TABLE OF CONTENTS

1. まとめ 6
2. 単回投与毒性試験 9
3. 反復投与毒性試験 10
3.1. 緒言 10
3.2. マウス 12
3.2.1. 皮下投与 12
3.2.1.1. 4 週間投与毒性試験（非 GLP 試験） 12
3.2.1.2. 13 週間皮下投与毒性試験（休薬期間：13 週間） 12
3.2.1.3. 13 週間皮下投与毒性試験（不純物の安全性評価を含む） 14
3.2.1.4. 13 週間皮下投与毒性試験（不純物の安全性評価を含む） 15
3.2.1.5. 26 週間皮下投与毒性試験（休薬期間：13 週間） 16
3.3. サル 18
3.3.1. 皮下投与 18
3.3.1.1. 13 週間静脈内及び皮下投与毒性試験（休薬期間：13 週間） 18
3.3.1.2. 39 週間皮下投与毒性試験（休薬期間：26 週間） 20
4. 遺伝毒性試験 32
4.1. 緒言 32
4.2. In vitro 試験 34
4.2.1. 細菌を用いる復帰突然変異試験 34
4.2.2. 哺乳類細胞を用いる染色体異常試験 34
4.3. In vivo 試験 35
4.3.1. マウス小核試験 35
4.4. 配列解析 35
4.5. 遺伝毒性不純物の合成経路の評価 36
4.5.1. 出発原料、中間体及び試薬 36
5. がん原性試験 41
5.1. 緒言 41
5.2. マウス 43
5.2.1. 104 週間がん原性試験 43
6. 生殖発生毒性試験 49
6.1. 緒言 49
6.2. 受胎能及び胚・胎児発生に関する併合試験 51

6.2.1. マウス 51
6.3. 胚・胎児発生に関する試験 52
6.3.1. ウサギ 52
6.3.1.1. 用量設定試験 52
6.3.1.2. 胚・胎児発生に関する試験（本試験） 52
6.4. 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 53
6.4.1. マウス 53
6.5. 幼若動物を用いた毒性試験 54
7. 局所刺激性試験 60
8. その他の毒性試験 60
8.1. サイトカイン放出試験 63
8.2. 光毒性 63
8.3. 不純物の試験 63
8.3.1. 復帰突然変異試験（Ames 試験） 64
8.3.1.1. [redacted]（starting material） 64
8.3.1.2. [redacted]（starting material） 64
8.3.1.3. [redacted]（starting material） 64
8.3.1.4. [redacted]（starting material） 64
8.3.1.5. [redacted]（starting material） 64
8.3.1.6. [redacted]（starting material） 65
8.3.1.7. [redacted]（starting material） 65
8.3.1.8. [redacted]（starting material） 65
8.3.1.9. [redacted]（[redacted]）（starting material for the synthesis of [redacted], [redacted], [redacted] and [redacted] phosphoramidites） 65
9. 考察及び結論 67
9.1. 投与中止及び死亡 68
9.2. 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 69
9.3. 血小板への影響 69
9.4. 肝臓への影響 70
9.5. 腎臓への影響 71
9.6. 乳腺への影響 72
9.7. その他の血液学的パラメータへの影響 73

9.8. 血液凝固への影響 73
9.9. 投与部位への影響 73
9.10. 遺伝毒性 73
9.11. 受胎能、胚・胎児発生、並びに出生前及び出生後の発生への影響 74
9.12. 局所刺激性 74
9.13. T 細胞依存性抗体反応 75
9.14. がん原性 75
9.14.1. 肝細胞腫瘍 76
9.14.2. 血管肉腫／血管腫 76
9.14.3. 皮膚／皮下線維肉腫 77
9.14.4. ベピロビルセンにおいて他の 2'-MOE ASO よりも腫瘍の発現頻度の高値を示した理由 77
9.15. ベピロビルセン及び標準治療薬である核酸アナログ併用時の非臨床安全性評価 79
9.16. 結論 80
10. 図表 87
11. 参考文献 87

2.6.6 及び 2.6.7 の略号等一覧

略号（略称）	英語	日本語
ADP	Adenosine Diphosphate	アデノシン二リン酸
A/G	Albumin/Globulin	アルブミン／グロブリン
ALP	Alkaline Phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	Alanine Transaminase	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 Transferase	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
Bb	Bilirubin	ビリルビン
CHB	Chronic Hepatitis B	B 型肝炎ウイルス持続感染
CHL	Chinese Hamster Lung	チャイニーズハムスター肺組織
Cmax	Maximum Concentration	最高血中濃度
CPA	Cyclophosphamide	シクロホスファミド
CPN	Chronic Progressive Nephropathy	慢性進行性腎症
CRP	C-reactive Protein	C 反応性蛋白
ECG	Electrocardiogram	心電図
EFD	Embryofetal Development	胚・胎児発生
EMS	Ethyl Methanesulfonate	メタンスルホン酸エチル
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
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M	免疫グロブリン M
IFN-γ	Interfereon gamma	インターフェロンγ
IP-10	Interferon Gamma-induced Protein 10	インターフェロンγ誘導性タンパク質 10
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	単球走化性タンパク質
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins	マクロファージ炎症タンパク質
MNPCEs	Micronucleated Polychromatic Erythrocytes	小核を有するマウス多染性赤血球
2’-MOE	2 – O-Methoxyethyl	2'-O-メトキシエチル
MRHD	Maximum Recommended Human Dose	最大推奨臨床用量
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PCE	Polychromatic Erythrocytes	多染性赤血球
PCR	Polymerase Chain Reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
(Q)SAR	Quantitative Structure Activity Relationships	定量的構造活性相関

RBC	Red Blood Cell	赤血球
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α	腫瘍壊死因子 α
WT	Wild Type	野生型

2.6.6. 毒性試験の概要文

1. まとめ

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は、マウス及びサルを用いたそれぞれ最長 26 及び 39 週間皮下投与試験（サルの試験では一部静脈内投与）を実施した。ベピロビルセンの遺伝毒性は一連の in vitro 及び in vivo 試験で評価し、がん原性はマウスを用いた 2 年間がん原性試験で評価した。また、マウス及びウサギを用いた一連の生殖発生毒性試験を実施した。

オリゴヌクレオチド（ベピロビルセンを含む）は ICH S10 ガイドラインの対象外であるため、ベピロビルセンの光毒性試験は実施していない。ベピロビルセンは ASO であるため、光毒性を示す可能性は低いと考えられる。また、ミトコンドリア毒性は 2'-MOE ASO のクラスエフェクトとして報告されていないことから、ベピロビルセンのミトコンドリア毒性に関する in vitro 評価は実施していない。

ベピロビルセンは、慢性 HBV 患者における標準治療薬である核酸アナログと併用して投与される。ベピロビルセンの併用投与毒性試験は実施していないが、併用投与による毒性又は標的器官の重複する可能性に関する非臨床評価については 9.15 項に示す。

ベピロビルセンを用いた主要な毒性試験の一覧を表 1 に示す。

表 1　ベピロビルセンを用いた主要毒性試験一覧

Study Type and Duration	Route of Administration	Species	Compound Administered
Repeat Dose Toxicity			
- 13 weeks	SC	Mouse	A
- 13 weeks	SC	Mouse	
- 13 weeks	SC	Mouse	
- 26 weeks	SC	Mouse	
- 13 weeks	SC (and IV)	Monkey	
- 39 weeks	SC	Monkey	
Genotoxicity			
- Ames test	In vitro	*S. typhimurium, E. coli* Chinese Hamster	A
- Chromosome Aberration Assay	In vitro	Mouse	
- Bone Marrow Micronucleus Assay	SC		
Carcinogenicity			
- 2-year	SC	Mouse	A
Reproductive and Developmental			
- FEED	SC	Mouse	A
- EFD	SC	Rabbit	
- PPND	SC	Mouse	

Key: A: Bepirovirsen sodium salt formulated in 0.9% w/v saline. EFD = Embryofetal Development. FEED = Fertility and Early Embryonic Development. PPND = Pre and Postnatal Development

ベピロビルセンのヒトでの投与経路は皮下投与であることから、毒性試験は主に皮下投与で実施した。毒性試験に用いたすべての動物種及び系統（CD-1 マウス、CByB6F1 WT マウス、NZW ウサギ、カニクイザル）については、毒性所見の評価及びそれらのヒトへの外挿

性を評価するための病理組織学的な背景所見や、多種多様な医薬品に対する反応に関する豊富なデータが利用可能である。試験に用いた動物種は、動物とヒトとのベピロビルセンの薬物動態及び代謝の類似性、並びにこれまでに得られている ASO に対する反応及びそれらの知見のヒトへの外挿性に基づいて選択した。一般的に、げっ歯類は、霊長類（ヒトを含む）と比較して、ASO に関連したこのクラスの薬物に特有の炎症反応に対する感受性が高いため[Henry, 2008]、全身曝露量に基づく安全域の算出に適した動物種ではない。一方、サルはヒトに外挿可能な ASO 代謝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。

重要な試験（各試験のトキシコキネティクス評価を含む）はいずれも OECD 加盟国において OECD 試験ガイドラインに従い、特記しない限り、GLP に準拠して実施した。用量設定試験は、GLP の一般原則に従って実施した。本概要に含まれていないベピロビルセンに関する試験の一覧を Appendix 1 に示す。

