TABLE OF CONTENTS

緒言 3

1. 非臨床試験計画 3

2. 参考文献 4

2.6.1 の略号等一覧

略号（略称）	英語	日本語
ASO	Antisense Oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
AUC	Area Under the Curve	血中濃度-時間曲線下面積
Cmax	Maximum Concentration	最高血中濃度
HBV	Hepatitis B Virus	B 型肝炎ウイルス
2'-MOE	2′-*O*-methoxy ethyl	2'-*O*-メトキシエチル
PK	Pharmacokinectis	薬物動態
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	メッセンジャーRNA

緒言

ベピロビルセン（別名：GSK3228836 及び ISIS505358）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（図 1）、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。ベピロビルセンが標的 mRNA に結合すると標的 mRNA の切断がおこり、HBV DNA 及びウイルス蛋白質量が減少する。

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。

ベピロビルセンの配列を図 1 に示す。

図 1　　ベピロビルセンの配列

5′-G ^{Me}C A G A G G T G A A G ^{Me}C G A A G ^{Me}U G ^{Me}C-3′

Where:

- A = Deoxyadenosine
- ^{Me}C = Deoxy-5-methylcytidine
- G = Deoxyguanosine
- T = Thymidine
- A = 2′-*O*-Methoxyethyl adenosine
- ^{Me}C = 2′-*O*-Methoxyethyl 5-methylcytidine
- G = 2′-*O*-Methoxyethyl guanosine
- ^{Me}U = 2′-*O*-Methoxyethyl 5-methyluridine

ベピロビルセンナトリウム塩は皮下投与のための注射用溶液として製剤化され、臨床使用に際しては、最大 300 mg/週（60 kg のヒトで 5 mg/kg に相当）の用量で投与することを予定している。第 1/2 相試験における母集団 PK 解析の結果、HBV 持続感染患者に 300 mg/週を投与した時の AUC0-48 及び Cmax は、それぞれ 98.2 μg*h/mL 及び 8.39 μg/mL と推定された（RPS-CLIN-113368、表 14）。これらのヒト推定最大曝露量は、非臨床動物種で悪影響が認められない最大曝露量との比較に用いた。

1. 非臨床試験計画

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。

毒性試験に使用した動物種を用いてベピロビルセンの薬物動態、分布及び代謝試験を実施し、体内動態を検討した。ベピロビルセンは同クラスの ASO と同様に、エンドヌクレアーゼにより代謝され ASO フラグメントとなり、更にエキソヌクレアーゼにより代謝及び分解され、尿中に排泄される[Baek, 2010; Levin, 2008; Geary, 2015; Yu, 2007]。

ベピロビルセンの薬物動態プロファイルを考慮して、ベピロビルセンの包括的な毒性評価を実施した。反復投与毒性試験として、静脈内及び／又は皮下投与によるマウス及びサルを用いたそれぞれ最長 26 及び 39 週間投与試験を実施した。ベピロビルセン及びその不純物の遺伝毒性評価として、一連の in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験並びに配列解析（トリプレックス形成等）を実施した。また、皮下投与によるマウスを用いた 2 年間がん原性試験並びに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。

非臨床試験の概要文（m2.6）に示した試験は、特記しない限り、いずれも臨床使用予定であるベピロビルセンナトリウム塩を使用して実施した。投与量及び濃度（血漿中の分析物濃度を含む）は、いずれも親化合物（ベピロビルセン）として表示する。

非臨床安全性試験で用いた原薬バッチの不純物プロファイルは、臨床試験で使用された製剤及び市販製品用製剤の不純物プロファイルと類似していた。非臨床安全性試験で用いたベピロビルセンのバッチ番号並びに処方及び不純物含量（必要に応じて）に関する情報の詳細については、m2.6.2 及び m2.6.6 の表中に示す。

副次的薬理試験、安全性薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の詳細については、m2.6.2～2.6.7 に示す。これらの試験の報告書は m4.2 に添付する。

2. 参考文献

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.

Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. Adv Drug Deliv Rev. 2015 Jun 29;87:46-51.

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, 2008:561

Yu RZ, Kim TW, Hong A, Watanabe TA, Gaus HJ & Geary RA. 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

TABLE OF CONTENTS

1. まとめ 4
2. 効力を裏付ける試験 6
3. 副次的薬理試験 6
3.1. In vitro 試験 8
3.1.1. オフターゲット遺伝子解析 8
3.1.2. ヒト PBMC 及びヒト TLR9 を過剰発現させた細胞におけるサイトカイン及びケモカイン産生に及ぼす影響 9
3.1.3. 種々の PRR 発現細胞株における免疫活性化作用 10
3.1.4. ヒト GPVI に対する親和性 12
3.2. In vivo 試験 12
3.2.1. ヒト TLR8 ノックインマウスにおける免疫活性化作用 12
3.2.2. ヒト TLR8 ノックインマウスにベピロビルセン投与した時に活性化される肝臓細胞に関する検討 16
3.2.3. HBV 感染マウスにおける免疫活性化の評価 16
3.2.4. 種々の ASO により誘導される免疫応答の比較 17
4. 安全性薬理試験 18
4.1. 中枢及び末梢神経系に及ぼす影響 20
4.2. 心血管系及び呼吸系に及ぼす影響 20
4.2.1. In vitro 試験 20
4.2.1.1. hERG アッセイ 20
4.2.2. In vivo 試験 21
4.2.2.1. サルを用いた試験 21
5. 薬力学的薬物相互作用試験 26
6. 考察及び結論 26
7. 図表 27
8. 参考文献 27
APPENDIX 1 29

2.6.2 及び 2.6.3 の略号等一覧

略号（略称）	英語	日本語
AAV-HBV	Adeno-associated virus- Hepatis B virus	HBV ゲノムを組み込んだアデノウイルスベクター
ACTN1	Actin 1	アクチン 1
ASO	Antisense Oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
CCL2	C Motif Chemokine Ligand 2, also known as Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1)	CC ケモカインリガンド 2
CCL4	C Motif Chemokine Ligand 4, also known as Macrophage Inflammatory Protein (MIP-1 beta)	CC ケモカインリガンド 4
CD	Cluster of differentiation	-
Cmax	Maximum Concentration	最高血中濃度
CXCL10	Chemokine Ligand 10 (also known as IP10)	ケモカインリガンド 10（別名 IP-10）
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	-
DMXAA	5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic Acid	-
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium Propane	-
EC50	Half Maximal Effective Concentration	50%有効濃度
FBS	Fetal Bovine Serum	ウシ胎児血清
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
HBsAg	Hepatitis B Surface Antigen	B 型肝炎ウイルス表面抗原
HB-PS	HEPES Buffered Physiological Saline	HEPES 緩衝生理食塩水
HBV	Hepatitis B Virus	B 型肝炎ウイルス
HEK	Human Embryonic Kidney	ヒト胎児腎細胞
HSA	Human Serum Albumin	ヒト血清アルブミン
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
IHC	Immunohistochemistry	免疫組織化学
IFN	Interferon	インターフェロン
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
IRF	Interferon Regulatory Factor	インターフェロン制御因子
KD	Dissociation Constant	解離定数
MDA5	Anti-Melanoma Differentiation-Associated gene 5	-
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
MSD	Meso Scale Discovery	-
NCBI	National Center for Biotechnology Information	米国立生物工学情報センター
NF-kB	Nuclear Factor Kappa B	核内因子 κB
NK	Natural killer	ナチュラルキラー
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構

2.6.2. 薬理試験の概要文

PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells	末梢血単核細胞
PBS	Phosphate-buffered Saline	リン酸緩衝生理食塩水
PRR	Pattern Recognition Receptor	パターン認識受容体
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction	定量的ポリメラーゼ連鎖反応
QTcF	Fridericia QTc Interval	Fridericia 補正式を用いた補正 QT 間隔
QTcI	Individual Animal Correction Factor	-
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
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium	-
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SLC41A2	Solute Carrier Family 41 Member 2	-
SO_2	Hemoglobin Oxygen Saturation	酸素飽和度
STING	Stimulator of Interferon Genes	インターフェロン遺伝子刺激因子
TLR	Toll-like Receptor	Toll 様受容体
TNF	Tumor Necrosis Factor	腫瘍壊死因子
WT	Wild Type	野生型

1. まとめ

ベピロビルセン（別名：GSK3228836 及び ISIS505358）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（図 1）、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。

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 2.7.2.4.4.2.B 及び 2.7.2.4.5.B に示す。副次的薬理試験として、種々の細胞を用いた in vitro 試験を実施した。また、ベピロビルセンの免疫活性化作用について検討するため、野生型 C57BL/6 マウス及びヒト TLR8 ノックインマウス（hTLR8 マウス）を用いた in vivo 試験も実施した。実施した副次的薬理試験の一覧及び本申請に用いる試験報告書の添付場所を表 1 に示す。安全性薬理試験として、中枢及び末梢神経系への影響（マウス、単回皮下投与）、呼吸系及び心血管系への影響（サル、単回皮下及び静脈内投与）を検討する in vivo 試験を実施した。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、それらの試験成績の要約は 2.6.6.3 に示す。また、in vitro 試験として hERG アッセイを実施した。実施した試験の一覧及び本申請に用いる試験報告書の添付場所を表 2 に示す。安全性薬理試験の概要表は 2.6.3 に示す。

ベピロビルセンを用いて実施した試験のうち、本申請資料に添付しない試験がある旨及びその理由を APPENDIX 1 に示す。

副次的薬理試験は、標準作業手順書に従い適切な試験方法で実施した。安全性薬理試験は GLP 及び OECD ガイドラインに従って実施し、OECD 加盟国において実施した。

ベピロビルセンの配列を図 1 に示す。特記しない限り、すべての薬理試験はベピロビルセンナトリウムを用いて実施したが、本文中に記載した投与量及び濃度はすべてベピロビルセンとして記載した。ベピロビルセンナトリウムの非臨床試験では、臨床試験で使用した製剤・市販予定製剤と同等の被験物質を使用した。安全性薬理試験で使用した被験物質の不純物プロファイルは、臨床使用及び市販製剤での使用を予定しているものと一致していた。安全性薬理試験で使用したバッチ及び調製法については表 3 に示す。また、これらのバッチに含まれる不純物の詳細を表 4 に示す。

