25, 100 µM	[redacted] 20[redacted]-005, (Penchala, 2013)
Pharmacological Profiling of AG10	10, 30, 100 µM	AB[redacted]126, 100003266, 100006852, 100008963, 100009521, 100009522

アコラミジスが細胞の生存率に影響を及ぼす可能性を、4 つの細胞株（Hep3B、Jurkat、MCF7、Hela）で評価した。細胞を 96 ウェルプレートに播種し、1～100 µM の濃度のアコラミジスを培養液に添加した（[redacted] 20[redacted]-005 試験）。37℃で 24 時間インキュベーションした後、MTT アッセイにより細胞生存率及び増殖を評価した。その結果、アコラミジスはいずれの細胞株に対しても細胞毒性及び増殖抑制作用を示さなかった（Figure 24）。図中の値は、溶媒対照群の細胞生存率を 100%としたときの相対値（%）を示す。

Figure 24: 4 種の細胞株を用いたアコラミジスの細胞生存率への影響の検討



The potential effect of AG10 on the viability and proliferation of four cell lines was studied via the MTT assay. AG10 was added to the culture medium at different concentrations (concentration range from 1 to 100 µM). Each bar shows the mean (SD) of three replicates.
Source: [redacted] 20[redacted]-005

アコラミジスの 10 µM 及び 100 µM 濃度における、受容体、酵素、イオンチャネルへのオフターゲット作用について検討した。アコラミジスとの交差反応性を [redacted]（[redacted] 社）スクリーニングで検討したところ、8 つの受容体に対し、アコラミジスの 100 µM で 50%以上の阻害がみられた標的タンパク質はみられなかった。ジフルニサルのようないくつかの TTR リガンドとは異なり、アコラミジス（10 µM）は甲状腺ホルモン核内受容体に結合せず、シクロオキシゲナーゼ酵

素である COX-1 や COX-2 に対する有意な阻害もみられなかった。また、アコラミジス（10 µM）の潜在的な阻害作用について CEREP パネルを用いて in vitro で検討した。その結果、いずれの結合アッセイにおいても、25%のカットオフ値に達する阻害はみられず、IC_{50} 値は求められなかった（AB[redacted]126 試験、100003266 試験、100006852 試験、100008963 試験、100009521 試験、100009522 試験）。

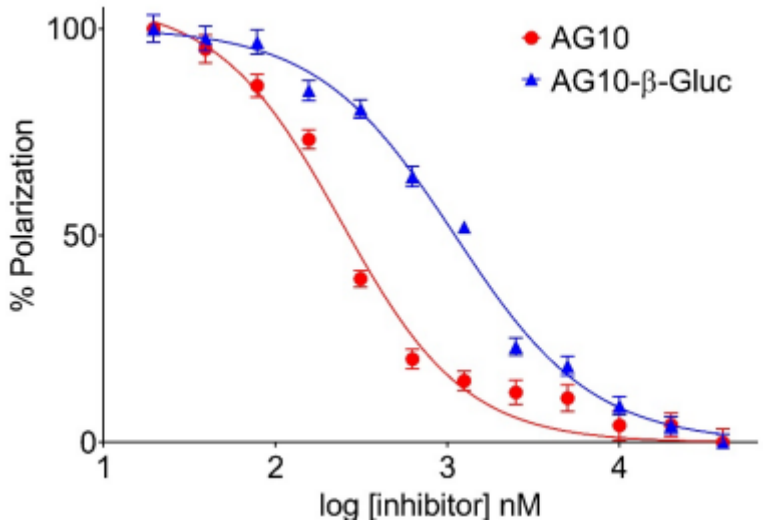
3.1 代謝物、立体異性体、不純物の薬理作用

3.1.1 代謝物の薬理作用

ラット、イヌ、サル及びヒトの肝細胞を用いた in vitro 代謝物プロファイリングの成績から、アコラミジス-AG が主要な代謝物として同定された（モジュール 2.6.4）。アコラミジス-AG は、アコラミジスを投与されたラット、イヌ及びサルの血漿サンプル中の主要な代謝物としても検出された。

アコラミジス-AG（β アノマー）の薬理作用を、FP 法及び WB により評価した。FP 法における TTR に対する親和性は、FP プローブ 2 を置換する能力によって決定した（Wiseman, 2005, Alhamadsheh, 2011）。アコラミジス又はアコラミジス-AG（0.02～40 µM）を、FP プローブ 2 含有 TTR アッセイ緩衝液に室温で添加し、FP 信号（λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 525 nm）を測定した。その結果、ヒト TTR に対するアコラミジス-AG の結合親和性（K_{app} : 1102 nM）は、アコラミジス（K_{app} : 241 nM）より低いことが示された（Figure 25）。