毒性試験は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（特記しない限り）。本申請概要で示した投与量及び濃度は、いずれも親化合物（以下、ベピロビルセン）として表示する。

毒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。ベピロビルセンの原薬規格には、10個の[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］が存在する（3.2.S.4.1）。[redacted]不純物は、[redacted]% w/w [redacted]の規格で管理される[Capaldi, 2017]（3.2.S.3.2）。毒性試験で使用された原薬のバッチ番号及び処方の詳細を、表 3、表 6、表 9 及び表 12 に、これらのバッチに含まれる不純物の詳細を、表 4、表 7、表 10、表 13 に示す。ベピロビルセン原薬中不純物の遺伝毒性リスク評価を 4.5 項に示す。

毒性試験において、特記しない限り、ベピロビルセンは最大濃度 120 mg/mL の塩化ナトリウム溶液に調製し、媒体には 0.9%生理食塩液（以下、媒体）を用いた。

毒性試験における重要所見の概要を以下に示す。試験デザイン及び重要所見の詳細を 3～8 項及び 2.6.7 表 12～27 に、毒性試験成績の包括評価を 9 項に示す。

単回投与毒性

- ベピロビルセンの単回投与毒性試験は実施していないが、安全性薬理試験及び遺伝毒性試験において、ベピロビルセンをそれぞれ 2000 及び 40 mg/kg まで単回投与したときの忍容性は良好であった。

反復投与毒性

- マウス及びサルにおいてベピロビルセン投与後に観察された毒性所見は、他の 2′-MOE ホスホロチオエート ASO で観察されたものと概ね一致していた[Frazier, 2015]。

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.6. 毒性試験の概要文

- サルにおいて、ベピロビルセンの 10 mg/kg/回以上の用量を最長 39 週間投与したときの投与に関連した主な悪影響と判断される所見として、血小板減少、低アルブミン血症及び血管炎が認められた。これらの用量においてベピロビルセン投与に関連した死亡例もみられており、この死亡は、血管周囲炎によるものではなく、血小板減少による出血性又は血栓性変化及び／又は低タンパク血症によるものと考えられた。
- マウスにおいて、ベピロビルセンの 30 mg/kg/回以上の用量を最長 26 週間投与したときの投薬に関連した悪影響と判断された所見として、肝酵素上昇、肝細胞の単細胞壊死／有糸分裂像の増加及び糸球体腎症が認められた。これらの変化は、ベピロビルセンのような免疫刺激性を有する ASO に対してげっ歯類は感受性が高い[Henry, 2008]ことに関連したものと考えられる。
- マウス及びサルにおけるその他の毒性所見として、最低用量（3 mg/kg/回）で組織／器官（投与部位を含む）に好塩基性顆粒及びマクロファージ空胞化が認められた。また、30 mg/kg/回（マウス）及び 8 mg/kg/回（サルの網状赤血球のみ）で血液学的変化がみられ、40 mg/kg/回（サル）では一過性の血液凝固異常（APTT 延長）も認められた。
- 臨床病理学的パラメータの変化及び病理組織学的変化は、マウス及びサルともに、休薬期間終了後に部分的又は完全に回復した。
- マウス 2 年間がん原性試験では、10 mg/kg/回以上の用量を投与した雌雄において、投与部位で線維化（軽微）の発現頻度の増加が認められた。

遺伝毒性

- ベピロビルセンは in vitro 遺伝毒性試験及びマウス小核試験で遺伝毒性を示さなかった。また、ベピロビルセンが三本鎖（トリプレックス）形成を介して遺伝毒性を誘発する可能性は低く、また、遺伝毒性に関する懸念すべき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と考えられた。

がん原性

- マウスにベピロビルセンの最大 30 mg/kg/回を週 1 回皮下投与した結果、肝腫瘍（肝細胞癌、腺腫及び血管肉腫／血管腫）、投与部位／皮膚線維肉腫、全身性血管肉腫の発現頻度の増加がみられ、概して雌よりも雄で発現頻度が高い傾向が認められた。
- この試験で観察された腫瘍は、他の 2'-MOE ASO（及び／又はげっ歯類におけるサロゲート）で報告されているものと定性的に類似しており、発現頻度はベピロビルセンで顕著に高かったが、これらはこのクラスの薬物（オリゴヌクレオチド）におけるマウス又はげっ歯類に特有のものであり、ヒト（CHB 患者を含む）への外挿性は低いと考えられる[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2019; Volanesorsen , 2018]。

生殖発生毒性

- ベピロビルセンは、マウス及びウサギでそれぞれ 25 及び 25.2 mg/kg/回（85.5 及び 88.2 mg/kg 週に相当）までの投与において、マウスの受胎能、マウス及びウサギの胚・

胎発生に対して影響を及ぼさなかった。いずれの動物種においても流産、胎児の外表・骨格・内臓の異常又は変異の発現頻度に影響は認められなかった。ベピロビルセンは胎児肝臓中では検出されなかった。

- ウサギでは、88.2 mg/kg/週の投与により、軽度の胎児体重の低値がみられたが、これは母動物毒性に起因すると考えられた。
- マウスの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、出生児の肝臓及び乳汁中にベピロビルセンが検出されたが、その濃度は母動物の肝臓で検出された濃度の 1.0%未満であった。妊娠期間、分娩、授乳並びに F1 及び F2 世代への影響は認められなかった。

局所刺激性

- ベピロビルセンの独立した局所刺激性試験は実施していない。
- サル 13 週間投与試験では、最大 40 mg/kg/回の用量で投与部位に意義のある変化は認められなかった。サル 39 週間投与試験では、投与部位に一過性の変化（1 週間以内に消失）がみられ、一部の動物ではより長期的（3 週間以上）に変化が観察されたが、本所見は投与手技に関連した可能性が高いと考えられた。病理組織学的検査では、3 mg/kg/回以上の用量で局所的な炎症細胞浸潤及び線維化が認められたが、いずれも悪影響ではないと判断された。マウスでは、13 及び 26 週間投与試験において、投与部位に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／程度の増大が認められた。

その他の毒性

- マウス脾臓細胞にベピロビルセン（200 又は 1000 µg/mL）を処理してインキュベーションした結果、サイトカイン及びケモカイン（IP-10、MIP-1α、TNF-α）の増加が認められた。しかしながら、ヒト PBMC を用いたより包括的な評価が実施されている（2.6.2.3.1.2）ことを考慮すると、マウスを用いた in vitro サイトカイン解析結果の臨床的意義は限定的であると考えられる。

2. 単回投与毒性試験

ベピロビルセンの単回投与毒性試験は実施していない。ベピロビルセンの急性毒性は、最大 2000 mg/kg を単回投与したマウス小核試験（2.6.6.4.3.1）、並びにマウス及びサルにそれぞれ最大 300 及び 40 mg/kg を投与した安全性薬理試験（2.6.2.4）で評価した。このアプローチは、海外において慢性疾患の適応症として既に承認されている 2'-MOE ASO での非臨床安全性評価にも適用されている[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2019]。

これらの試験の結果、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。

3. 反復投与毒性試験

3.1. 緒言

CD-1 及び CByB6F1 WT マウス並びにカニクイザルを用いた反復投与毒性試験を実施した。反復投与毒性試験は皮下投与により実施したが、サル 13 週間投与試験では、いくつかの群で最初の週にベピロビルセンを静脈内投与し、その後は皮下投与に変更した。ベピロビルセンの臨床使用を支持するため、マウス及びサルにそれぞれ最長 26 及び 39 週間投与した。各試験では、データを有意義に評価できるよう十分な数の動物を使用した。

ベピロビルセン反復投与後の主要所見及び影響量／無影響量を表 18 に、主要な毒性試験におけるベピロビルセン反復投与後の血漿中濃度の比較結果を表 21 に示す。実施した試験の一覧を GLP 適合状況及び報告書格納場所とともに表 2 に示す。各試験の概要表を 2.6.7 表 12～18 に示す。

ベピロビルセン反復投与時の TK データの概要表を 2.6.5 表 8～11（吸収、血漿中濃度）、表 14～22（分布、肝臓及び腎臓中濃度）、表 24～26（分布、胎盤及び乳汁移行）及び表 30（代謝）に、TK 結果については 2.6.4 で考察する。

ベピロビルセンのロット番号及び処方に関する情報を表 3 に、各ロットに含まれる不純物の詳細を表 4 に示す。

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 2 ベピロビルセンの反復投与毒性試験一覧

Table 2 List of Repeat Dose Toxicity Studies Conducted 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
4-Weeks[h]	Mouse (CD-1)	11M+3M[TK]	SC	40	4-weeks[g]	No	GSK	2023N535316 (M73070N)	m4.2.3.2
13 Weeks	Mouse (CD-1)	10M/10F +6M/6F[R]	SC	4, **12**, 40, 100[a]	13 Weeks	Yes	[redacted]	2019N417087 (505358-AS01)	m4.2.3.2
13 Weeks	Mouse (CByB6F1 [Wild Type])	12M/12F +18M/18F[TK]	SC	4, 12, **40**	13 Weeks	Yes	[redacted]	2019N406770 (M71693G)	m4.2.3.2
13 Weeks (qualification study)	Mouse (CD-1)	12M/12F+6M/6F[f]	SC	**12**[e]	13 Weeks	Yes	[redacted]	2021N488385 (M72229G)	m4.2.3.2
26 Weeks	Mouse (CD-1)	12M/12F+6M/6F[R]	SC	3, **10**, 30, 60[b]	26 Weeks	Yes	[redacted]	2019N419097 (505358-AS06)	m4.2.3.2
13 Weeks	Monkey (cynomolgus)	3M/3F+2M/2F[R] 3M/3F+2M/2F[R] 7M/7F[TK]	IV/SC SC SC	4, **8**, 12[c] 40[c] **8**[d]	13 Weeks	Yes	[redacted]	2019N417078 (505358-AS02)	m4.2.3.2
39 Weeks	Monkey (cynomolgus)	4M/4F 7M/7F	SC	3, **6**[b] 10, 20[b]	39 Weeks	Yes	[redacted]	2019N419364 (505358-AS05)	m4.2.3.2

