TABLE OF CONTENTS

1. 非臨床試験の概括評価 6
1.1. 緒言 6
1.2. 非臨床試験計画概略 6
1.2.1. 動物種の選択 7
1.2.2. モジュール 4 に含まれない資料 8
2. 薬理試験 8
2.1. 副次的薬理試験 8
2.2. 安全性薬理試験 9
3. 薬物動態 10
3.1. 分析方法及びバリデーション 10
3.2. 吸収 10
3.3. 分布 11
3.3.1. In Vitro 11
3.3.2. In Vivo 12
3.3.2.1. マウス 12
3.3.2.2. サル 12
3.3.2.3. 生殖発生毒性試験における分布 12
3.3.3. PBPK モデルによるヒト定常状態における肝臓及び腎臓中濃度の予測 13
3.4. 代謝 13
3.4.1. In Vitro 13
3.4.2. In Vivo 14
3.5. 排泄 15
3.6. 薬物動態学的薬物相互作用 15
3.6.1. 被相互作用 15
3.6.2. 相互作用 15
4. 毒性試験 16
4.1. 緒言 16
4.2. 急性毒性 16
4.3. 反復投与毒性 16
4.3.1. 死亡／安楽死 17
4.3.2. サルにおける血管炎及びその他の炎症反応又は補体関連所見 17
4.3.3. 血小板への影響 18

4.3.4. 肝臓への影響 18
4.3.5. 腎臓への影響 19
4.3.6. 乳腺への影響 21
4.3.7. その他の血液学的所見 21
4.3.8. 血液凝固への影響 22
4.3.9. 投与部位への影響 22
4.3.10. T 細胞依存性抗体産生（TDAR） 23
4.3.11. 無毒性量及び曝露量比較 23
4.4. 遺伝毒性 26
4.5. がん原性 27
4.6. 生殖発生毒性 30
4.7. 幼若動物を用いた毒性試験 31
4.8. 局所刺激性 31
4.9. 光毒性 32
4.10. ミトコンドリア毒性 32
4.11. マウス脾臓細胞におけるサイトカイン誘導 33
4.12. ベピロビルセン及び標準治療薬である核酸アナログ（NA）併用時の非臨床安全性評価 33
4.13. 不純物／分解生成物／添加物／抽出物 33
4.13.1. 出発原料、中間体及び試薬 34
5. 総括及び結論 34
5.1. 副次的薬理試験及び安全性薬理試験 34
5.2. 薬物動態 35
5.2.1. PK 及びバイオアベイラビリティ 35
5.2.2. 分布 35
5.2.3. 代謝 36
5.2.4. 排泄 36
5.2.5. 薬物相互作用 36
5.3. 毒性 36
5.3.1. 反復投与毒性 37
5.3.2. 局所刺激性 39
5.3.3. 遺伝毒性 39
5.3.4. がん原性 39

5.3.5. 生殖発生毒性.....40
5.4. 結論.....40
6. 参考文献.....40

2.4 の略号等一覧

略号（略称）	英語	日本語
AAV-HBV	Adeno-associated virus- Hepatis B virus	アデノ随伴ウイルス-B 型肝炎ウイルス
ABC	ATP-Binding Cassette	ATP 結合カセット
A/G	Albumin/Globulin	アルブミン／グロブリン
ALT	Alanine Aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
APC	Alternative Pathway of Completion	副経路
APTT	Activated Partial Thromboplastin Time	活性化部分トロンボプラスチン時間
ASO	Antisense Oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
AST	Aspartate Aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	Area Under the Curve	血中濃度-時間曲線下面積
CCL	C motif chemokine ligand	CC ケモカインリガンド
CHB	Chronic Hepatitis B	B 型肝炎ウイルス持続感染
Cmax	Maximum concentration	最高血中濃度
CPN	Chronic Progressive Nephropathy	慢性進行性腎症
CRP	C-Reactive Protein	C 反応性タンパク質
CXCL	chemokine ligand	ケモカインリガンド
CYP	Cytochrome P	シトクロム P450
DDI	Drug-drug Interactions	薬物相互作用
DILI	Drug Induced Liver Injury	薬物性肝障害
EC50	50% Concentration for Maximum Response	50%有効濃度
ECG	Electrocardiogram	心電図
eGFR	Estimated glomerular filtration rate	推算糸球体濾過量
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酵素結合免疫吸着測定法
Emax	Maximum Response	最大反応
F or Fabs	Absolute bioavailability	絶対的バイオアベイラビリティ
GalNAc	N -acetylgalactosamine	N-アセチルガラクトサミン
GLDH	Glutamate Dehydrogenase	グルタミン酸脱水素酵素
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
GPVI	Glycoprotein 6	糖タンパク質 6
HBV	Hepatis B virus	B 型肝炎ウイルス
HBsAg	hepatitis B surface antigen	B 型肝炎ウイルス表面抗原
hERG	human ether-a-go-go-related gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IFN-γ	Interferon gamma	インターフェロン γ
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M	免疫グロブリン M
IL	Interleukin	インターロイキン
IL-12p40	component of cytokines interleukin IL-12 and IL-23	IL-12 及び 23 を構成するサブユニット
IP-10	Interferon-γ inducible protein 10	インターフェロン γ 誘導性タンパク質 10

IHC	Immunohistochemical	免疫組織化学
ISH	In situ Hybridization	組織内ハイブリダイゼーション
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
MATE	Multidrug and Toxin Extrusion Transporter	多剤毒素排出トランスポーター
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1	単球走化性タンパク質
MDA5	Anti-Melanoma Differentiation-Associated gene 5	-
MRHD	Maximum Recommended Human Dose	最大推奨臨床用量
MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein 1α	マクロファージ炎症タンパク質-1α
MIP-1β	Macrophage Inflammatory Protein 1β	マクロファージ炎症タンパク質-1β
2'-MOE	2′-*O*-methoxy ethyl	2'-*O*-メトキシエチル
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	メッセンジャーRNA
MRP	Multidrug Resistance-Associated Protein	多剤耐性関連タンパク質
MS	Mass Spectrometry	質量分析
NA	Nucleos(t)ide Analogue	核酸アナログ
NK	Natural Killer	ナチュラルキラー
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
NOEL	No Observed Effect Level	無影響量
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト
OAT	Organic Anion Transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic Cation Transporter	有機カチオントランスポーター
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構
PBMC	Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells	末梢血単核細胞
PBPK	Physiologically Based Pharmacokinetics	生理学的薬物速度論
PK	Pharmacokinectis	薬物動態
PPND	Pre- and Post-Natal Development	出生前及び出生後の発生
QWBA	Quantitative Whole-body Autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィ
RIG-I	Retinoic Acid-inducible Gene I	レチノイン酸誘導型遺伝子I
RNA	Ribonucleic Acid	リボ核酸
ROW	Rest of World	その他の地域
SLC	Solute Carrier	溶質輸送体
STING	Stimulator of Interferon Genes	インターフェロン遺伝子刺激因子
TDAR	T-cell Dependent Antibody Response	T 細胞依存性抗体産生
TDF/TAF	Tenofovir alafenamide	テノホビルアラフェナミド
TLR	Toll-like Receptor	Toll 様受容体
Tmax	Time to Peak Drug Concentration	最高血漿中濃度到達時間
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α	腫瘍壊死因子 α
UV	Ultraviolet	紫外線
WT	Wild Type	野生型

1. 非臨床試験の概括評価

1.1. 緒言

ベピロビルセンは、キメラ型の 2'-*O*-（2-メトキシエチル）（2'-MOE）修飾ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）であり、B 型肝炎ウイルス（HBV）によって産生されるプレゲノム RNA を含むすべての mRNA に共通して存在する領域に相補的な配列を有する。

本申請に際して実施した一連の非臨床試験の成績から、HBV 持続感染患者に今回申請する用法・用量で皮下投与することの妥当性が裏付けられた。以下に非臨床試験計画及びその試験の要約を示す。

HBV 持続感染の治療と本剤の位置づけについては、2.5.1.2 に記載した。

1.2. 非臨床試験計画概略

HBV 持続感染の治療にベピロビルセンを使用することの妥当性を裏付けるため、一連の非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験を実施した。

非臨床薬理試験として、効力を裏付ける試験（非臨床ウイルス学的試験）、副次的薬理試験及び安全性薬理試験を実施したが、非臨床ウイルス学的試験（in vitro 及び in vivo 試験）の概括評価及びそれらの試験成績の要約は、それぞれ 2.5.4.1 及び 2.7.2.4.4.2.B に記載した。

ベピロビルセンの非臨床薬物動態について、他の 2′-MOE ASO の公表データを活用して検討した。このクラスの ASO の薬物動態特性は化学構造及び骨格の修飾によって規定されることが報告されている[Geary, 2015]。ベピロビルセンの 5-10-5 ギャップマー構造は海外で承認済みの ASO（inotersen、mipomersen 及び volanesorsen）及び後期臨床試験中の複数の ASO に共通している[Geary, 2015; Yu, 2016; Hill, 2023]。また、ベピロビルセンの GalNAc 結合型プロドラッグに関するデータも公表されており、ベピロビルセンの薬物動態特性に関するさらなる洞察が得られている[Han, 2019]。

ASO は速やかに吸収されるという文献的報告[Geary, 2015]に基づき、ベピロビルセンの単回投与 PK 試験は実施しなかった。

マウスでは最長 26 週間、サルでは最長 39 週間の反復皮下投与毒性試験（サル 13 週間投与試験では、試験 1 週に低及び中用量群に静脈内負荷投与）を、休薬期間を設けて実施し、全身及び組織におけるベピロビルセンの曝露量を測定した。遺伝毒性試験及び生殖発生毒性試験においても TK 評価を実施した。ベピロビルセンの血漿タンパク結合率及び薬物相互作用の可能性について評価するため、一連の in vitro 及び in silico 試験を実施した。ヒト薬物動態データを用いて PBPK モデルを構築し、肝臓中ベピロビルセンの濃度を in silico で予測した。マウス及びサルでの全身曝露量並びに in vitro 及び in vivo 代謝試験の結果から、ヒトにおけるベピロビルセン及びその代謝物の安全性予測において、これら 2 種の動物種を用いることは適切であると考えられた。

反復投与毒性試験で評価した腎臓及び肝臓への分布は、他の 2’-MOE ASO での報告と同程度であったため[Geary, 2009; Post, 2019]、QWBA 評価は実施しなかった。ベピロビルセンの

排泄様式は他の ASO と同様と予想されるため[Levin, 2008; Baek, 2010; Geary, 2015; Yu, 2007]、ベピロビルセンの排泄試験は実施しなかった。

毒性試験として、マウス及びサルを用いたそれぞれ最長 26 及び 39 週間皮下投与毒性試験（最長 26 週間の休薬期間を設定；サル 13 週間投与試験では、試験 1 週に低及び中用量群に静脈内負荷投与）を実施した。2′-MOE ASO の単回投与試験の意義は低いと考えられるため、ベピロビルセンの単回投与毒性試験は実施していない。一連の遺伝毒性試験及び規制当局からのフィードバック[EMA, 2021; PMDA, 2020; FDA, 2020; CDE, 2019]に基づき、マウスを用いた 2 年間がん原性試験を実施した。マウス及びウサギを用いた生殖発生毒性試験を実施した（幼若動物を用いた試験は実施せず）。局所刺激性については、反復投与毒性試験及び 2 年間がん原性試験における投与部位の一般状態観察及び病理組織学的検査により評価した。

ベピロビルセンは治療用オリゴヌクレオチドであり、ICH S10 の適用範囲外と考えられるため、光毒性に関する試験は実施していない。

ベピロビルセンは世界各国で慢性 B 型肝炎患者に対する標準治療薬である核酸アナログとの併用が予定されている。そのため、証拠の重み付け（Weight of Evidence）アプローチに基づき毒性／標的臓器の重複する可能性について評価した。

すべての主要な安全性薬理試験及び毒性試験並びに一部の薬物動態試験は、いずれも OECD 試験ガイドライン及び GLP に準拠して OECD 加盟国で実施した。他の試験はいずれも各試験実施施設の標準業務手順書及び GLP の一般原則に従って実施した。

いずれの試験においても、特に記載のない限り、ベピロビルセンナトリウム塩を使用した。本概要書で引用した被験物質並びにすべての用量及び濃度（分析対象物質の血漿中濃度を含む）は親化合物を示す（以下、ベピロビルセン）。以下に要約する非臨床安全性試験で用いた原薬のナトリウム塩及び薬物由来不純物のプロファイルは、臨床使用製剤及び市販用製剤と類似していた。

非臨床試験成績の包括評価及び結論を 5 項に示す。

1.2.1. 動物種の選択

非臨床安全性試験はマウス及びサルを用いて実施した。生殖発生毒性試験では、非げっ歯類としてウサギを用いた。これらの動物種は、2’-MOE ASO を用いた毒性試験で一般的に使用されており、観察された所見の解釈を裏付けるための豊富な背景データを有している。また、ベピロビルセン皮下投与後に十分な全身曝露量を示し、配列のみがベピロビルセンと異なる他の 2’-MOE ASO において、非臨床動物種（マウス、サル）とヒトで定性的に類似した in vitro 及び in vivo 代謝が示されている。なお、ベピロビルセンが標的とする HBV RNA は、ヒトを含む哺乳類では発現していないことから（HBV に感染していない限り）、毒性試験における動物種の選択に際して、主要標的に対する薬理学的意義は考慮していない。

副次的薬理試験では、ベピロビルセンの免疫活性化作用を検討するため、hTLR8 ノックインマウス（hTLR8 マウス）を用いた。また、HBV 感染及び HBV mRNA の存在がベピロビルセンの免疫活性化作用に影響を及ぼす可能性を検討するため、一部の試験では HBV ゲノ

ムを組み込んだ AAV ベクターをマウスに投与して作製した慢性 HBV 感染マウスを用いた。

1.2.2. モジュール 4 に含まれない資料

ベピロビルセンの非臨床試験の概要を以下に示し、試験報告書をモジュール 4 に添付する。本申請書に最終報告書を添付していない資料の一覧を Appendix 1 に示す。

2. 薬理試験

効力を裏付ける試験（非臨床ウイルス学的試験）として一連の in vitro 及び in vivo 試験を実施したが、それらの試験成績の要約及び試験一覧はそれぞれ 2.7.2.4.4.2.B 及び 2.7.2.4.5.B に示す。効力を裏付ける試験成績の概括評価は 2.5.4.1 に示す。

副次的薬理試験及び安全性試験の要約及び概要表はそれぞれ 2.6.2「薬理試験の概要文」及び 2.6.3「薬理試験概要表」に示す。試験報告書はすべて m4.2.1 に添付する。

2.1. 副次的薬理試験

バイオインフォマティクス解析及びその後に実施した in vitro 試験の結果から、ベピロビルセンがヒト mRNA に結合してオフターゲット作用を示す可能性は極めて低く、HBV mRNA に対して高い特異性を有することが確認された。他の 2'-MOE ASO において、血小板上に発現する GPVI 受容体への結合に関連した軽度～中等度の血小板減少が報告されており、ベピロビルセンの毒性試験及び臨床試験においても血小板減少がみられていることから、ベピロビルセンの GPVI 受容体への結合性を検討したところ、他の 2'-MOE ASO と同程度の親和性でヒト GPVI に結合する可能性が示された。

ヒトの肝臓に存在する免疫細胞を用いた検討は困難であるため、健常ドナーより得た PBMC（hPBMC）をベピロビルセンで処理した時の免疫刺激作用（サイトカイン産生プロファイル及び産生細胞）を評価した。hPBMC をベピロビルセン［50 μM：最大ヒト推奨用量である 300 mg を皮下投与した時の推定血漿中 Cmax（1.14 μM）の 40 倍超］存在下で 18 時間インキュベートすることにより、培養上清中サイトカイン（IFN-γ、IL-6、CXCL10、TNF-α 及び IL-12p40 等）は、被験物質非存在下（培地のみ）群と比較して軽度ではあるが有意に上昇した。また、ベピロビルセンで処理した時に誘導されるサイトカインを産生する主な細胞種をフローサイトメトリーにより評価したところ、単球、樹状細胞及び NK 細胞であることが示された。以上のことから、ベピロビルセンはこれらの免疫細胞を介してサイトカイン誘導作用を示すことが示唆された。しかしながら、ベピロビルセンをヒトに投与した時の血中からのクリアランスは速く、速やかに組織に移行することから、循環血液中のベピロビルセンによる作用は限定的であり、ベピロビルセンによるサイトカイン誘導作用は肝臓に存在する免疫細胞を介して発現すると考えられる。

臨床試験においてベピロビルセンの投与により IL-12、TNF-α、IFN-γ、CXCL9 及び CXCL10 等のサイトカインの誘導作用がみられたことから（2.7.2.4.4.4.B）、ベピロビルセンの作用機序に自然免疫活性化作用が関与する可能性を評価した。種々のヒト PRR（hTLR2、