ベピロビルセンの副次的薬理試験及び安全性薬理試験で得られた試験成績の要約を以下に示す。

図 1　ベピロビルセンの配列

5′-G ^{Me}C A G A G G T G A A G ^{Me}C G A A G ^{Me}U G ^{Me}C-3′

Where:

- A = Deoxyadenosine
- ^{Me}C = Deoxy-5-methylcytidine
- G = Deoxyguanosine
- T = Thymidine
- A = 2′-*O*-Methoxyethyl adenosine
- ^{Me}C = 2′-*O*-Methoxyethyl 5-methylcytidine
- G = 2′-*O*-Methoxyethyl guanosine
- ^{Me}U = 2′-*O*-Methoxyethyl 5-methyluridine

効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験（非臨床ウイルス学的試験）の要約及び試験一覧は 2.7.2.4.4.2.B 及び 2.7.2.4.5.B に示す。

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。
- 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 PBMC（hPBMC）をベピロビルセンで 18～19 時間処理すると、軽度ではあるが統計学的に有意な培養上清中のサイトカイン［IFN-γ、IL-18、IL-6、CXCL10（別名：IP-10）、TNF-α、IL-12p40 等］濃度の上昇がみられ、これらのサイトカインは主に単球、樹状細胞及び NK 細胞から産生されることが示された。また、ベピロビルセン処理により、単球及び樹状細胞の細胞表面において、活性化マーカー（CD40、CD86 及び CD163 等）の発現が増加することが示された。これらの細胞よりも軽度ではあるが、B 細胞でも同様の変化が認められた。
- ヒトのパターン認識受容体（PRR）を過剰発現させた細胞株を用いた検討において、ベピロビルセンは hTLR8 をわずかに活性化させることが示されたが、STING、RIG-I、MDA5 並びに hTLR2、3、4、5、7 及び 9 に対しては活性化作用を示さなかった。
- hTLR8 マウスにベピロビルセン（40 mg/kg）を皮下投与すると、IL-12p40、CXCL10、TNF-α 及び IL-6 等の複数のサイトカインの血漿中濃度が上昇し、肝臓においてサイトカイン及びケモカイン（*Cxcl10*、*Il-12b*、*Tnf*、*Ccl2* 及び *Ccl4* 等）の発現を誘導することが示された。また、hTLR8 マウスにベピロビルセンを投与した時にサイトカインを

産生する一次応答細胞は、肝臓のマクロファージ及びクッパー細胞であることが示された。

- AAV-HBV を感染させた hTLR8 マウスにベピロビルセン（40 mg/kg）単回皮下投与し、その 4 時間後のサイトカイン誘導作用を非感染マウスと比較したところ、非感染マウス及び慢性感染マウスで同程度の血漿中サイトカインの上昇及び肝臓におけるサイトカイン遺伝子の発現増加がみられた。野生型マウスでは、AAV-HBV 非感染マウス及び慢性感染マウスのいずれにおいても、ベピロビルセン投与後にサイトカイン誘導は認められなかった。
- 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 活性化作用を有する 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。

安全性薬理試験

- 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 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。

薬力学的薬物相互作用試験

- ベピロビルセンと併用投与される可能性のある他の薬剤との相互作用を評価するための薬力学的試験は実施しなかった。

2. 効力を裏付ける試験

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 2.7.2.4.4.2.B 及び 2.7.2.4.5.B に示す。

3. 副次的薬理試験

種々の細胞を用いた in vitro 試験においてベピロビルセンの副次的薬理作用を評価した。また、ベピロビルセンの免疫活性化作用について検討するため、野生型及び hTLR8 マウスを用いた in vivo 試験も実施した。実施した試験の一覧及び本申請に用いる試験報告書の添付場所を表 1 に示す。

表 1　副次的薬理試験一覧

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Off-target gene analysis	A431, HepG2 cells	In silico, In vitro	No	Ionis	2015N239606 (3676-137)	m4.2.1.2
Evaluation in human cells and analysis of cytokines	hPBMCs	In vitro	No	Ionis	2019N419130 (505358-IS04)	m4.2.1.2
Evaluation in human TLR9 cell line and analysis of cytokines	HEK293XL--hTLR9A cells	In vitro	No	Ionis	2019N419133 (505358-IS05)	m4.2.1.2
In vitro assessment of immunostimulatory effect	hPBMCs	In vitro	No	GSK	2021N491821	m4.2.1.2
In vitro assessment of immunostimulatory effect	hTLR cell lines RIG-I-/MDA-5- Cell Lines STING Cell Lines	In vitro	No	[redacted]	2021N491808	m4.2.1.2
Affinity of ASOs for human glycoprotein 6[a]	Purified recombinant GPVI Purified recombinant HSA	In vitro	No	GSK	2022N521527	m4.2.1.2
Evaluation of immune activation in human TLR8 mice	Wild type and hTLR8 knock-in C57BL/6 mice	SC	No	[redacted]	2021N491084	m4.2.1.2
Investigating responsive cells using RNAscope and the effects of HBV infection on bepirovirsen-mediated responses using AAV-HBV in hTLR8 and WT mice	Wild type and hTLR8 knock-in C57BL/6 mice	SC	No	GSK	2024N551134	m4.2.1.2
Evaluating the differential immune responses induced by various ASO sequences	Wild type and hTLR8 knock-in C57BL/6 mice	SC	No	GSK	2024N549296	m4.2.1.2

Key:
Studies conducted with bepirovirsen sodium parent form (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) unless otherwise noted.
a = This study has been conducted with GSK5209540A, an Alexa488-labelled version of Bepirovirsen.
AAV-HBV = Adeno-associated virus- Hepatis B virus. ASO = antisense oligonucleotide. HEK293XL-hTLR9a = Human embryonic kidney cell line stably transfected to express the human TLR9 gene. hTLR8 = Human Toll-like receptor 8. hPBMCs = Human peripheral blood mononuclear cells. SC = Subcutaneous. WT = wild type.

Testing Facility:
GSK = GSK
[redacted] = [redacted], US
Ionis = Ionis Pharmaceuticals, Inc. (formerly known as ISIS Pharmaceuticals).
[redacted] = [redacted]

3.1. In vitro 試験

3.1.1. オフターゲット遺伝子解析

ヒトトランスクリプトームにおいてベピロビルセンの配列に一致又は部分一致する配列が存在するかをデータベースで検索し、ベピロビルセンの配列に完全又は部分的に相補的なヒト遺伝子が存在する場合、その遺伝子に対してオフターゲット作用を示す可能性について評価する試験を実施した（2015N239606、4.2.1.2）。

NCBI が提供している Reference Sequence Database を用い、ヒトトランスクリプトーム解析を実施した。リファレンス配列へのマッピングには Bowtie アルゴリズム[Langmead, 2009]を用いた。ミトコンドリアのトランスクリプトームを含むすべてのヒトトランスクリプトームのいかなる領域においても、ベピロビルセンと完全相補な配列及び 1 塩基ミスマッチで相補する配列は存在しなかった。また、相補配列が連続 17 塩基以上の遺伝子もみつからなかったが、2 塩基ミスマッチで相補する 1 種類のヒト mRNA（SLC41A2；Solute Carrier Family 41 Member 2）が確認された。

ベピロビルセンがヒト SLC41A2 を標的とするかを確認するために、ヒト肝臓由来細胞株 HepG2 及び扁平上皮由来 A431 細胞株をベピロビルセンで処理し、SLC41A2 の発現量に及ぼす影響を検討した。各細胞株にベピロビルセン（0.082～20 μM；媒体 PBS）を添加し、37℃で 20 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、細胞を溶解させ、グラスファイバーフィルター／カオトロピック塩を用いて RNA を精製し、ヒト SLC41A2 mRNA の発現量をワンステップ RT-RCR により定量した。本試験では、陰性対照として ISIS141923 及び ISIS129700（いずれもターゲットをもたない ASO）、並びに陽性対照として ISIS582460（ACTN1 を標的とする ASO）を同じ条件で評価した。

HepG2 及び A431 細胞株を、ベピロビルセン及び 3 種類の対照 ASO（いずれも最高濃度 20 μM）で処理しても、ヒト SLC41A2 mRNA 発現量の低下は認められなかった。一方、陽性対照 ASO である ISIS582460 を処理した場合には、HepG2 及び A431 株のいずれにおいてもターゲット mRNA の発現量が低下することが確認された（EC50 は約 2.5 μM）。本試験で用いたヒト細胞株は HBV を感染させていない／HBV 発現プラスミドを導入していないことから、ベピロビルセンのオンターゲット活性を検出することはできないため、ヒト SLC41A2 mRNA 発現量に影響を示さなかった濃度がオンターゲット作用を示す濃度とどの程度の乖離があるのかを直接比較することはできない。しかしながら、HBV 発現プラスミドを恒常的に導入した HepG 2.2.15 細胞株を用いた別の検討におけるベピロビルセンのオンターゲット作用（HBV RNA の発現低下作用）の EC50（122 nM）は、陽性対照 ASO（ISIS582460）によるターゲット mRNA の発現量の低下作用の EC50（113 nM）と同程度であった（2.7.2.4.4.2.1.1.B）ことを踏まえ、仮にベピロビルセンがオンターゲット作用を示すと想定される濃度を ISIS582460 と同程度と仮定（すなわち、EC50 は約 2.5 μM 程度と仮定）すると、ヒト SLC41A2 mRNA 発現量に対しては本試験の最高濃度（20 μM）でも影響がみられなかった（すなわち、EC50 は少なくとも 20 μM 超）ことから、オンターゲット作用を示す濃度との乖離は低く見積もって 10 倍超であると推察された。以上より、ベピロビルセンがヒト SLC41A2 mRNA 発現に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

更に、ヒトゲノムにみられる既知の SNPs を蓄積したデータベース（dbSNP）を用いて同様の解析を行ったところ、ベピロビルセンによって発現低下が引き起こされる可能性のある既知のバリアントは確認されなかった。