Testing Facility: [redacted] = [redacted] GSK = GSK. [redacted] = [redacted] = [redacted]

Note. All studies were conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358), unless noted otherwise. NOAEL is indicated in **BOLD.**

Key: F: Female. GLP: Good Laboratory Practice. IV = Intravenous. M: male. NA = Not applicable. R = Recovery. SC = SC. TK = Toxicokinetic.

a = Animals dosed on Days 1, 3, 5, and 7, and then once weekly doses of 4, 12, 40 and 100 mg/kg/dose thereafter through Day 91.

b = Animals dosed on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly from Day 21 in Week 3 to Day 273 (Week 39).

c = Bepirovirsen was administered to the 4, 8 and 12 mg/kg/dose groups on Days 1, 3, and 5 by IV (1 hour infusion), then SC once weekly on Day 7 through Day 91. Bepirovirsen was SC administered to the 40 mg/kg/dose group on Days 1, 3, and 5, then SC once weekly on Day 7 through Day 91. Bepirovirsen was SC administered to the TK group at 8 mg/kg/dose on Days 1, 3, 5, and 7.

d = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7 only.

e = Animals dosed on Days 1, 3, 5, and 7, and then once weekly doses of 12 mg/kg/dose thereafter through Day 91.

f = 12 terminal timepoint animals per sex per group (0 and 12 mg/kg) and 6 satellites animals per sex for terminal liver and kidney bepirovirsen tissue level assessment.

g = 11 male main study animals and 3 males used for terminal bepirovirsen tissue bioanalysis. Animals were dosed on Days 1, 3, 5, 7, 14, 21 and 28.

h = Study conducted with GSK4421747A, the sodium salt is a chimeric 2'-MOE ASO targeted to hepatitis B virus ribonucleic acid. It has the same sequence and chemistry as bepirovirsen but has been synthesized to have only [redacted]% of the [redacted] present.

3.2. マウス

3.2.1. 皮下投与

3.2.1.1. 4 週間投与毒性試験（非 GLP 試験）

GSK4421747A は B 型肝炎ウイルスのリボ核酸を標的としたキメラ型の 2′-MOE ASO であり、GSK4421747A 投与後の影響を評価するための比較対照としてベピロビルセンを用いた。雄 CD-1 マウス（各群 11 例、TK 測定のために追加で各群 3 例）にベピロビルセンの 0（媒体）又は 40 mg/kg/回を 4 週間にわたり 7 回皮下投与した［初週に 4 回（試験 1、3、5 及び 7 日）、以降は週 1 回（試験 14、21 及び 28 日）］（2023N535316、4.2.3.2）。試験の概要を 2.6.7 表 12 に示す。TK 結果（分布、肝臓及び腎臓中濃度）については 2.6.4.3.3.1.1 で考察する。

ベピロビルセン投与に関連した所見は、CD-1 マウスを用いた 13 及び 26 週間投与試験で得られた結果と一致していた（投与スケジュール／期間に基づく）。ベピロビルセンを投与した全例において、クッパー細胞で投薬に関連した好塩基性顆粒の蓄積がみられ、クッパー細胞の細胞質肥大、細胞数増加、小クラスター形成（軽度）を特徴とした。また、投薬に関連した肝細胞の所見として、細胞質変化（軽微～軽度、多巣性；均一な両染性～好酸性細胞質を特徴とする）、肥大（軽微）及び単細胞壊死（軽微）がみられ、これに関連して ALT、AST 及び GLDH の高値（対照群のそれぞれ 2.2、1.56 及び 2.9 倍）も認められた。

3.2.1.2. 13 週間皮下投与毒性試験（休薬期間：13 週間）

CD-1 マウス（各群雌雄 10 例、休薬群として 12 及び 100 mg/kg/回群に雌雄各 6 例を追加）にベピロビルセンの 0（媒体）、4、12、40 及び 100 mg/kg/回を試験 1、3、5 及び 7 日、試験 14～91 日の期間は週 1 回皮下投与し、その後 13 週間の休薬期間を設けた（2019N417087、4.2.3.2）。生存性確認、一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、血液・血液生化学的検査、薬物濃度測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。試験の概要を 2.6.7 表 13 に示す。肝臓及び腎臓中濃度は試験 93 日（全投薬群）及び 182 日（休薬群）に採取したサンプルを用いて測定し、これらの結果については 2.6.4.3.3.1.1（分布、肝臓及び腎臓中濃度）及び 2.6.4.4.2.1.1（代謝）で考察する。

本試験では軽微～中等度の毒性変化がみられ、大部分はげっ歯類において ASO 投与時に認められる既知の炎症反応に起因したものであり[Henry, 2008]、休薬により発現頻度及び程度は概ね軽減した。

生存性、一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査及び剖検で投薬に関連した影響は認められなかった。

40 mg/kg/回以上の群で AST 及び ALT の軽度～中等度の高値（対照群のそれぞれ最大 3.2 及び 4.3 倍）がみられ、これに関連して肝臓で組織学的変化が認められた。統計学的に有意であったのは、100 mg/kg/回群の雄でみられた ALT 高値のみであった。これらの変化は休薬により概ね回復した。40 mg/kg/回以上の群の雄でトリグリセリドの軽微低値（対照群の最大 52%）及び赤血球系パラメータの軽度低値（対照群の最大 14%）がみられた。赤血球系パラメータの低値は休薬期間終了後もみられたが、これに関連した組織学的変化は認められなか

ったことから、悪影響ではないと考えられた。ALT 又は AST 増加は休薬期間終了までに回復した。

投与期間終了時の剖検では、肝重量の高値（100 mg/kg/回群の雌雄で、対照群のそれぞれ 17 及び 13%）、脾臓重量の高値（40 mg/kg/回以上の群の雌雄で、対照群のそれぞれ 40～55%及び 29～38%）及び胸腺重量の低値（100 mg/kg/回群の雌で対照群の 33%）が認められた。これらの変化は概ね休薬期間終了時も認められた。また、12 及び 100 mg/kg/回群の雄では、休薬期間終了後に腎重量の高値が認められた（投与との関連性は不明）。

投与期間終了時の病理組織学的検査では、12 mg/kg/回以上の群において、肝臓クッパー細胞で用量依存的な軽微～中等度の好塩基性顆粒の蓄積（細胞内への被験物質の取り込みを示す）がみられた。好塩基性顆粒を有するクッパー細胞では、時折、軽度の細胞質空胞化がみられた。また、12 mg/kg/回以上（大部分は 100 mg/kg/回）の群で、時折、軽微～軽度のびまん性（汎小葉性）又は小葉中心性肝細胞肥大（細胞サイズ増大による）がみられ、100 mg/kg/回群では肝重量（体重に対する相対重量）の高値も認められた。40 mg/kg/回以上の群では軽微～軽度の肝細胞壊死、変性（軽度～中等度の肝酵素上昇と関連）及び有糸分裂像の増加がみられた。全投薬群において、対照群と比較して、肝臓の単核細胞（リンパ球及びマクロファージ）浸潤の発現頻度の軽度高値がみられた。

休薬期間終了後、肝臓所見の発現頻度／程度は概ね軽減したが、100 mg/kg/回群の雄での肝細胞肥大の発現頻度及び程度は、投与期間終了時よりも増強した。また、100 mg/kg/回群で休薬期間終了後に肝細胞の巨大核がみられた。これらの所見の程度は、100 mg/kg/回群の雄 1 例で中等度であったことを除き、軽微であった。

腎臓では、投与期間終了時に尿細管上皮細胞及び間質内マクロファージの好塩基性顆粒並びに糸球体腎症がみられた。12 mg/kg/回以上の群で腎尿細管上皮（主に近位尿細管）に軽微～中等度の好塩基性顆粒の蓄積、100 mg/kg/回群では間質内マクロファージでも軽微に認められた。これらの所見は細胞内への被験物質の取り込みを示すものと考えられるが、これに関連した壊死は認められなかった。40 及び 100 mg/kg/回群の各雌 1 例で軽微な糸球体腎症がみられ、多巣性の糸球体細胞外基質及び／又は細胞密度の増加を特徴とした。

休薬期間終了時の腎臓所見としては、100 mg/kg/回群の雄 4 例でみられた軽微～中等度の糸球体腎症のみであり、投薬群において尿細管上皮及び間質内マクロファージで認められた好塩基性顆粒は消失した。