Figure 25: **蛍光偏光法によるアコラミジス及び主要代謝物アコラミジス-AG の TTR への結合評価**

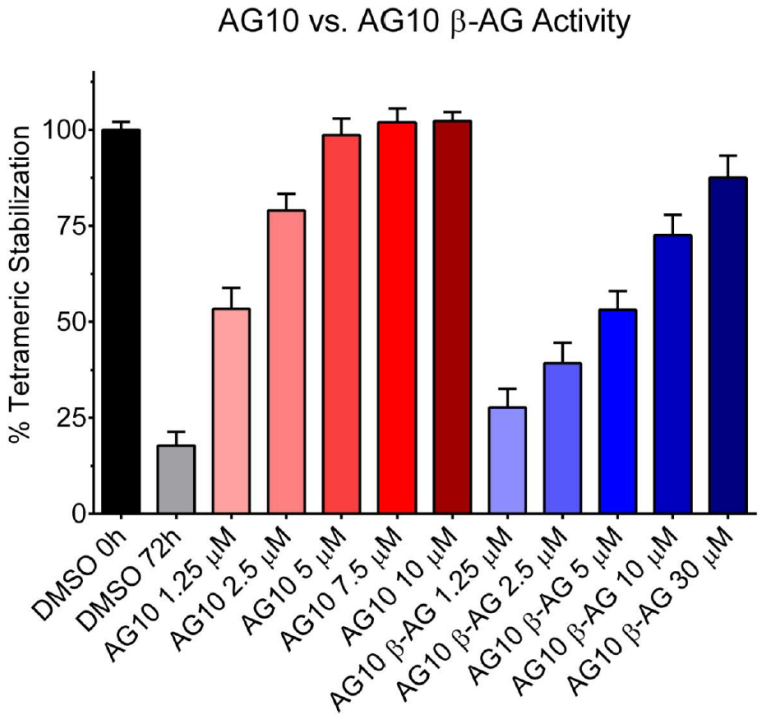


Fluorescence polarization measurements were carried out at λ_{ex} = 485 nm and λ_{em} = 525 nm The K_{app} values were reported as the mean (SD) for three independent experiments.
AG10-β-Gluc = acoramidis-AG.
Source: NC-[redacted]-0003

アコラミジス-AG は中性 pH では不安定であるため、生物活性の測定には酸性培地での安定化が必要である。WB アッセイでは TTR を酸性化緩衝液（pH～4）で不安定化することから、本アッセイでは、アコラミジス-AG はインキュベーション期間を通じて安定していると考えられており、得られた結果は他の化学的な修飾や分解を受けずにアコラミジス-AG のみの活性を示してい

る。Figure 26 に示すように、アコラミジス-AG は、プールされたヒト血漿中の野生型 TTR 安定化作用の比較で、アコラミジスの 24%～34%の活性しか示さなかった。

Figure 26: アコラミジス及びアコラミジス-AG による TTR 安定化作用（ウエスタンブロッティング）



AG10 stabilization saturates at approximately 5 μM, while AG10 β-AG activity does not saturate up to a concentration of 30 μM. Graph depicts mean and standard deviation of % tetrameric stability according to compound concentration as aggregate results from 12 gels (n = 12).
Source: 001

ヒト血清での検討に加えて、アコラミジス-AG の薬理作用についてイヌとサルの血清を用いて検討した。ただし、これらの試験系では代謝物の安定性が考慮されていないため、ヒト、イヌ、サル血清を用いたアコラミジス-AG の in vitro TTR 安定化作用の検討では注意が必要である。特に、FPE アッセイでは血清サンプルを中性 pH で 6 時間以上インキュベーションする必要がある。さらに、代謝物の半減期がより短い等の PK パラメーターの違いにより、生体での TTR 安定化に対するアコラミジス-AG の寄与が変化する可能性がある。

以上、アコラミジスの代謝物はアコラミジスよりも薬理活性が弱いと考えられる。

3.1.2 立体異性体の薬理作用

アコラミジスには立体異性体は存在しないため、その薬理作用の検討は実施しなかった。

4 安全性薬理試験

医薬品規制調和国際会議（ICH）の安全性薬理試験ガイドライン（ICH S7A, 2001; ICH S7B, 2005）に準じて、アコラミジスのコア・バッテリー試験を GLP 適用下で実施した（Table 6）。

Table 6: 安全性薬理試験一覧

Type of Study and Test System	GLP Compliance	Study Number
hERG, HEK cells, in vitro	No	[redacted]0227.TUC
hERG, HEK cells, in vitro	Yes	[redacted]0111.DPW
CNS safety Pharmacology, rats, in vivo	Yes	8355820
Respiratory safety pharmacology, rats, in vivo	Yes	8355819
Cardiovascular safety pharmacology, dogs, in vivo	Yes	8355826

Abbreviations: CNS = central nervous system; GLP = Good Laboratory Practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go-related gene

4.1 In vitro 安全性薬理試験

4.1.1 HEK293 細胞の hERG カリウムチャネル電流に対するアコラミジスの影響（GLP 非適用）

ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）を安定的に発現させた HEK293 細胞を用いた全細胞パッチクランプ法により、アコラミジスの hERG カリウム電流に対する影響について検討した（[redacted]0227.TUC 試験）。

試験の結果、アコラジミス 3～100 μM（n = 3）では、hERG チャネルに対して 50%を越える阻害はみられなかった（100 μM で 12.9%阻害）。

4.1.2 HEK293 細胞の hERG カリウムチャネル電流に対するアコラミジスの影響（GLP 適用）

hERG を安定的に発現させた HEK293 細胞を用いた全細胞パッチクランプ法により、アコラミジスの hERG カリウム電流に対する影響について検討した（[redacted]0111.DPW 試験）。本試験は、20[redacted]年[redacted]月中に[redacted]（[redacted], [redacted], [redacted]）によって実施された。

試験の結果、アコラミジス 10 μM 及び 50 μM の hERG 電流阻害率（平均値 ± 標準誤差）は、各々、3.2 ± 2.8%（n = 4）及び 2.1 ± 2.9%（n = 3）であった。一方、溶媒対照での阻害率は-3.2 ± 2.0%（n = 3）、陽性対照薬のテルフェナジン（60 nM）では 85.5 ± 0.9%の阻害がみられた。

4.2 In vivo 安全性薬理試験

中枢神経系及び呼吸器系に及ぼすアコラミジス（100、300、又は 1000 mg/kg）の影響について、雄性ラットを用いて検討したところ、アコラミジスは中枢神経系及び呼吸器系に影響を及ぼさなかった。中枢神経系への評価は Irwin 変法で実施した。なお、ラットにアコラミジス 1000 mg/kg を投与した際の C_{max} は 172 μg/mL であった。

心血管系に及ぼす影響について、テレメトリー装置を装着したイヌを用いて検討した。アコラミジス 600 mg/kg 投与で、投与後 3 時間以内に血圧（収縮期、拡張期、平均動脈圧、脈圧）が低下（最大-34%）し、2 例では軽度だが用量依存的な影響がみられた。血圧低下後、心拍数は投与後 4 時間から 19 時間まで増加し（+67%）、その結果、PR 及び QT 間隔は、それぞれ投与後 1 時間から 7 時間まで、及び投与後 4 時間から 19 時間まで短縮した。50 及び 200 mg/kg 投与では、いずれのパラメーターにもアコラミジス投与に関連した影響は認められなかった。なお、イヌにアコラミジス 200 mg/kg 投与した際の最高血漿中濃度は 90.9 μg/mL であった。