以上の試験成績から、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。

3.1.2. ヒト PBMC 及びヒト TLR9 を過剰発現させた細胞におけるサイトカイン及びケモカイン産生に及ぼす影響

hPBMC 及び hTLR9 を過剰発現させた HEK293XL 細胞株（HEK293XL-hTLR9A）を種々の濃度のベピロビルセンで処理し、ベピロビルセンの免疫活性化作用について評価した。本試験では、陽性対照として CpG モチーフを含む ASO を用いた（2019N419130 及び 2019N419133、4.2.1.2）。

ドナー（2 例）の全血より得た PBMC を PBS で洗浄し、遠心分離した後、ペニシリン及びストレプトマイシンを添加した 10% FBS 含有 RPMI に再懸濁した。再懸濁した各ドナー由来の細胞（duplicate）に、ベピロビルセン（0.0128～200 μM）を添加し、37℃で 24 時間インキュベートしたのち、マルチプレックス MSD アッセイにより、培養上清に遊離した IL-6 及び IL-10 濃度を測定した。HEK293XL-hTLR9A 細胞株（n=1、triplicate）も同様の方法で処理したが、遠心分離後はペニシリン及びストレプトマイシンを添加した 10% FBS 含有 DMEM で再懸濁した。その後、ベピロビルセン存在下でインキュベートしたのち、培養上清に遊離した IL-8 及び CXCL10 濃度を測定した。

hPBMC をベピロビルセンで処理すると、培養上清中の IL-6 及び IL-10 濃度は非添加群と比較して上昇した。1 例のドナーでは、IL-6 及び IL-10 濃度が非添加群と比較して最大 22.7 倍（8 μM）及び 3 倍（0.32 μM）上昇し、別のドナーでは最大 18.5 倍（200 μM）及び 2.6 倍（1.6 μM）上昇した。HEK293XL-hTLR9A 細胞株をベピロビルセンで処理すると、培養上清中 CXCL10 濃度は非添加群と比較して軽度に上昇した（最高濃度の 200 μM 処理時に非添加群と比較して 2.1 倍）が、IL-8 濃度の上昇はみられなかった。

別の試験では、hPBMC をベピロビルセンで処理した時の免疫活性化作用（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（2021N491821、4.2.1.2）。

健常ドナー（7 例）由来の凍結保存 hPBMC を解凍・洗浄し、ペニシリン及びストレプトマイシンを添加した 10% FBS 含有 RPMI で再懸濁した。再懸濁した細胞をベピロビルセン（50 μM）、培地のみ、DOTAP（トランスフェクション試薬）／ベピロビルセン（0.2 及び 0.4 μg）混合液又は DOTAP のみ存在下で 18～24 時間インキュベートした。培養上清を回収し、サイトカイン解析用に-80℃で保存した。細胞は、CellTiter-Glo アッセイキット（プロメガ G7573）を用いた生存率アッセイ、又は細胞内サイトカイン染色及び活性化マーカーの評価（フローサイトメトリー法）に用いた。細胞生存アッセイでは、陽性対照としてクロロキン（500 μM；100 mM クロロキン二リン酸原液を培地で希釈し、培養液中のクロロキンの最終濃度が 500 μM となるように調製）を用いた。

2.6.2. 薬理試験の概要文

サイトカイン産生プロファイルは、PRR が核酸を認識することにより活性化される種々の経路を代表する一連のサイトカイン（IFN-β、IFN-γ、IL-18、IL-1β、IL-6、CXCL10、TNF-α 及び IL-12p40）の培養上清中濃度をシングルプレックス（IL-12p40）又はカスタムマルチプレックス MSD アッセイにより測定して評価した。また、PBMC 由来のどの細胞種がベピロビルセンによって刺激され、サイトカイン産生を誘導しているのかについて、細胞表面マーカー（蛍光標識抗体を用いて検出）及びサイトカイン（細胞内染色法）をフローサイトメトリーにより評価した。バリデーション済みのマルチカラーフローパネルを用い、主要な免疫細胞サブセット、活性化マーカー及び主要なサイトカインを特定した。

hPBMC をベピロビルセン（50 μM）存在下で 18 時間インキュベートすることにより、培養上清中の IFN-γ、IL-18、IL-6、CXCL10、TNF-α 及び IL-12p40 は軽度ではあるが有意に上昇した［被験物質非存在下（培地のみ）群と比較して IFN-γ で 1.84 倍、IL-18 で 1.10 倍、IL-6 で 3.63 倍、CXCL10 で 2.17 倍、TNF-α で 3.21 倍及び IL-12p40 で 4.22 倍］。DOTAP を用いてベピロビルセン（0.4 μg）を細胞内に送達させると、ばらつきが認められたものの、7 例のすべてのドナー由来の PBMC で IL-18、IL-1β 及び IL-6 濃度が DOTAP のみを添加した対照群と比較して有意に上昇した（それぞれ 1.38、3.24 及び 2.34 倍）。

本試験で用いた一部の細胞を用いて生存に及ぼす影響を検討したところ、検討したすべてのベピロビルセン処理群において、生存率に対する悪影響はみられなかった。また、3 例のドナーから得た PBMC を用いてベピロビルセン（50 μM）存在下で 19 時間インキュベートし、サイトカイン産生を誘導する細胞種を検討したところ、ベピロビルセン処理によって誘導されるサイトカインは主に単球、樹状細胞及び NK 細胞から産生されることが示された。更に、ベピロビルセンで処理することにより、単球及び樹状細胞の細胞表面において、活性化マーカー（CD40、CD86 及び CD163 等）の発現増加が認められた。これらの細胞よりも軽度ではあるが、B 細胞でも同様の変化が認められた。

3.1.3. 種々の PRR 発現細胞株における免疫活性化作用

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、種々のヒト PRR（TLR2、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 HEK293 細胞株又は THP1-Dual 細胞株（STING のみ）を用いて評価した。これらの細胞株をベピロビルセンで処理した時の NF-κB（TLR 受容体）又は IRF3（STING、RIG-I 及び MDA5）の活性化を指標に自然免疫活性化作用を評価した（2021N491808、4.2.1.2）。

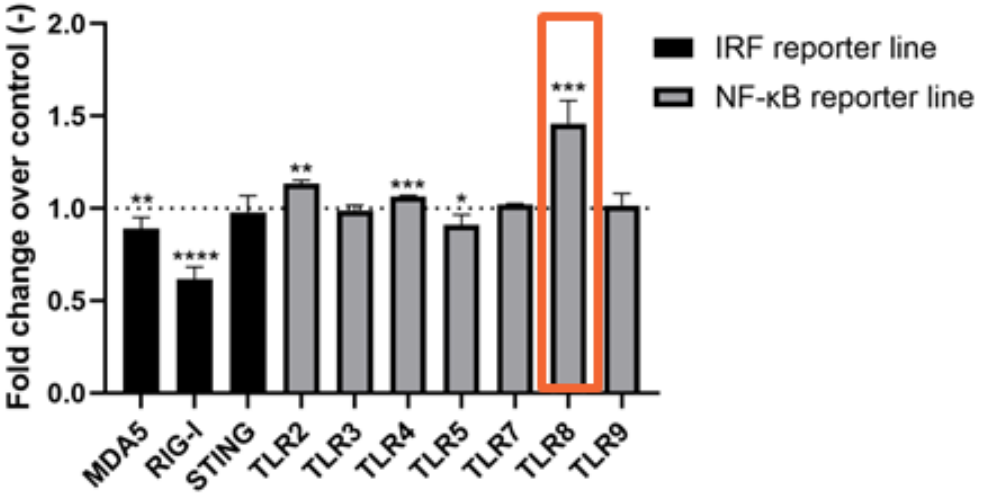
TLR 受容体発現細胞株（NF-κB の下流に SEAP を組み込んだレポーター遺伝子を導入した細胞）を用いた試験では、ベピロビルセン（100、200 及び 300 ng/well）を直接各細胞に添加するか、DOTAP（DOTAP の添加量はベピロビルセンの用量に応じて異なるため、DOTAP 単独群もそれぞれに対応する用量を添加）と予め混合させた液を添加し、16～24 時間インキュベートした。その後、培養上清中の SEAP の活性を測定することによって NF-κB 活性化作用を定量化した。STING、RIG-I 及び MDA5 発現細胞株（IRF3 の下流にルシフェラーゼを組み込んだレポーター遺伝子を導入した細胞）を用いた試験では、ベピロビルセン（20 μM）を直接各細胞に添加するか、トランスフェクション試薬である Lipofectamine 2000

（2 μg/mL）と予め混合させた液を添加し、16～24 時間インキュベートした。その後、培養上清中に分泌されるルシフェラーゼを定量して IRF3 活性化作用を評価した。

その結果、hTLR8 過剰発現細胞株において、DOTAP を用いてベピロビルセンをトランスフェクトした時に軽度ではあるが有意な NF-κB 活性化作用が認められた（ベピロビルセンを単独で添加した場合には認められず）。DOTAP を用いてベピロビルセンの 100、200 及び 300 ng/well）をトランスフェクトした群では、培地のみの対照群と比較して 1.7、1.7 及び 1.8 倍の NF-κB 活性化作用が認められた（DOTAP 単独群では 1.1、1.3 及び 1.6 倍）。図 2 には、DOTAP を用いてベピロビルセン（100 ng/well）をトランスフェクトした群の値を DOTAP 単独群の値で平準化した結果を示した（すなわち、hTLR8 過剰発現細胞株における NF-κB 活性化作用は 1.7/1.1＝約 1.5）。一方、hTLR2、3、4、5、7 及び 9 を発現させた細胞株ではいずれのベピロビルセン群でも明らかな NF-κB 活性化作用は認められなかった。マウス TLR8 を発現させた細胞では、ベピロビルセンを単独又はトランスフェクション試薬を用いて細胞に導入した場合でも、有意な NF-κB 活性化作用は認められなかった（図は示していない）。RIG-I、MDA5 及び STING を発現させた細胞では、ベピロビルセンを単独処理又はトランスフェクション試薬を用いて細胞に導入した場合のいずれにおいても、IRF3 経路の活性化は認められなかった。

以上より、ベピロビルセンは hTLR8 をわずかに活性化させることが示されたが、STING、RIG-I、MDA5 並びに hTLR2、3、4、5、7 及び 9 に対しては活性化作用を示さなかった。

図 2　　種々のヒト PRR 発現細胞株における免疫活性化作用



Source: GSK Study Report 2021N491808, m4.2.1.2, Figure 8. Composite graph of cell lines on different backgrounds overexpressing PRRs of interest. A test for significance was performed on all cell types for response towards transfected bepirovirsen relative to the respective control. For IRF reporter cell lines, fold changes were normalized to media. For NF-κB reporter cell lines, fold changes were normalized to DOTAP. Means and standard deviations are shown. *p*-value >0.05 (not significant), *p* ≤0.05 (*), ≤0.01 (**), ≤0.001 (***) and ≤0.0001 (****).