脾臓では、100 mg/kg/回群の雄及び 40 mg/kg/回以上の群の雌において、投与期間終了時に髄外造血（軽微）の発現頻度の軽度高値がみられ、これに関連して脾臓重量の増加も認められた。休薬期間終了時では、100 mg/kg/回群の雄 3 例で脾臓髄外造血がみられたが、雌ではみられなかったことから、休薬期間終了時に髄外造血の発現頻度増加はないと判断した。

胸腺では、投与期間終了時に 100 mg/kg/回群の皮質リンパ球減少の発現頻度増加（雄で軽微～中等度、雌で軽微）がみられた。本所見は、ベピロビルセン投与に対するストレスに関連した二次的変化（間接的影響）と考えられ、これに関連して 100 mg/kg/回群の雌では胸腺重量の低値が認められた。休薬期間終了時でも、100 mg/kg/回群の雄で胸腺における皮質リンパ球減少の発現頻度・程度の高値がみられたが、雌では休薬期間終了時に投薬に関連した明らかな影響は認められなかった。

投与部位では、投与期間終了時に全投薬群の雄雌で真皮及び皮下組織において、好塩基性顆粒を有するマクロファージの集簇（細胞内への被験物質の取り込みを示す）が用量依存的にみられ、その程度は雄で軽微～軽度、雌で軽微～中等度であった。また、全投薬群で投与部位に軽微～軽度の単核細胞浸潤が低頻度に認められた。休薬期間終了時では、好塩基性顆粒を有するマクロファージ集簇の程度に著しい軽減が認められた。

好塩基性顆粒を有するマクロファージは複数の組織にみられたが、特に肝臓、投与部位、リンパ節で顕著であり、その他の組織ではほとんど認められなかった。休薬期間終了時では、マクロファージ内の好塩基性顆粒の発現頻度及び程度ともに顕著に軽減した。

精子形成サイクル検査において、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。

以上より、NOAEL は 12 mg/kg/回と推定された。12 mg/kg/回群の試験 93 日における腎臓及び肝臓中の雌雄合算平均ベピロビルセン濃度はそれぞれ 95.8 及び 57.7 μg/g であった。

3.2.1.3. 13 週間皮下投与毒性試験（不純物の安全性評価を含む）

ベピロビルセン関連不純物の安全性確認、及び規格限界値（3.2.S.4.1）設定の妥当性の裏付けのため、CByB6F1 WT マウスに 13 週間皮下投与したときのベピロビルセンの毒性及び TK を評価した。マウス（各群雌雄 12 例）にベピロビルセンの 0（媒体）、4、12 及び 40 mg/kg/回を試験 1、3、5 及び 7 日、その後、試験 91 日まで週 1 回（計 16 回）皮下投与した（2019N406770、4.2.3.2）。体重・摂餌量測定、血液・血液生化学的検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。試験の概要を 2.6.7 表 14 に示す。TK 結果については 2.6.4.2.2.1.1（吸収、血漿中濃度）及び 2.6.4.3.3.1.1（分布、肝臓及び腎臓中濃度）で考察する。

ベピロビルセンは良好な忍容性を示し、投薬に関連した一般状態及び体重・摂餌量への影響は認められなかった。

12 mg/kg/回群の雌 1 例が試験 92 日（最終投与は試験 91 日）に死亡したが、死因は不明であった。本例では、試験期間を通して体重及び摂餌量への影響はみられず、死亡前に一般状態への影響も認められなかった。本薬に関連した組織学的所見として、腎尿細管における軽微な好塩基性顆粒の蓄積、並びに下顎唾液腺、坐骨神経及び投与部位における軽微～軽度の顆粒含有マクロファージの集簇がみられた。肝臓では軽微な単核細胞浸潤も認められた。40 mg/kg/回群においても一般状態に悪影響はみられておらず、肉眼的又は組織学的変化は他の動物と同様／同程度であったことを考慮すると、死亡はベピロビルセンに関連したものではなく、投与処置による可能性も考えられる。

投薬に関連した臨床病理学的所見として、全投薬群の雌雄で赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリットの低値、40 mg/kg/回群の雄で網状赤血球数の低値、40 mg/kg/回群の雌で赤血球分布幅の高値、40 mg/kg/回群の雌雄で平均赤血球ヘモグロビン量の低値、40 mg/kg/回群の雄で白血球数の低値がみられた。また、40 mg/kg/回群において、雄でグルコースの低値、雌で総コレステロール、総蛋白及びアルブミンの高値、並びに雌雄でトリグリセリドの低値が認められた。

2.6.6. 毒性試験の概要文

肝臓では、40 mg/kg/回群の雌雄で軽微～軽度の肝細胞変性及び単細胞壊死がみられた。これに関連して、40 mg/kg/回群の雌雄で ALT の高値（対照群の 2.49 倍）、AST の高値（対照群の 2.46 倍）、GLDH の高値（対照群の 22.03 倍）等の肝胆道系パラメータに投薬に関連した変化が認められた。40 mg/kg/回群の雄では軽微な有糸分裂像の増加が認められた。12 mg/kg/回以上の群の雄及び 40 mg/kg/回群の雌では、軽微な小葉中心性肝細胞肥大がみられ、40 mg/kg/回群ではこれに関連して肝重量の高値（対照群の 1.17 倍）が認められた。また、単核細胞浸潤の発現頻度の高値がみられ、12 及び 40 mg/kg/回群の雄で軽微、4 及び 12 mg/kg/回群の雌で軽微、40 mg/kg/回群の雌で軽微～軽度に認められた。40 mg/kg/回群の雌雄で肝細胞内に軽微な好塩基性顆粒の蓄積がみられ、12 及び 40 mg/kg/回群の雌雄では軽微な顆粒含有マクロファージ（好塩基性顆粒及び／又は空胞化を伴うクッパー細胞）の集簇が認められた。肝酵素の上昇は軽微であり、肝臓の組織学的所見の程度も軽微～軽度であること、一般状態に悪影響はみられていないこと、また、これらの所見はマウスにおける ASO のクラスエフェクトとして報告されているものであり悪影響ではないと考えられていること[Frazier, 2015]を考慮すると、本試験でみられた肝臓所見はいずれも悪影響ではないと考えられた。

腎臓では、40 mg/kg/回群の雄及び 12 mg/kg/回以上の群の雌で尿細管上皮細胞における好塩基性顆粒の軽微な蓄積が認められた。

脾臓では、12 mg/kg/回以上の群の雄及び全投薬群の雌で軽微な髄外造血がみられ、12 mg/kg/回以上の群では、これに関連して脾臓重量の高値（対照群の最大 1.52 倍）が認められた。また、40 mg/kg/回群の雌雄で軽微な顆粒含有マクロファージ（細胞質に好塩基性顆粒の蓄積を有する）の集簇がみられた。

胸腺では、40 mg/kg/回群の雌雄において、胸腺重量の低値（対照群の 0.71 倍）を伴う細胞密度の軽微低値がみられ、雄ではリンパ球数の低値（対照群の 0.63 倍）も認められた。

その他の投薬に関連した組織学的所見として、全投薬群の雌雄のリンパ節（腋窩、下顎及び腸間膜）、肺、大動脈、心臓、大腿脛骨関節滑膜、耳下腺・下顎唾液腺、膵臓、膀胱、胃、盲腸、腓腹筋・ヒラメ筋、坐骨神経、精嚢、前立腺、精巣上体、腟、皮膚及び投与部位等の複数の組織において、軽微～軽度の好塩基性顆粒含有マクロファージの集簇が認められた。

以上より、本試験において悪影響はみられなかったことから、NOAEL は 40 mg/kg/回と推定された。40 mg/kg/回群の AUC(0-t)及び Cmax（雌雄合算平均）はそれぞれ 116 μg.h/mL 及び 42.4 μg/mL であり、試験 93 日における肝臓及び腎臓中の雌雄合算平均ベピロビルセン濃度はそれぞれ 232.0 及び 272.5 μg/g であった。

3.2.1.4. 13 週間皮下投与毒性試験（不純物の安全性評価を含む）

ベピロビルセンを CD-1 マウス（各群雌雄各 12 例）に 0（媒体）及び 12 mg/kg/回を試験 1、3、5 及び 7 日に 1 日 1 回、その後、週 1 回、合計 13 週間皮下投与（計 16 回）した（2021N488385、4.2.3.2）。剖検時（試験 92 日）の組織採取及び生体分析のため、各群雌雄各 6 例を追加した。生存性確認、一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査（試験開始前のみ）、血液・血液生化学的検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施し

た。TK 用動物の組織（腎臓及び肝臓）中の薬物濃度測定は、試験 92 日に採取したサンプルを用いて実施した。試験の概要を 2.6.7 表 15 に示す。TK 結果については 2.6.4.3.3.1.1（分布、肝臓及び腎臓中濃度）で考察する。

12 mg/kg/回群で赤血球系パラメータへの影響がみられ、赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットの低値（雄で対照群のそれぞれ 0.96、0.91 及び 0.91 倍、雌で対照群のそれぞれ 0.94、0.95 及び 0.96 倍）、リンパ球数の低値を伴う白血球数の低値（雄 1 例、雌 2 例）が認められた。また、心臓、下顎リンパ節、投与部位、皮膚（鼠径部）及び膀胱に軽微～軽度の好塩基性顆粒含有マクロファージの集簇がみられ、腎臓（尿細管）及び肝臓（クッパー細胞）に軽微な好塩基性顆粒が認められた。脾臓重量（絶対及び相対）の高値がみられたが、これに関連した組織学的変化は認められなかった。