以上の成績から、臨床においてアコラミジスは中枢神経系、呼吸器系、心血管系に影響を及ぼ

す可能性は低いことが示唆された。

4.2.1 中枢神経系に及ぼす影響

中枢神経系に及ぼすアコラミジスの影響についてラットを用いて検討した（8355820 試験）。本試験は、20[redacted] 年 [redacted] 月に [redacted], [redacted]（[redacted], [redacted]）によって GLP 適用下で実施された。

各群 8 例の雄性 Crl:CD（Sprague Dawley）ラット（7～8 週齢）にアコラミジス（100、300、又は 1000 mg/kg）又は溶媒（0.5%メチルセルロース、400cps）を 10 mL/kg の容量で単回経口投与した。

本試験のデザインを Table 7 に示す。

Table 7: ラットの中枢神経系安全性薬理試験のデザイン

Group	AG10 Dose (mg/kg)	No. of Animals (Males)	Dose Formulation Concentration (mg/mL)	Dose Volume (ml/kg)
1	0 (vehicle)	8	0	10
2	100	8	10	
3	300	8	30	
4	1000	8	100	

Source: 8355820

神経学的影響の評価は、ケージ内姿勢、受動性、オープンフィールド自発運動、及び反応性の観察と体温測定を含む Irwin 変法にて、投与後 1、3、6、及び 24 時間後に実施した。

その結果、全ての動物は、神経学的評価終了後、2 日目に予定された安楽死まで生存し、異常な所見も認められなかった。アコラミジス（100、300、及び 1000 mg/kg）は、いずれの時点においても、Irwin 変法のいずれの評価項目にも影響を及ぼさず、体温への影響も認められなかった。本試験における無影響量（NOEL）1000 mg/kg での C_{max} は 172 µg/mL、AUC は 2440 µg*hr/mL である（8355824 試験）。

4.2.2 呼吸器系に及ぼす影響

呼吸器系に及ぼすアコラミジスの影響についてラットを用いて検討した（8355819 試験）。本試験は、20[redacted] 年 [redacted] 月に [redacted], [redacted]（[redacted], [redacted]）によって GLP 適用下で実施された。

各群 8 例の雄性 Crl:CD（Sprague Dawley）ラット（約 11 週齢）にアコラミジス（100、300、又は 1000 mg/kg）又は溶媒（0.5%メチルセルロース、400cps）を 10 mL/kg の容量で単回経口投与した。

本試験のデザインの概要を Table 8 に示す。

Table 8: ラットの呼吸器系安全性薬理試験のデザイン

Group	AG10 Dose (mg/kg)	No. of Animals (Males)	Dose Formulation Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)
1	0 (vehicle)	8	0	10

2	100	8	10	
3	300	8	30	
4	1000	8	100	

Source: 8355819

呼吸機能の評価のため、ヘッドアウトプレチスモグラフィーを用いて一回換気量、呼吸数、及び毎分換気量を投与前、投与 30 分後から 6 時間後まで連続的に、また、投与 24 時間後に 30 分間測定した。死亡や一般状態の観察も実施した。

その結果、全ての動物は、呼吸器データ測定終了後、予定された安楽死まで生存し、異常な所見も認められなかった。アコラミジス（100、300、及び 1000 mg/kg）は、一回換気量、呼吸数、及び毎分換気量に有意な影響を及ぼさなかった。本試験における NOEL（1000 mg/kg）での C_{max} は 172 µg/mL、AUC は 2440 µg*hr/mL である（8355824 試験）。

4.2.3 心血管系に及ぼす影響

テレメトリーを装着した雄ビーグル犬に 50、200 又は 600 mg/kg のアコラミジスを 5 mL/kg の投与量で単回強制経口投与し、投与後 19 時間までの心血管系に対するアコラミジスの影響を評価した（8355826 試験）。

4 頭の雄性ビーグル犬（13～32 ヵ月齢）に、各用量のアコラミジス又は溶媒（0.5%[w/v]メチルセルロース、400 cps）を 1 週間の休薬期間を設けたラテン方格法で割付け、5 mL/kg の容量で単回強制経口投与した。

心血管系の評価は、心電図（ECG）波形、PR 間隔、QRS 間隔、QT 間隔、QTc 間隔、心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧、平均動脈圧、及び脈圧の定量的解析に基づいて行った。ECG、血圧、体温は、少なくとも投与 90 分前から投与後 19 時間まで継続的に記録した。死亡、一般状態の観察、体重測定も実施した。

その結果、投与 1 週間後に各動物の血漿中に検出可能なアコラミジスはみられなかった。全ての動物は投与段階 23 日目まで生存した。600 mg/kg 投与により過剰な唾液分泌と嘔吐がみられたが、アコラミジス投与による体重変化は認められなかった。50、200、600 mg/kg のアコラミジス投与による ECG 波形、QRS 時間、QTc 間隔、体温への影響は認められなかった。

血圧への影響の評価において、600 mg/kg 投与により収縮期血圧が最大 26%（37 mmHg、投与後 2～13 時間）、拡張期血圧が最大 20%（16 mmHg、投与後 2～9 時間）、平均動脈圧が最大 22%（22 mmHg、投与後 2～11 時間）、また、脈圧が最大 34%（24 mmHg、投与後 3～19 時間）低下がみられ、感受性の高い 2 例では軽度だが用量依存的な影響がみられた。

心拍数の評価では、600 mg/kg 投与により心拍数が最大 67%増加（53 拍/分、投与後 4～19 時間）したが、この心拍数の増加は、血圧低下に対する代償性の反応と評価された。