3.1.4. ヒト GPVI に対する親和性

2'-MOE ASO の臨床試験では血小板減少がみられており、その表現型は大きく 2 つ（Phenotype 1 及び 2）に分類される[Crooke, 2017; Slingsby, 2022]。2'-MOE ASO でみられる血小板減少の主な表現型は Phenotype 1 であり、血小板減少の程度は軽度～中等度で、血小板上に発現する GPVI 受容体への結合と関連していると考えられている。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たことから（2.6.6.3.3.1 及び 2.5.5.7.1.2）、ベピロビルセンの GPVI 受容体への結合性を蛍光偏光法により評価した（2022N521527、4.2.1.2）。

ヒト GPVI 及び HSA（対照蛋白質）を段階的に希釈して duplicate でアッセイプレートに添加したのち（最高濃度 500 μM）、蛍光色素 Alexa488 で標識したベピロビルセン（別名：GSK5209540A 又は 1660161）をアッセイバッファー（PBS）中 10 nM となるように添加した。室温で 30 分間インキュベートした後、Pherastar プレートリーダーで偏光蛍光を測定した。Duplicate で測定した値の平均値を 4 パラメータロジスティックモデルに当てはめて滴定曲線を得た。解離定数（KD）は GraFit ソフトウェア v7.0.1 を用いて算出した。

Alexa488 で標識したベピロビルセン（GSK5209540A）はヒト GPVI に結合し、その KD（平均値）は 0.89 μM であった。この値は、in vivo 試験において軽度～中等度の血小板減少を誘発し、ex vivo 試験においてヒト血小板の活性化を誘導することが報告されている他の 2 種類の 2'-MOE ASO の結合親和性と同程度であった（例：ISIS104838 の GPVI に対する KD は 1.2°μM[Slingsby, 2022]）。Slingsby らの報告と同様に、Alexa488 で標識したベピロビルセンの対照蛋白質 HSA への結合親和性はヒト GPVI と比べて低かった（KD は 7.1 μM）。

以上のように、ベピロビルセンのヒト GPVI への結合親和性は in vivo 試験で軽度～中等度の血小板減少を誘発することが知られている他の 2 種類の 2'-MOE ASO と同程度であることが示された。

3.2. In vivo 試験

3.2.1. ヒト TLR8 ノックインマウスにおける免疫活性化作用

ベピロビルセンが TLR8 依存的なメカニズムを介して自然免疫系のシグナル伝達を活性化させるかを、サイトカイン産生作用を指標に評価した（2021N491084、4.2.1.2）。一本鎖 RNA 及び TLR8 アゴニストは hTLR8 に作用してサイトカイン産生を誘導するが、マウス TLR8 には作用しないことが報告されているため[Forsbach, 2008]、hTLR8 ノックインマウス（hTLR8 マウス）を用いてベピロビルセンの作用を検討し、野生型 C57BL/6 マウスでの作用と比較した。

試験 1

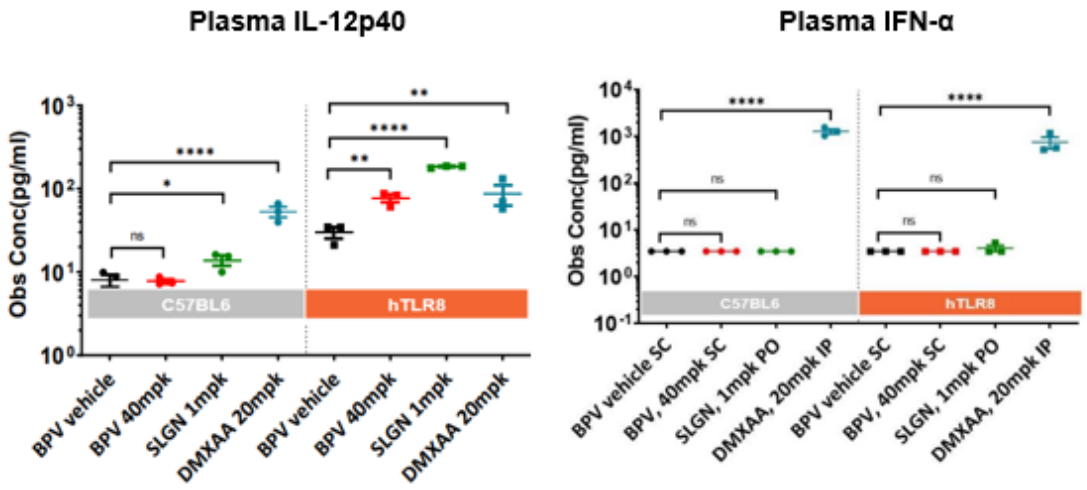
野生型 C57BL/6 マウス及び hTLR8 マウス（n=6 /群）にベピロビルセン（40 mg/kg、皮下投与）、selgantolimod（TLR8 アゴニスト；1 mg/kg、経口投与）、DMXAA（マウス STING アゴニスト；20 mg/kg、腹腔内投与）又は媒体（PBS、皮下投与）を単回投与したのち、4 及び 12 時間後に各群 3 例ずつ血液を採取し、血漿中サイトカイン（CXCL10、IL-18、TNF-α、IL-10、IL-12p40、IFN-α、IFN-β 及び IFN-γ）濃度を、Luminex アッセイにより測定し

た。また、hTLR8 マウスにベピロビルセンを投与することによって認められたサイトカイン濃度の上昇が肝臓での mRNA 発現誘導に由来するものかどうかを明らかにするため、投与 4 及び 12 時間後にすべてのマウスから肝臓及び脾臓を摘出して RNA を抽出し、qPCR により組織中のサイトカイン（*Cxcl10*、*Ifng*、*Il-6*、*Il-10*、*Il-12b*、*Il-18* 及び *Tnf*）mRNA 発現量を測定した。

hTLR8 マウスにベピロビルセン（40 mg/kg）及び selgantolimod（1 mg/kg）を投与すると、血漿中の複数のサイトカイン（IL-12p40、CXCL10、TNF-α 及び IL-6）濃度の上昇がみられた。代表的な例として、投与 4 時間後の血漿中 IL-12p40 に対する作用を図 3 左に示した。ベピロビルセン（40°mg/kg）の単回皮下投与により、hTLR8 マウスでは血漿中 IL-12p40 濃度の上昇が認められたのに対し、野生型 C57BL/6 マウスでは認められなかった。Selgantolimod（1 mg/kg；陽性対照）投与群では、hTLR8 マウス及び野生型 C57BL/6 マウスのいずれにおいても血漿中 IL-12p40 濃度の上昇がみられたが、野生型 C57BL/6 マウスでの上昇はわずかであり、上昇の程度は hTLR8 マウスの方が明らかに高かった。一方、DMXAA（20°mg/kg；陽性対照）では hTLR8 マウス及び野生型 C57BL/6 マウスのいずれにおいても、血漿中 IFN-α 濃度の上昇がみられたが、ベピロビルセン及び selgantolimod 投与群ではいずれのマウスにおいても IFN-α 濃度の上昇は認められなかった（図 3 右）。

hTLR8 マウスにベピロビルセン（40 mg/kg）を単回皮下投与することにより、媒体群と比較して肝組織中 *Cxcl10* 及び *Tnf* 遺伝子の発現量が有意に増加したが、同マウスの脾臓組織ではこの作用は認められなかった。Selgantolimod（1 mg/kg）投与群では、媒体群と比較して有意差はみられなかったものの、肝臓において *Ifng* mRNA の発現量が増加する傾向が認められた。その他にも、脾臓及び肝臓でいくつかのサイトカイン mRNA 量の軽微な増加が認められたが、いずれも媒体群と比較して有意差は認められなかった。

図 3 野生型 C57BL/6 マウス及び hTLR8 マウスにベピロビルセンを投与した 4 時間後の血漿中 IL-12p40 及び IFN-alpha 濃度



Source: GSK Study Report 2021N491084, m4.2.1.2, Figure 1 and 3. "C57BL/6" = mice expressing murine TLR8. "hTLR8" = mice expressing human TLR8. BPV = bepirovirsen, SLGN= selgantolimod, oral TLR8 agonist, DMXAA = murine STING agonist, mpk = mg/kg, PO (oral), SC (subcutaneous), IP (intraperitoneal). ns = not significant p >0.05, * p < 0.05, ** P<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001 (One-way ANOVA).