3、4、5、7、8 及び 9、STING、RIG-I、MDA5）並びにマウス TLR8 を過剰発現させた細胞株を用いて、ベピロビルセン処理により NF-κB（TLR 受容体）又は IRF3（STING、RIG-I及び MAD5）が活性化されるかを評価したところ、hTLR8 過剰発現細胞株において、軽度な NF-κB 活性化作用が認められた。その他の TLR、RIG-I、MDA5、又は STING を発現させた細胞では、NF-κB 及び IRF3 の明らかな活性化はみられなかった。

In vivo 試験では、hTLR8 ノックインマウス（hTLR8 マウス）にベピロビルセンを皮下投与した時のサイトカイン誘導作用（血漿中サイトカイン濃度及び肝臓中サイトカイン mRNA 発現量）を評価した。その結果、ベピロビルセンの投与により、陽性対照である TLR8 アゴニストと同様に、血漿中サイトカイン（IL-12p40、CXCL10、TNF-α、IL-6 及び IL-10 等）濃度の上昇がみられた。また、肝臓において複数のサイトカイン及びケモカイン mRNA（*Cxcl10*、*Il-12b*、*Tnf*、*Ccl2*、*Ccl4* 等）の発現量を増加させることが示された。これらの発現誘導は野生型では認められなかった。hTLR8 マウスにベピロビルセンを投与した時にみられた肝臓におけるサイトカイン遺伝子の発現誘導に関与している細胞を RNAscope アッセイにより同定（*Ccl2*、*Ccl4*、*Cxcl10* 及び *Tnf* を検出）したところ、これらのサイトカイン mRNA の発現は、主にクッパー細胞及び浸潤マクロファージを含む F4/80 陽性細胞で認められた。このことからベピロビルセンの投与により、肝臓の非実質細胞（クッパー細胞及び浸潤マクロファージ）においてサイトカイン産生が誘導されると考えられた。

ベピロビルセンと同じ塩基長及び同じギャップマー構造の他の ASO（HBV を標的としないスクランブル ASO、TLR9 活性化作用を有する ASO、軽微な炎症を惹起することが知られている ASO）を用いて野生型／hTLR8 マウスでのサイトカイン誘導作用を比較した。その結果、ベピロビルセンのサイトカイン誘導作用は hTLR8 マウスでのみ認められたのに対し、TLR9 を活性化させる ASO は野生型マウス及び hTLR8 マウスのいずれにおいてもサイトカイン誘導作用を示した。また、hTLR8 マウスにベピロビルセンを投与した時のサイトカイン濃度の上昇の程度は、スクランブル ASO 及び軽微な炎症を惹起する ASO の投与による上昇よりも明らかに高かったことから、hTLR8 マウスにベピロビルセンを投与することによってみられたサイトカイン誘導は、ベピロビルセンの配列に関連した作用である可能性が示唆された。

2.2. 安全性薬理試験

ベピロビルセンの安全性薬理試験として、マウスを用いた単回投与試験により神経行動学的な機能に及ぼす影響を評価し、サルを用いた単回投与試験により心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を評価した。In vitro 試験として、hERG テール電流に及ぼす影響を評価した。更に、マウス及びサルの反復投与毒性試験において、血清及び／又は尿検体を用いた生化学的検査により腎臓に及ぼす影響を評価したが、それらの結果については 2.6.6.3 に記載した。安全性薬理試験の概要表は 2.6.3 に示す。

雄の CD-1 マウスにベピロビルセン（40、100 又は 300 mg/kg）を単回皮下投与した時の神経行動及び体温への影響について評価した。ベピロビルセン（最高用量 300 mg/kg）を単回皮下投与しても、Irwin 法を用いた一般症状・行動観察において、投与 24 時間後まで神経行動への影響を示唆する変化はみられず、体温の変化も認められなかった。本試験における無

影響量（NOEL）である 300 mg/kg 投与時のマウス血漿中濃度は、最大ヒト推奨用量である 300 mg を皮下投与した時の推定血漿中遊離型 Cmax の平均値（ベピロビルセンのヒト血漿タンパク結合率 95%として算出）と比較して 4.9 倍高値であった。

hERG テール電流に対するベピロビルセンの作用を検討した結果、媒体対照群と比較して統計学的に有意な阻害作用を示さなかった。本試験で用いたベピロビルセンの濃度（190 μM）は、最大ヒト推奨用量である 300 mg を皮下投与した時の推定血漿中遊離型 Cmax の平均値（約 0.06 μM；ベピロビルセンのヒト血漿タンパク結合率 95%として算出）と比較して 3000 倍以上であった。

カニクイザルにベピロビルセンを単回投与し、呼吸系及び心血管系の機能に及ぼす影響を評価した。ベピロビルセンを 12 mg/kg で静脈内投与、又は 40 mg/kg で皮下投与しても、一般状態に影響はみられず、測定期間を通して、収縮期及び拡張期血圧、平均動脈圧、心拍数、呼吸数、体温、第II誘導心電図パラメータ・波形並びに動脈血ガスに対する影響は認められなかった。ベピロビルセン 12 mg/kg を静脈内投与した時及び 40 mg/kg を皮下投与した時の血漿中 Cmax の平均値はそれぞれ 128.44 又は 110.23 μg/mL（遊離型濃度はそれぞれ 2.18 及び 1.87 μg/mL；ベピロビルセンのサル血漿タンパク結合率 98.3%として算出）であり、最大ヒト推奨用量である 300 mg を皮下投与した時の推定血漿中遊離型 Cmax の平均値（0.43 μg/mL）と比較すると、それぞれ 5.1 又は 4.4 倍であった。

3. 薬物動態

各薬物動態試験及びその結果の要約を 2.6.4「薬物動態試験の概要文」に示す。実施した各薬物動態試験の一覧、要約表及び結果を 2.6.5「薬物動態試験の概要表」に示す。薬物動態試験の報告書は 4.2.2 に記載する。

3.1. 分析方法及びバリデーション

3 つのアッセイプラットフォーム（ELISA、HPLC-UV 及び HPLC-MS/MS）を用いて、マウス、ウサギ及びサルの腎臓及び肝臓組織並びに／又は血漿中のベピロビルセンを測定するための方法を開発した。非臨床 GLP 毒性試験では、分析に使用した方法を各検量線範囲において十分にバリデートした。HPLC-UV を用いて、マウス及びサルの組織における代謝物の分類試験を実施した。また、UHPLC-MS を用いて、マウス、ウサギ、サル及びヒトの肝 S9 画分並びにヒト血漿における追加の代謝物同定試験を実施した。

いずれの方法及び定量限界も、ベピロビルセンの薬物動態解析を実施するうえで、特異性及び感度に関して適切であった。バリデートした分析法の概要を 2.6.4 APPENDIX 1 に示す。

3.2. 吸収

ASO は速やかに吸収されることが報告されていること[Geary, 2015]から、ベピロビルセンの単回投与 PK/TK 試験は実施せず、単回投与後の吸収については、カニクイザルを用いた 13 週間反復投与試験で評価した。毒性試験において、カニクイザルにベピロビルセンを 13

及び 39 週間、静脈内又は皮下投与による負荷投与に続いて皮下投与した時のベピロビルセンの PK/TK を検討した。

CByB6F1 WT マウス及び CD-1 マウスの両方を用いてベピロビルセンの肝臓及び腎臓中濃度を評価した。血漿中濃度については動物使用量を減らすため、CByB6F1 WT マウスのみで測定した。

CByB6F1 WT マウスに 40 mg/kg/回までの用量でベピロビルセンを 13 週間皮下投与した時、試験 1 日及び 91 日のいずれにおいても、ベピロビルセンは 4 mg/kg/回群の雌では投与後 8 時間まで、雄では投与後最長 24 時間まで血漿中で定量可能であった。12 及び 40 mg/kg/回群では、試験 1 日及び 91 日の雌雄で投与後 24 時間、ベピロビルセンは血漿中で定量可能であった。

Tmax は試験 1 日及び 91 日の雌雄ともに概して投与後 0.5 時間であったが、例外として試験 91 日の 40 mg/kg/回群の雌では投与後 1 時間であった。

全身曝露量（Cmax 及び AUC0-t）に有意な性差（2 倍超）は認められなかったため、雌雄合算平均値を算出した。試験 1 日及び 91 日の曝露量は、用量に比例して増加した。

カニクイザルにベピロビルセンを静脈内投与（4～12 mg/kg/回）した時の Tmax は投与終了直後であった。皮下投与（4～40 mg/kg/回）後の Tmax の中央値は 1～4 時間であり、初回投与後とその後の投与後で同程度であった。

サルに静脈内投与（負荷投与 1 日目）した時の Cmax は同用量を皮下投与した時の Cmax よりも高く、これは皮下投与後の吸収が遅いために Tmax が遅いことと一致した。しかし、AUC は 2 つの投与経路間で同程度であったことから、ベピロビルセンは皮下投与後に完全に吸収されることが示唆された（皮下投与時の F＞80%）。全身曝露量に明らかな又は一貫した性差は認められなかった。

サルに静脈内投与（負荷投与 1 日目）後の Cmax 及び AUC は用量依存的に増加した。皮下投与後（試験最終日）の Cmax は用量比をわずかに下回って増加した一方で、AUC0-48 は単回投与後では用量に比例して増加したが、反復投与後では用量比を上回って増加した。

データの要約表を 2.6.5 表 8～表 11 に示す。非臨床動物とヒトでの全身曝露量の比較を表 1 に示す。

3.3. 分布

3.3.1. In Vitro

マウス、サル及びヒト血漿を用いて、ベピロビルセンの in vitro 血漿タンパク結合を検討した。ベピロビルセンの高い血漿タンパク結合は親水性相互作用によるものであり、親和性が低く、非特異的であると考えられる。ベピロビルセンの血漿タンパク結合率はマウスで 91.6%超、サルで 98.3%超、ヒトで 94.9%超であった。データの要約表を 2.6.5 表 23 に示す。

In vitro において、ベピロビルセンはヒトトランスポーターBCRP、P-gp 及び MRP2（ABC トランスポーター）並びに MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2（SLC トランスポーター）の基質ではなかった。データの要約表を 2.6.5 表 27 に示す。

3.3.2. In Vivo

マウス、ウサギ及びサルにおける肝臓及び腎臓への分布

このクラスの ASO は皮下投与後に組織に広く分布し、概して肝臓及び腎臓に高濃度に分布した[Geary, 2015; Post, 2019]。ベピロビルセン濃度は、サルでは検討したすべての用量で肝臓中よりも腎皮質中で高く、マウスでは概して低用量でのみ肝臓中よりも腎皮質中で高かった。皮下投与後の腎臓及び肝臓組織中濃度を表 2 に示す。生殖発生毒性試験で得られた肝臓（母動物及び胎児）及び胎盤中濃度を表 7 に示す。

データの要約表を 2.6.5 表 14～表 22 及び 2.6.5 表 24～表 26 に示す。

3.3.2.1. マウス

CD-1 マウスを用いた 13 及び 26 週間反復投与毒性試験（腎臓及び肝臓）、CByB6F1 WT マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験（腎臓及び肝臓）、マウス小核試験（肝臓のみ）、並びに受胎能及び胚・胎児発生に関する併合試験で、ベピロビルセンの組織中濃度を測定した。ベピロビルセンの腎臓中濃度は用量比を下回って増加したが、肝臓中濃度は概ね用量に比例して増加した。雌の腎臓における曝露量は、すべての用量で雄よりも有意に高かった。

13 週間の休薬期間後にベピロビルセンが定量されたのは、マウスを用いた 13 週及び 26 週間反復投与毒性試験のそれぞれ 100 及び 60 mg/kg/回群の肝臓試料でのみであり、その他の組織試料のベピロビルセン濃度はすべて定量下限未満であった。

13 週間投与したマウスの肝臓及び腎臓におけるベピロビルセンの細胞分布を、in situ ISH 法及び IHC 法を用いて解析した[Spencer-Dene, 2023]。肝臓におけるベピロビルセンの分布は既報のデータ[Prakash, 2014]と一致しており、ベピロビルセンの大部分（約 85%）が非実質細胞に、約 15%が肝細胞に分布した。腎臓では、ベピロビルセンは主に皮質に認められ、近位尿細管細胞に分布していた。

データの要約表を 2.6.5 表 14～表 20 に示す。

3.3.2.2. サル

サルを用いた 13 及び 39 週間反復投与毒性試験では、腎臓及び肝臓中濃度は用量比を下回って増加し、性差は認められなかった。

13 週間反復投与毒性試験（12 及び 40 mg/kg/回群）では、13 週間の休薬後に腎臓及び肝臓試料中のベピロビルセン濃度は約 96～98%低下した。39 週間反復投与毒性試験では、26 週間の休薬期間後にすべての組織試料においてベピロビルセン濃度は定量下限未満となった。

データの要約表を 2.6.5 表 21～表 22 に示す。

3.3.2.3. 生殖発生毒性試験における分布

マウスを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する併合試験では、すべての母動物の肝臓でベピロビルセンが定量可能であり、曝露量は用量に比例して増加した。また、中及び高用量群の胎盤でも定量されたが（母動物の肝臓の 6%未満）、胎児の肝臓では定量下限未満であ

った。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物の肝臓及び胎盤でベピロビルセンが定量された（胎盤中濃度は肝臓中濃度の 7%未満）が、胎児の肝臓では定量下限未満であった。以上の結果から、ベピロビルセンは胚及び胎児への移行性が低いことが示された。

マウス PPND 試験では、母動物の肝臓中ベピロビルセン濃度は用量に比例して増加したが、15 及び 25 mg/kg/回群における分娩後 10 日の乳汁中、並びに生後 10 日及び 21 日の出生児の肝臓中の曝露量はごくわずか（母動物肝臓中濃度の 1.0%未満）であった。

データの要約表を 2.6.5 表 24～表 26 に示す。

3.3.3. PBPK モデルによるヒト定常状態における肝臓及び腎臓中濃度の予測

臨床試験において組織生検を実施しなかったため、150 mg 及び 300 mg をヒトに投与した時の肝臓及び腎臓中のベピロビルセンの初期濃度を、カニクイザルの PK データを基にアロメトリックスケーリング法を用いて推定した[Geary, 2015]。推定に際しては、Gastroplus（version 9.7）で規定されている臓器パラメータを用いて、薬物動態が線形であると仮定し、サルとヒトの肝臓及び腎臓の体積補正を行った。150 及び 300 mg を投与した時の推定ヒト肝臓中濃度は、それぞれ 128 及び 256 µg/g tissue であった。150 及び 300 mg を投与した時の推定ヒト腎臓中濃度は、それぞれ 129 及び 259 µg/g tissue であった。

続いて、単回及び反復投与時の臨床血漿中薬物動態データ（2.5.3）を用いて PBPK モデルを構築して検証し、ヒトにベピロビルセン 300 mg を反復投与した時の肝臓及び腎臓中濃度について推定した。その結果、本 PBPK モデルから、肝臓及び腎臓における Cmax はそれぞれ 172 µg/mL 及び 132 µg/mL と予測された。PBPK モデルによる予測は、上記のアロメトリックスケーリングによる予測に優先すると考えられる。

データの要約表を 2.6.5 表 12～表 13 に示す。

3.4. 代謝

ベピロビルセンを含む 2’-MOE ASO は、エンドサイトーシス及びミクロピノサイトーシスによりそれぞれ肝臓及び腎臓に取り込まれ、内因性エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼにより代謝される[Shemesh, 2016; Geary, 2015; Yu, 2016]。

概して、ベピロビルセンの代謝様式は臨床で報告されている他の ASO（GalNAc 結合型ベピロビルセン[Han, 2019]及び mipomersen[Geary, 2015; Post, 2019]のヒト血漿中及び尿中代謝物プロファイル）と同様であった。

3.4.1. In Vitro

マウス、ウサギ、サル及びヒト肝 S9 画分におけるベピロビルセンの in vitro 代謝プロファイルを検討した。いずれの試料においても、24 時間のインキュベート後の主要な薬物関連成分はベピロビルセンであり、代謝物は検出されなかった。N-1（n-MOE-［5-メチルシチジン（MeC）］）に相当する微量の薬物関連不純物（D1）が同定されたが、この試験系で代謝的に生成されたものではなかった。データの要約表を 2.6.5 表 28 に示す。

2.4. 非臨床試験の概括評価

CYP 及び UDP-グルクロン酸転移酵素の誘導及び／又は阻害を評価する in vitro 試験を実施した。ベピロビルセンは、単一ドナー由来のヒト凍結肝細胞において、CYP3A4 の軽度な in vitro 誘導作用を示した（EC50, u 及び Emax はそれぞれ 13.6 µM 及び 2.28 倍）。DDI の可能性に関する誘導／阻害試験の要約については 3.6 項に示す。