本試験で観察された血液学的及び組織学的変化は悪影響ではないと判断されたことから、NOAEL は 12 mg/kg/回と推定された。本用量投与時の肝臓及び腎臓中の平均ベピロビルセン濃度はそれぞれ 45.9 及び 134 µg/g であった。本試験でみられた所見（NOAEL、肝臓及び腎臓中濃度を含む）は、いずれも先に実施したマウスを用いた試験で認められたものと一致した。

3.2.1.5. 26 週間皮下投与毒性試験（休薬期間：13 週間）

CD-1 マウス（各群雌雄 12 例、30 及び 60 mg/kg/回群には休薬群として雌雄各 6 例を追加）に 26 週間投与し、その後 13 週間の休薬期間を設けて、ベピロビルセンの毒性を評価した。マウスにベピロビルセンの 0（媒体）3、10、30 及び 60 mg/kg/回を試験 1、5、10 及び 14 日に皮下投与し、その後、試験 21～182 日まで週 1 回投与（計 24 回）した（2019N419097、4.2.3.2）。生存性確認、一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査（試験開始前、投与期間及び休薬期間終了時の剖検前）、血液・血液生化学的検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。試験の概要を 2.6.7 表 16 に示す。TK 結果については 2.6.4.3.3.1.1（分布、肝臓及び腎臓中濃度）で考察する。

試験 184 日には、各群雌雄各 6 例から血液学的検査用サンプルを採血し、剖検用に割り当てられた別の各群雌雄各 6 例から血液生化学的検査用サルプルを採血した。

試験 273 日には、各群雌雄各 3 例から血液学的検査用サンプルを採血し、休薬期間終了時の剖検用に割り当てられた別の各群雌雄各 3 例から血液生化学的検査用サルプルを採血した。血液サンプルはサイトカイン／ケモカイン及び免疫グロブリン測定に供した。また、代謝物分析のため、60 mg/kg/回群の雌雄各 3 例（非絶食）から試験 175 日の投与後 0～24 時間及び 24～48 時間に採尿した。

本試験では、概して軽微～中等度の毒性所見が用量依存的にみられ、大部分は ASO の肝臓及び腎臓への分布によるものであり、げっ歯類に ASO を投与したときに観察される既知の炎症反応によるものであった[Henry, 2008]。これらの所見の発現頻度及び程度は、概して休薬期間終了時に軽減した。

本試験において死亡及び一般状態への影響は認められなかった。

60 mg/kg/回群の雄及び 10 mg/kg/回以上の群の雌で投薬に関連した軽微～軽度の赤血球系パラメータの低値（対照群の最大 21%）が認められた。これらの所見は網状赤血球及び赤血

球の形態変化を伴わず、休薬期間終了時までに概ね回復した。30 mg/kg/回以上の群の雄で投与期間終了時に統計学的に有意な AST 及び ALT の高値がみられた（対照群のそれぞれ 2.6 及び 4.7 倍）。雌では全投薬群で AST 及び ALT の高値傾向が散発的にみられたが、統計学的に有意でなく、用量との関連性もみられず、休薬期間中に回復した。60 mg/kg/回群の雌雄で投与期間終了時にトリグリセリドの軽度低値（対照群の最大 51%）がみられたが、雌では休薬期間終了時までに回復した。

投与期間終了時の剖検例において、対照群と比較して、肝臓、脾臓及び胸腺の重量変化が認められた。60 mg/kg/回群の雄及び 10 mg/kg/回以上の群の雌で肝臓の相対重量（体重換算）の高値（対照群のそれぞれ 1.1 及び 1.1～1.2 倍）、30 mg/kg/回群の雌で肝臓の平均絶対重量及び相対重量（脳重量換算）の高値が認められた。これらの群でみられた肝重量増加の一因として、肝細胞肥大及び／又はクッパー細胞内の好塩基性顆粒の蓄積・クッパー細胞の空胞化が関与した可能性が考えられる。10 mg/kg/回群の雌で脾臓の相対重量（体重換算）、30 mg/kg/回以上の群の雌雄で脾臓の平均重量（絶対重量並びに体重又は脳重量換算での相対重量）の高値がみられた。これらの器官重量の高値は、雄では用量依存的であったが（対照群の 1.3～1.4 倍）、雌では用量との関連性はみられなかった（対照群の 1.3～1.5 倍）。30 mg/kg/回以上の群で認められた脾臓重量の高値は、投薬に関連した赤脾髄での細胞密度増加に関連したものと考えられる。60 mg/kg/回群の雌で胸腺重量（絶対重量及び脳重量換算での相対重量）の低値がみられ、平均絶対重量は 42.9%低値であった。これらの所見は、60 mg/kg/回群の雌で認められた胸腺皮質でのリンパ球減少の発現頻度・程度の高値を反映したものであり、投薬による直接的又は間接的（ストレス）な影響である可能性が考えられる。

休薬期間終了時では、投与期間終了時に認められた肝臓、脾臓及び胸腺重量の変化は、60 mg/kg/回群の雌における肝臓重量（体重換算での相対重量は 1.2 倍）の高値を除き、回復性が認められた。肝臓の病理組織学的検査では、60 mg/kg/回群の雌で肝重量増加に関連した変化は認められていない。

投与期間終了時の剖検例において、肝臓、腎臓、脾臓及び胸腺で投薬に関連した組織学的変化が認められた。また、全身の組織マクロファージ及び腎尿細管上皮細胞で好塩基性顆粒の蓄積（細胞内への被験物質の取り込みを示す）が認められた。10 mg/kg/回以上の群（雌雄）でクッパー細胞内に好塩基性顆粒の軽微～中等度の蓄積が用量依存的にみられ、肝細胞肥大及び空胞化も認められた。30 mg/kg/回以上の群では細胞質変化が認められた（雄：軽微～中等度、雌：軽微～軽度）。その他に、30 mg/kg/回群の雄 1 例及び 60 mg/kg/回群の雄 2 例で軽微～軽度の汎小葉性肝細胞肥大、60 mg/kg/回群の雄 1 例で軽度の巨大核が低頻度に認められた。30 mg/kg/回群以上の雄及び 10 mg/kg/回以上の群の雌では有糸分裂像の軽度増加が認められた。30 mg/kg/回以上の群の雌雄では軽微な肝細胞単細胞壊死がみられ、AST 及び ALT の高値と一致した。

10 mg/kg/回以上の群の雌雄で近位尿細管上皮細胞内に細胞内への被験物質の取り込みを示す好塩基性顆粒の蓄積がみられたが、これに関連した変性又は壊死は認められなかった。好塩基性顆粒蓄積は概ね軽微であったが、60 mg/kg/回群の雌数例では尿細管上皮細胞内で軽度～重度に認められた。これらのうち 2 例では、軽微～軽度の尿細管上皮細胞の空胞化も認め

られた。また、60 mg/kg/回群の雄 2 例では、間質内マクロファージにおける好塩基性顆粒の軽微な蓄積が認められ、30 mg/kg/回群の雌 2 例及び 60 mg/kg/回群の雌 1 例で糸球体細胞外マトリックスの軽微～軽度増加が認められた。

30 mg/kg/回群の雌及び 60 mg/kg/回群の雌雄では、対照群と比較して赤脾髄の細胞密度増加（軽微）の発現頻度の高値がみられ、脾臓における髄外造血の増加が示唆された。低用量群における赤脾髄の細胞密度増加の発現頻度は対照群と同程度であった。

30 mg/kg/回以上の群の雄及び全投薬群の雌では、胸腺における皮質リンパ球減少の発現頻度及び／又は程度の増強がみられた。本所見は、投薬による直接的又は間接的（ストレス）な影響と考えられるが、一部は通常動物における生物学的変動内の変化である可能性も考えられる。

全投薬群の投与部位において、細胞内への被験物質の取り込みを示す好塩基性顆粒含有マクロファージの集簇（概して軽微～軽度）が用量に応じて認められた。対照群及び投薬群の投与部位で認められたその他の所見は、発現頻度が低く、発現頻度にばらつきがみられたことから、投与法（注射）による影響又は背景的にみられる変化と考えられた。

全身の組織マクロファージにおいて、種々の程度の細胞質空胞化をときに伴う好塩基性顆粒の蓄積（細胞内への被験物質の取り込みを示す）が 30 mg/kg/回以上の群で用量依存的に認められた。組織マクロファージ内の好塩基性顆粒の蓄積は軽微～軽度であり、これに関連した細胞壊死は認められなかった。肝臓及び投与部位以外で顕著な影響が認められた組織／器官は、リンパ節及び生殖器官であった。低用量群では主に肝臓（10 mg/kg/回群）及び／又は投与部位（3 及び 10 mg/kg/回群）に認められた。休薬期間終了時では部分的又は完全な回復性がみられたが、一部の組織では好塩基性顆粒の蓄積が認められた。

精子形成サイクル検査において、投薬に関連すると考えられる影響は認められなかった。

以上より、NOAEL は 10 mg/kg/回と推定された。10 mg/kg/回群の試験 184 日における腎臓及び肝臓中の雌雄合算平均ベピロビルセン濃度はそれぞれ 94.6 及び 54.2 µg/g であった。