試験 2

ベピロビルセンにより誘導される自然免疫活性化の組織特異性について評価した。野生型 C57BL/6 マウス及び hTLR8 マウス（n=8 /群）にベピロビルセン（40 mg/kg、皮下投与）、陽性対照として selgantolimod（TLR8 アゴニスト；3 mg/kg、経口投与）、スクランブル ASO141923（別名：ISIS141923；40 mg/kg、皮下投与）、GalNAc を結合させたベピロビルセン（GSK3389404；10 及び 40 mg/kg、皮下投与）及び DMXAA（マウス STING アゴニスト；20 mg/kg、腹腔内投与）又は媒体（PBS、皮下投与）を単回投与した。投与 4 及び 24 時間後にそれぞれ各群 4 例ずつ血液を採取し、血漿中サイトカイン（CXCL10、IL-18、TNF-α、IL-10、IL-12p40、IFN-α、IFN-β、IFN-γ 及び IL-6）濃度を、Luminex アッセイにより測定した。また、投与 4 及び 24 時間後にすべてのマウスから組織検体（肝臓、脾臓及び回腸）を採取して、RNA を抽出し、qPCR により組織中のサイトカイン（*Cxcl10*、*Ifng*、*Il-12b* 及び *Tnf*）mRNA 発現量を測定した。また、肝臓組織については *Il-6*、*Ccl2*、*Ccl3*、*Ccl4*、*Ifna* 及び *Ifnb*、回腸組織については *Il-6* mRNA 発現量についても測定した。

hTLR8 マウスにベピロビルセン（40 mg/kg）を単回皮下投与又は selgantolimod（3 mg/kg）を単回経口投与することにより、血漿中サイトカイン濃度（IL-12p40、CXCL10、TNF-α 及び IL-6 等複数のサイトカイン）の上昇がみられた。代表的な例として、投与 4 時間後の血漿中 IL-12p40 に対する作用を図 4 左に示した。スクランブル ASO（40 mg/kg）及び GalNAc を結合させたベピロビルセン（GSK3389404：10 mg/kg）投与群におけるサイトカイン誘導作用は、ベピロビルセン（40 mg/kg）投与群と比較して弱かった。

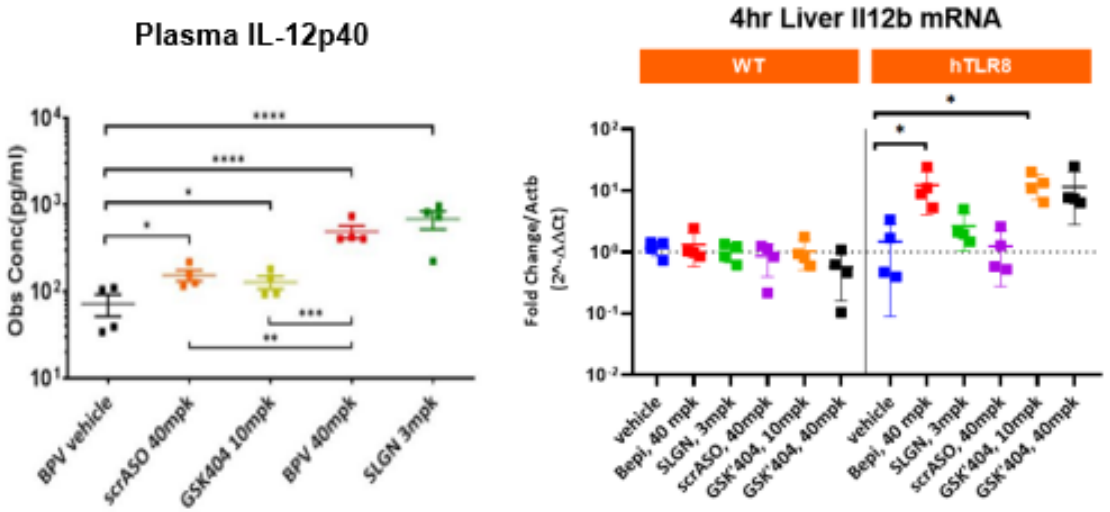
肝臓、脾臓及び回腸組織中のサイトカイン mRNA 量を qPCR により測定したところ、サイトカイン産生の組織特異性が示され、selgantolimod 投与群では hTLR8 マウスの回腸及び

2.6.2. 薬理試験の概要文

ベピロビルセン投与群では hTLR8 マウスの肝臓で特徴的な作用が認められた。hTLR8 マウスに selgantolimod（3 mg/kg）を経口投与した群では、回腸組織において *Cxcl10*、*Ifng*、*Il-12b* 及び *Il-6* の mRNA 発現が誘導された。ベピロビルセン（40 mg/kg）投与群では、肝臓組織において、*Cxcl10*、*Il-12b* 及び *Tnf* の mRNA 発現の誘導がみられた（代表として、投与 4 時間後の *Il-12b* の発現について図 4 右に示した）。また、ベピロビルセン（40 mg/kg）投与群ではその他に肝組織におけるケモカイン *Ccl2* 及び *Ccl4* mRNA 発現の誘導も認められた。GalNac 結合ベピロビルセン（10 mg/kg）投与群では肝臓における *Il-12b*、*Tnf* 及び *Ccl4* mRNA の発現量が有意に増加した（40 mg/kg 群でも同様の傾向がみられたが有意差は認められず）。一方、スクランブル ASO（40 mg/kg）の投与では、検討したすべての組織（脾臓、肝臓及び回腸）でサイトカイン mRNA 量の増加は認められなかった。

以上のように、hTLR8 マウスを用いて組織中の mRNA 発現量を検討した試験成績から、ベピロビルセンは TLR8 依存的な機序により肝臓でサイトカイン発現を誘導することが示された。

図 4　hTLR8 マウスにベピロビルセンを投与した 4 時間後の血漿中 IL-12p40 及び肝臓中 Il-12b mRNA 発現量



Source: GSK Report 2021N491084, Figure 11 and 15. "WT" = C57BL/6 mice expressing murine TLR8. "hTLR8" = mice expressing human TLR8. "BPV/Bepi" = Bepirovirsen; GSK3228836. "SLGN" = Selgantolimod. "GSK'404" = GSK3389404, GalNAc conjugated version of bepirovirsen. "scrASO" = naked scrambled ASO. "mpk" = mg/kg. Graphs show individual biological replicates (n=4 mice per group), mean and standard error of the mean (left) or standard deviation (right). Plasma protein cytokine concentrations (left) were log*10*-transformed and a one-way ANOVA was performed on each cytokine. Treatment means were obtained with 95% CIs and comparisons were calculated. For mRNA analysis (right), statistical Analysis by Kruskal-Wallis test was performed on log-transformed values followed by Dunn's multiple comparisons test to compare treatments to vehicle control. Non-adjusted (left) or adjusted (right) p value >0.05 (not significant; n.s.), ≤0.05 (*), ≤0.01 (**), ≤0.001 (***) and ≤0.0001 (****).

3.2.2. ヒト TLR8 ノックインマウスにベピロビルセン投与した時に活性化される肝臓細胞に関する検討

hTLR8 マウスにベピロビルセンを投与することにより肝臓においてサイトカイン遺伝子の発現が誘導されることが示されたことから、これらの発現誘導に関与している肝臓中の細胞を同定した（2024N551134、4.2.1.2）。

hTLR8 マウス（n=5 /群）にベピロビルセン（40 mg/kg）又は媒体（PBS）を単回皮下投与し、4 時間後に肝臓を摘出して、左外側葉からホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製した。蛍光標識した特異的 DNA プローブを用いた in situ hybridization によってサンプル中の mRNA を検出する試薬キット（蛍光多重染色用 RNAScope）を用い、細胞を同定するための IHC（クッパー細胞を抗 F4/80 抗体及び Opal 780 蛍光色素を用いて同定）と組み合わせて、複数のサイトカインの mRNA（*Ccl2*、*Ccl4*、*Cxcl10* 及び *Tnf*）を全自動免疫染色装置 Bond Rx（ライカ社製）を用いて検出した。

hTLR8 マウスにベピロビルセン（40 mg/kg）を投与した群では、媒体投与群と比較して、投与 4 時間後の肝臓における *Ccl4*、*Ccl2*、*Tnf* 及び *Cxcl10* の発現レベルが統計学的に有意に高値であった。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。*Cxcl10* の発現は、F4/80 陽性細胞だけでなく、F4/80 陰性肝細胞においても同程度の誘導が認められたが、肝細胞では TLR8 が発現していないことから[Faure-Dupuy, 2018]、本試験でみられた *Cxcl10* の誘導は、ベピロビルセンに対する直接的な反応ではなく、一次応答細胞から産生される TNF 等のサイトカインを介した二次的な反応である可能性が考えられた[Narumi, 2000]。

これらの試験成績から、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）が活性化されることが示された。

3.2.3. HBV 感染マウスにおける免疫活性化の評価

HBV 感染及び HBV mRNA の存在がベピロビルセンの自然免疫活性化作用に影響を及ぼす可能性を検討するため、AAV ベクターに HBV ゲノムを組み込んだ AAV-HBV を用いた慢性 HBV 感染マウスモデルにベピロビルセンを投与した時のサイトカイン誘導について検討した（2024N551134、4.2.1.2）。

野生型 C57BL/6 マウス及び hTLR8 マウス（n=5/群）に AAV-HBV を感染させた（Day 1）のち、群分け及び被験物質投与開始日の計 2 回（野生型 C57BL/6 マウスでは Day 84/85 及び 91/92、hTLR8 マウスでは Day 28 及び 35）採血し、血漿中 HBs 抗原濃度を ELISA 法で測定することによって HBV 感染を確認した（採血日が異なる理由は、野生型 C57BL/6 感染マウスは他の試験で AAV-HBV を感染させたマウスの余剰分を用いたため）。感染確認後、ベピロビルセン（40 mg/kg）又は媒体（PBS）を単回皮下投与し、その 4 時間後に血漿及び肝臓検体を採取した。血漿中サイトカイン濃度（IL-1β、IL-10、IL-6、CXCL1、TNF-α、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、IL-12p40 及び CXCL10）は MSD アッセイで測定した。肝臓サンプルは、サイトカイン評価の前に液体窒素中で瞬間凍結し、-80℃で保存したのち、肝臓 RNA を単離し、qPCR により組織中のサイトカイン（*Il-12b*、*Il-10*、*Il-6*、*Cxcl1*、*Tnf*、*Ifna*、*Ifnb1*、*Ifng*、*Il-1b*、*Cxcl10*、*Ccl2* 及び *Ccl4*）mRNA 発現量を測定した。

2.6.2. 薬理試験の概要文

野生型 C57BL/6 マウスでは、AAV-HBV 非感染マウス及び慢性感染マウスのいずれにおいても、ベピロビルセン投与後にサイトカイン誘導は認められなかった。hTLR8 マウスでは、AAV-HBV 感染の有無にかかわらず、他の試験でみられた結果と同様に血漿中サイトカイン濃度の上昇及び肝臓におけるサイトカイン遺伝子発現の増加が認められた。その作用は非感染マウス及び慢性感染マウスで同程度であり、統計学的な有意差は認められなかった。以上のように、ベピロビルセン投与後のサイトカイン誘導に対して AAV-HBV 感染の影響はみられなかった。