データの要約表を 2.6.5 表 27 及び 2.6.5 表 33～34 に示す。

3.4.2. In Vivo

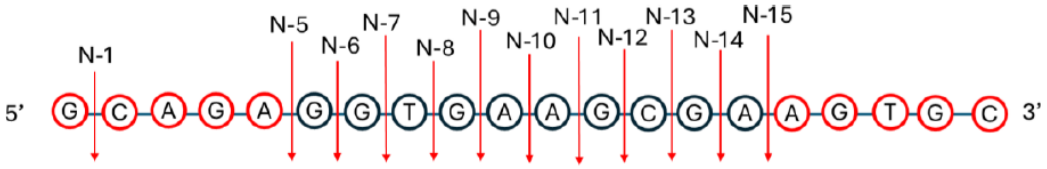
マウス及びサルを用いた 13 週間反復投与毒性試験で採取した肝臓及び腎臓試料を用いて、ベピロビルセンの代謝プロファイルを検討した。最も多く検出された ASO はベピロビルセンであり、総 ASO（総ピーク面積）の 58～90%を占めた。マウス及びサルの組織（肝臓及び腎臓）中で認められた計 12 種類の推定代謝物の要約を図 1 に示す。マウスでは薬物関連物質の 6%、サルでは 4%を超える代謝物はなかった。

ヒト肝臓の代替として、B-well 試験（202009 試験）から採取したプールヒト血漿試料を用いてベピロビルセンの代謝プロファイルを検討した。中国、日本及び ROW において採取したすべてのヒトプール血漿試料において、未変化体及び 8 種類の代謝物（M1～M8）が検出された。このプロファイルに基づくと、ベピロビルセンの主要代謝経路は加水分解であり、代謝物は切断型であるため RNase H を誘導する可能性は低く、薬理学的に不活性であると考えられる。

ベピロビルセンのヒト代謝プロファイルは非臨床動物種での代謝プロファイルと類似しており、同クラスの他の ASO ギャップマーについて公表されているプロファイルとも同様であった[Geary, 2015; Yu, 2016; Post, 2019]。また、ベピロビルセンのヒト代謝物は非臨床動物種における代謝プロファイルと質的に類似していることから、ヒト代謝物は非臨床動物種の代謝物に十分含まれていると考えられた。

データの要約表を 2.6.5 表 30～表 32 に示す。

図 1 マウス及びサルの肝臓及び腎臓におけるベピロビルセンの in vivo 推定代謝物



Metabolite	N-1	N-5	N-6	N-7	N-8	N-9	N-10	N-11	N-12	N-13	N-14	N-15
Mouse												
Liver	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Kidney	✓	ND	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Monkey												
Liver	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Kidney	✓	ND	ND	ND	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND

Key: ND = Not determined

3.5. 排泄

他の ASO を用いた試験に基づくと[Geary, 2015]、ベピロビルセンは、組織での代謝を受けて短鎖化代謝物となり、腎排泄を介して消失すると考えられる。なお、健康被験者を対象とした第 1 相試験（213725 試験）で実施したベピロビルセンの尿中濃度測定については、2.7.2.3.3.5 に示す。

3.6. 薬物動態学的薬物相互作用

ベピロビルセンが薬物代謝酵素及びトランスポーターの基質又は阻害剤となる可能性を検討した in vitro 試験データを用いて、臨床での薬物相互作用の可能性を評価した。

規制ガイドラインで推奨されているように、必要に応じて、Basic 法及びメカニズムに基づく静的モデルによるアプローチを用いて、ベピロビルセンの相互作用の可能性を評価した[FDA, 2020; EMA, 2013; PMDA, 2018; ICH M12, 2024]。

3.6.1. 被相互作用

In vitro において、ベピロビルセンはヒトトランスポーターである BCRP、P-gp 及び MRP2（ABC トランスポーター）並びに MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2（SLC トランスポーター）の基質ではなかった。

ベピロビルセンのような ASO は、エンドサイトーシスにより肝臓に、ミクロピノサイトーシスにより腎臓に取り込まれる[Geary, 2015]。非臨床代謝データ（3.4 項）から、ベピロビルセンは内因性エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによって代謝されることが確認され、これは公表データ[Shemesh, 2016; Yu, 2016]と一致している。これらの取り込み及び代謝経路は、テノホビル、ラミブジン、アデホビル及び telbivudine 等の HBV 持続感染患者にも投与される可能性のある抗ウイルス薬によって阻害されない。更に、第 2a 相試験（205695 試験、2.7.2.2.2.2.1）において、ベピロビルセンと核酸アナログを併用投与した時、HBV 持続感染患者のベピロビルセン血漿中 PK プロファイルに変化は認められなかった。したがって、ベピロビルセンが相互作用を受ける可能性は低いと考えられる。

データの要約表を 2.6.5 表 27 に示す。

3.6.2. 相互作用

ベピロビルセンは、単一ドナー由来のヒト凍結肝細胞において、CYP3A4 の軽度な in vitro 誘導作用を示し、EC50 及び Emax はそれぞれ 24.2 μM 及び 2.35 倍であった。更に、ICH M12 に従い、ベピロビルセンの非結合型濃度を用いて算出した EC50, u 及び Emax はそれぞれ 13.6 μM 及び 2.28 倍であった。ベピロビルセンは他の 2 例のドナーの肝細胞では CYP3A4 を誘導せず、検討した 3 例のドナーすべてで CYP1A2 及び CYP2B6 を誘導しなかった。規制ガイダンス基準[EMA, 2013; PMDA, 2018; FDA, 2020; FDA, 2022]に基づいた EC50 及びより保守的な EC50, u の両方を用いた Basic 法による静的モデルの結果からは、臨床的に重大な CYP3A4 に対する DDI リスクは予測されなかった。

In vitro において、ベピロビルセンは CYP2C8 及び MRP2 を阻害した（IC50 はそれぞれ＞100 μM 及び 8.49 μM）。しかし Basic 法による静的モデルから、ベピロビルセンは CYP2C8 及び MRP2 の臨床的に意義のある可逆的阻害剤ではないことが予測された。

ベピロビルセンは、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4 の可逆的又は時間依存的な阻害剤ではなく、UGT の可逆的阻害剤でもなかった。

ベピロビルセンは、P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K に対して阻害作用を示さなかった。

サイトカインは代謝酵素の発現を調節し、サイトカイン発現が増加すると CYP 活性が低下する可能性がある[Coutant, 2023]。In vitro でヒト PBMC に 200 μM までのベピロビルセンを処理した結果、IL-6 及び IL-10 の産生がそれぞれ最大 22.7 倍及び 3 倍増加した。ベピロビルセンを臨床用量 300 mg で投与したときの最大血漿中曝露量は約 10 μg/mL（1.35 μM に相当）であり、臨床において IL-6 及び IL-10 が誘導される可能性は低いと考えられた。

データの要約表を 2.6.5 表 27、2.6.5 表 29 及び 2.6.5 表 33～34 に示す。

4. 毒性試験

4.1. 緒言

各毒性試験の概要を 2.6.6「毒性試験の概要文」に示す。実施した毒性試験の一覧、概要表及び所見を 2.6.7「毒性試験概要表」に示す。試験報告書は m4.2.3 に添付する。ベピロビルセンのトキシコキネティクス及び組織中濃度分析の概要を 2.6.7 に示す。

CD-1 及び CByB6F1WT マウスにおける毒性所見は、糸球体腎症（CD-1 マウスでみられたが、CByB6F1 WT マウスでは認められず）を除き、概ね同様であった。そのため、本概要ではより感受性の高い系統である CD-1 マウスを用いた試験成績に焦点を当てて記載する。

4.2. 急性毒性

ベピロビルセン等の 2'-MOE ASO のヒトでのリスク評価において、単回投与毒性試験を実施する意義は極めて低いため、ベピロビルセンを用いた単回投与毒性試験は実施していない。マウスの小核試験で 2000 mg/kg まで、マウス及びサルの安全性薬理試験でそれぞれ 300 及び 40 mg/kg までを単回投与した時の忍容性はいずれも良好であった［2.6.6.4.3.1（小核試験）及び 2.6.2.4（安全性薬理試験）：2.6.7 表 21 及び 2.6.3 表 4］。

以上のことから、ベピロビルセンのマウス及びサルにおける概略の致死量は、それぞれ 2000 及び 40 mg/kg 超と考えられる。

4.3. 反復投与毒性

反復投与毒性試験における主要所見を、ヒトへの外挿性の考察とともに以下に要約する。また、CD-1 マウスを用いた 2 年間がん原性試験で認められた非腫瘍性所見（より短期間の試験では観察されず）についても記載した。反復投与毒性試験で認められた投与部位への影響については 4.8 項で詳述する。

各試験成績の概要を 2.6.6.3.2.1（マウス）及び 2.6.6.3.3.1（サル）に示し、概要表を 2.6.7 表 12～表 18 に示す。

4.3.1. 死亡／安楽死

サル 39 週間投与試験では、投薬期間及び休薬期間を通じて、投薬に関連した死亡／瀕死例が認められた。途中死亡／安楽死／投与中止例は 7 例［3 mg/kg/回群 1 例（投薬に関連しないと判断）、20 mg/kg/回群 6 例（うち 1 例は投薬に関連しないと判断）］であった。10 mg/kg/回群の別の 1 例は、9 ヵ月間の投与を完了したが、CRP 高値を伴う重度の血清アルブミン低値及び試験 352 日から認められた膝・手関節の急性関節炎のため、26 週間の休薬期間中の試験 354 日に安楽死させた（2.6.7 表 18）。

これらの死亡／瀕死の原因は、血小板減少による出血／血栓に関連した変化及び／又は低蛋白血症（種特異的かつ慢性的な補体活性化及びそれに伴う糸球体腎炎による）と考えられた。サル 39 週間投与試験では、投薬に関連した死亡率の増加がみられたが（10 mg/kg/回群で 10%、20 mg/kg/回群で 50%）、補体活性化を介した血管周囲の炎症による死亡／安楽死は認められなかった。これらの所見は、最大推奨臨床用量（MRHD）を投与した時の曝露量（AUC：98.2 μg.h/mL）の 4.9 倍以上の全身曝露量で観察された。

マウスを用いた 2 年間がん原性試験では、30 mg/kg/回群の雄で統計学的に有意な死亡率の増加（生存率低下）が認められた。ベピロビルセン投与に関連して高頻度にみられ、死亡に関与したと考えられる腫瘍性病変（4.5 に要約）は、その機序を考慮すると、ヒトへの外挿性は低いと考えられる（2.6.7 表 22）。

4.3.2. サルにおける血管炎及びその他の炎症反応又は補体関連所見

サル 13 及び 39 週間投与試験では、それぞれ 12 mg/kg/回以上及び最大 20 mg/kg/回までの用量で複数例に種々の組織（脳、心臓、胆嚢、腸、肝臓、卵巣管、子宮及び膣）で血管／血管周囲の炎症がみられ、これらの組織への影響に伴って、炎症マーカー（MCP-1、CRP、MIP-1β 及び IFNγ、高用量群では IL-6 も含む）の増加及び補体活性化が認められた。補体活性化は Bb の高値と C3 の低値（APC マーカー）によって示され、C4a（補体活性化の古典経路マーカー）の変化は認められなかった。広範囲にわたって血管炎がみられた動物では、C3 の低値並びに Bb、CRP 及び炎症性サイトカインの高値が一貫して観察された。また、サル 13 週間投与試験の投与期間終了時に、主に 40 mg/kg/回（2.6.7 表 17 及び表 18）で、アルブミンの低値（約 10%）、グロブリンの高値（約 10%）及びそれに伴う A/G 比の低値が認められた。

他の 2’-MOE ASO を用いたサルの試験においても血管炎及び／又は血管周囲炎が報告されており[Shen, 2016]、この機序には、サルで ASO を介した APC の活性化が生じやすいことが関与していると考えられている[Frazier, 2015; Shen, 2014]。ヒトでは ASO を介した APC の活性化が生じにくいことから、ベピロビルセンを投与したサルで顕著に認められた血管炎がヒトで発現する可能性は低いと考えられる[Frazier, 2015; Shen, 2014; Shen, 2016]。

臨床試験（B-Clear 試験）で認められた血管炎の発現頻度の増加及び補体マーカーへの影響は、ベピロビルセンを投与した CHB 患者では APC の活性化が認められていないこと

（2.5.5.7.1.3）を考慮すると、サルの血管炎の発現機序とは異なると考えられる。したがって、サルでの血管／血管周囲の炎症は臨床的に意義のある所見ではないと考えられる。しかしながら、血管炎に関連する免疫疾患が疑われる患者又はその既往歴を有する患者にベピロビルセンを使用する際は注意すべきと考えられることから、添付文書（案）にはこの点を記載する予定である。

4.3.3. 血小板への影響

サル 13 週間投与試験では、12 mg/kg/回群の 1 例で重度の血小板数の低値が認められた。サル 39 週間投与試験では、20 mg/kg/回群の雌雄各 3 例及び 10 mg/kg/回群の雌 1 例で、悪影響と判断された血小板数の低値が認められた（試験 44 日以降）。

血小板減少症は、サル及びヒトへの 2'-MOE ASO 投与時の毒性所見としてよく知られており[Henry, 2017]、2 つのタイプ（軽度／中等度のタイプと特異体質性／免疫介在性のタイプ）が報告されている[Crooke, 2017; Slingsby, 2022]。ベピロビルセンを投与したサルでは両タイプの血小板減少が認められた（特に 39 週間投与試験の高用量群）。サル 39 週間投与試験で悪影響と判断された血小板数減少が認められた高用量群の 6 例中 3 例では、免疫介在性タイプの重度の血小板減少（予想困難／急速な血小板数の減少又は投与中止後の血小板数の回復遅延を有す）を発現した可能性が高いと考えられた。悪影響と判断された血小板減少が認められた残りの動物では、投与期間中に血小板数が徐々に低下したこと、及び／又は投与を再開しても更なる低下が認められなかったことから、より軽度のタイプの血小板減少を示した可能性が高い（2.6.7 表 17 及び表 18）。

臨床試験でも血小板減少が認められているが（2.5.5.7.1.2）、発現頻度は低く、このことは、ヒトは 2'-MOE ASO を介した血小板への影響に対する感受性がサルよりも低いことと一致する[Crooke, 2017]。

4.3.4. 肝臓への影響

CD-1 マウスを用いた最長 26 週間投与試験では、用量依存的な肝臓への影響がみられ、その程度は投与期間に応じて増大した。10 mg/kg/回以上で好塩基性顆粒を有するクッパー細胞がみられ、これに関連して種々の程度の肝細胞の肥大及び空胞化が認められ、げっ歯類における ASO の免疫賦活作用によるクッパー細胞の活性化と一致していた[Frazier, 2015]。また、肝細胞の変化［30 mg/kg/回以上で細胞質変化、肥大（肝重量増加と関連）、巨大核、有糸分裂像増加及び単細胞壊死］に関連して、肝酵素（ALT、AST 及び GLDH）の上昇も認められた。13 及び 26 週間投与試験では、40 mg/kg/回以上でトリグリセリドの低値も認められた。13 週間の休薬期間終了後では、肝臓の組織学的変化の発現頻度及び程度は概して軽減した（ただし、13 週間投与試験の 100 mg/kg/回の雄では、投与期間終了時と比較して、肝細胞肥大の発現頻度の増加及び巨大核が認められた）（2.6.7 表 13、表 14、表 15 及び表 16）。

マウスの 2 年間がん原性試験においても、同様の非腫瘍性変化に加えて、30 mg/kg/回群で変異肝細胞巣［好塩基性、好酸球性（雌雄）又は明細胞性（雄のみ）］の発現頻度及び／又

は程度の増強が認められた（4.5 項）。他の肝細胞所見と同様、発現頻度／程度は、概して雌よりも雄で高かった（2.6.7 表 22）。

サル 13 及び 39 週間投与試験では、肝臓で血管周囲炎が認められた（4.3.2）。39 週間投与試験ではクッパー細胞内の好塩基性顆粒の蓄積もみられたが、トランスアミナーゼの増加は認められず、サルでは肝細胞障害が認められていないことと一致した（マウスで認められたものと比較して）（2.6.7 表 17 及び表 18）。

マウス及びサルのクッパー細胞で認められた好塩基性顆粒は、オリゴヌクレオチド関連物質の蓄積を示唆するものであり、悪影響ではないと考えられる[Henry, 2008]。サルでは、上述のとおり、これらの変化に関連したトランスアミナーゼの増加はみられず、肝細胞障害が認められていないことと一致する。ベピロビルセンを投与したマウスで認められた肝細胞の組織学的変化（及びそれに伴う ALT 及び AST の持続的上昇）は、げっ歯類での ASO に対する炎症反応の亢進（ヒトを含む他の動物種との比較）に関連した二次的変化であり[Henry, 2008]、これらの所見のヒトへの外挿性は低いと考えられる。

臨床試験においても一過性かつ可逆的な ALT 増加（通常、投与開始 12 週間以内に発現）が認められた（2.7.2.3.6.2）。これらは投与を継続しても回復したことから、DILI を示唆するものではないと考えられた（2.5.5.7.1.1）。

4.3.5. 腎臓への影響

CD-1 マウス及びカニクイザルを用いたそれぞれ最長 26 及び 39 週間投与試験において、血液生化学的検査及び／又は尿検査並びに病理組織学的検査により、ベピロビルセンが腎機能に及ぼす影響について評価した。両動物種における腎臓所見は、他の 2'-MOE ASO 投与時に観察された所見と一致していた[Henry, 2008; Shen, 2016]［2.6.7 表 13、表 14、表 15 及び表 16（マウス）、並びに 2.6.7 表 17 及び表 18（サル）］。