ECG の評価では、600 mg/kg 投与後 1～7 時間に PR 間隔が 15%（16 msec）減少し、投与後 4～19 時間には QT 間隔が 18%（44 msec）短縮した。PR 及び QT 間隔の変化は正常で、心拍数の増加に伴う二次的なものであった。QRS 時間と QTc 間隔に影響はみられなかった。また、50 mg/kg 及び 200 mg/kg 投与では、いずれのパラメーターにもアコラミジス投与に関連した影響は認められなかった。なお、本試験における NOEL（200 mg/kg）での C_{max} は 90.9 µg/mL、$AUC_{0\text{-}24}$ は 574 µg*hr/mL である（8355825 試験）。

4.3　安全性薬理試験のまとめ

アコラミジスは、雄性ラットに 1000 mg/kg まで投与しても、中枢神経系及び呼吸器系に影響を及ぼさなかった。

テレメトリーを装着した覚醒イヌにアコラミジス 600 mg/kg を投与すると、投与後 3 時間以内に血圧（収縮期血圧、拡張期血圧、平均動脈圧、及び脈圧）が最大 34%低下し、感受性が高い 2 頭の動物では軽度だが用量依存的な影響がみられた。血圧低下により心拍数は最大 67%増加し、その結果、PR 及び QT 間隔は、各々、15%及び 18%短縮した。In vitro hERG 試験において、アコラミジスが hERG カリウム電流に影響を及ぼす可能性は低いことが示された。なお、これらの成績は、健康成人に治療用量を超えるアコラミジス（1780 mg）を単回経口投与した際の心電図測定結果によっても裏付けられた（AG10-005 試験）。

以上の成績から、臨床においてアコラミジスは中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に影響を及ぼす可能性は低いことが示唆された。

5　薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用の検討は実施しなかった。

6　考察及び結論

ATTR-CM 患者（野生型及び変異型）を含むヒト及び複数の動物種を用いた in vitro 及び in vivo/ex vivo 試験成績からアコラミジスの標的に対する薬理作用が明らかになった。生化学的試験により、様々な生物種の TTR に対するアコラミジスの感受性と選択性が確立されている。アコラミジスの薬理作用はイヌとサルにおいて用量依存的であり、幅広い曝露量で PK/PD 相関を検討することができる。ラット及びイヌを用いた安全性薬理試験成績から、臨床においてアコラミジスは中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に影響を及ぼす可能性は低いことが示唆された。これらの成績から、アコラミジスの TTR への結合機序、並びに血清中及び血漿中の TTRwt、TTRv の四量体への安定化作用が示され、被験者の治療を可能とする適切な曝露量が確立された。

7　参考文献

Alhamadsheh MM, Connelly S, Cho A, Reixach N, Powers ET, Pan DW, et al. Potent kinetic stabilizers that prevent transthyretin-mediated cardiomyocyte proteotoxicity. Sci Transl Med. 2011;3(97):97ra81.

Batista AR, Gianni D, Ventosa M, Coelho AV, Almeida MR, Sena-Esteves M, et al. Gene therapy approach to FAP: in vivo influence of T119M in TTR deposition in a transgenic V30M mouse model. Gene Ther. 2014;21(12):1041-1050.

Bulawa CE, Connelly S, Devit M, Wang L, Weigel C, Fleming JA, et al. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(24):9629-9634.

Chang L, Munro SLA, Richardson SJ, Schreiber G. Evolution of thyroid hormone binding by transthyretins in birds and mammals. Eur J Biochem. 1999;259(1-2):534-542.

Cheng SY, Pages RA, Saroff HA, Edelhoch H, Robbins J. Analysis of thyroid hormone binding to human serum prealbumin by 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate fluorescence. Biochemistry. 1977;16(16):3707-3713.

Choi S, Connelly S, Reixach N, Wilson IA, Kelly JW. Chemoselective small molecules that covalently modify one lysine in a non-enzyme protein in plasma. Nat Chem Biol. 2010a;6(2):133-139.

Choi S, Kelly JW. A competition assay to identify amyloidogenesis inhibitors by monitoring the fluorescence emitted by the covalent attachment of a stilbene derivative to transthyretin. Bioorg Med Chem. 2011;19(4):1505-1514.

Choi S, Ong DST, Kelly JW. A stilbene that binds selectively to transthyretin in cells and remains dark until it undergoes a chemoselective reaction to create a bright blue fluorescent conjugate. J Am Chem Soc. 2010b;132(45):16043-16051.

Cody V. Mechanisms of molecular recognition: crystal structure analysis of human and rat transthyretin inhibitor complexes. Clin Chem Lab Med. 2002;40(12):1237-1243.

Coelho T, Carvalho M, Saraiva MJ, Alves I, Almeida MR, Costa PP. A strikingly benign evolution of FAP in an individual found to be a compound heterozygote for two TTR mutations: TTR MET 30 and TTR MET 119. J Rheumatol. 1993;20:179

Dwulet FE, Benson MD. Primary structure of an amyloid prealbumin and its plasma precursor in a heredofamilial polyneuropathy of Swedish origin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(3):694-698.

Ferguson RN, Edelhoch H, Saroff HA, Robbins J, Cahnmann HJ. Negative cooperativity in the binding of thyroxine to human serum prealbumin. Preparation of tritium-labeled 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid. Biochemistry. 1975;14(2):282-289.

Greve AM, Christoffersen M, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Association of Low Plasma Transthyretin Concentration With Risk of Heart Failure in the General Population. JAMA Cardiol. 2021;6(3):258-266.

Hammarstrom P, Jiang X, Hurshman AR, Powers ET, Kelly JW. Sequence-dependent denaturation energetics: A major determinant in amyloid disease diversity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99 Suppl 4:16427-16432.

Hammarstrom P, Schneider F, Kelly JW. Trans-suppression of misfolding in an amyloid disease. Science. 2001;293(5539):2459-2462.

Hornstrup LS, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Genetic stabilization of transthyretin, cerebrovascular disease, and life expectancy. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33(6):1441-1447.