3.3. サル

3.3.1. 皮下投与

サル 13 週間投与毒性試験（2019N417078）では、いくつかの投薬群に対して、試験初週の投与は静脈内で実施したが、その後は皮下投与で実施した。それ以外の反復投与毒性試験は皮下投与で実施した。

3.3.1.1. 13 週間静脈内及び皮下投与毒性試験（休薬期間：13 週間）

カニクイザル（各群雌雄 3 例、休薬群として 12 及び 40 mg/kg/回群に雌雄各 2 例を追加）に 13 週間投与し、その後 13 週間の休薬期間を設けて、ベピロビルセンの毒性を評価した（2019N417078、4.2.3.2）。サルにベピロビルセンの 0（媒体）、4、8 及び 12 mg/kg/回を試験 1、3 及び 5 日に静脈内持続投与し、その後、試験 7～91 日まで週 1 回皮下投与した（グループ 1～4）。また、ベピロビルセンの 40 mg/kg/回を試験 1、3 及び 5 日に皮下投与し、その後、試験 7～91 日まで週 1 回皮下投与する群（グループ 5）も設けた。8 mg/kg/回群には

雌雄各 7 例を追加し、試験 1、3、5 及び 7 日に皮下投与した（グループ 6）。試験の概要を 2.6.7 表 17 に示す。TK 結果については 2.6.4.2.2.2.1（吸収、血漿中濃度）、2.6.4.3.3.1.2（分布、肝臓及び腎臓中濃度）及び 2.6.4.4.2.2.1（代謝）で考察する。

毒性評価用動物（グループ 1～5）には、順化期間、投与期間及び休薬期間に、一般状態観察（1 日 2 回）、体重測定、血液凝固検査（フルパネル及び試験 91 日に APTT のみ）、血漿中 C3 及び Bb 濃度測定、血液・血液生化学的検査、サイトカイン／ケモカイン測定、尿検査を実施した。また、皮下投与開始 2 日目以降、各投与日の投与前に投与部位の観察を実施した。眼科学的検査は、順化期間に 1 回（予備動物及びグループ 6 の動物を含む）、並びに試験 13 及び 24 週に実施した。心電図検査は、順化期間に 1 回（予備動物及びグループ 6 の動物を含む）、並びに試験 13 及び 26 週に実施した。TK 用サンプルとして、グループ 1～5 の動物から、投与期間及び休薬期間を通して複数の時点で血液を採取し、グループ 5 の動物から代謝物測定用の尿を採取した。

TK 用動物（グループ 6）には、順化期間及び投与期間に、一般状態観察（1 日 2 回）、体重測定、TK 測定用の採血、投与前に投与部位の観察（試験 3 日から開始）を実施した。

毒性評価用動物（グループ 1～5）は、13 週間投与し、試験 93 日（投与期間終了時）に剖検を実施した。休薬群の動物は、最終投与 13 週間後の試験 182 日に剖検した。

TK 用動物（グループ 6）は、試験 3 日（投与前）、9、16、23、30、44 及び 58 日に雌雄各 1 例を剖検し、TK 測定のため肝臓及び腎臓を採取した。

毒性評価用動物（グループ 1～5）では、剖検時に肉眼観察を実施し、組織を採取した。これらの組織から作成したヘマトキシリン・エオジン染色切片を用いて組織病理学的検査を実施した。予定剖検日に安楽死させたすべての動物で器官重量測定を実施し、また、オフターゲット毒性及び TK 評価を目的に肝臓及び腎臓を採取した。

40 mg/kg/回群で試験 91 日に APTT の一過性の延長がみられた（投与 4 時間後にピーク、ベースライン値と比較して約 1.3 倍）。8 mg/kg/回以上の群では、対照群と比較して、網状赤血球数（絶対及び相対値）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変化は認められなかった。投与期間終了時に、主として 40 mg/kg/回群でアルブミンの低値（投与開始前のベースライン値と比較して約 10%）及びグロブリンの高値（ベースライン値と比較して約 10%）並びにこれらに伴う A/G 比の低値が認められた。12 mg/kg/回群の雄及び 40 mg/kg/回群の雌雄で、対照群と比較して、CRP の高値がみられた。これらの臨床病理学的変化は軽度であり、一般状態観察及び病理組織学的検査で関連する所見は認められなかったことから、悪影響ではないと判断された。休薬期間終了時では、これらの変化は回復性を示した。

12 mg/kg/回群の雄 1 例で試験 65 日に血小板数の顕著な低値（$45\times10^3/\mu L$）がみられ、試験 73 日には更に低値を示した（$16\times10^3/\mu L$）が、休薬によりベースライン値と同程度まで回復した。本所見はベピロビルセンに対する特異体質反応と考えられた。本所見は悪影響と判断されたが、その他の 12 mg/kg/回以上の群の動物で同様の反応は認められなかった。

12 及び 40 mg/kg/回群で投与後に一過性の Bb の高値が認められた。12 mg/kg/回群では、試験 1 日の静脈内投与後 1 時間以内に顕著な高値がみられた。40 mg/kg/回群では、試験 1 日の投与後 8 時間以内にベースライン値（群平均値）の約 5 倍の増加がみられ、同様の変化が

試験 91 日でも認められた。12 及び 40 mg/kg/回群では、バラツキがあるものの、投与期間終了時及び休薬期間に C3 の低値が認められた。

サイトカイン及びケモカイン測定では、40 mg/kg/回群で試験 93 日に MCP-1 の高値が認められた（対照群の約 5 倍、ベースライン値の 6 倍以上）。

40 mg/kg/回群で肝相対重量（体重換算）の高値（対照群と比較して 29%）、12 及び 40 mg/kg/回群で脾臓相対重量（体重換算）の高値（対照群と比較してそれぞれ 76 及び 90%）がみられた。

病理組織学的検査では、肝臓、腎臓及びリンパ節において、用量依存的な好塩基性顆粒の蓄積が認められた。腎臓ではこれに関連した上皮細胞の変性はみられなかった。肝臓ではクッパー細胞の肥大及び大型空胞形成（顆粒含有）がみられたが、変性は認められなかった。リンパ節では組織球で空胞（通常の大きさ又は肥大）を伴う好塩基性顆粒がみられたが、好塩基性顆粒の蓄積に関連した悪影響は認められなかった。

13 週間の休薬期間終了時、12 mg/kg/回群では下顎及び腸間膜リンパ節、40 mg/kg/回群では下顎及び腸間膜リンパ節並びに腎臓で好塩基性顆粒の蓄積が依然として認められた。40 mg/kg/回群では、投与期間終了時と比較して、リンパ節での発現頻度は低下した。これらの組織学的変化はいずれも悪影響ではないと判断された。

投与期間終了時（試験 93 日）には 12 mg/kg/回群の雌 2 例、休薬期間終了時（試験 182 日）には 40 mg/kg/回群の雌雄各 1 例で、血管／血管周囲の炎症が認められた。

以上より、サルにおける NOAEL は 8 mg/kg/回と推定された。8 mg/kg/回群の試験 91 日における AUC(0-48)及び Cmax（雌雄合算平均）はそれぞれ 179 μg.h/mL 及び 27 μg/mL であった。

3.3.1.2. 39 週間皮下投与毒性試験（休薬期間：26 週間）

カニクイザル（各群雌雄 4～5 例、休薬群として 10 及び 20 mg/kg/回群に雌雄各 2 例を追加）に 39 週間投与し、その後 26 週間の休薬期間を設けて、ベピロビルセンの毒性を評価した。サルにベピロビルセンの 0（媒体）、3、6、10 及び 20 mg/kg/回を試験 1、5、10 及び 14 日に皮下投与し、その後、試験 21 日～試験 39 週まで週 1 回皮下投与した（2019N419364、4.2.3.2）。生存性確認、一般状態観察（投与部位を含む）、体重測定、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、免疫グロブリン測定（IgG 及び IgM）、尿検査、補体検査（C3、Bb、C4a）、サイトカイン／ケモカイン測定、T 細胞依存性抗体産生（TDAR）試験、血小板機能検査［ADP に対する血小板の感受性評価（順化期間中）］、網血小板測定、PCR 検査（Simian *Plasmodium*）、TK 評価（血漿及び組織中）、器官重量測定、剖検［投与期間終了時（試験 275 日）及び休薬期間終了時（試験 455 日）］及び病理組織学的検査を実施した。病理組織学的検査は、ヘマトキシリン・エオジン染色切片を用いて実施し、早期剖検例では、腎臓及び心臓組織のグラム染色を実施した。試験の概要を 2.6.7 表 18 に示す。TK 結果については 2.6.4.2.2.2.1（吸収、血漿中濃度）、2.6.4.3.3.1.2（分布、肝臓及び腎臓中濃度）で考察する。

2.6.6. 毒性試験の概要文

投与部位において、最大 20 mg/kg/回の皮下投与により、変色、痂皮形成、腫脹、打撲／擦過傷等が肉眼的にみられ、ほとんどは 1 週間以内に消失した。一部の動物では持続的にみられ、概ね試験 245 日以降に観察された。病理組織学的検査では、軽微～中等度の単核細胞・マクロファージ浸潤及び線維化がみられ、10 mg/kg/回以上の群で好中球浸潤の程度の増強が認められた。剖検時に投与部位で観察された皮膚の肥厚に関連して、10 mg/kg/回以上の群では線維化が認められた。