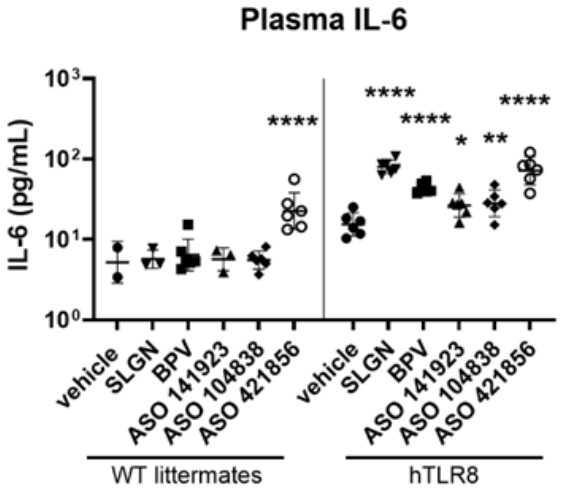
3.2.4. 種々の ASO により誘導される免疫応答の比較

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自然免疫応答（3.2.1）が ASO の配列に関連しているかを評価するため、hTLR マウス及び野生型 C57BL/6 同腹仔マウス（n=6/群）にベピロビルセンと同じ塩基長かつ同じ 5-10-5 ギャップマーデザインの他の ASO を皮下投与（いずれも 40 mg/kg）し、ベピロビルセン（40 mg/kg、皮下投与）の作用と比較した（2024N549296、4.2.1.2）。検討した ASO には、ASO141923（ターゲットを持たないスクランブル ASO、別名：ISIS141923）、ASO421856（TLR9 活性化作用を有する）及び ASO104838（軽微な炎症誘導作用を有する、別名：ISIS104838）が含まれた。また、selgantolimod（3 mg/kg、経口投与）投与群も設けた。投与 4 時間後の血漿中サイトカイン濃度及び肝臓のサイトカイン mRNA 量を測定し、免疫活性化作用を評価した。血漿中サイトカイン濃度（IL-1β、IL-10、IL-6、CXCL1、TNF-α、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、IL-12p40 及び CXCL10）は MSD mouse U-PL アッセイで測定した。また、肝臓サンプルから RNA を単離し、qPCR により組織中のサイトカイン（*Tnf*、*Il-6*、*Il-12b*、*Cxcl10*、*Il-10*、 *Cxcl1*、*Ifng*、*Ifna* 及び *Ifnb1*）mRNA 発現量を測定した。

TLR9 経路を活性化する ASO421856 投与群では、野生型マウス及び hTLR8 マウスのいずれにおいても、TNF-α、IL-6、IL-12p40、CXCL10、IL-10、CXCL1 及び IFN-γ の血漿中濃度及び肝臓における遺伝子発現量の増加がみられた。一方、ベピロビルセン投与群では、hTLR8 マウスにおいて血漿中 TNF-α、IL-6、IL-12p40、IL-10 及び IFN-γ 濃度の有意な増加がみられた（媒体対照群と比較して、それぞれ 3.56、2.85、1.82、1.96 及び 3.10 倍に増加）。また、hTLR8 マウスの肝臓においても血漿で増加がみられたサイトカイン（*Tnf*、*Il-6*、*Il-12b* 及び *Il-10*）に加え、*Cxcl10* 及び *Cxcl1* 遺伝子の発現量に有意な増加がみられた（ただし、*Ifng* は RNA レベルでは検出されなかった）。野生型マウスではこれらのサイトカインの明らかな増加はみられなかった。代表として、血漿中 IL-6 濃度の結果を図 5 に示す。

ベピロビルセン投与による hTLR8 マウスで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における遺伝子発現量の増加）は、ベピロビルセンと同じ塩基長かつ同じ 5-10-5 ギャップマーデザインである ASO104838（軽微な炎症誘発作用を有する）及び ASO141923（HBV を標的としないスクランブル ASO）と比較して統計学的に有意に高かった（データは示していない）ことから、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。hTLR8 マウスに selgantolimod を投与した群では、ベピロビルセンと同様のサイトカイン誘導がみられることが確認された。

図 5　野生型 C57BL/6 マウス及び hTLR8 マウスにベピロビルセンを投与した 4 時間後の血漿中 IL-6 濃度



Source: GSK Report 2024N549296, Figure 1. WT littermate or transgenic hTLR8 male mice (n=6/strain/treatment group) were treated with vehicle (PBS), ASOs, or selgantolimod prior to sacrifice 4hr post-dose. Protein IL-6 was measured from plasma by MSD assay. Plasma cytokine protein data are presented as mean ± standard deviation. Data points represent individual animals. Statistical significance is indicated by asterisks (*p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001, ****p≤0.0001, one-way ANOVA) for comparisons to respective vehicle group.

4. 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、カニクイザ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。

安全性薬理試験の一覧、最終報告書の添付場所及び GLP の適用状況を表 2 に記載した。安全性薬理試験で使用したベピロビルセンのバッチの一覧及び媒体の情報を表 3 に、不純物プロファイルを表 4 に記載した。安全性薬理試験の概要表は 2.6.3 に示す。

表 2　安全性薬理試験一覧

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose)	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
hERG	HEK 293 cells	NA	In vitro	0, 1.39 mg/mL	NA	Yes	[redacted]	2022N503330 (V72411G)	m4.2.1.3
Neurobehavioral effects (Irwin)	Mice (CD-1)	6M	SC	0, 40, 100, **300**	Single	Yes	[redacted]	2019N419057 (505358-AS03)	m4.2.1.3
Cardiovascular effects and respiratory function	Monkeys (cynomolgus)	4M[a]	IV (1 h infusion) SC	0, 12 **40**	Single	Yes	[redacted]	2019N418251 (505358-AS04)	m4.2.1.3
	Mouse (CD1)	10M/10F+6M/6F[R]	SC	0, 4, **12**, 40, 100[b]	13 Weeks	Yes	[redacted]	2019N417087 (505358-AS01)	m4.2.3.2
Renal Assessment[f]	Monkey (cynomolgus)	3M/3F+2M/2F[R] 3M/3F+2M/2F[R] 7M/7F[TK]	IV/SC SC SC	0, 4, **8**, 12[d] 0, 40[d] 0, 8[e]	13 Weeks	Yes	[redacted]	2019N417078 (505358-AS02)	m4.2.3.2
	Monkey (cynomolgus)	4M/4F 7M/7F	SC	0, 3, **6**[c] 10, 20[c]	39 Weeks	Yes	[redacted]	2019N419364 (505358-AS05)	m4.2.3.2

Key:
All studies have been conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) unless otherwise noted.
a = Same cohort of animals used with 1 week washout period between 12 and 40 mg/kg dosing occasions.
b = Animals dosed on Days 1, 3, 5, and 7, and then once weekly doses of 4, 12, 40 and 100 mg/kg/week thereafter through Day 91.
c = Animals dosed on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly from Day 21 in Week 3 to Day 182 (Week 26) or Day 273 (Week 39).
d = Animals were dosed IV or SC on Days 1, 3, 5, then weekly SC doses from Day 7 (Week 1) to Day 91 (Week 13).
e = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7 only.
f = Renal function was assessed during repeat dose toxicity studies by the evaluation of serum chemistry and urinalysis parameters. Data are summarized in m2.6.6, Section 3.3.1.
HEK 293 = Human embryonic kidney cells; IV = Intravenous; NA =Not applicable; R = Recovery; SC = Subcutaneous; TK = Toxicokinetic
NOAEL is indicated in BOLD.

Testing Facility:
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted]

4.1. 中枢及び末梢神経系に及ぼす影響

マウスにベピロビルセン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（2019N419057、4.2.1.3）。

雄の CD-1 マウス（n=6/群）にベピロビルセン（40、100 又は 300 mg/kg）及び媒体（生理食塩液）を単回皮下投与した。投与前並びに投与 1、4 及び 24 時間後に Irwin 法[Irwin, 1968]により一般症状・行動観察を行い、同じ時点で体温測定も実施した。体温の変化については、GraphPad Prism software（v.4.03）を用いて統計学的解析を行った。投与 24 時間後に高用量投与群（300 mg/kg）の肝臓を摘出・凍結し、ベピロビルセンの曝露量測定に供した（2.6.4.3.3.1.1）。

マウスの行動及び体温に対し、ベピロビルセン投与に関連した変化は認められなかった。すべての投薬群で投与後に握力の軽微な低下がみられたが、用量反応性は認められず、媒体投与群でも同様の所見が観察されたことから、ベピロビルセンの投与に関連した所見ではないと考えられた。その他の所見として、Straub の挙尾反応、瞳孔の変化、群居性の低下及び啼鳴がみられたが、これらの所見はいずれも非常に軽微であり、用量反応性は認められず、一部の所見は投与前から観察されたことから、中枢神経系への特異的な作用を示唆するものではないと考えられた。

以上のように、ベピロビルセンを 300 mg/kg までの用量で単回皮下投与し、投与 24 時間後まで Irwin 法を用いた一般症状・行動観察及び体温測定を行ったところ、投薬による影響はみられなかった。

4.2. 心血管系及び呼吸系に及ぼす影響

4.2.1. In vitro 試験

4.2.1.1. hERG アッセイ

hERG 電流を阻害する化合物は、心筋の活動電位持続時間を延長させ、その結果ヒトにおいて QT 間隔延長作用を示す可能性があることから、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（2022N503330、4.2.1.3）。

hERG を安定的に発現させた HEK293 細胞に、ベピロビルセン、媒体（HEPES 緩衝生理食塩水；HB-PS）、E-4031（hERG テール電流阻害作用を有する化合物）又はテルフェナジン（陽性対照）を添加し、ホールセルパッチクランプ法により hERG テール電流に及ぼす影響を評価した。

ベピロビルセン［190 µM（1.39 mg/mL）］による作用をまず n=1 で検討したところ、hERG 電流に明らかな影響を及ぼさなかったため、E-4031（100 nM）を添加して、電流が阻害されることを確認した。このプロセスを 2 回繰り返したが、同様の結果が得られた（計 n=3）。媒体（HB-PS）の電流に及ぼす影響は、約 10.8 分間（ベピロビルセン適用時間よりも長い時間）測定した（n=3）、hERG 電流に明らかな影響を及ぼさなかったため、E-4031（100 nM）を添加して、電流が阻害されることを 2 回のアッセイで確認した。被験物質添加前の安定的な波形をコントロールとして、被験物質を添加した後の電流と比較した（%コントロール）。