ICH S7A. *Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals (FDA-2000-D-0274)*. 2001.

ICH S7B. *Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals (FDA-2004-D-0366)*. 2005.

Ji A, Wong P, Judge DP, Graef IA, Fox J, Sinha U. Acoramidis Produces Near-Complete TTR Stabilization in Blood Samples from Patients with Variant Transthyretin Amyloidosis that is Greater than that Achieved with Tafamidis. European Society of Cardiology (ESC) Congress; Amsterdam. ePoster, Pharmacotherapy; 2023.

Marchesini GR, Meulenberg E, Haasnoot W, Mizuguchi M, Irth H. Biosensor recognition of thyroid-disrupting chemicals using transport proteins. Anal Chem. 2006;78(4):1107-1114.

Miller M, Pal A, Albusairi W, Joo H, Pappas B, Haque Tuhin MT, et al. Enthalpy-Driven Stabilization of Transthyretin by AG10 Mimics a Naturally Occurring Genetic Variant That Protects from Transthyretin Amyloidosis. J Med Chem. 2018;61(17):7862-7876.

Monaco HL, Rizzi M, Coda A. Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. Science. 1995;268(5213):1039-1041.

Navab M, Mallia AK, Kanda Y, Goodman DS. Rat plasma prealbumin. Isolation and partial characterization. J Biol Chem. 1977;252(14):5100-5106.

Palha JA. Transthyretin as a thyroid hormone carrier: function revisited. Clin Chem Lab Med. 2002;40(12):1292-1300.

Penchala SC, Connelly S, Wang Y, Park MS, Zhao L, Baranczak A, et al. AG10 inhibits amyloidogenesis and cellular toxicity of the familial amyloid cardiomyopathy-associated V122I transthyretin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(24):9992-9997.

Purkey HE, Dorrell MI, Kelly JW. Evaluating the binding selectivity of transthyretin amyloid fibril inhibitors in blood plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(10):5566-5571.

RCSB PDB: 3CFM. RCSB Protein Data Bank. Crystal structure of the apo form of human wild-type transthyretin. Available from: https://www.rcsb.org/structure/3CFM.

RCSB PDB: 3P3T. RCSB Protein Data Bank. Human transthyretin (TTR) complexed with 4-(3-(2-flourophenoxy)propyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrazole. Available from: https://www.rcsb.org/structure/3P3T.

RCSB PDB: 4HIQ. RCSB Protein Data Bank. The structure of V122I mutant transthyretin in complex with AG10. Available from: https://www.rcsb.org/structure/4HIQ.

Schreiber G. The evolution of transthyretin synthesis in the choroid plexus. Clin Chem Lab Med 2002; 40(12):1200–1210.

Sebastião MP, Lamzin V, Saraiva MJ, Damas AM. Transthyretin stability as a key factor in amyloidogenesis: X-ray analysis at atomic resolution. J Mol Biol. 2001;306(4):733-744.

Sekijima Y, Wiseman RL, Matteson J, Hammarstrom P, Miller SR, Sawkar AR, et al. The biological and chemical basis for tissue-selective amyloid disease. Cell. 2005;121(1):73-85.

Vyndaqel-EPAR. Assessment report: Vyndaqel, International non-proprietary name: tafamidis, Procedure No. EMEA/H/C/002294/X/0049/G. 2020.

Vyndaqel-FDA-CDER. Assessment Report: Vyndaqel, International non-proprietary name: tafamidis, Application No. 211996 and 212161. 2019.

Wiseman RL, Johnson SM, Kelker MS, Foss T, Wilson IA, Kelly JW. Kinetic stabilization of an oligomeric protein by a single ligand binding event. J Am Chem Soc. 2005;127(15):5540-5551.

Wojtczak A, Cody V, Luft JR, Pangborn W. Structure of rat transthyretin (rTTR) complex with thyroxine at

2.5 A resolution: first non-biased insight into thyroxine binding reveals different hormone orientation in two binding sites. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2001;57(Pt 8):1061-1070.

TABLE OF CONTENTS

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary 2
2.6.3.1 PHARMACOLOGY OVERVIEW 2
2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS 5
2.6.3.3 SECONDARY PHARMACODYNAMICS 7
2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY 9
2.6.3.5 PHARMACODYNAMIC DRUG INTERACTIONS 10

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary

2.6.3.1 PHARMACOLOGY OVERVIEW

Test Article: Acoramidis (AG10)

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in eCTD
Primary Pharmacodynamics – In Vitro						
Characterization of AG10 Binding to TTR: Fluorescence Polarization	No	Purified protein	In vitro assay	[redacted]	[redacted] 20[redacted]-001	4.2.1.1-1
Characterization of AG10 Binding to TTR: Isothermal Titration Calorimetry	No	Purified protein	In vitro assay	[redacted]	[redacted] 20[redacted]-002	4.2.1.1-2
Interaction Kinetics of AG10 and Tafamidis with Purified Human TTR Assayed by Surface Plasmon Resonance	No	Purified protein	In vitro assay	[redacted]	NC-365	4.2.1.1-3
Binding Affinity of AG10 and Tafamidis to Purified Human TTR Assayed by Microscale Thermophoresis	No	Purified protein	In vitro assay	[redacted]	NC-366	4.2.1.1-4
Analysis of AG10 Fluorescent Probe Exclusion (FPE) Assay	No	Human serum	In vitro assay	[redacted]	NC-[redacted]-0001	4.2.1.1-5
Effect of in Vitro Addition of AG10 and Tafamidis to Human Serum Samples from Individuals Carrying TTR Variants Assayed by Fluorescent Probe Exclusion	No	Human serum	In vitro assay	[redacted]	NC-363	4.2.1.1-6
Effect of in Vitro Addition of AG10 and Tafamidis to Human Plasma and Serum from Individuals with TTR Variants as Tested by Western Blotting	No	Human plasma	In vitro assay	[redacted]	NC-388	4.2.1.1-7
Comparison of AG10, Tafamidis and Diflunisal in Western Blot Stabilization Assay	No	Human plasma	In vitro assay	[redacted]	NC-[redacted]71	4.2.1.1-8
Structure Analysis of the AG10-TTR Complex	No	Crystallography	In vitro assay	[redacted]	NC-740	4.2.1.1-9