尿細管上皮細胞及び間質マクロファージにおける好塩基性顆粒の蓄積

CD-1 マウスの 13 及び 26 週間投与試験では、10 mg/kg/回以上で近位尿細管上皮細胞に、60 mg/kg/回以上では間質マクロファージに好塩基性顆粒の用量依存的な蓄積が認められた。マウス 26 週間投与試験の 60 mg/kg/回では、低頻度の尿細管上皮細胞の空胞化も認められた。なお、マウスを用いた試験におけるベピロビルセンの組織中濃度（最大 470 µg/g）（表 2）は、他の 2'-MOE ASO で尿細管の影響に対する感受性が最も高い動物種と考えられたサル[Henry, 2008]において変性所見が認められた閾値（＞2200 µg/g）を大きく下回っていた（2.6.7 表 13 及び 16）。

サル 13 及び 39 週間投与試験においても、投薬群で腎臓の近位尿細管上皮に好塩基性顆粒の蓄積が認められた。サル 13 及び 39 週間投与試験においてそれぞれ 40 mg/kg/回又は 20 mg/kg/回を投与した時のベピロビルセンの腎皮質中平均濃度（それぞれ 2240 及び 1050 µg/g）は、他の 2'-MOE ASO の 13 週間投与試験で尿細管変性が認められた閾値と、それぞれ同程度又は半分未満であった（2.6.7 表 17 及び表 18）。

尿細管上皮細胞（マウス及びサル）及び組織マクロファージ（マウスのみ）における好塩基性顆粒は、細胞内へのオリゴヌクレオチドの取込みを示唆するものであり、悪影響ではな

いと考えられる[Henry, 2008; Frazier, 2015]。マウス 13 週間及びサル 39 週間投与試験において、これに関連する変性／壊死はみられず、それぞれ 13 及び 26 週間の休薬期間終了後までに回復性を示した。ベピロビルセンの MRHD 投与時の推定腎臓中濃度は、サルを用いた試験の NOAEL 投与時の曝露量よりも 4 倍超低かった（表 2）。このことは、ベピロビルセンの MRHD 投与時の腎臓中蓄積量が、尿細管変性が生じるレベルに達する可能性は低いことを示している。

糸球体への影響

CD-1 マウス 13 及び 26 週間投与試験では、30 mg/kg/回以上で軽度の糸球体腎症が低頻度に認められた。26 週間投与試験では、13 週間の休薬期間終了後、本所見は単発的に発現し、程度の変化もみられなかったが、13 週間投与試験では休薬後に中等度の変化も認められた。この休薬期間終了後の程度の増強は予想される変化であり、他のオリゴヌクレオチド（2'-O-メチルホスホロチオアート ASO である drisapersen 等）を投与した CD-1 マウスで認められた所見と一致している[Frazier, 2015]（2.6.7 表 13、表 15 及び表 16）。

サル 39 週間投与試験では、投薬群の数例で腎臓の間質に血管及び血管周囲の炎症が認められた。20 mg/kg/回（高用量）群の数例では、これらの変化は悪影響と判断され、一般状態悪化の要因と考えられたが、これらの変化は、機序的及び病理組織学的には補体による血管への影響に関連したものと考えられる（4.3.2）[Shen, 2014; Frazier, 2015; Engelhardt, 2015]。20 mg/kg/回群では糸球体腎炎に関連した死亡／安楽死がみられ、これに関連して重度の低アルブミン血症及び腎臓の安全性に関する尿中バイオマーカー（尿蛋白／クレアチニン比の上昇、アルブミンの上昇）の変化が認められた。39 週間投与試験の 10 mg/kg/回群では腎臓に悪影響はみられず（13 週間投与試験での所見と一致）、この時の曝露量（AUC）は、MRHD 投与時の 4.9 倍に相当する（2.6.7 表 17 及び表 18）。

CD-1 マウスで認められた軽度の糸球体腎症は種特異的な変化（げっ歯類は ASO による TLR 活性化を生じやすいこと、及びこの動物種／系統が背景的にアミロイドーシスを有することに関連）であり[Frazier, 2018]、ヒトへの外挿性は低いと考えられる。これらの糸球体への悪影響は、CByB6F1 WT マウスを用いた 13 週間投与試験（GLP 適用、不純物の安全性評価を含む）では、40 mg/kg/回まで認められなかった。加齢性アミロイドーシスは、特に CD-1 マウスで顕著にみられることから、このことがベピロビルセン投与による糸球体への影響に系統差が生じた一因である可能性が考えられる。また、サルで認められた糸球体腎炎及びこれに関連する腎臓のバイオマーカーへの影響は、機序的及び病理組織学的には、ホスホロチオエート化 ASO を投与したサルでの APC 活性化に対する高い感受性に関連したものであり、これらの変化のヒトへの外挿性は懐疑的であると考えられている[Frazier, 2015; Shen, 2014]。

慢性進行性腎症（CPN）

マウス 2 年間がん原性試験では、30 mg/kg/回群の雄で投薬に関連した中等度の CPN の増悪が認められた（2.6.7 表 22）。CPN はげっ歯類における背景所見であり、加齢とともに発現頻度が増加する[Frazier, 2012]。ラットでは腎臓内の 2'-MOE ASO の濃度が高い場合に増悪

することが報告されている[Henry, 2008; Mipomersen, 2013; Frazier, 2015]。ラットにおける 2'-MOE ASO を介した CPN 増悪の機序には、クラスエフェクト（腎臓の近位尿細管での低分子量の蛋白質の再吸収阻害による尿蛋白の増加[Haas, 2001]、及び免疫反応に対する感受性の増加[Marlowe, 2017]）が関与していると考えられる。ベピロビルセンを 2 年間投与した雄マウスで認められた CPN の増悪においても同様のプロセスが原因である可能性が考えられる。重要な点として、これらの変化はげっ歯類特異的であり、ヒトへの外挿性はないと考えられる[Hard, 2009]。

ベピロビルセン投与患者には、通常、腎機能パラメータ（eGFR、蛋白尿）の評価を実施するが、これまでに臨床において APC 活性化を示唆する所見は認められていない。

4.3.6. 乳腺への影響

マウス 2 年間がん原性試験では、30 mg/kg/回群の雌で軽微～中等度の乳管拡張の発現頻度及び／又は程度の増強が認められた。また、同用量の雌 70 例中 3 例で軽微～軽度の小葉腺胞過形成及び軽微～中等度の異型過形成の発現頻度の増加が認められた。重要な点として、これらに関連する腫瘍性所見は認められなかった（2.6.7 表 22）。投薬に関連した雌生殖器の変化はみられておらず、下垂体前葉で腫瘍又は過形成は認められていないことから、乳腺の変化がホルモンに起因する可能性は低いと考えられる。

組織常在マクロファージが乳腺基底細胞の増殖を促進し、幹細胞の活性を維持するとの報告がある[Zhou, 2023]。そのため、マウスにおけるオリゴヌクレオチドによる免疫刺激の増強[Henry, 2008]及びそれに伴うマクロファージの活性化が上述した変化に関連している可能性が考えられる。ベピロビルセンを投与した雌マウスでは、乳腺に隣接する皮膚で好塩基性顆粒を有する空胞化マクロファージの増加が認められている。しかしながら、マウス 26 週間投与試験（又は 13 週間の休薬期間終了後）では、がん原性試験で用いた用量の 2 倍の用量においても、乳腺への影響はみられておらず、また、サル 39 週間投与試験でも同様の乳腺への影響は認められていない。

これらの所見の臨床的意義は不明であるが、海外で承認されている他の 2'-MOE ASO を 2 年間投与したマウスでも同様の変化が認められている[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2018; Volanesorsen, 2019]。ベピロビルセンのこれまでの臨床試験において、ヒトの乳腺への影響を示唆する所見はみられていない。なお、ベピロビルセンのヒトへの最大投与期間は 24 週間であり（2.7.4）、2'-MOE（ベピロビルセンを含む）を投与したマウスにおける乳腺の変化は、生涯投与でのみ発現することが確認されている。

4.3.7. その他の血液学的所見

マウス 13 週間投与試験では、40 mg/kg/回以上で赤血球系パラメータ（赤血球数、平均赤血球ヘモグロビン量、ヘモグロビン及びヘマトクリット）の低値（最大 14%）がみられたが（2.6.7. 表 13）、関連する組織学的所見は認められなかったことから、これらの変化は悪影響ではないと判断された。マウス 26 週間投与試験では、60 mg/kg/回の雄及び 10 mg/kg/回以上の雌で軽微～軽度の赤血球系パラメータの低値（最大 21%）がみられたが、これらの変化は休薬期間終了時までに概ね回復した（2.6.7. 表 16）。30 及び 60 mg/kg/回で投薬に関連し

て赤脾髄での細胞密度の増加（雌のみ）の発現頻度増加がみられたが、本所見は髄外造血亢進を示唆するものと考えられる。同様の赤血球への影響は、海外で承認されている他の 2'-MOE ASO を投与したマウスでも認められている[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2018; Volanesorsen, 2019]。

サル 13 週間投与試験では、8 mg/kg/回以上で網状赤血球数の低値（最大 40%）がみられたが、赤血球系パラメータ及び病理組織学的検査で変化は認められなかった（2.6.7 表 17）。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（本試験）では、全投薬群で有意な赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘマトクリット及びヘモグロビン）の低値（最大 13.2%）が認められたが、軽度であるため悪影響ではないと判断された（2.6.7 表 25）。

ベピロビルセンの臨床試験では赤血球系パラメータの減少を示す一貫した変化はみられておらず、マウス及びウサギで認められた所見のヒトへの外挿性はないと考えられる。

4.3.8. 血液凝固への影響

サル 13 週間投与試験では、試験 91 日に軽度の APTT 延長（ベースラインと比較して約 1.3 倍）が認められた（悪影響ではないと判断）（2.6.7 表 17）。本所見は 40 mg/kg/回群（高用量）でのみ一過性（投与 4 時間後に最大となり、24 時間後までにベースライン値まで回復）に認められた。サル 39 週間投与試験（高用量群には 20 mg/kg/回を投与）では同様の変化は認められていないが、その理由として、血漿中で十分な曝露にまで達していなかった可能性が考えられる。

APTT 延長は 2'-MOE ASO の最高血漿中濃度に関連した既知のクラスエフェクトであり[Henry, 2008]、悪影響ではないと判断された。本所見の発現には、内因性凝固カスケードの血漿タンパクであるテナーゼの ASO を介した阻害が関与している[Sheehan, 1998]。臨床試験においてベピロビルセン投与による凝血異常を示唆する所見はみられておらず、このことは、MRHD における Cmax（8.39 µg/mL）が APTT 延長を誘発するのに必要な ASO の血漿中濃度（50～100 µg/mL）を十分に下回っていることと一致している[Sheehan, 1998]。

4.3.9. 投与部位への影響

マウス及びサルを用いた反復投与毒性試験で認められた投与部位所見については、4.8 項で考察する。

マウス 2 年間がん原性試験では、10 mg/kg/回以上の群の雌雄で投与部位に軽微な線維化の発現頻度増加が認められた（2.6.7 表 22）。本所見は 13 及び 26 週間投与後の結果と一貫しており、ASO の炎症反応に対する感受性が高いマウスにおける慢性的かつ軽度の炎症に関連した変化と考えられる[Henry, 2008]。線維化が認められた動物で線維肉腫が認められていない、又は線維肉腫が認められた動物で投与部位の線維化がみられていないことを考慮すると、皮膚の線維化が投与部位の線維肉腫の原因ではないと考えられる（4.5 項）。

4.3.10. T 細胞依存性抗体産生（TDAR）

サル 39 週間投与試験（2.6.7 表 18）において TDAR を評価した。抗 KLH IgM 抗体産生にはばらつきがみられたが、全群で概ね同程度であった。全群で抗 KLH IgG 抗体産生がみられたが、対照群と比較して、投薬群では反応の低下が認められた。この影響は全投薬群で投与期間終了時（試験 275 日）まで有意にみられ、休薬期間終了時（試験 455 日）まで持続した。このように、ベピロビルセンのサルへの 39 週間投与により、抗 KLH IgG 抗体産生に影響がみられたが、反応は完全には消失せず、動物の一般状態に本所見に関連する明らかな影響（39 週間の投与期間中又は 26 週間の休薬期間中に易感染性を示唆する所見はみられず）は認められなかった。本所見のヒトへの外挿性は不明である。

4.3.11. 無毒性量及び曝露量比較

げっ歯類は、一般的に、霊長類（ヒトを含む）と比較して、ASO のクラスエフェクトである炎症反応に対する感受性が高く[Henry, 2008]、2’-MOE ASO の全身曝露量に基づく安全域の算出に適切な動物種ではないと考えられる。そのため、CD-1 マウスにおいてベピロビルセンの全身曝露量に基づく安全域は算出していない。一方、サルはヒトに外挿可能な ASO の代謝様式及び薬物動態プロファイルを示すため、安全域の算出はサルのデータを用いた。ベピロビルセンと同様、2’-MOE ASO の主要分布組織は腎臓及び肝臓であることから[Geary, 2009]、主要な反復投与毒性試験においても組織中濃度を評価した（表 2）。ヒトに MRHD である 300 mg を投与した時の肝臓及び腎臓中濃度を推定したが、これらの指標はリスク評価には用いていない。

サル 39 週間投与試験における NOAEL の推定

サル 39 週間投与試験では、3 mg/kg/回群の雌 1 例を自然発生性の腎疾患に伴う持続的なアルブミン低値により早期安楽死させたため、当初、NOAEL は推定されなかった（4.3.1、2.6.7 表 18）。この動物で認められた重度のアルブミン低値は、自然発生性の糸球体硬化症及びそれに関連する腎盂腎炎（カニクイザルの多くで認められる加齢性変化であり、投薬に関連したものではない）に起因する尿中蛋白排泄量の増加によるものと考えられる[Drevon-Gaillot, 2006; Chamanza, 2010; Frazier, 2018]。その他の動物において投薬に関連した悪影響は 6 mg/kg/回まで認められていない。

糸球体及びアルブミンへの影響はサルにおける ASO 投与に関連した変化である可能性が考えられたため、当初、NOAEL を推定しなかったが、6 mg/kg/回群で重度の低アルブミン血症又は腎臓での同様の組織学的所見が認められていないことを考慮すると、3 mg/kg/回群の雌 1 例で認められた蛋白尿は、ベピロビルセン投与に起因／関連したものではないと考えられる。したがって、本試験の NOAEL は 6 mg/kg/回と推定された。NOAEL 投与時の AUC0-48 及び Cmax はそれぞれ 197μg.h/mL 及び 22.5 μg/mL（サル 13 週間投与試験の NOAEL（8 mg/kg/回）での曝露量と概ね同程度）であり、これはヒトに MRHD を投与した時の AUC 0-168 及び Cmax のそれぞれ 2.01 及び 2.68 倍に相当する。

2.4. 非臨床試験の概括評価

表 1　ベピロビルセン皮下投与後の平均全身曝露量の比較結果

Species (Duration)	Dose (mg/kg/dose)	AUC_{0-48} (μg.h/mL)		Ratio of Animal to Human Exposure[c]	Cmax (μg/mL)		Ratio of Animal to Human Exposure
		Day 1	End of Study		Day 1	End of Study	
Mouse (CByB6F1 WT) (13 Weeks)[d] 2019N406770	4	5.64	7.43	0.08[e]	4.73	4.38	0.52[e]
	12	22.5	27.6	0.28[e]	16.0	13.9	1.66[e]
	40	**87.4**	**116**	**1.18[e]**	**52.8**	**42.2**	**5.03[e]**
Monkey (cynomolgus) (13 Weeks) 2019N417078	4[a]	72.0 [34.9-92.9]	65.4 [44.2-107]	0.67	40.5 [23.5-50.4]	11.4 [4.35-16.2]	1.36
	8[a]	**165 [137-184]**	**179 [141-259]**	**1.82**	**67.8 [57.7-82.7]**	**27.0 [16.4-37.1]**	**3.22**
	12[a]	231 [181-319]	309 [174-593]	3.15	119 [101-151]	34.4 [21.6-47.8]	4.10
	40[b]	848 [727-973]	1470 [750-1390]	14.97	80.7 [60.3-131]	61.8 [48.2-89.2]	7.37
Monkey (cynomolgus) (39 Weeks) 2019N419364	3	37.5 [26.2-77.3]	83.4 [29.7-159]	0.85	8.8 [5.3-19.8]	7.71 [3.6-12.6]	0.92
	6	**114 [85.5-167]**	**197 [74.7-306]**	**2.01**	**23.8 [17.6-41.6]**	**22.5 [9.8-41.4]**	**2.68**
	10	208 [170-270]	480 [190-1430]	4.89	28.9 [23.0-44.9]	31.1 [8.8-83.3]	3.71
	20	475 [335-587]	1240 [503-2900]	12.63	52.7 [43.0-63.1]	62.9 [40.9-99.9]	7.50
Human[c]	300	98.2		-	8.39		-