投与期間及び休薬期間を通じて 8 例の早期死亡／安楽死／投与中止例が認められた（投与期間：3 mg/kg/回群 1 例、20 mg/kg/回群 6 例、休薬期間：10 mg/kg/回群 1 例）。これらのうち、6 例（10 mg/kg/回群の 1 例及び 20 mg/kg/回群の 5 例）では、以下に述べるようにベピロビルセン投与に関連する所見が認められた。

20 mg/kg/回群では、1 例（動物番号 52）を重度の血小板数減少のため試験 86 日に安楽死させた。2 例［動物番号 47（雌）及び 4（雄）］は、持続的な補体活性化（C3 低値及び Bb 高値）、全身性炎症、及び腎臓への影響を伴う血清アルブミンの持続的かつ顕著な低値のため、それぞれ試験 240 又は 241 日に安楽死させた。動物番号 47 では、顕著な血小板数の低値、並びに子宮及び腎尿細管腔の出血に関連すると考えられる赤血球数の顕著な低値が認められた。更に、種々の臓器の動脈で血管／血管周囲への単核細胞又は混合炎症細胞の浸潤（軽微～軽度）を伴う内膜及び外膜の肥厚（軽微～軽度）が認められた。また、腎臓、肝臓、脾臓及び子宮の重量高値がみられ、肝臓の褐色化も認められた。これらの臓器では関連した病理組織学的変化が認められた。腎臓では糸球体の軽度肥大、好中球の軽微浸潤、尿細管腔における軽度の出血、軽微な蛋白及び細胞（好中球）円柱、単核細胞の軽度浸潤、並びに尿細管上皮の軽微再生が認められた。肝臓ではクッパー細胞の軽微肥大及クッパー細胞内の好塩基性顆粒の中等度の蓄積、単核細胞の軽度浸潤及び褐色色素の軽微沈着が認められた。脾臓ではリンパ濾胞におけるリンパ球密度の軽度増加、造血亢進がみられた。子宮及び子宮頸部でそれぞれ中等度及び軽度の単核細胞浸潤、軽度の出血が認められた。

動物番号 58（雄）では、持続性の血小板数低値及び全身性炎症を示唆する所見が認められ、試験 258 日（投与期間終了 10 週間後）に死亡発見された。直接的な死因は肺動脈血栓及び肺における急性かつ重度の出血であったが、これらの所見の原因は不明である。

動物番号 51（雌）では、持続的な血小板減少がみられ、試験 91 日以降に持続的な補体活性化（C3 低値及び Bb 高値）、試験 135 日まで全身性炎症を示唆する所見、試験 233 日まで腎臓への影響（尿中アルブミン、総蛋白及び尿蛋白／クレアチニン比の高値、並びに尿沈渣中の RBC）も認められたため、早期に投与を中止した。これらの変化の大部分は試験 455 日までに概ね回復したが、尿中蛋白排泄量の高値は持続的に認められ、剖検での腎臓所見と一致した。また、下顎リンパ節マクロファージ内の好塩基性顆粒の軽微増加、腎臓の糸球体の軽微肥大、尿細管に軽微な蛋白円柱が認められた。

10 mg/kg/回群では、雄 1 例（動物番号 32）で持続的な補体活性化、全身性炎症、体重減少、腎障害並びに膝・手関節の炎症が認められたため、試験 354 日（投与期間終了 12 週間後）に安楽死させた。これらの所見は、一部投薬に関連したものである可能性が考えられたが、尾部損傷及び複数回の外科的処置による可能性も考えられた。安楽死に至った直接的な

原因は、CRP 高値を伴う重度の血清アルブミンの低値並びに膝・手関節の急性関節炎と考えられる。

10 mg/kg/回群の雌 1 例（動物番号 41）では、試験 65 及び 128 日に観察された血小板減少のため一時的に投与を中止（2 回）したが、回復性がみられたため投与を再開し、予定剖検日まで投与を継続した（最終投与日まで生存）。

予定していた期間の投与を完了した生存例（上記の雌を含む）では、臨床病理所見として、血小板数減少、C3、血清アルブミン、A/G 比の低値、並びに血清グロブリン、IgG 及び／又は IgM、CRP、尿中蛋白及びサイトカイン（MCP-1、MIP-1β 及び IFN-γ、高用量群で IL-6）の高値が認められた。これらの動物でみられた主要所見として、補体活性化及び全身性炎症反応がみられ（腎障害の有無にかかわらず）、10 及び 20 mg/kg/回群で最も顕著に認められた。これらの変化は 26 週間の休薬期間終了時までに部分的に回復した。

KLH を用いて免疫毒性を評価したところ、抗 KLH IgM 抗体産生にばらつきがみられたが、概して全群で同程度の反応がみられた。全群で抗 KLH IgG 抗体産生が認められたが、対照群と比較して、試験 268 日の抗体価は全投薬群で低値傾向（20 mg/kg/回群で有意）を示し、試験 275 日では全投薬群で有意であった。休薬期間終了時（試験 455 日）では、10 及び 20 mg/kg/回群で有意に低値であった。

投与期間終了時の病理組織学的検査で認められた主な所見は、腎臓、投与部位、肺、肝臓、脾臓、子宮、腸間膜リンパ節、種々の臓器の動脈等における炎症性変化であった。全投薬群において種々の臓器及び組織に単核細胞浸潤が認められ、用量に応じて発現頻度・程度は増大し、発現部位は増加した。

6 mg/kg/回以上の群では、動脈で軽微～中等度の内膜肥厚、軽度の中膜肥厚及び／又は単核細胞／混合炎症細胞の血管／血管周囲への軽微～軽度浸潤がみられた。6 mg/kg/回群の雌 1 例では心臓で軽微な内膜肥厚が認められた。

全投薬群の腎臓近位尿細管上皮、肝臓クッパー細胞、腸間膜及び／又は下顎リンパ節マクロファージ内に好塩基性顆粒の蓄積が認められたが、これらの変化に関連した悪影響はみられなかった。

26 週間の休薬期間後においても、臨床的病理学的及び病理組織学的変化並びに補体活性化を示唆する所見は認められたが、いずれの休薬群（10 及び 20 mg/kg/回）においても投与期間終了時と比較して所見の程度は軽減していた。

以上より、3 mg/kg/回群の死亡例 1 例で多臓器に血管炎がみられ、本例（雌）は、持続性の補体活性化及び全身性炎症を伴う持続的なアルブミン低値により安楽死させたが、自然発生的に認められる腎障害もみられた。この動物でみられた低アルブミン血症は、本薬による補体活性化がわずかに関与した可能性があるものの、カニクイザルにおいて潜在的かつ自然発生的にみられる、投薬と関連しない糸球体硬化症及び続発性腎盂腎炎（多くのサルでみられる加齢性変化）による尿中蛋白質排泄量の増加を原因として著しく増悪した[Drevon-Gaillot, 2006; Chamanza, 2010; Frazier, 2018]。本例では、心臓の右心室に中等度の線維化がみられたが、その他に上述した補体活性化による血管への影響に関連した変化は認められなかった。また、同群又は高用量群の他の動物において同様の血管への影響が観察されたが、心臓に線維化は認められなかった。これらのデータに加えて、カニクイザルにおいて心臓線維

化は背景的に認められていること[Drevon-Gaillot, 2006; Chamanza, 2010]、2'-MOE ホスホロチオエート ASO のクラスエフェクトとして報告されていないこと[Henry, 2008]を考慮すると、この変化は自然発生的かつ偶発的なものであり、投薬に関連したものではないと考えられた。

3 mg/kg/回群のサル 1 例で認められた腎臓への影響及び重度の低アルブミン血症（早期安楽死の直接的な原因）は投薬に関連するものではないと判断され、自然発生的な糸球体病変が本例にみられたタンパク質喪失の原因であると考えられた。6 mg/kg/回群では重度の低アルブミン血症及び同様の腎臓への病理組織学的変化は認められなかった。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 AUC(0-t)及び Cmax（雌雄合算平均）はそれぞれ 197 μg.h/mL 及び 22.6 μg/mL であり、サルを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験の NOAEL（8 mg/kg/回）投与時の曝露量（AUC(0-t)及び Cmax はそれぞれ 179 μg.h/mL 及び 27 μg/mL）と概ね同程度であった。

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 3　反復投与毒性試験で用いたベピロビルセンのバッチ番号及び処方

Batch or Lot Number(s)	Study Type	Species (Strain) or Test System	Duration of Dosing	Report No. (Study No.)	Concentration (mg/mL)	Formulation
[redacted]	Repeat dose	Mouse (CD-1)	4-weeks	2023N535316 (M73070N)	4	0.9% Saline
	Repeat dose	Mouse (CD-1)	13 Weeks	2019N417087 (505358-AS01)	0.4, 1.2, 4, 10	0.9% Saline
	Repeat dose	Mouse (CByB6F1 [Wild Type])	13 Weeks	2019N406770 (M71693G)	0.4, 1.2, 4	0.9% Saline
	Repeat dose	Mouse (CD-1)	13 Weeks	2021N488385 (M72229G)	1.2	0.9% Saline
	Repeat dose	Mouse (CD-1)	26 Weeks	2019N419097 (505358-AS06)	0.3, 1, 3, 6	0.9% Saline
	Repeat dose	Monkey (cynomolgus)	13 Weeks	2019N417078 (505358-AS02)	1, 2, 3, 10, 20, 30, 100	0.9% Saline
	Repeat dose	Monkey (cynomolgus)	39 Weeks	2019N419364 (505358-AS05)	7.5, 15, 25, 50	0.9% Saline

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 toxicology studies were representative of the batches proposed for clinical use.