Test Article: Acoramidis (AG10)

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in eCTD
Primary Pharmacodynamics – In Vivo						
A 7-Day Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Dogs Administered AG10 Once Daily by Oral Gavage with a 7-Day Recovery	No	Beagle dogs	Ex vivo assay, Oral gavage	[redacted]	8350153	4.2.3.2-5
Pharmacokinetic Study of AG10 Following Oral Administration in Non-naïve Beagle Dogs	No	Non-naïve Beagle dogs	Ex vivo assay, Oral gavage	[redacted]	EID-[redacted]01	4.2.2.7-1
Collection of Samples for Determination of the Pharmacokinetics of AG10 after a Single Intravenous or Oral Dose to Monkeys	No	Cynomolgus monkeys, male	Ex vivo assay, Intravenous and Oral gavage	[redacted]	8367761	4.2.2.2-9
Secondary Pharmacodynamics						
AG10 Inhibits Amyloidogenesis and Cellular Toxicity of the Fmilial Amyloid Cardiomyopathy-Associated V122I Transthyretin	No	Purified protein	In vitro assay	[redacted]	Penchala et al., 2013	4.3-34
Data Report for Pharmacology Services - AG10 Receptor Binding Screening	No	Cell based/enzymatic	In vitro assay	[redacted], Taiwan	AB[redacted]126	4.2.1.2-1
In Vitro Pharmacology: Study of MMA2 and Tafa	No	Cell based/enzymatic	In vitro assay	[redacted], France	100003266	4.2.1.2-2
In Vitro Pharmacology: Study of MMA1	No	Cell based/enzymatic	In vitro assay	[redacted], France	100006852	4.2.1.2-3
In Vitro Pharmacology: Study of AG10 (Purpose was to test AG10 in binding assays using a panel of ligands/receptors)	No	Cell based/enzymatic	In vitro assay	[redacted], France	100008963	4.2.1.2-4
In Vitro Pharmacology: Study of AG10 (Effects of AG10 in agonist/antagonist binding to Receptor A3)	No	Cell based/enzymatic	In vitro assay	[redacted], France	100009521	4.2.1.2-5

Test Article: Acoramidis (AG10)

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in eCTD
In Vitro Pharmacology: Study of AG10 (Panel of 17 Kinases)	No	Cell based/enzymatic	In vitro assay	[redacted], France	100009522	4.2.1.2-6
Assessment for Effects of AG10 on Viability of Cell Lines	No	Purified protein	In vitro assay	[redacted]	[redacted]20[redacted]-005	4.2.1.2-7
In Vitro Evaluation of the Binding Affinity of AG10 Acylglucuronide to Transthyretin	No	Human plasma, Phosphate buffer	In vitro assay	[redacted]	NC-[redacted]-0003	4.2.1.2-8
Analysis of AG10 β-acyl Glucuronide Activity by Western Blot Assay in Pooled Human Plasma	No	Human plasma	In vitro assay	[redacted]	001	4.2.1.2-9
Safety Pharmacology						
Effect of AG-10 on Cloned hERG Potassium Channels Expressed in Human Embryonic Kidney Cells	Yes	HEK293 cells	In vitro assay	[redacted]	[redacted]0111.DPW	4.2.1.3-2
FASTPatch® hERG Assay: Effects of AG10 on Cloned hERG Potassium Channels Expressed in Human Embryonic Kidney Cells (HEK293)	No	HEK293 cells	In vitro assay	[redacted]	[redacted]0227.TUC	4.2.1.3-1
Central Nervous System Safety Pharmacology Evaluation of AG10 following Oral Administration to Male Rats	Yes	Sprague Dawley rats, male	Oral gavage	[redacted]	8355820	4.2.1.3-3
Respiratory Safety Pharmacology Evaluation Using Head-Out Plethysmography of AG10 following Oral Administration to Male Rats	Yes	Sprague Dawley rats, male	Oral gavage	[redacted]	8355819	4.2.1.3-4
Cardiovascular Safety Pharmacology Evaluation of AG10 Administered by Oral Gavage to Male Telemetry-Instrumented Conscious Dogs	Yes	Male Beagle dogs, telemetry instrumented	Oral gavage	[redacted]	8355826	4.2.1.3-5

Abbreviations: MMA1 = acoramidis, MMA2 = acoramidis, Tafa = tafamidis, TTR = transthyretin