表 1　ベピロビルセン皮下投与後の平均全身曝露量の比較結果（続き）

Note: Numbers in brackets indicate [minimum-maximum] range.
Key:
a = Animals were dosed IV on Days 1, 3, 5, then weekly SC doses from Day 7 of Week 1 to Day 91 (Week 13).
b = Animals were dosed SC on Days 1, 3, 5, then weekly from Day 7 of Week 1 to Day 91 (Week 13). c = AUC0-168.
c = Plasma pharmacokinetics in chronic hepatitis B patients following administration of 300 mg total SC dose in clinical study modelling (data presented in IND122685 EOP2 meeting package, Oct 2022; clinical study 209668; see m2.5, Section 3.2 and Phase 2 Population PK report, Table 14, RPS- CLIN-113368).
d = Exposure values were derived from composite sampling with n=3/sex/dose at each timepoint.
e = Systemic exposures defined in the mouse are not being used to inform risk assessment as in general, rodents are more sensitive to the class-related pro-inflammatory effects of ASOs as compared to primates (including human) and therefore not considered an appropriate species for the calculation of systemic safety margins [Henry, 2008]. Bepirovirsen (also known as GSK3228836) is extensively distributed into the kidney and liver, and tissue concentrations are considered more important measures of drug distribution in rodents.
NOAEL = No observed adverse effect level is indicated in **BOLD.**

表 2 マウス及びサルにベピロビルセンを皮下投与した時の平均腎臓及び肝臓中濃度

Species (Duration) (No. animals/sex/group) Report No	Dose (mg/kg)	Kidney (µg/g Tissue)		Ratio of Animal to Human Kidney Exposure[b]	Liver (µg/g Tissue)		Ratio of Animal to Human Liver Exposure[c]
		Male	Female		Male	Female	
Mouse (CD-1) (13 Weeks) (n=6M/6F) 2019N417087	4	36.1	55.4	0.35	20.1	12.3	0.09
	12	**54.8**	**137**	**0.73**	**57.0**	**58.4**	**0.34**
	40	86.8	163	0.95	226	157	1.11
	100	159	440	2.27	459	304	2.22
Mouse (CD-1) (13 Weeks) (n=6M/6F) 2021N488385	**12**	70.0	198	1.02	48.8	42.9	0.27
Mouse (CByB6F1 (Wild Type)) (13 Weeks) (n=6M/6F) 2019N406770	4	67.4	103	0.65	30.0	28.2	0.17
	12	94.4	223	1.20	119	136	0.74
	40	**168**	**377**	**2.06**	**251**	**213**	**1.35**
Mouse (CD-1) (26 Weeks) (n=12M/12F+6M/6F[R]) 2019N419097	3	31.7	38.1	0.26	9.5	9.3	0.05
	10	**58.4**	**131**	**0.72**	**68.3**	**40.1**	**0.32**
	30	89.9	215	1.15	183	113	0.86
	60	134	470	2.29	315	221	1.56
Mouse (CD-1) (104 Weeks) (n=70M+6M tissue analysis) 2021N489170	3	28.2	44.9	0.28	14.4	14.4	0.08
	10	76.7	147	0.85	43.6	43.6	0.25
	30	85.7	229	1.19	161	121	0.82
Monkey[a] (cynomolgus) (13 Weeks) (n=3M/3F+2M/2F[R]) 2019N417078	4	420		3.18	241		1.40
	8	**623**		**4.72**	**467**		**2.72**
	12	1020		7.73	581		3.38
	40	2240		16.97	1040		6.05
Monkey[a] (cynomolgus) (39 Weeks) (n= Up to 7M/7F) 2019N419364	3	314		2.38	191		1.11
	6	**709**		**5.37**	**353**		**2.05**
	10	911		6.90	441		2.56
	20	1050		7.95	532		3.09

Key:
a = No gender differences were observed, therefore average data is provided for monkey.
b = Based on PBPK Modelling, the estimated human kidney exposure following 300 mg dose = 132 µg/g tissue (GSK Study No. 2024N562088).
c = Based on PBPK Modelling, the estimated human liver exposure following 300 mg dose = 172 µg/g tissue (GSK Study No. 2024N562088).
NOAEL = No Observed Adverse Effect Level (**bolded**); R = Recovery; NA = Not Applicable.

4.4. 遺伝毒性

細菌を用いた復帰突現変異試験において、ベピロビルセンはいずれの菌株（ネズミチフス菌及び大腸菌）に対しても、S9-mix の有無にかかわらず、5000 µg/plate までの濃度で変異原性を示さなかった（2.6.7 表 19）。また、CHL 細胞を用いた染色体異常試験において、S9-

mix の有無にかかわらず、500 µg/mL までの濃度で染色体異常誘発性を示さなかった（2.6.7 表 20）。CD-1 マウスにベピロビルセンの 2000 mg/kg までを単回皮下投与した in vivo 骨髄小核試験において、ベピロビルセンは遺伝毒性を示さなかった（2.6.7 表 21）。

ベピロビルセンの配列にはトリプレックス形成に必要な長さのポリプリン又はポリピリミジンストレッチは含まれていないため[Kuan, 2004; Jain, 2008; Berman, 2016]、ベピロビルセンが部位特異的突然変異を誘導するリスクはないと考えられる。また、シークエンス解析及びその後に実施した in vitro 試験の結果、ベピロビルセンは HBV RNA に対して非常に特異的であり、ヒト mRNA に対するハイブリダイゼーションを介したオフターゲット作用を示す可能性は低いことが示された（2 項）。これらの解析結果において、DNA 修復、細胞周期の調節又は有糸分裂キナーゼのような理論的に遺伝毒性を誘発する可能性があるオフターゲット mRNA は確認されなかった。

4.5. がん原性

CD-1 マウスを用いた 2 年間がん原性試験では、表 3 に詳述したように、投薬に関連した肝腫瘍、線維肉腫及び全身血管肉腫／血管腫の発現頻度増加が認められた（2.6.7 表 22）。

表 3 CD-1 マウスを用いた 2 年間がん原性試験における投薬に関連した腫瘍病変

Tumor Type	Sex	Dose (mg/kg/dose)
Hepatocellular carcinoma	Male Female	10 30
Hepatocellular adenoma	Male Female	30
Liver hemangiosarcoma	Males Females	3 30
Liver hemangioma	Males Females	30 Not Observed
Fibrosarcoma (injection site)	Males Females	10 Not Observed
Fibrosarcoma (skin proximate to the injection site)	Males Females	30 Not Observed
Whole Body hemangiosarcoma	Males Females	30 10
Combined hemangiosarcoma/ hemangioma	Males Females	30

マウスがん原性試験で設定した 30 mg/kg/回は、体表面積換算で、ヒトにベピロビルセンの MRHD である 300 mg/週を投与した時の約 0.5 倍に相当する（表 4）。投薬に関連した腫瘍性所見は 3 及び 10 mg/kg/回群でも認められている。マウスでは 2’-MOE ASO のクリアランスが、ヒト及びその他の動物種よりも著しく高く[Wang, 2019]、このことを考慮して体重補正係数を適用した場合は、約 0.9 倍とわずかに高くなる（表 4）。

海外で承認されている 2’-MOE ASO で、かつマウスの 2 年間がん原性データが利用可能なものとして、volanesorsen 及び mipomersen の 2 つの薬剤がある（表 5 及び表 6）。ベピロビルセン投与により肝細胞腺腫及び血管肉腫の増加がみられた時の用量は、volanesorsen と

同程度であったが、volanesorsen では肝細胞癌の増加は認められなかった。Mipomersen では、MRHD の約 1.5 倍の用量で同様の腫瘍が認められた。

表 4　CD-1 マウス 2 年間がん原性試験で用いたベピロビルセンの用量及び最大推奨臨床用量との比較（mg/kg、体表面積及び体重補正換算に基づく）

Mouse Dose (mg/kg/dose)	Ratio of Mouse to MHRD* Based on mg/kg Dose	Ratio of Mouse to MHRD* Based on BSA Scaling[&]	Ratio of Mouse to MHRD* Based on Adjusted Bodyweight Scaling[$]
3	0.6	0.05	0.09
10	2.0	0.16	0.29
30	6.0	0.49	0.86

Key: MHRD = Maximum Human Recommended Dose. BSA = Body Surface Area.
*Assumes MHRD of 300 mg/week dose in a 60 kg human = 5 mg/kg
[&]Assumes mouse to human body surface area (BSA) scaling factor of 12.3 [Nair, 2016]
[$]Assumes a mouse to human body weight adjusted scaling factor for 2MOE ASOs of 7.0 [Wang, 2019]

表 5　CD-1 マウス 2 年間がん原性試験で用いた volanesorsen の用量及び最大推奨臨床用量との比較（体表面積及換算に基づく）並びにベピロビルセンと共通する腫瘍性所見

Dose in mg/kg (Used in mouse 2-year carc. study)	Margin versus 285 mg[a] MHRD (BSA comparison[b])	Tumor observation (in common with bepirovirsen)
6	0.1x	- Hepatocellular adenoma - Hemangiosarcoma
25	0.43x	- Hepatocellular adenoma - Hemangiosarcoma
40	0.68x	- Hepatocellular adenoma - Hemangiosarcoma
25 (rodent surrogate)	N/A	- Hepatocellular adenoma - Hemangiosarcoma

Key: MHRD = Maximum Human Recommended Dose. BSA = Body Surface Area.
a = Assumes MHRD of 285 mg/week dose in a 60 kg human = 4.755 mg/kg
b = Assumes mouse to human body surface area (BSA) scaling factor of 12.3 [Nair, 2016]

表 6 CD-1 マウス 2 年間がん原性試験で用いた mipomersen の用量及び最大推奨臨床用量との比較（体表面積及換算に基づく）並びにベピロビルセンと共通する腫瘍性所見

Dose in mg/kg (Used in mouse 2-year carc. study)	Margin versus 200 mg[a] MHRD (BSA comparison[b])	Tumor observation (in common with bepirovirsen)
5	0.12x	Not Observed
20	0.49x	Not Observed
60	1.48x	- Fibrosarcoma - Hepatocellular adenoma (and hepatocellular adenoma and carcinoma combined) - Hemangiosarcoma
60 (rodent surrogate)	N/A	- Fibrosarcoma - Hepatocellular adenoma

Key: MHRD = Maximum Human Recommended Dose. BSA = Body Surface Area.
a = Assumes MHRD of 200 mg/week dose in a 60 kg human = 3.3 mg/kg
b = Assumes mouse to human body surface area (BSA) scaling factor of 12.3 [Nair, 2016]

ベピロビルセン投与により増加が認められた腫瘍は、海外で既に承認されている 2'-MOE ASO である mipomersen 及び volanesorsen 並びにそれらのげっ歯類でのサロゲートで報告されたものと定性的に類似していた（表 5 及び表 6）[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2018_OnS_HypTool_76290]。肝細胞癌、肝細胞腺腫及び血管肉腫の発現頻度は、ベピロビルセンで顕著に高かった。しかしながら、以下に詳述する評価結果に基づくと、マウス 2 年間がん原性試験で観察された腫瘍のヒトへの外挿性は低いと考えられる。

肝細胞癌及び肝細胞腺腫は、ベピロビルセンを投与したマウスで観察された慢性的な肝細胞障害及びそれに伴う肝細胞の増殖／再生反応の亢進に起因するものと考えられる。注目すべき点として、雄マウスでは、雌と比較して、非腫瘍性の肝臓所見の程度の増強がみられており、これに関連して肝腫瘍の発現頻度も雄で高かった。ベピロビルセンを投与したマウスで観察された肝細胞における一連の影響は、ヒト及びサルと比較して、マウスにおいて 2'-MOE ASO の炎症反応に対する感受性が高いことを示している[Henry, 2008]。マウスは特に肝臓での増殖シグナルに対して感受性が高く、肝腫瘍を発症しやすいが、これらの腫瘍は必ずしも臨床的に意義のあるものではない[McClain, 1989; Greaves, 2007; Stoot, 2010]。サル 39 週間投与試験では、マウスよりも高い曝露量を示したが、肝細胞障害及びそれに関連した増殖／再生反応は認められていない。また、臨床試験においても、DILI を示唆する所見は認められていない。ベピロビルセン投与 CHB 患者において一過性の ALT 増加がみられたものの、投与を継続しても回復性を示したことから、ウイルスクリアランスに関連したものと考えられる。臨床での ALT 増加の原因は、マウスで認められた持続的な肝細胞障害によるものとは異なると考えられ、このことはマウスがん原性試験で認められた肝細胞の腫瘍性変化のヒト（CHB 患者を含む）への外挿性が低いことを裏付けるものと考えられる。

ベピロビルセンを投与したマウスで観察された血管肉腫／血管腫の増加は、ASO の免疫促進作用による慢性的なマクロファージ活性化[Frazier, 2015]及び軽度の低酸素（反復投与毒

性試験での赤血球系パラメータの低下によって示される）に起因する可能性が考えられる[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2018]。遺伝学的に血管肉腫／血管腫を生じやすいマウスでは、マクロファージの活性化及び低酸素が制御不能な血管新生を促進することが知られている[Cohen, 2009]。また、ベピロビルセンを投与した CHB 患者において低酸素を示す所見が認められていないこと、ヒトでは 2'-MOE ASO の炎症反応に対する感受性が低いこと[Henry, 2008]を考慮すると、マウスにおけるクラスエフェクトと考えられるこれらの腫瘍のヒトへの外挿性は低いと考えられる。また、注目すべき点として、CHB 患者においてこの腫瘍の発現リスクは上昇していないことが示されている[Song, 2019]。

げっ歯類では、ASO を慢性的に皮下投与することにより、線維芽細胞の増殖性変化が生じ、その結果、投与部位の線維肉腫が生じることが報告されている[Mipomersen, 2013]。本所見は慢性的な局所刺激／炎症及びサイトカイン放出によるものであり、ヒトへの外挿性は低いと考えられている[Rundhaug, 2010]。これに一致する所見として、ベピロビルセンを投与したマウスでは、好塩基性顆粒を有するマクロファージ（種々の程度の細胞質空胞化を伴う）の集簇が用量依存的に認められた。

ベピロビルセンのマウスを用いた反復投与毒性試験でみられた非腫瘍性病変が、2 年間がん原性試験で認められた腫瘍の形成促進及び進行に関与している可能性が考えられる。ベピロビルセンでは、mipomersen 又は volanesorsen と比較して、主要な非腫瘍性病変がより早期又は低用量から発現したことが、他の 2'-MOE ASO よりもこの種の腫瘍の発現頻度が高い理由に関連している可能性がある。

4.6. 生殖発生毒性

ベピロビルセンは雌雄マウスの受胎能及び妊娠マウスの初期胚発生に影響を及ぼさず、雌雄ともに忍容性は概ね良好であったが、52.5 及び 87.5 mg/kg/週群の雄で用量依存的な肝毒性が認められた。52.5 及び 87.5 mg/kg/週群の動物の胎盤組織中にベピロビルセンは低濃度（肝臓中濃度の 5.4%以下）で存在したが、胎児の肝臓組織中では検出されなかった［定量下限（10 μg/g）以下］ことから、胎児への曝露は認められない又はわずかであることが示された。体表面積換算での比較に基づくと、NOAEL である 87.5 mg/kg/週は、MRHD（週 1 回）の約 1.4 倍に相当する（ヒト体重 60 kg と想定）（2.6.7 表 24）。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（本試験）では、ベピロビルセン投与による胚・胎児発生への影響はみられず、着床率、並びに胎児の外表、骨格及び内臓の奇形・変異の発生頻度に影響は認められなかった。88.2 mg/kg/週群で母動物毒性（体重・摂餌量の低値）がみられ、軽度の胎児体重の低値（10.3%）が認められたが、母動物毒性に対する二次的影響と考えられた。胎盤組織中のベピロビルセン濃度は低かったが（母動物の肝臓中濃度の 7%以下）、胎児の肝臓中濃度は定量下限（10 μg/g）以下であり、胎児への曝露は認められない又はごくわずかであることが示された。体表面積換算での比較に基づくと、無影響量（NOEL）である 44.1 mg/kg/週及び影響量である 88.2 mg/kg/週（母動物毒性に関連した、悪影響ではない胎児体重の低値）は、MRHD（週 1 回）のそれぞれ約 2.9 及び 5.7 倍に相当する（ヒト体重 60 kg と想定）（2.6.7 表 25）。

2.4. 非臨床試験の概括評価

マウスを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、ベピロビルセン投与による分娩、授乳及び出生児の発生への影響は認められなかった（2.6.7 表 26）。87.5 mg/kg/週を投与した時の母動物の平均肝臓中濃度は、分娩後 21 日で 898.8 µg/g であり、乳汁中（分娩後 10 日）並びに分娩後／生後 10 日及び分娩後／生後 21 日の出生児の肝臓中濃度はわずか（母動物の肝臓中濃度の 1.0%以下）であった（52.5 mg/kg/週以上の F1 出生児では乳汁中及び肝臓中で定量下限を超える濃度で検出）。母動物の生殖能並びに F1 及び F2 マウスにおける出生前及び出生後の発生に対する NOAEL は 87.5 mg/kg/週と推定され、この用量は MRHD（週 1 回）の約 1.4 倍に相当する（ヒト体重 60 kg と想定）