媒体対照群（n=3）の hERG テール電流阻害率は 3.0%であったのに対し、ベピロビルセン処理群（n=3）の阻害率は 1.6%であり、これらの間に統計学的に有意な差はみられなかった。同じ条件下で測定した陽性対照（テルフェナジン、60 nM）の hERG テール電流阻害率は 88.3%（n=2）であった。E-4031（100 nM）処理群（n=5）の hERG テール電流阻害率は、91.0%であった。

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 倍以上高値であった。

4.2.2. In vivo 試験

4.2.2.1. サルを用いた試験

カニクイザルにベピロビルセンを単回投与した時の、呼吸系及び心血管系の機能に及ぼす影響を評価した（2019N418251、4.2.1.3）。

テレメトリーを装着した覚醒下の雄のカニクイザル（n=4）に、媒体（生理食塩液、皮下投与）、ベピロビルセンの 12 mg/kg（1 時間かけて単回静脈内投与）及び 40 mg/kg（皮下投与）を漸増投与した。媒体及びベピロビルセン 12 mg/kg の投与間隔は 2 日、並びにベピロビルセン 12 及び 40 mg/kg の投与間隔は 1 週間とした。

投与の 2 時間前から収縮期及び拡張期血圧、平均動脈圧、心拍数、呼吸数、体温並びに第II誘導心電図の測定を開始し、投与 1 時間前から投与 24 時間後までのデータを解析した。心電図パラメータとして PR、RR 及び QT 間隔並びに QRS 時間を算出し、QT 間隔については、心拍数で補正した QTcF（Fridericia 補正式を用いて算出）及び QTcI（個体ごとの QTc）で評価した。媒体及びベピロビルセン（12 及び 40 mg/kg）投与時の心電図波形の解析は、投与開始前、作用のピークが予想される時点（投与 1 時間後）及び測定終了時（投与 24 時間後）に実施した。すべてのパラメータについて、ベピロビルセン投与後の各時点の測定値を、投与前値及び各時点における媒体投与時の値と比較した。

また、ベピロビルセン 12 mg/kg を静脈内投与した約 1 時間後及び 40 mg/kg を皮下投与した約 3 時間後に、各動物から静脈血を採取して、血漿中ベピロビルセン濃度を測定した。更に、動脈血ガス分析（PO_2、PCO_2、pH 及び SO_2%）用に、投与開始前及び投与約 3 時間後に動脈血を採取した。

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・波形及び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 を静脈内投与した約 1 時間後及び 40 mg/kg を皮下投与した約 3 時間後の血漿中濃度はそれぞれ 128.44 及び 110.23 μg/mL（遊離型濃度はそれぞれ、2.18 及び 1.87 μg/mL）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 及び 4.4 倍であった。

表 3　安全性薬理試験に用いた被験物質のバッチ番号及び調製方法

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、これらの試験で使用した被験物質のバッチ番号及び調製方法は 2.6.6 の表 3 に示す。

Batch or Lot Number(s)	Study Type	Species (Strain) or Test System	Test Article or Form	Duration of Dosing	Report No. (Study No.)	Formulation	Concentration (mg/mL)
[redacted]	hERG tail current	In Vitro (HEK 293)	A	NA	2022N503330 (V72411G)	HB-PS	1.39
	Neurobehavioral effects in mice (Irwin)	Mice (CD-1)	A	Single	2019N419057 (505358-AS03)	0.9% Sodium Chloride	4, 10, 30
	Cardiovascular effects and respiratory function in monkeys	Monkeys (cynomolgus)	A	Single	2019N418251 (505358-AS04)	0.9% Sodium Chloride	3, 10, 100

Note: The synthetic route used to prepare the nonclinical batches was consistent to the synthetic route used to prepare the proposed clinical batch, and the batches used in the conduct of the safety pharmacology studies were representative of the batches proposed for clinical use.
Key:
A = Bepirovirsen sodium parent compound [also known as GSK3228836 and ISIS 505358 (5'- GCAGAGGTGAAGCGAAGTGC-3')].
HB-PS = HEPES buffered physiological saline. NA = not applicable.

表 4　安全性薬理試験（in vivo 試験）に用いた被験物質に含まれる不純物

Report No. (Study No.)	Species	Duration of Dosing	Dose Levels bepirovirsen (mg/kg/dose)	Bepirovirsen Batch Number(s)	Impurity Present* (% w/w)	Multiple of Maximum Potential Daily Human Dose**
2019N419057 (505358-AS03)	Mice (CD-1)	Single	40, 100, 300	[redacted]	A[a] 2.4	2.29, 5.71, 17.14
					B[a] 2.0	3.33, 8.33, 25.0
					C[a] 1.1	3.66, 9.16, 27.5
					D[a] 1.8	4.0, 10.0, 30.0
					E[b] 1.4	4.66, 11.66, 35.0
					F[b,c] 1.2	2.0, 5, 15.0
					G[b,c] 0.67	2.23, 5.58, 16.75
					H[c] ≤ 0.76	2.02, 5.06, 15.2
					I[c] ≤ 0.76	
					J[d] 14.9	6.62, 16.55, 49.66

表 4　安全性薬理試験（in vivo 試験）に用いた被験物質に含まれる不純物（続き）

Report No. (Study No.)	Species	Duration of Dosing	Dose Levels bepirovirsen (mg/kg/dose)	Bepirovirsen Batch Number(s)	Impurity Present* (% w/w)	Multiple of Maximum Potential Daily Human Dose**
2019N418251 (505358-AS04)	Monkeys (cynomolgus)	Single	12 (IV) 40 (SC)	[redacted]	A[a] 2.4	0.69, 2.29
					B[a] 2.0	1.0, 3.33
					C[a] 1.1	1.1, 3.66
					D[a] 1.8	1.2, 4.0
					E[b] 1.4	1.4, 4.66
					F[b,c] 1.2	0.6, 2.0
					G[b,c] 0.67	0.67, 2.23
					H[c] ≤ 0.76	0.61, 2.02[e]
					I[c] ≤ 0.76	
					J[d] 14.9	1.98, 6.62

表 4　安全性薬理試験（in vivo 試験）に用いた被験物質に含まれる不純物（続き）

Key:
Multiple of human dose = (Nonclinical dose)(Reported impurity level in %) / (Impurity spec. in %)(Patient dose 6 mg/kg).

* = Specified impurities [m3.2.S.4.1]; reported impurity level [m3.2.S.4.4]..
** = Multiple of human dose was calculated based on a weekly exposure to 300 mg/week of bepirovirsen administered SC as Bepirovirsen solution for injection, 150 mg/mL SSD (equivalent to 6 mg/kg/week) based on a 50 kg body weight) and assuming that the impurity level is at the maximum limit specified in the proposed Drug Substance Specification [m3.2.S.4.1]

a. Impurity measured by [redacted].
b. Impurity measured by [redacted].
c. [redacted] impurity population included due to similar mass. Improvements in amidite manufacture and process knowledge indicate this impurity is predominantly [redacted] impurity population ([redacted])
d. Sum of total impurities measured by [redacted] and total impurities measured by [redacted]
e. Based on the specification applied to the nonclinical batch at the time of analysis, calculation of the Multiple of Maximum Potential Daily Human Dose for impurities H and I was performed by combining the proposed clinical specifications, i.e. [redacted]% as a sum of the specification for H and I (see m3.2S.4.4 and m3.2.S.4.1).

List of specified impurities [m3.2.S.4.1]:
A: [redacted] impurity [redacted] (impurity specification [redacted]%)
B: [redacted] impurity [redacted] ([redacted]) (impurity specification [redacted]%)
C: [redacted] impurity [redacted] ([redacted]) (impurity specification [redacted]%)
D: [redacted] impurity [redacted] (impurity specification [redacted]%)
E: [redacted] impurity [redacted] (impurity specification [redacted]%)
F: [redacted] impurity [redacted] (impurity specification [redacted]%)
G: [redacted] impurity [redacted] (impurity specification [redacted]%)
H: [redacted] impurity [redacted] (impurity specification [redacted]%)
I: [redacted] impurity [redacted] (impurity specification [redacted]%)
J: Total drug-related impurities content (impurity specification [redacted]%)

5. 薬力学的薬物相互作用試験

ベピロビルセンと併用投与される可能性のある他の薬剤との相互作用を評価するための薬力学的試験は実施しなかった。

6. 考察及び結論

ベピロビルセンは、キメラ型の 2'-MOE 修飾ホスホロチオエート ASO であり、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。

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 2.7.2.4.4.2.B 及び 2.7.2.4.5.B に示す。

副次的薬理試験

ヒトトランスクリプトームにおいてベピロビルセンの配列に一致又は部分一致する配列が存在するかをデータベースで検索したところ、2 塩基ミスマッチで相補する 1 種類のヒト mRNA（SLC41A2）が確認されたが、その後に実施したヒト細胞株を用いた in vitro 試験の結果から、ベピロビルセンは SLC41A2 mRNA 発現に影響を及ぼさないことが示された。また、ヒトゲノムにみられる既知の SNPs を蓄積したデータベース（dbSNP）を用いて同様の解析を行ったところ、ベピロビルセンによって発現低下が引き起こされる可能性のある既知のバリアントは確認されなかったことから、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。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。

種々の in vitro 試験によりベピロビルセンの免疫活性化作用を検討した。hPBMC を用いた試験において、IFN-γ、CXCL10、IL-6 及び TNF-α 等のサイトカイン誘導作用が認められた。この作用は弱いものの、複数の試験でみられたことから、再現性があることが示された。また、これらのサイトカインは主に hPBMC 由来の単球、樹状細胞及び NK 細胞で産生されること、hPBMC をベピロビルセンで処理すると単球及び樹状細胞表面における活性化マーカー（CD40、CD86 及び CD163 等）の発現が増加することが示された。別の試験において、ベピロビルセンは hTLR8 に対して弱い活性化作用を示したが、他の TLR には影響を及ぼさないことが確認された。ベピロビルセン投与によって誘導されたサイトカインは、TLR8 リガンドを hTLR8 に作用させた場合に誘導されることが知られているサイトカインであったことからも、ベピロビルセンの免疫刺激作用は主に hTLR8 経路を介して生じると考えられた。

hTLR8 マウスを用いた in vivo 試験においても、ベピロビルセンの投与により、IL-12p40、CXCL10、TNF-α 及び IL-6 等の血漿中サイトカイン濃度が上昇することが示された。これらのサイトカイン濃度の上昇は、野生型マウス（マウス TLR8 は一本鎖 RNA 又は