[a] An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

2.6.3.2 PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Acoramidis (AG10)						
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Concentrations or Doses**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Characterization of AG10 Binding to TTR: Fluorescence Polarization	Purified protein	In vitro assay	0.006 µM to 12.5 µM	N=3	AG10 binds to human TTR with high affinity (K_{app} = 193 nM; R^2 = 0.994) (mean value from triplicate determinations)	[redacted] 20[redacted]-001
Characterization of AG10 Binding to TTR: Isothermal Titration Calorimetry	Purified protein	In vitro assay	25 µM	N=1	Analysis of the free energies associated with AG10 binding to TTR shows high binding affinity, and the dissociation constants indicate that AG10 binds to TTR with negative cooperativity (K_{d1} = 4.8 nM, K_{d2} = 314 nM. AG10 binding is almost entirely enthalpically driven (enthalpy change, ΔH1 = −13.60 kcal/mol, entropy change, TΔS1 = −2.26 kcal/mol).	[redacted] 20[redacted]-002
Interaction Kinetics of AG10 and Tafamidis with Purified Human TTR Assayed by Surface Plasmon Resonance	Purified protein	In vitro assay	3.91 nM to 1000 nM	N=4	The mean ± SD kinetic parameters of the AG10 to TTR interaction were determined: k_{on} 1.27 x10^6 ± 2.58 x10^5 s, k_{off} 1.99 x10^{-2} ± 2.21 x10^{-3} s^{-1}, residence time 50.70 ± 5.39 s, and equilibrium dissociation constant (KD) 15.95 ± 2.46 nM. The mean ± SD kinetic parameters of the tafamidis to TTR interaction were determined (n=4): k_{on} 6.90 x10^5 ± 1.32 x10^5 s, k_{off} 8.56 x10^{-2} ± 2.64 x10^{-2} s^{-1}, residence time 12.49 ± 3.54 s, and KD 123.75 ± 26.85 nM.	NC-365
Binding Affinity of AG10 and Tafamidis to Purified Human TTR Assayed by Microscale Thermophoresis	Purified protein	In vitro assay	0.3 nM to 10 µM	N=4	AG10 had a higher binding affinity for TTR compared to tafamidis. The mean ± SD equilibrium dissociation constant (KD) of AG10 to TTR was 26 ± 7 nM. The corresponding KD of tafamidis binding to TTR was 105 ± 21 nM.	NC-366
Analysis of AG10 Fluorescent Probe Exclusion (FPE) Assay	Human serum	In vitro assay	1.25 µM to 80 µM	N=3	AG10 binds dose responsively to TTR in pooled human serum from healthy donors; that AG10 binds selectively to TTR in the presence of other plasma proteins in buffer; and that AG10 binds to V122I TTR in patient serum.	NC-[redacted]-0001
Effect of in Vitro Addition of AG10 and Tafamidis to Human Serum Samples from Individuals Carrying TTR Variants Assayed by Fluorescent Probe Exclusion	Human serum	In vitro assay	0 µM to 10 µM	N=3~6	AG10 (10 µM) resulted in a mean ± SD%Target engagement of 103.42 ± 12.51% across 54 individual variant patient serum samples including 12 unique TTR variants.	NC-363

Effect of in Vitro Addition of AG10 and Tafamidis to Human Plasma and Serum from Individuals with TTR Variants as Tested by Western Blotting	Human plasma	In vitro assay	0 µM to 10 µM	N=1 to 33	A lot of the variants seems to achieve or near maximum % TTR tetramer stability at the lower 5 µM AG10 concentration instead of the expected 10 µM AG10 most likely due to their significantly lower TTR concentration in plasma relative to their WT patient counterparts.	NC-388
Comparison of AG10, Tafamidis and Diflunisal in Western Blot Stabilization Assay	Human plasma	In vitro assay	0.5 µM to 10 µM	N=7	AG10 can achieve complete TTR tetramer stabilization at a concentration as low as 7µM.	NC-[redacted]71
Structure Analysis of the AG10-TTR Complex	Crystallography	In vitro assay	NA	N=4 or 5	The modeled WT-acoramidis structure has a similar interaction network of Ser117 side chains when compared to T119M TTR crystal structures, with interchain Ser117 oxygen distances of 5.0-5.1 Å and 4.6-5.0 Å respectively.	NC-740
A 7-Day Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Dogs Administered AG10 Once Daily by Oral Gavage with a 7-Day Recovery	Beagle dogs	Ex vivo assay, Oral gavage	0 to 200 mg/kg/day	N=2 or 6	TTR stability analysis showed that the target was engaged in all dose groups at >90% occupancy one hour after dosing and was still engaged at a range of 41-77% prior to dosing on Day 7.	8350153
Pharmacokinetic Study of AG10 Following Oral Administration in Non-naïve Beagle Dogs	Non-naïve Beagle dogs	Ex vivo assay, Oral gavage	0 to 20 mg/kg/day	N=4	TTR Kelly Probe Data generated from serum samples collected at 2 and 4 hours postdose showed > 90% occupancy by AG10 in plasma samples from all Group B (20 mg/kg) canine test subjects.	EID-[redacted]01
Collection of Samples for Determination of the Pharmacokinetics of AG10 after a Single Intravenous or Oral Dose to Monkeys	Cynomolgus monkeys, male	Ex vivo assay, Intravenous and Oral gavage	IV,1 mg/kg or Oral, 5 mg/kg	N=3	Intravenous administration of AG10 to male monkeys resulted in an average C_{max} of 6.45 µg/mL and there were detectable levels of AG10 in plasma at 48 or 72 hr post-dose (C_{last}). The terminal half-life ($t_{1/2}$) ranged from 8.37 – 12.5 hr and the AUC_{0-inf} ranged from 18.8 – 36.8 µg*hr/mL. After oral gavage administration, AG10 was absorbed, with T_{max} values ranging from 0.500 to 1.00 hr. After reaching an average peak concentration (C_{max}) of 3.60 µg/mL, AG10 concentrations declined, with the $t_{1/2}$ values ranging from 12.1 – 14.4 hr. The AUC_{0-inf} ranged from 51.1 – 74.5 µg*hr/mL, and the absolute oral bioavailability was ~49.4%.	8367761