表 7　雌マウス及びウサギにベピロビルセンを皮下投与した時の平均胎盤及び肝臓中濃度

Species (study type)	Dose (mg/kg/Dose)	Gestation Day	N	Maternal Liver (µg/g)	Placenta (µg/g)	Fetal Liver (µg/g)
Mouse (FEED)	3	GD18	4	39.7	BLQ	BLQ
	15	GD18	5	217	4.23	BLQ
	25	GD18	4	328	17.6	BLQ
Rabbit (EFD)	6	GD20	2	194	BLQ	BLQ
		GD28	4	82.5	BLQ	BLQ
	12.6	GD20	2	452	20.6	BLQ
		GD28	5	160	BLQ	BLQ
	25	GD20	2	796	51.5	BLQ
		GD28	5	392	11.2	BLQ
Mouse (PPND)	3	10	6	77.82	BLQ	BLQ
		21	6	255.83	NM	BLQ
	15	10	5/6	456.17	0.01	0.04
		21		476.60	NM	0.05
	25	10	24*	830.00	0.03	0.18
		21	24*	898.83	-	0.14

Note: All studies were conducted with bepirovirsen (also known as GSK3228836)
Key:
PPND = Pre and Postnatal Development
FEED = Fertility and Embryofetal Development.
EFD = Embryofetal Development
BLQ = Below limits of quantification.
NM = not measured

4.7. 幼若動物を用いた毒性試験

本承認申請は 18 歳以上の患者を対象とした CHB の治療を目的としているため、幼若動物を用いた毒性試験は実施していない。

4.8. 局所刺激性

マウス 13 及び 26 週間投与試験では、全投薬群で皮下投与部位にマクロファージ内の好塩基性顆粒の蓄積が認められた。本所見はオリゴヌクレオチド関連物質の存在を示すものであり、毒性学的に意義のある変化ではないと考えられる[Frazier, 2015]（2.6.7 表 13 及び表 16）。また、投与部位で空胞化マクロファージ及び単核細胞浸潤の発現頻度及び程度の増加がみられたが、これらはげっ歯類における ASO による炎症反応に対する高い感受性を反映したものと考えられる[Henry, 2008]。

サル 13 週間投与試験では、様々な程度の浮腫及び線維化が認められたが、これらの変化は投与処置による外傷又は投与液量に関連するものであり、投薬に関連するものではないと考えられた（2.6.7 表 17）。39 週間投与試験では、肉眼的所見（変色、痂皮形成、腫脹、打撲／擦過傷）は概ね 1 週間以内に回復したことから、投与処置に関連した軽度の損傷又は出血に伴う変化と考えられた（2.6.7 表 18）。一部の動物では 3 週間以上連続して認められ、概ね試験 245 日以降に観察された（ただし、20 mg/kg/回群の雌では試験 147 日から肉眼的所見が認められた）。

投与部位の病理組織学的検査では、投薬群（3 mg/kg/回以上）において、真皮及び／又は皮下組織で軽微～中等度の単核細胞浸潤、皮下組織で軽微～軽度のマクロファージ浸潤及び軽微～中等度の線維化が認められた。10 mg/kg/回以上の群では、好中球浸潤の程度の増強が認められた（対照群で軽微に対して軽度）。剖検時に観察された投与部位の肥厚に関連して、10 mg/kg/回以上で線維化が認められた。

以上より、サル 13 及び 39 週間投与試験では、投与部位に重度／悪影響と判断される変化は認められず、それぞれ 40 及び 20 mg/kg/回までの用量で忍容性は良好であり、過度の刺激性を示唆する所見は認められなかった。

4.9. 光毒性

ベピロビルセンの最大吸収波長は 256 nm であるが、約 290～300 nm［太陽光の波長内（すなわち 290～700 nm [ICH S10, 2013]）］まで吸収帯が存在している（3.2 S.3.1）。しかしながら、ベピロビルセンは、治療用オリゴヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドは原則、ICH S10 ガイドラインの対象外と考えられるため、ベピロビルセンの光毒性試験は実施していない。

マウス及びサルを用いた反復投与毒性試験では、投与後のベピロビルセン濃度が比較的高いことが予想される投与部位（4.8 項）を含め[Geary, 2009]、光毒性と一致すると考えられる所見は認められなかった（4.3 項）。また、ベピロビルセンのような 2’-MOE ASO は、投与部位周囲の皮膚以外に、皮膚又は眼（光毒性が発現する可能性が最も高い組織[ICH S10, 2013]）に顕著に分布しないことが報告されている[Geary, 2009; Post, 2019]。

4.10. ミトコンドリア毒性

2’-MOE ASO のクラスエフェクトとしてミトコンドリア毒性は報告されていないため[Henry, 2008]、ベピロビルセンの in vitro ミトコンドリア毒性評価は実施していない。マウス及びサルを用いた反復投与毒性試験（4.3 項）では、ミトコンドリア機能障害を示唆する所見は認められておらず、両動物種で観察された変化は、2’-MOE ASO による既知の種特異的なクラスエフェクトに直接関連したものであった[Henry, 2008]。

ベピロビルセンは、ミトコンドリアのトランスクリプトームを含むヒト RNA と比較して、HBV RNA 転写産物に対して高い特異性を示す（2 項）。したがって、ヒトにおいて、ミトコンドリア機能に関連する影響も含め、ハイブリダイゼーションを介したオフターゲット作用が生じる可能性は低いと考えられる。

4.11. マウス脾臓細胞におけるサイトカイン誘導

マウス脾臓細胞を用いた in vitro 試験において、ベピロビルセン（40～1000 μg/mL）のサイトカイン産生誘導能を評価した結果、200 及び 1000 μg/mL の濃度で IP-10、MIP-1α 及び TNF-α の顕著な増加（濃度依存的、2 倍以上、統計学的に有意）が認められた（2.6.7 表 27）。なお、ヒト PBMC を用いて実施したより詳細かつヒトに外挿性のあるサイトカイン放出試験の結果については、2.1 項に示す。

4.12. ベピロビルセン及び標準治療薬である核酸アナログ（NA）併用時の非臨床安全性評価

ベピロビルセン及び B 型慢性肝炎の標準治療薬として併用投与される NA の毒性データを総合的に評価した結果、TDF／TAF 及びエンテカビルによる相加的／相乗的な影響について検討するための追加の非臨床試験は必要ないと考えられる。

NA との併用による相加的／相乗的な作用を示唆する毒性所見は認められず、添付文書に示す肝臓及び腎臓の安全性に関するモニタリングにより十分に管理可能と考えられる。また、ベピロビルセンと NA の併用による臨床使用経験は、追加の非臨床試験によって得られる情報よりも、より関連性が高く、有益であると考えられる（2.7.4）。

4.13. 不純物／分解生成物／添加物／抽出物

オリゴヌクレオチド関連化合物（中間体、不純物及び分解生成物等）は、ICH M7 ガイドラインの対象外である。また、[redacted]不純物［ 不純物A* 、 不純物B* 、 不純物C* 、 不純物D* 、 不純物E* 、 不純物F* 、 不純物G* 、[redacted]不純物、[redacted]不純物、類縁物質総量）は、いずれもオリゴヌクレオチド関連化合物であるため、ICH M7 ガイドラインの適用外である（3.2.S.4.1）。

ベピロビルセンの不純物の安全性確認の必要な閾値は、ベピロビルセンの MRHD が 300 mg であることに基づき 1.5% w/w に設定されている。この基準は Capaldi らの概説に示された原則に基づいて設定されており[Capaldi, 2017]、EMA で定義された基準とも一致している[EMA, 2024]。不純物集団の個々の不純物を分離して定量することが不可能な場合には、安全性確認の必要な閾値として 1.5% w/w を不純物集団全体に適用している。ベピロビルセンの[redacted]不純物群及びそれらの安全性確認の必要な閾値については 3.2.S.4.1 に示す。

変異原性を示す又は変異原性を示す可能性がある低分子不純物（ニトロソアミンを含む）が原薬中に存在する可能性について検討するために、市販用製剤の原薬の合成経路に関する評価を ICH M7 ガイドラインに従って実施した。

＊新薬承認情報提供時に置換

4.13.1. 出発原料、中間体及び試薬

ベピロビルセンの市販用製剤の原薬の合成経路の評価により、[redacted]（[redacted]、synthesis reagent）、[redacted]（[redacted]、synthesis reagent impurity）及び[redacted]（synthesis by-product）が変異原性物質として特定された（ICH M7 のクラス 1 及び 2）。これらの不純物は、ICH M7 オプション 4 に従って、化学反応性や物理的な工程を通して、最終原薬中では毒性学的懸念の閾値を超えて存在しないように管理される。

その他のすべての出発物質、試薬又は合成中間体は、遺伝毒性の可能性を示すアラート構造を有しておらず（DEREK 及び/又は Leadscope）、Ames 試験で変異原性を示さないことが確認されたため、ICH M7 クラス 5 と判断した。

ベピロビルセン製剤に使用する添加剤は、安全性／有効性が確立された一般的な添加剤であり（3.2.P.4）、添加剤の規格は日本、欧州及び米国薬局方に準拠している。薬局方に記載されている以上の管理は実施していない。

ベピロビルセンの合成経路の評価により、予定臨床用量において、変異原性を示す又は変異原性示す可能性がある不純物（Ames 試験及び／又は Derek／Leadscope により判定）が毒性学的懸念の閾値を超えるレベルで最終原薬中に存在する可能性はないことが示された[ICH M7, 2014]。

以上より、ベピロビルセンの原薬規格において設定された不純物プロファイル及び不純物の限度値（3.2.S.4.1）が最終製剤の安全性に影響を及ぼすことはないと考えられた。

5. 総括及び結論

ベピロビルセンの臨床使用に際しては、ベピロビルセンの 300 mg を最初の 2 週間は週 2 回投与し、それ以降の投与 3～24 週は週 1 回投与する。ベピロビルセンを用いて実施した非臨床データは、ベピロビルセンのヒトでの皮下投与を支持するものであった。

5.1. 副次的薬理試験及び安全性薬理試験

バイオインフォマティクス解析及びその後に実施した in vitro 試験の結果から、ベピロビルセンがヒト mRNA に対して作用する可能性は極めて低く、HBV mRNA に対して高い特異性を有することが確認された。

ベピロビルセンは弱い TLR8 活性化作用を有することが示され、その作用は免疫細胞（単球、樹状細胞及び NK 細胞）に発現する TLR8 を介している可能性が示唆された。ベピロビルセンの主たる薬理作用は HBV の複製阻害による抗ウイルス作用であるが、TLR8 を介する自然免疫系の活性化も薬効の一部に寄与する可能性が考えられた。

安全性薬理試験では、マウス（末梢及び中枢神経系に及ぼす影響）及びサル（呼吸及び心血管系に及ぼす影響）の試験において、それぞれ 300 mg/kg 及び 40 mg/kg までの用量で単回皮下投与しても、ベピロビルセン投与による影響は認められなかった。In vitro hERG アッセイにおいて、ベピロビルセンは、hERG 電流を阻害しなかった。

5.2. 薬物動態

5.2.1. PK 及びバイオアベイラビリティ

ベピロビルセンの PK プロファイルを一連の in vivo 及び in vitro 試験により検討した。マウスに 13 及び 26 週間、カニクイザルに 13 及び 39 週間皮下投与した時の血漿中及び組織中（腎臓及び肝臓）のベピロビルセン濃度を測定した。マウスに皮下投与した時、試験 1 日及び 91 日の Tmax は、雌雄とも概して投与後 0.5 時間であった。AUC は用量依存的に増加し、性差は認められなかった。

カニクイザルに単回及び最長 39 週間反復皮下投与した時の Tmax は 1～4 時間と推定された。静脈内投与（試験 1 週の負荷投与）及びその後の 2～13 週までの皮下投与後の Cmax 及び AUC は、用量依存的に増加した。39 週間までの反復皮下投与試験では、Cmax は概して用量比をわずかに下回って増加したが、AUC0-48 は単回投与後には用量に比例して増加したが、反復投与後には用量比を上回って増加した。

カニクイザルでは、静脈内投与後の Cmax は皮下投与後よりも高く、これは皮下投与後の吸収が遅いことによる Tmax の遅延と一致していた。しかし、AUC は 2 つの投与経路間で同程度であったことから、ベピロビルセンは皮下投与後に完全に吸収されることが示唆された（皮下投与時の F＞80%）。

5.2.2. 分布

このクラスの分子と一致して、ベピロビルセンの高い血漿タンパク結合率は親水性相互作用によるものであり、親和性が低く、非特異的であると考えられる。ベピロビルセンの血漿タンパク結合率はマウスで 91.6%超、サルで 98.3%超、ヒトで 94.9%超であった。

サルでは、腎臓及び肝臓中濃度は全用量範囲で用量比を下回って増加した。26 週間までの試験において、13 週間の休薬期間後、マウスの高用量群の肝臓並びにサルの肝臓及び腎臓でベピロビルセンが定量された。肝臓中濃度は雌雄マウスで同程度であり、概して用量に比例して増加した。一方、腎臓中濃度は用量比を下回って増加し、雌マウスの腎臓曝露量はすべての用量で雄マウスより有意に高かった。サルの 39 週間試験では、26 週間の休薬期間終了時に採取した肝臓及び腎臓試料中のベピロビルセン濃度はすべて定量下限未満であった。

13 週間反復投与したマウスの肝臓及び腎臓におけるベピロビルセンの細胞分布を、in situ ISH 法及び IHC 法を用いて解析した[Spencer-Dene, 2023]。ベピロビルセンの肝臓での分布は既報のデータ[Prakash, 2014]と一致しており、ベピロビルセンの大部分（約 85%）が非実質細胞に、約 15%が肝細胞に分布した。腎臓ではベピロビルセンは主に皮質に認められ、近位尿細管細胞に分布した。

受胎能及び胚・胎児発生に関する併合試験における妊娠 CD-1 マウスの胎児の肝臓並びに胚・胎児発生に関する試験における妊娠 NZW ウサギの胚及び胎児の肝臓でベピロビルセンの濃度は定量下限未満であったことから、ベピロビルセンは胚・胎児に移行しにくいことが示された。マウス PPND 試験では、乳汁中及び出生児肝臓中のベピロビルセンの曝露量はごくわずか（母動物肝臓中濃度の 1.0%未満）であったことから、乳汁を介した移行性は低いことが示された。

PBPK モデルにより、ヒト肝臓及び腎臓における Cmax はそれぞれ 172 µg/ mL 及び 132 µg/mL と予測された。

5.2.3. 代謝

マウス、ウサギ、カニクイザル及びヒトの肝 S9 画分とのインキュベーションにより、ベピロビルセンの in vitro 代謝安定性を評価した。また、マウス及びカニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験で肝臓及び腎臓におけるベピロビルセンの in vivo 代謝を評価したところ、類似の ASO の代謝と同様であった[Geary, 2015; Post, 2019]。いずれの動物種においても、主要な薬物関連物質は未変化体のベピロビルセンであり、その代謝物のパターンから、このクラスの他のギャップマーと同様に、ベピロビルセンは DNA 鎖の内部で切断されて半量体になることが示唆された。

B-well 試験（202009 試験）から採取したヒト血漿検体の定性的解析では、その代謝プロファイルは非臨床動物種で認められたものと類似しており、このクラスの他の ASO ギャップマーとも同様であった。ベピロビルセンのヒト代謝プロファイルは非臨床動物種での代謝プロファイルと質的に類似していることから、ヒト代謝物は非臨床動物種の代謝物に十分含まれていると考えられた[Geary, 2015; Yu, 2016; Post, 2019].