TLR8 アゴニストには反応しない報告がある）にベピロビルセンを投与した際には認められなかったことからも、ベピロビルセンは hTLR8 を介して免疫応答を活性化させると考えられた。本試験において、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）の作用と比較したところ、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。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（*Tnf*、*Ccl2* 及び *Ccl4* 等）の発現量を増加させることが示された。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は、主にクッパー細胞及び浸潤マクロファージ等の非実質細胞であることが確認された。

上記の in vitro 及び in vivo 試験の成績から、ベピロビルセンが弱い TLR8 活性化作用を有し、特定の免疫細胞において主に TLR8 経路を介して免疫応答を促進させる可能性が示された。このようなベピロビルセンの TLR8 活性化作用は、HBV 持続感染患者の治療において、ウイルス抑制及び免疫系活性化に寄与する可能性が示唆される。

安全薬理試験

ベピロビルセンの安全性薬理試験として、マウス又はサルに単回皮下投与することにより、中枢・末梢神経系に及ぼす影響、又は心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を評価した。マウスに最高 300 mg/kg までの用量で皮下投与しても、中枢及び末梢神経系への影響を示唆する変化は認められなかった。また、ベピロビルセンを 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・波形及び動脈血ガスに対する影響は認められなかった。また、in vitro の hERG アッセイにおいて、ベピロビルセン［190 μM（1.39 mg/mL）］は、hERG テール電流に対して阻害作用を示さなかった。

以上の非臨床薬理試験成績は、HBV 持続感染患者に対する治療薬としての使用を支持すると考えられた。

7. 図表

図表は本文中に記載した。

8. 参考文献

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;27(3):121-129.

2.6.2. 薬理試験の概要文

Faure-Dupuy S, Vegna S, Aillot L, et al. Characterization of Pattern Recognition Receptor Expression and Functionality in Liver Primary Cells and Derived Cell Lines. J Innate Immun. 2018;10(4):339-348.

Forsbach A, Nemorin JG, Montino C, et al. Identification of RNA Sequence Motifs Stimulating Sequence-Specific TLR8-Dependent Immune Responses. J Immunol. 2008;180(6):3729-38.

Irwin S. Comprehensive observation assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia. 1968;13(3): 222-257.

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

Narumi S, Yoneyama H, Inadera H, et al. TNF-alpha is a potent inducer for IFN-inducible protein-10 in hepatocytes and unaffected by GM-CSF in vivo, in contrast to IL-1beta and IFN-gamma. Cytokine. 2000;12(7):1007-16.

Slingsby MHL, Vijey P, Tsai IT, et al. Sequence-specific 2'-O-methoxyethyl antisense oligonucleotides activate human platelets through glycoprotein VI, triggering formation of platelet-leukocyte aggregates. Haematologica. 2022;107(2):519-531.

APPENDIX 1

ADDITIONAL INFORMATION

Studies listed in m2.6.2 comprise those conducted during the formal research and development of the compound. Any early screening studies completed on multiple compounds during the candidate selection phase and prior to in license of bepirovirsen have not been reviewed.

1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW FOR BEPIROVIRSEN

Table 1 List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed with Bepirovirsen

A range of in vitro and in vivo studies has been conducted to investigate the primary pharmacodynamics (virology) of bepirovirsen. A full discussion and tabular listing of these studies is provided in m2.7.2.4, Special Studies.

Table 2 List of Secondary Pharmacodynamic Studies Performed with Bepirovirsen

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Off-target gene analysis	A431, HepG2 cells	In silico In vitro	No	Ionis	2015N239606 (3676-137)	m4.2.1.2
Evaluation in human cells and analysis of cytokines	hPBMCs	In vitro	No	Ionis	2019N419130 (505358-IS04)	m4.2.1.2
Evaluation in human TLR9 cell line and analysis of cytokines	HEK293XL-hTLR9 A cells	In vitro	No	Ionis	2019N419133 (505358-IS05)	m4.2.1.2
In vitro assessment of immunostimulatory effect	hPBMCs	In vitro	No	GSK	2021N491821	m4.2.1.2
In vitro assessment of immunostimulatory effect	hTLR cell lines RIG-I-/MDA-5- Cell Lines STING Cell Lines	In vitro	No	[redacted]	2021N491808	m4.2.1.2
Affinity of ASOs for human glycoprotein 6[a]	Purified recombinant GPVI Purified recombinant HSA	In vitro	No	GSK	2022N521527	m4.2.1.2
Evaluation of immune activation in human TLR8 mice	Wild type and hTLR8 knock-in C57BL/6 mice	SC	No	[redacted]	2021N491084	m4.2.1.2
Investigating responsive cells using RNAscope and the effects of HBV infection on bepirovirsen-mediated responses using AAV-HBV in hTLR8 and WT mice	Wild type and hTLR8 knock-in C57BL/6 mice	SC	No	GSK	2024N551134	m4.2.1.2
Evaluating the differential immune responses induced by various ASO sequences	Wild type and hTLR8 knock-in C57BL/6 mice	SC	No	GSK	2024N549296	m4.2.1.2

Key:
Studies conducted with bepirovirsen sodium parent form (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) unless otherwise noted.
a = This study has been conducted with GSK5209540A, an Alexa488-labelled version of Bepirovirsen.
AAV-HBV = Adeno-associated virus- Hepatis B virus. ASO = antisense oligonucleotide. HEK293XL-hTLR9a = Human embryonic kidney cell line stably transfected to express the human TLR9 gene. hTLR8 = Human Toll-like receptor 8. hPBMCs = Human peripheral blood mononuclear cells. SC = Subcutaneous. WT = wild type.

Testing Facility:
GSK = GSK
[redacted] = [redacted] US
Ionis = Ionis Pharmaceuticals, Inc. (formerly known as ISIS Pharmaceuticals).
[redacted] = [redacted]

Table 3 List of Safety Pharmacology Studies Performed with Bepirovirsen

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose)	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
hERG	HEK 293 cells	NA	In vitro	0, 1.39 mg/mL	NA	Yes	[redacted]	2022N503330 (V72411G)	m4.2.1.3
Neurobehavioral effects (Irwin)	Mice (CD-1)	6M	SC	0, 40, 100, **300**	Single	Yes	[redacted]	2019N419057 (505358-AS03)	m4.2.1.3
Cardiovascular effects and respiratory function	Monkeys (cynomolgus)	4M[a]	IV (1 h infusion) SC	0, 12 **0, 40**	Single	Yes	[redacted]	2019N418251 (505358-AS04)	m4.2.1.3
	Mouse (CD1)	10M/10F+6M/6F[R]	SC	0, 4, **12**, 40, 100[b]	13 Weeks	Yes	[redacted]	2019N417087 (505358-AS01)	m4.2.3.2
Renal Assessment[f]	Monkey (cynomolgus)	3M/3F+2M/2F[R] 3M/3F+2M/2F[R] 7M/7F[TK]	IV/SC SC SC	0, 4, **8**, 12[d] 0, 40[d] 0, 8[e]	13 Weeks	Yes	[redacted]	2019N417078 (505358-AS02)	m4.2.3.2
	Monkey (cynomolgus)	4M/4F 7M/7F	SC	0, 3, **6**[c] 10, 20[c]	39 Weeks	Yes	[redacted]	2019N419364 (505358-AS05)	m4.2.3.2

Key:
All studies have been conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) unless otherwise noted.
a = Same cohort of animals used with 1 week washout period between 12 and 40 mg/kg dosing occasions.
b = Animals dosed on Days 1, 3, 5, and 7, and then once weekly doses of 4, 12, 40 and 100 mg/kg/week thereafter through Day 91.
c = Animals dosed on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly from Day 21 in Week 3 to Day 182 (Week 26) or Day 273 (Week 39).
d = Animals were dosed IV or SC on Days 1, 3, 5, then weekly SC doses from Day 7 (Week 1) to Day 91 (Week 13).
e = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7 only.
f = Renal function was assessed during repeat dose toxicity studies by the evaluation of serum chemistry and urinalysis parameters. Data are summarized in m2.6.6, Section 3.3.1.
HEK 293 = Human embryonic kidney cells; IV = Intravenous; NA =Not applicable; R = Recovery; SC = Subcutaneous; TK = Toxicokinetic
NOAEL is indicated in **BOLD.**

Testing Facility:
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted]

2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Not applicable.

3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS

Not applicable.

4. SAFETY PHARMACOLOGY

Table 4 Safety Pharmacology Studies with Bepirovirsen

Organ Systems Evaluated	Species (Strain)	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg/dose)	No. Per Sex Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliant	Report No. (Study No.)
hERG	HEK 293 cells	In vitro	1.39 mg/mL (190 µM)	3 cells per concentration	No effect on hERG channel tail current was observed.	Yes	2022N503330 (V72411G)
Neurobehavioral effects (Irwin)	Mice (CD-1)	SC	40, 100, or **300**	6M	No effects on neurobehavioral function were observed.	Yes	2019N419057 (505358-AS03)
Cardiovascular effects and respiratory function	Monkeys (cynomolgus)	IV (1 h infusion) SC	12 **40**	4M[a]	No effects on cardiovascular or respiratory function were observed	Yes	2019N418251 (505358-AS04)

Note: NOAEL is indicated in **BOLD.**
Renal function was assessed during repeat dose toxicity studies by the evaluation of serum chemistry and urinalysis parameters. Reports number 2019N417087 (505358-AS01); 2019N419097 (505358-AS06); 2019N417078 (505358-AS02); 2019N419364 (505358-AS05) are summarized in m2.6.6, and tabulated summary in m2.6.7 Table 13, Table 16, Table 17 and Table 18 respectively. Reports are located in m4.2.3.2.
Key:
All studies have been conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358).
HEK 293 = Human embryonic kidney cells; IV = Intravenous; SC = Subcutaneous.
a = Same cohort of animals used with 1 week washout period between 12 and 40 mg/kg dosing occasions.

5. PHARMACODYNAMIC DRUG INTERACTIONS

Not applicable.