Abbreviations: Admin. = administration, NA = not applicable, TTR = transthyretin

2.6.3.3 SECONDARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Acoramidis (AG10)						
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Concentrations**	**Sex and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
AG10 Inhibits Amyloidogenesis and Cellular Toxicity of the Familial Amyloid Cardiomyopathy-Associated V122I Transthyretin	Purified protein	In vitro assay	0.1 µM to 10 µM	N=4	There was no significant difference in the stabilizing effect of AG10 toward heterozygous (at 10 µM, tetramer 108.3 ± 5.2%) and homozygous V122I-TTR (at 10 µM, tetramer 114.4 ± 15.8%) compared with its effect toward WT-TTR (at 10 µM, tetramer 97.6 ± 9.4%).	Penchala et al., 2013
Data Report for Pharmacology Services	Cell based/enzymatic	In vitro assay	100 µM	N=2	No significant responses (≥50% inhibition or stimulation for Biochemical assays) were noted in the primary assays, including androgen receptor AR, estrogen receptor ERa, etc.	AB[redacted]126
In Vitro Pharmacology: Study of MMA2 and Tafa	Cell based/enzymatic	In vitro assay	10 µM	N=2	An inhibition (or stimulation) towards COX1 and COX2 are not considered significant and mostly attributable to variability of the signal around the control level.	100003266
In Vitro Pharmacology: Study of MMA1	Cell based/enzymatic	In vitro assay	10 µM	N=2	An inhibition (or stimulation) towards thyroid hormone receptor (TR) is not considered significant and mostly attributable to variability of the signal around the control level.	100006852
In Vitro Pharmacology: Study of AG10 (Purpose was to test AG10 in binding assays using a panel of ligands/receptors)	Cell based/enzymatic	In vitro assay	100 µM	N=2	An inhibition (or stimulation) towards 54 ligands/receptors is not considered significant and mostly attributable to variability of the signal around the control level. An inhibition towards A3 was 42.1%, indicative of weak to moderate effects.	100008963
In Vitro Pharmacology: Study of AG10 (Effects of AG10 in agonist/antagonist binding to Receptor A3)	Cell based/enzymatic	In vitro assay	10 µM to 100 µM	N=2	At 10 µM, an inhibition (or stimulation) towards A3 (antagonist/agonist effect) is not considered significant and mostly attributable to variability of the signal around the control level. At 30 µM and 100 µM, while their inhibition were not considered significant towards A3 (antagonist effect), those towards A3 (agonist effect) were 25.5% and 26.6%, respectively, almost around cut-off level of non-significant response.	100009521
In Vitro Pharmacology: Study of AG10 (Panel of 17 Kinases)	Cell based/enzymatic	In vitro assay	10 µM	N=2	An inhibition (or stimulation) towards panel of 17 kinases is not considered significant and mostly attributable to variability of the signal around the control level.	100009522

Test Article: Acoramidis (AG10)						
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Concentrations**	**Sex and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Assessment for Effects of AG10 on Viability of Cell Lines	Purified protein	In vitro assay	0 µM to 100 µM	N=3	AG10 showed no cytotoxic effects toward any of the cell lines (Hep3B, Jurkat, MCF7 and Hela) that were tested at concentrations up to 100 µM.	[redacted] 20[redacted]-005
In Vitro Evaluation of the Binding Affinity of AG10 Acylglucuronide to Transthyretin	Human plasma, Phosphate buffer	In vitro assay	0.02 µM to 40 µM	N=3	Binding affinity of the metabolite (AG10-β-Gluc) to human TTR was found to be lower than that of AG10 in FP assay (K_{app} = 241 nM and 1102 nM for AG10 and AG10-β-Gluc respectively).	NC-[redacted]-0003
Analysis of AG10 β-acyl Glucuronide Activity by Western Blot Assay in Pooled Human Plasma	Human plasma	In vitro assay	0 µM to 30 µM	N=12	AG10 β-acyl glucuronide was a weak stabilizer of transthyretin homotetramer. As measured by the western blot assay, relative stabilization activity of AG10 β-acyl glucuronide was approximately 24 - 34% of that of AG10.	001

Abbreviations: Admin. = administration, Cox = cyclooxygenase, HeLa = cervical cancer cell line, Hep3B = human hepatoma cell line, Jurkat = T lymphocyte cell line, MCF7 = breast cancer cell line, MMA = acoramidis, Tafa = tafamidis, TTR = transthyretin

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Acoramidis (AG10)

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	Gender and No.	Noteworthy Findings	GLP[a]	Study Number
Cardio-vascular	HEK293 cells	In vitro	10 and 50 µM	NA	AG10 inhibited hERG current by (Mean ± SEM) 3.2 ± 2.8% at 10 µM (n = 4) and 2.1 ± 2.9% at 50 µM (n = 3) versus -3.2 ± 2.0% (n = 3) in control. hERG inhibition at 10 and 50 µM was not statistically significant ($P < 0.05$) when compared to vehicle control values. Testing was not conducted at concentrations higher than 50 µM because the analytical method was not validated in the assay vehicle at higher concentrations. The IC_{50} for the inhibitory effect of AG10 on hERG potassium current was not calculated but was estimated to be greater than 50 µM.	Yes	[redacted]0111. DPW
Cardio-vascular	HEK293 cells	In vitro	3, 10, 30, 100 µM	NA	AG10 inhibited hERG current by (Mean ± SD) 2.2 ± 1.0% at 3 µM, 4.9 ± 2.7% at 10 µM, 6.6 ± 2.4% at 30 µM, and 12.9 ± 2.4% at 100 µM (n = 3 for all concentrations) versus 99.3 ± 0.3% (n = 2) in control. The hERG patch clamp assay did not reach half maximal response in current inhibition.	No	[redacted]0227. TUC
Central Nervous System	Rat/ Sprague Dawley	Oral gavage	100, 300, 1000	8M/group	No AG10-related abnormal effects were observed in any behavioral component of the modified Irwin assessment or on body temperature from 1 through 24 hours postdose at any dose level.	Yes	8355820
Respiratory	Rat/ Sprague Dawley	Oral gavage	100, 300, 1000	8M/group	No AG10-related effects on death, clinical observations, or respiratory function were noted through 24 hours postdose.	Yes	8355819
Cardio-vascular	Dog/ beagle	Oral gavage	50, 200, 600	4M	Administration of 600 mg/kg decreased blood pressure (systolic, diastolic, mean arterial pressure, and arterial pulse pressure) by as much as -34% within 3 hours postdose, with mild dose-dependent effects in two sensitive animals. Following the reduction of blood pressure, heart rate increased from 4 through 19 hours postdose (as much as 67%), which resulted in PR and QT interval decreases from 1 through 7 hours postdose and from 4 through 19 hours postdose, respectively. No AG10-related effects were noted for qualitative ECG, QRS duration, QTc interval, and body temperature.	Yes	8355826

[a] An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

2.6.3.5 PHARMACODYNAMIC DRUG INTERACTIONS

No pharmacodynamic drug-drug interaction studies have been conducted with acoramidis.