5.2.4. 排泄

他の ASO を用いた試験に基づくと、ベピロビルセンは組織での代謝を受けて短鎖化代謝物となり、腎排泄を介して消失すると予想される[Geary, 2015]。なお、健康被験者を対象とした第 1 相試験（213725 試験）で実施したベピロビルセンの尿中濃度測定については、2.7.2.3.3.5 に示す。

5.2.5. 薬物相互作用

ベピロビルセンの酵素及びトランスポーターとの薬物相互作用に関する包括的な in vitro 評価の結果に基づき、相互作用を及ぼす又は相互作用を受ける可能性について検討した結果、臨床的に重大なリスクは認められなかった。

5.3. 毒性

ベピロビルセンの毒性試験に用いる動物種として、マウス及びサルは 2’-MOE ASO を用いた試験で一般的に使用されていること、豊富な背景データが利用可能であること、皮下投与時に十分な曝露量を示していること、並びに動物種間で代謝が類似していることから、マウス及びサルが適切と考えられた。ベピロビルセンは HBV RNA（非 HVB 感染動物種では発現していない）を標的とすることから、動物種の選択に際して薬理学的意義は考慮していない。

5.3.1. 反復投与毒性

マウス及びサルにベピロビルセンをそれぞれ最長 26 及び 39 週間投与した時の毒性所見は、これらの動物に他の 2'-MOE ASO を反復投与した時に認められたものと概ね一致していた[Henry, 2008]。マウスにおける標的臓器は腎臓、肝臓、赤血球系及び投与部位であり、一般的に、これらの変化はげっ歯類における ASO による炎症反応に対する感受性の高さを反映したものと考えられた[Henry, 2008]。サルにおける主要所見として、血小板減少、並びに持続的な補体活性化［古典経路ではなく副経路（APC）を介す］による低アルブミン血症、血管炎及び糸球体腎炎が認められた。また、両動物種において複数の組織で、オリゴヌクレオチド関連物質の蓄積（悪影響ではないと判断）を示唆する好塩基性顆粒を有するマクロファージの増加が認められた。両動物種における毒性変化は、サルの補体活性に関連した血管炎を除き、概して可逆的（又は休薬群で回復傾向を示す）であった。

サルでは、ベピロビルセン投与により軽度／中等度のタイプと特異体質性／免疫介在性のタイプの血小板減少が認められた。ベピロビルセンの臨床試験においても同様の影響がみられているが、発現頻度は低く、ヒトは 2’-MOE ASO を介した血小板減少症に対する感受性が低いことと一致する[Crooke, 2017]。しかしながら、サル 39 週間投与試験の高用量群では、血小板減少に関連した死亡／瀕死状態（出血又は血栓に関連した変化による）がみられていることから、添付文書（案）では、血小板のモニタリング及びその結果に応じた用量調節を実施することを規定した。サルにおけるその他の主な毒性所見として、APC 活性化及びこれに関連した血管炎及び血管周囲炎がみられ、発現頻度及び程度は概して用量／投与期間に伴って増強した。また、血管炎に関連して C3 の減少、APC 分解産物（Bb 等）及びその他の全身性炎症マーカー（CRP 及び炎症性サイトカイン等）の増加が認められた。ヒトはサルと比較して ASO を介した APC 活性化が生じにくいため、サルで認められた血管炎症がヒトで発現する可能性は低い[Shen, 2014; Frazier, 2015; Shen, 2016]。臨床試験において血管炎の増加及び全身性炎症マーカーへの影響が認められたが、APC 活性化との関連性は示されておらず、サルにベピロビルセンを投与した時に認められた血管炎とは異なるものと考えられる。しかしながら、添付文書（案）には免疫介在性血管炎の既往歴を有する患者への投与に関する警告を記載することとした。

腎臓においては、サル 39 週間投与試験の高用量（20 mg/kg/回）群で糸球体腎炎がみられ、本所見が死亡／瀕死状態の要因と考えられる。これに関連して、重度の低アルブミン血症（早期安楽死の主因）及び尿中バイオマーカーの変化も認められた。これらはサルで顕著な APC の活性化に関連したものであり、したがって、ヒトへの外挿性は低いと考えられる[Shen, 2014; Frazier, 2015; Engelhardt, 2015]。CD-1 マウスにおいても動物種／げっ歯類で特異的な腎臓所見がみられており、反復投与毒性試験では低頻度の糸球体腎症が認められた。これはげっ歯類において ASO を介した TLR 活性化に対する感受性が高いこと及びこの動物種／系統における背景所見であるアミロイドーシスに関連したものであり、ヒトへの外挿性は低いと考えられる[Frazier, 2018]。また、2 年間がん原性試験では雄マウスに CPN の増悪が認められたが、これはげっ歯類で特異的な所見であり、ヒトへの外挿性は低いと考えられる[Hard, 2009]。臨床的意義のある腎臓所見として、尿細管上皮細胞（両動物種）及び組織マクロファージ内（マウスのみ）の好塩基性顆粒の蓄積が認められたが、本所見は可逆的であ

り、細胞内へのオリゴヌクレオチドの取込みを示唆するものであるため、悪影響ではないと考えられる[Henry, 2008; Frazier, 2015]。ヒトへの MRHD の投与により、尿細管上皮に変性を発現させる閾値にまでオリゴヌクレオチド関連物質の蓄積が生じる可能性は低いと考えられる[Henry, 2008]。しかしながら、添付文書（案）では、腎機能パラメータの定期的なモニタリングを実施することを規定した。

肝臓への影響は主にマウスでみられ、クッパー細胞における好塩基性顆粒の蓄積（オリゴヌクレオチドの蓄積を示す）、肝細胞毒性（細胞質変化、単細胞壊死等）及びそれに関連する増殖／再生性変化（トランスアミナーゼの上昇を伴う）が認められた。サルでも同様のクッパー細胞の変化がみられ、マウスよりも高い曝露量を示したものの、傷害性変化は認められなかった。マウスにおける肝細胞の変化は、げっ歯類での ASO に対する炎症反応の亢進に関連した二次的変化であり、ヒトへの外挿性は低いと考えられる。ベピロビルセンを投与した CHB 患者において一過性の ALT 上昇が認められているが、これらはウイルスクリアランスに関連したものと考えられ、投与を継続しても概ね回復したことから、DILI を示唆するものではないと考えられた。なお、添付文書（案）では、肝機能パラメータの定期的なモニタリングを実施することを規定した。

その他の動物でのみ観察された臨床病理学的所見（悪影響とは判断されず）として、マウス（及びウサギ）で赤血球系パラメータの軽度低値が認められた（他の 2’-MOE ASO で認められた所見と一致[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2018; Volanesorsen, 2019]）。サルでは、13 週間投与試験の高用量群で一過性の APTT 延長がみられたが、39 週間投与試験では認められなかった。本所見はホスホロチオエート ASO のクラスエフェクトとして知られており、高い全身曝露に関連したものと考えられている[Henry, 2008]。本所見がヒトで発現する可能性はあるものの、MRHD 投与時のベピロビルセンの全身曝露量は、APPT 増加が予想される閾値を大きく下回っている[Sheehan, 1998]。なお、CHB 患者おいて凝固障害は認められていない。

ヒトへの外挿性が不明と考えられる所見として、サル 39 週間投与試験の TDAR 試験において、抗 KLH IgG 反応の低下が認められた（抗 KLH IgM 反応に変化は認められず）。なお、サルの一般状態においてこれに関連した悪影響（感染症の発現頻度増加等）は認められていない。また、マウス 2 年間がん原性試験では、高用量群の雌で乳管拡張の発現頻度及び／又は程度の増大がみられ、低頻度ながら小葉腺胞過形成及び異型過形成の発現頻度増加も認められた。これらの乳腺への影響はホルモンに起因するものではないと考えられ、また、乳腺腫瘍の増加も認められなかった。同様の乳腺への影響は、他の 2’-MOE ASO を用いたマウスの 2 年間がん原性試験でも認められており[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2018; Volanesorsen, 2019]、オリゴヌクレオチドによる免疫反応に対してマウスが高い感受性を示すことに関連している可能性が考えられる。

サルはヒトと類似した ASO の代謝様式及び薬物動態プロファイルを示すことから、ヒトにおける臨床用量投与時の曝露量との比較にはサルを用いた。サル 13 週間投与試験における NOAEL である 8 mg/kg/回投与時の雌雄平均 AUC0-48 及び Cmax は、それぞれ 179 μg.h/mL 及び 27.0 μg/mL であり、ヒトに MRHD を投与した時の AUC0-168 及び Cmax のそれぞれ 1.82 及び 3.22 倍に相当する。サル 39 週間投与試験における NOAEL は 6 mg/kg/回

と推定され、この時の AUC0-168 及び Cmax はそれぞれ 197 μg.h/mL 及び 22.6 μg/mL であり、ヒト MRHD 投与時の AUC0-168 及び Cmax のそれぞれ 2.01 及び 2.68 倍に相当する。添付文書（案）では、肝臓、腎臓及び血小板パラメータの定期的なモニタリング及びその結果に応じた用量調節を実施することを規定した。

5.3.2. 局所刺激性

マウス及びサルを用いた反復投与毒性試験の一環として局所刺激性を評価した。ベピロビルセンを反復皮下投与した時の投与部位の忍容性は良好であった。投与部位で観察された所見は悪影響ではないと判断され、これらの動物種における 2'-MOE ASO の典型的な変化と考えられた。

5.3.3. 遺伝毒性

ベピロビルセンは、Ames 試験においていずれの菌株でも変異原性を示さず、CHL 細胞において染色体異常誘発性を示さなかった。また、in vivo マウス骨髄小核試験において、ベピロビルセンは遺伝毒性を示さなかった。

オフターゲット遺伝子解析では、遺伝毒性を誘発する又は遺伝毒性を誘発する可能性があるオフターゲット mRNA は特定されなかった。また、シークエンス解析の結果、ベピロビルセンがトリプレックス形成を介して遺伝毒性を示す可能性はないと考えられた。

5.3.4. がん原性

マウス 2 年間がん原性試験では、投薬に関連した肝腫瘍（肝細胞癌、肝細胞腺腫及び血管肉腫／血管腫）、線維肉腫及び全身性血管肉腫／血管腫の発現頻度増加が認められた。ベピロビルセン投与により増加が認められた腫瘍は、海外で承認されている 2'-MOE ASO である mipomersen 及び volanesorsen 並びにそれらのげっ歯類でのサロゲートで報告されているものと概ね定性的に類似していたが[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2018]、これらの腫瘍（肝細胞腺腫、血管肉腫、特に肝細胞癌）の発現頻度は、ベピロビルセンで顕著に高かった。ベピロビルセンのマウスを用いた反復投与毒性試験でみられた非腫瘍性病変が、2 年間がん原性試験で認められた腫瘍の形成及び進行に関与している可能性があり、ベピロビルセンでは、mipomersen 及び volanesorsen と比較して、主要な非腫瘍性病変がより早期に発症したことが、他の 2'-MOE ASO よりもこの種の腫瘍の発現頻度が高い理由である可能性が考えられる。

マウスでは、ヒトと比較して、2'-MOE ASO の免疫刺激作用に対する感受性が高いことを考慮すると[Henry, 2008]、マウス 2 年間がん原性試験で認められた腫瘍のヒトへの外挿性は低いと考えられる。なお、ベピロビルセンの CHB 患者への投与期間は最大 24 週間であり、これはマウスがん原性試験で腫瘍の増加が認められたときの投与期間よりも極めて短い期間である。

5.3.5. 生殖発生毒性

ベピロビルセンはマウスの雌雄受胎能、マウス及びウサギの胚・胎児発生並びにマウスの出生前及び出生後の発生に影響を及ぼさなかった。胚・胎児発生に関する試験において、胎盤組織でベピロビルセンが検出されたが、胎児組織では検出されなかったことから、ベピロビルセンが胎盤を通過して胎児に移行する可能性はわずかであることが示された。

5.4. 結論

上記のとおり、ベピロビルセンを用いた一連の包括的な非臨床試験により、ベピロビルセンのオフターゲット作用、薬物動態及び毒性プロファイルを明らかにした。これらの非臨床データは添付文書（案）（モニタリング頻度及び用量調整を含む）に準じたベピロビルセンの臨床使用を支持するものであった。

6. 参考文献

Andersson P, Burel SA, Estrella H, Foy J, Hagedorn PH, Harper TA Jr, Henry SP, Hoflack JC, Holgersen EM, Levin AA, Morrison E, Pavlicek A, Penso-Dolfin L, Saxena U. Assessing Hybridization-Dependent Off-Target Risk for Therapeutic Oligonucleotides: Updated Industry Recommendations. Nucleic Acid Ther. 2025 Feb;35(1):16-33.

Anderson, RT, Choi, HS, Lenz, O, et al. Association between seroclearance of hepatitis B surface antigen and long-term clinical outcomes of patients with chronic hepatitis B virus infection: systematic review and meta-analysis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2021;19(3), pp.463-472.

Agarwal K, Lok J, Gane E. Antisense oligonucleotides (ASOs) in chronic hepatitis B infection: Opportunities and challenging the orthodoxy. J Hepatol. 2022 Oct;77(4):906-908.

Amin OE, Colbeck EJ, Daffis S, et al. Therapeutic Potential of TLR8 Agonist GS-9688 (Selgantolimod) in Chronic Hepatitis B: Remodeling of Antiviral and Regulatory Mediators. Hepatology. 2021 Jul;74(1):55-71.

Baek MS, Yu R, Gaus H, Grundy J and Geary R. In vitro metabolic stabilities and metabolism of 2'-O-(Methoxyethyl) partially modified phosphorothioate antisense oligonucleotides in preincubated rat or human whole liver homogenates. Oligonucleotides 2010; 20(6): 309-316.

Berman CL, Barros SA, Galloway SM, et al. OSWG Recommendations for Genotoxicity Testing of Novel Oligonucleotide-Based Therapeutics. Nucleic Acid Ther. 2016 Apr;26(2):73-85.

Capaldi D, Teasdale A, Henry S, et al. Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products. Nucleic Acid Ther. 2017 Dec;27(6):309-322.

Chamanza R, Marxfeld HA, Blanco AI, et al. Incidences and range of spontaneous findings in control cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) used in toxicity studies. Toxicologic Pathology. 2010;38:642-657.

Cohen SM, Storer RD, Criswell KA, Doerrer NG, Dellarco VL, Pegg DG, Wojcinski ZW, Malarkey DE, Jacobs AC, Klaunig JE, Swenberg JA, Cook JC. Hemangiosarcoma in rodents: mode-of-action evaluation and human relevance. Toxicol Sci. 2009 Sep;111(1):4-18.

Coutant, D.E., Boulton, D.W., Dahal, U.P., Deslandes, A., Grimaldi, C., Pereira, J.N.S., Säll, C., Sarvaiya, H., Schiller, H., Tai, G., Umehara, K., Yuan, Y. and Dallas, S. (2023), Therapeutic Protein Drug Interactions: A White Paper From the International Consortium for Innovation and Quality in Pharmaceutical Development. Clin Pharmacol Ther, 113: 1185-1198.

Crooke ST, Baker BF, Witztum JL, et al. The Effects of 2'-O-Methoxyethyl Containing Antisense Oligonucleotides on Platelets in Human Clinical Trials. Nucleic Acid Ther. 2017 Jun;27(3):121-129.

Drevon-Gaillot E, Perron-Lepage M, Clement C, Burnett R. A review of background findings in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) from three different geographical origins. Experimental and Toxicologic Pathology. 2006;58: 77-88.

Du Y, Wu J, Liu J, et al. Toll-like receptor-mediated innate immunity orchestrates adaptive immune responses in HBV infection. Front Immunol. 2022 Jul 29;13:965018.

Engelhardt J. A., Fant P., Guionaud S., et al. Drug induced vascular injury associated with nonsmall molecule therapeutics in preclinical development. Part II. Antisense oligonucleotides. Toxicol Pathol. 2015; 43:935-944 .

European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. J Hepatol. 2017; 67(2):370-98.

Frazier KS, Seely JC, Hard GC, et al. Proliferative and nonproliferative lesions in the rodent urinary system. Toxicol Pathol. 2012; 40:14-86.

Frazier KS, Obert LA, Drug-induced glomerulonephritis: The spectre of biotherapeutic and antisense oligonucleotide immune activation in the kidney. Toxicol Pathol. 2018; 46(8):904-917.

Frazier KS. Antisense Oligonucleotides: The promise and the challenges from the toxicologic pathologist’s perspective. Toxicol Pathol, 2015; 43:78–79.

Geary RS. Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2009 Apr;5(4):381-91.

Geary, RS, Norris, D, Yu, R and Bennett, CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. Advanced Drug Delivery Reviews 2015; 87: 46-51.

Gish R, Agarwal K, Mahajan A, Desai S, et al. Nucleos(t)ide Analog Treatment Discontinuation in Chronic Hepatitis B Virus Infection: A Systematic Literature Review. Gastro Hep Adv. 2024;4(1):100536.

Geary RS, Baker BF, Crooke ST. Clinical and preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mipomersen (kynamro): a second-generation antisense oligonucleotide inhibitor of apolipoprotein B. Clin Pharmacokinet. 2015 Feb;54(2):133- 46.

Greaves, P. Liver and Pancreas. IN: Histopathology of Preclinical Toxicity Studies, third Edition (2007). (P Greaves, editor). Elsevier, Amsterdam, pp. 468-475. (GSK is unable to provide a copy of this reference at the time of this submission, as the company does not have the necessary legal copyright clearance.)

Greaves P. Endocrine glands. In: Histopathology of Preclinical Toxicity Studies, 4th edition. Elsevier, 2012:767-9. (GSK is unable to provide a copy of this reference at the time of this submission, as the company does not have the necessary legal copyright clearance.)

Han et al., A Randomized,Double-Blind, Placebo-Controlled, First-Time-in-Human Study to Assess the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Single and Multiple Ascending Doses of GSK3389404 in Healthy Subjects. Clin Pharmacol Drug Dev. 2019 Mar 12;8(6):790–801

Hansen ME, Bentin T, and Nielsen PE. High-affinity triplex targeting of double stranded DNA using chemically modified peptide nucleic acid oligomers. Nucleic Acids Res. 2009;37:4498-4507.

Haas M, Kato Y, Haverdings R et al. Delivery of Drugs and Antisense Oligonucleotides to the Proximal Tubular Cell of the Kidney Using Macromolecular and Pro‐drug Approaches. IN: Drug Targeting: Organ-Specific Strategies, Wiley, 2001:121-155.

Hard GC, Johnson KJ, Cohen SM. A comparison of rat chronic progressive nephropathy with human renal disease-implications for human risk assessment. Crit Rev Toxicol. 2009; 39(4):332–346.

Henry SP, Monteith D, Kombrust DJ, Levin AA. Effects of IV infusion of phosphorothioate oligonucleotides on coagulation, complement activation and hemodynamics. Nucleosides & Nucleotides 1997; 16(7-9): 1673-1676.

Henry SP, Kim TW, Kramer-Strickland K, et al. Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Applications; Toxicologic properties of 2'-O-methoxyethyl chimeric antisense inhibitors in animals and man. Crooke ST editor. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group; 2008: 327-363.

Henry SP et al. Mechanism of Alternative Complement Pathway Dysregulation by a Phosphorothioate Oligonucleotide in Monkey and Human Serum. Nucleic Acid Ther. 2014 octOct;24(5):326-35. (This reference has not been originally included in m4.3 due to copy right clearance, however it will be provided with the final submission.)

Henry SP, Seguin R, Cavagnaro J, Berman C, et al. Considerations for the Characterization and Interpretation of Results Related to Alternative Complement Activation in Monkeys Associated with Oligonucleotide-Based Therapeutics. Nucleic Acid Ther. 2016 Aug;26(4):210-5.

Henry SP, Narayanan P, Shen L, et al. Assessment of the Effects of 2'-Methoxyethyl Antisense

Oligonucleotides on Platelet Count in Cynomolgus Nonhuman Primates. Nucleic Acid Ther. 2017 Aug;27(4):197-208.

Hill AC, Hall J. A Randomized,Double-Blind, Placebo-Controlled, First-Time-in-Human Study to Assess the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Single and Multiple Ascending Doses of GSK3389404 in Healthy Subjects. Helv. Chim. Ac. 2023, 106.

Jain AG, Wang G, Vasquez KM. DNA triple helices: biological consequences and therapeutic potential. Biochimie. 2008; 90:1117-1130.

Frazier KS, et al. Species-specific Inflammatory Responses as a Primary Component for the Development of Glomerular Lesions in Mice and Monkeys Following Chronic Administration of a Second-generation Antisense Oligonucleotide. Toxicologic Pathology. 2014; 42(5): 923-935.

Kuan JY, PM Glazer. Targeted gene modification using triplex-forming oligonucleotides. Methods Mol Biol. 2004; 262:173–194.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. 2009;10(3):R25.

Levin AA and Henry SP. Toxicology of oligonucleotide therapeutics and understanding the relevance of the toxicities. In: Cavagnaro JA, editor. Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals. Wiley, 2008:561Wiley, 2008:561. (GSK is unable to provide a copy of this reference at the time of this submission, as the company does not have the necessary legal copyright clearance.)

Lindow M, Vornlocher HP, Riley D, Kornbrust DJ, Burchard J, Whiteley LO, Kamens J, Thompson JD, Nochur S, Younis H, Bartz S, Parry J, Ferrari N, Henry SP, Levin AA. Assessing unintended hybridization-induced biological effects of oligonucleotides. Nat Biotechnol. 2012 Oct;30(10):920-3.

Loglio A, Lampertico P. How durable is functional cure (hepatitis B surface antigen loss) in patients with chronic hepatitis B treated with current antivirals? Hepatol Commun. 2020;4(1):5-7.

Lok AS, Zoulim F, Dusheiko G, et al. Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval. Hepatology. 2017; 66(4):1296-313.

Lok AS, Zoulim F, Dusheiko G, et al. Durability of hepatitis B surface antigen loss with nucleotide analogue and peginterferon therapy in patients with chronic hepatitis B. Hepatol Commun. 2019;4:8-20.

Marlowe JL, Akopian V, Karmali P, et al. Recommendations of the Oligonucleotide Safety Working Group's Formulated Oligonucleotide Subcommittee for the Safety Assessment of Formulated Oligonucleotide-Based Therapeutics. Nucleic Acid Therap Published Online:1 Aug 2017.

McClain RM. The significance of hepatic microsomal enzyme induction and altered thyroid function in rats: Implications for thyroid gland neoplasia. Toxicologic Pathology, 1989; 17: 294-306

Mitra MS, Datta K, Hutchinson R, Nicolette JJ, Pettersen JC, Wegesser TC, Bercu JP. Harmonized 3Rs-based non-mutagenic impurity qualification study designs developed using the results of an IQ consortium survey. Regul Toxicol Pharmacol. 2021 Jun;122:104895.

Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. J Basic Clin Pharm. 2016 Mar;7(2):27-31. doi: 10.4103/0976-0105.177703. PMID: 27057123; PMCID: PMC4804402. (This reference has not been originally included in m4.3 due to copy right clearance, however it will be provided with the final submission.)

Narayanan P, Shen L, Curtis BR, et al. Investigation into the Mechanism(s) That Leads to Platelet Decreases in Cynomolgus Monkeys During Administration of ISIS 104838, a 2'-MOE-Modified Antisense Oligonucleotide. Toxicol Sci. 2018 Aug 1;164(2):613-626.

Post N, Yu R, Greenlee S, et al. Metabolism and Disposition of Volanesorsen, a 2'-O-(2 methoxyethyl) Antisense Oligonucleotide, Across Species. Drug Metab Dispos. 2019; 47(10):1164-1173.

Prakash T, Graham M, Yu J, et al. Targeted Delivery of Antisense Oligonucleotides to Hepatocytes Using Tri-antennary N-Acetyl Galactosamine Improves Potency 10-fold in Mice. Nuc Acid Res. 2014 Jul; 42(13): 8796-8807.

Rundhaug JE, Fischer SM. Molecular Mechanisms of Mouse Skin Tumor Promotion. Cancers, 2010; 2: 436-482;

Sewing S, Roth AB, Winter M. Assessing single-stranded oligonucleotide drug-induced effects in vitro reveals key risk factors for thrombocytopenia. PLoS One. 2017; 12(11)

Sheehan JP, Lan HC. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex. Blood. 1998 Sep 1;92(5):1617-25.

Sheehan JP and Phan TM. Phosphorothioate OligonuceotidesOligonucleotides Inhibit the Intrinsic Tenase Complex by an Allosteric Mechanism. Biochemistry. 2001;40:4980-4989.

Shemesh CS, Yu RZ, Gaus HJ, Greenlee S, Post N, Schmidt K et al. Elucidation of the Biotransformation Pathways of a Galnac3-conjugated Antisense Oligonucleotide in Rats and Monkeys. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2016; 5: e319

Shen L., Frazer-Abel A., Reynolds PR, et al. Mechanistic understanding for the greater sensitivity of monkeys to antisense oligonucleotide–mediated complement activation compared with humans. J Pharmacol Exp Ther (2014). 351: 709-17.

Shen L, Engelhardt JA, Hung G, et al. Effects of Repeated Complement Activation Associated with Chronic Treatment of Cynomolgus Monkeys with 2'-O-Methoxyethyl Modified Antisense Oligonucleotide.Nucleic Acid Ther. (2016). 26(4):236-49.

Shiha G, Ibrahim A, Helmy A, et al. Asian-Pacific Association for the Study of the Liver (APASL)

consensus guidelines on invasive and non-invasive assessment of hepatic fibrosis: a 2016 update. Hepatol Int. 2017 Jan;11(1):1-30.

Slingsby, M.H. et al. Sequence-specific 2'-O-methoxyethyl antisense oligonucleotides activate human platelets through glycoprotein VI, triggering formation of platelet-leukocyte aggregates Haematologica 2022, 107, 519-531.

Song C, Lv J, Liu Y, et al. Associations Between Hepatitis B Virus Infection and Risk of All Cancer Types. JAMA Netw Open. 2019 Jun 5;2(6):e195718.

Spencer-Dene B, Mukherjee P, Alex A, Bera K, Tseng WJ, Shi J, Chaney EJ, Spillman DR Jr, Marjanovic M, Miranda E, Boppart SA, Hood SR.et al. Localization of unlabeled bepirovirsen antisense oligonucleotide in murine tissues using in situ hybridization and CARS imaging. RNA., 2023 Oct;29(10):1575-1590. (This reference has not been originally included in m4.3 due to copy right clearance, however it will be provided with the final submission.)

Stoot JHMB, Coelen RHS, De Jong MC, Dejong CHC. Malignant transformation of hepatocellular adenomas into hepatocellular carcinomas: a systematic review including more than 1600 adenoma cases. HPB 2010, 12, 509–522.

Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. Hepatology. 2018; 67(4):1560-1599.

Vlachogiannakos I, Cholongitas E, et al. Discontinuation of oral antivirals in chronic hepatitis B: A systematic review. Hepatology. 2016; 63(5):1481-92.

Wakefield LM, Thordarson G, Nieto AI, Shyamala G, Galvez JJ, Anver MR, Cardiff RD. Spontaneous pituitary abnormalities and mammary hyperplasia in FVB/NCr mice: implications for mouse modeling. Comp Med. 2003 Aug;53(4):424-32.

Wang Y, Yu RZ, Henry S, Geary RS. Pharmacokinetics and Clinical Pharmacology Considerations of 3’-Conjugated Antisense Oligonucleotides. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2019 Jun;15(6):475-485.

Yip, TCF, Wong, GLH, Chan, HLY, et al. HBsAg seroclearance further reduces hepatocellular carcinoma risk after complete viral suppression with nucleos (t) ide analogues. J Hepatol. 2019; 70(3), pp.361-370.

You S, Delahaye J, Ermler M, et al. Bepirovirsen, antisense oligonucleotide (ASO) against hepatitis B virus (HBV), harbors intrinsic immunostimulatory activity via Toll-like receptor 8 (TLR8) preclinically, correlating with clinical efficacy from the Phase 2a study. Journal of Hepatology.2022; 77. S873-S874.

You S, Elston R, Yuen MF. Reply to: "Bepirovirsen/GSK3389404: Antisense or TLR9 agonists?". J Hepatol. 2023 Mar;78(3):e108-e110.

Yuen MF, Heo J, Jang JW, et al. Safety, tolerability and antiviral activity of the antisense oligonucleotide bepirovirsen in patients with chronic hepatitis B: a phase 2 randomized controlled trial. Nat Med. 2021 Oct;27(10):1725-1734.

Yu RZ, Kim TW, Hong A, Watanabe TA, Gaus HJ & Geary RS. Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B 100. Drug Metab Dispos. 2007; 35: 460-468.

Yu et al NUCLEIC ACID THERAPEUTICS Volume 26, Number 6, 2016. Mary Ann Liebert, Inc.

Yu RZ, Warren MS, Watanabe T, Nichols B, Jahic M, Huang J, et al. Lack of interactions between an antisense oligonucleotide with 2'-O-(2-methoxyethyl) modifications and major drug transporters. Nucleic Acid Ther 2016;26 (2):111-17.

Zhou, Y., Ye, Z., Wei, W. et al. Macrophages maintain mammary stem cell activity and mammary homeostasis via TNF-α-PI3K-Cdk1/Cyclin B1 axis. NPJ Regen Med 8, 23 (2023).

References (Available Upon Request)

Baraclude (Entecavir) FDA Drug Approval Package Pharmacology Review, 2005.

VEMLIDY (tenofovir alafenamide, TAF) FDA Drug Approval Package Pharmacology Review, 2016.

Hepsera (adefovir dipivoxil) FDA Prescribing Information. Available at: HEPSERA (adefovir dipivoxil) Tablets.

Inotersen FDA Nonclinical Review, 2017, available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/211172Orig1s000PharmR.pdf .

Kynamro (mipomersanmipomersen) US Summary of Pharmacology Review. January 2013. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/203568Orig1s000PharmR.pdf

Epivir (lamivudine) FDA Drug Prescribing information. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/020564s37_020596s036lbl.pdf.

Tyzeka (telbivudine) FDA Drug Prescribing Information. Available at: Tyzeka (telbivudine) tablets label.

VIREAD (Tenofovir Disoproxil Fumarate, TDF) FDA Drug Approval Package available at: Pharmacology Review, 2001.

Volanesorsen EMA EPAR, 2019, Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/waylivra-epar-public-assessment-report_en.pdf.

Volanesorsen FDA Advisory Committee Meeting briefing document, 2018.

Guidelines (not provided)

EMEA. CHMP SWP Reflection Paper on the Assessment of the Genotoxic Potential of Antisense Oligodeoxynucleotides. January, 2005. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/199726/2004.

EMA Guideline on the clinical evaluation of medicinal products intended for treatment of hepatitis B, 2006.

EMA (draft) Guideline on the Development and Manufacture of Oligonucleotides, 2024.

EMA. Guideline on the Investigation of Drug Interactions. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2; 2013.

FDA. In Vitro Drug Interaction Studies - Cytochrome P450 Enzyme and Transporter Mediated Drug Interaction, Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Silver Spring, MD; 2020.

FDA guidance for industry: Antiviral Product Development — Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency, 2006.

FDA guidance for industry: Chronic hepatitis B virus infection – developing drugs for treatment, 2022

FDA (draft) guidance for industry: Nonclinical safety assessment of oligonucleotide-based therapeutics, 2024.

Clinical Pharmacology Considerations for Human Radiolabeled Mass Balance Studies Guidance for Industry (FDA, 2024)).

ICH M12 on drug interaction studies - Scientific guideline. EMA, 2024.

ICH M7: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. September 2014.

ICH S2(R1): Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceutical intended for human use, 2008.

ICH S5(R3): Detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals, 2020.

ICH S10: Photosafety evaluation of pharmaceuticals, 2013.

PMDA Guideline for Preclinical Safety Assessment of Oligonucleotide Therapeutics, March 2020 (English Translation): 000236289.pdf

PMDA (2018) Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information.

World Health Organization (WHO). Webpage Facts Sheet: Hepatitis B, 9 April 2024. (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b).

World Health Organization (WHO). Global hepatitis report 2024: action for access in low- and middle-income countries. Geneva: World Health Organization; 2024.

Regulatory Feedback (not provided)

CDE: written feedback following pre-IND meeting, dated 2019-Dec-19, application number 2019004097.

EMA: EMA/SA/0000067129 requested on 19 July 2021, response by CHMP issued to GSK on 14 October 2021 (EMADOC-1700519818-731039).

FDA: Response to Carcinogenicity Special Protocol Assessment Request – Final execCAC Report – IND 122685. Dated 25 November, 2020.

PMDA: PMSB/ELD Notification 0304001, dated 4 March, 2020. Consultation on pre-phase IIb clinical trial (other than orphan).

APPENDIX 1 MODULE 4 SECTIONS WITHOUT STUDY REPORTS

The following provides a brief justification for the absence of studies in certain sections of Module 4.

Module 4 Sections Without Study Reports	Rationale for Omission
m4.2.1.1. Primary Pharmacodynamics	Primary Pharmacodynamic study reports are included in m5.3.5.4 as per ICH M4 guidelines.
m4.2.1.4. Pharmacodynamic Drug Interactions	Pharmacodynamic Drug Interaction studies were considered unnecessary since bepirovirsen is an ASO with high specificity and is very unlikely to affect other pharmacologic targets.
m4.2.2.2. Absorption	Absorption assessment has been included in repeat dose toxicity studies. These data are presented in Section 3.2 of the NCO.
m4.2.2.5. Excretion	Studies to investigate the excretion of bepirovirsen were not considered appropriate as the protein binding typical of ASOs prevents glomerular filtration and limits urinary excretion of bepirovirsen.
m4.2.2.6. Pharmacokinetic Drug Interactions	Relevant in vitro data from studies investigating the substrate and inhibition properties of bepirovirsen with drug metabolizing enzymes and transporters were used to assess the potential for clinical PK drug interactions (see metabolism 3.4 and distribution 3.3).
m4.2.2.7. Other Pharmacokinetic Studies	No other pharmacokinetic studies conducted that have not been included in appropriate subsections.
m4.2.3.1. Single Dose Toxicity	No studies conducted as considered to be of limited value to human risk assessment for 2'-MOE ASOs, such as bepirovirsen.
m4.2.3.4.2 Short or Medium term Carcinogenicity	The 2-year carcinogenicity study in the mouse informed on life-time dosing effects in at least one rodent species therefore a shorter study would not be informative
m4.2.3.4.3 Carcinogenicity Other Studies	No other carcinogenicity studies conducted that have not been included in appropriate subsections.
m4.2.3.5.4 Studies in which the offspring (juvenile animals) are dosed and/or further evaluated	The present application is to support the registration of bepirovirsen for the treatment of CHB in patients aged ≥18 years of age. No studies have therefore been conducted in juvenile animals.
m4.2.3.6 Local Tolerance	No standalone studies. The assessment has been made as part of the repeat dose toxicity and carcinogenicity studies.
m4.2.3.7.1 Antigenicity	No studies have been conducted that have not been included in other subsections where appropriate.
m4.2.3.7.2 Immunotoxicity	
m4.2.3.7.3 Mechanistic studies	
m4.2.3.7.4 Dependence	
m4.2.3.7.5 Metabolites	