Note. All studies were conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358), unless noted otherwise.

表 4　反復投与毒性試験（GLP）で用いたバッチ中の不純物含量

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**
2019N417087 (505358-AS01)	Mouse (CD-1)	13 Weeks	0, 4, **12**, 40, 100[a]	[redacted]	A[f] 2.4	0.22, 0.68, 2.28, 5.71
					B[f] 2.0	0.33, 1.00, 3.33, 8.33
					C[f] 1.1	0.36, 1.10, 3.66, 9.16
					D[f] 1.8	0.40, 1.20, 4.00, 10
					E[g] 1.4	0.46, 1.40, 4.66, 11.66
					F[g,h] 1.2	0.20, 0.60, 2.00, 5
					G[g,h] 0.67	0.22, 0.67, 2.23, 5.58
					H[h] ≤ 0.76	0.20,0.61, 2.02, 5.06[i]
					I[h] ≤ 0.76	
					J[i] 14.9	0.66, 1.98, 6.62, 16.55

表 4　反復投与毒性試験（GLP）で用いたバッチ中の不純物含量（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**
2019N406770 (M71693G)	Mouse (CByB6F1 [Wild Type])	13 Weeks	0, 4, 12, **40**	[redacted]	A[f] 4.5	0.42, 1.28, 4.28
					B[f] 2.5	0.41, 1.25,4.16
					C[f] 1.0	0.33, 1.00, 3.33
					D[f] 0.91	0.20, 0.60, 2.02
					E[g] 0.50	0.16, 0.50, 1.66
					F[g,h] 1.6	0.26, 0.80, 2.66
					G[g,h] 0.6	0.20, 0.60, 2.00
					H[h] ≤ 0.47	0.12, 0.37, 1.25[i]
					I[h] ≤ 0.47	
					J[j] 13.4	0.59, 1.78, 5.95

表 4　反復投与毒性試験（GLP）で用いたバッチ中の不純物含量（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**
2021N488385 (M72229G)	Mouse (CD-1)	13 Weeks	0, 12[c]	[redacted]	A[f] 3.0	0.85
					B[f] 1.4	0.70
					C[f] 1.2	1.20
					D[f] 0.48	0.32
					E[g] 0.85	0.85
					F[g,h] 1.7	0.85
					G[g,h] 4.0	4.00
					H[h] ≤ 0.76	0.61[i]
					I[h] ≤ 0.76	
					J[j] 27.7	3.69

表 4　反復投与毒性試験（GLP）で用いたバッチ中の不純物含量（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**
2019N419097 (505358-AS06)	Mouse (CD-1)	26 Weeks	3, 10, 30, 60[b]	[redacted]	A[f] 2.4	0.17, 0.57, 1.71, 3.42
					B[f] 2.0	0.25, 0.83, 2.50, 5.00
					C[f] 1.1	0.27, 0.91, 2.75, 5.50
					D[f] 1.8	0.30, 1.00, 3.00, 6.00
					E[g] 1.4	0.35, 1.16, 3.50, 7.00
					F[g,h] 1.2	0.15, 0.50, 1.50, 3.00
					G[g,h] 0.67	0.16, 0.55, 1.67, 3.35
					H[h] ≤ 0.76	0.15, 0.50, 1.52, 3.04[i]
					I[h] ≤ 0.76	
					J[j] 14.9	0.49, 1.65, 4.96, 9.33

表 4　反復投与毒性試験（GLP）で用いたバッチ中の不純物含量（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**
2019N417078 (505358-AS02)	Monkey (cynomolgus)	13 Weeks	4, 8, 12[c] 40[c] 8[d]	[redacted]	A[f] 2.4	0.22, 0.45, 0.68, 2.28
					B[f] 2.0	0.33, 0.66, 1.00, 3.33
					C[f] 1.1	0.36, 0.73, 1.10, 3.66
					D[f] 1.8	0.40, 0.80, 1.20, 4.00
					E[g] 1.4	0.46, 0.93, 1.40, 4.66
					F[g, h] 1.2	0.20, 0.40, 0.60, 2.00
					G[g, h] 0.67	0.22, 0.44, 0.67, 2.23
					H[h] ≤ 0.76	0.20, 0.40, 0.61, 2.02[i]
					I[h] ≤ 0.76	
					J[i] 14.9	0.66, 1.32, 1.98, 6.62

表 4　反復投与毒性試験（GLP）で用いたバッチ中の不純物含量（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**
2019N419364 (505358-AS05)	Monkey (cynomolgus)	39 Weeks	3, 6[b] 10, 20[b]	[redacted]	A[f] 2.4	0.17, 0.34, 0.57, 1.14
					B[f] 2.0	0.25, 0.50, 0.83, 1.66
					C[f] 1.1	0.27, 0.55, 0.91, 1.83
					D[f] 1.8	0.30, 0.60, 1.00, 2.00
					E[g] 1.4	0.35, 0.70, 1.16, 2.33
					F[g,h] 1.2	0.15, 0.30, 0.50, 1.00
					G[g,h] 0.67	0.16, 0.33, 0.55, 1.11
					H[h] ≤ 0.76	0.15, 0.30, 0.50, 1.01[i]
					I[h] ≤ 0.76	
					J[i] 14.9	0.49, 0.99, 1.65, 3.31

表 4　反復投与毒性試験（GLP）で用いたバッチ中の不純物含量（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 exposure to 300 mg/week (Week 1 and Week 2: the proposed recommended dose is 300 mg bepirovirsen, twice a week. Weeks 3-24: the recommended dose is 300 mg bepirovirsen, once a week) of bepirovirsen administered SC as a Bepirovirsen solution for injection, 150 mg/mL SSD (safety syringe device) (equivalent to 6 mg/kg/day 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] (i.e., worst case situation). The recommended clinical daily dosage regimen is 6 mg/day of bepirovirsen.
a = Animals dosed on Days 1, 3, 5, and 7, and then once weekly doses of 4, 12, 40 and 100 mg/kg/dose thereafter through Day 91.
b = Animals dosed on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly from Day 21 in Week 3 to Day 273 (Week 39).
c = Bepirovirsen was administered to the 4, 8 and 12 mg/kg/dose groups on Days 1, 3, and 5 by IV (1 hour infusion), then SC once weekly on Day 7 through Day 91. Bepirovirsen was SC administered to the 40 mg/kg/dose group on Days 1, 3, and 5, then SC once weekly on Day 7 through Day 91. Bepirovirsen was SC administered to the TK group at 8 mg/kg/dose on Days 1, 3, 5, and 7.
d = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7 only.
e = Animals dosed on Days 1, 3, 5, and 7, and then once weekly doses of 12 mg/kg/dose thereafter through Day 91.
f = Impurity measured by [redacted]
g = Impurity measured by [redacted]
h = May also incorporate the [redacted] impurity population due to similar mass. Improvements in amidite manufacture and process knowledge indicate this impurity is predominantly [redacted] impurity population ([redacted])
i = Sum of total impurities measured by [redacted] and total impurities measured by [redacted].
l = Based on the specification applied to the nonclinical batch at the time of analysis, calculation of the Multiple of Maximum Potential Daily Human Dose forimpurities 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]%)

4. 遺伝毒性試験

4.1. 緒言

ベピロビルセンを用いた一連の in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験を実施した。変異原性については細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）、染色体異常誘発能について CHL 細胞を用いた染色体異常試験で評価した。試験はラット肝代謝活性化（S9-mix）の存在下／非存在下で適切な媒体及び陽性対照を用いて実施した。In vitro 試験で用いたベピロビルセンの最高濃度はガイドラインに従い設定した。また、染色体異常誘発性／異数性誘発性について、マウスを用いた in vivo 小核試験により評価した。

いずれの試験も GLP 及び ICH S2(R1)ガイドライン[ICH, 2008]に準拠して実施した。

実施した試験の一覧を GLP 適合状況及び報告書格納場所とともに表 5 に示す。

これらの試験で用いたベピロビルセンのバッチ一覧及び製剤方法に関する情報を表 6 に、バッチ中の不純物の詳細を表 7 に示す。

出発原料、不純物及び／又は合成試薬を由来とする 8 つの不純物並びに[redacted]（合成試薬）の変異原性について Ames 試験で評価した（8.3 項）。

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 5　ベピロビルセンの遺伝毒性試験一覧

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Bacterial Mutation Assay (Ames)	*S. typhimurium* *E. coli*	NA	In vitro	0, 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate	NA	Yes	[redacted]	2019N419124 (505358-IS01)	m4.2.3.3.1
Chromosome Aberration Assay	Chinese Hamster Lung cells	NA	In vitro	0, 62.5, 125, 250, 500 µg/mL	NA	Yes	[redacted]	2019N419080 (505358-IS02)	m4.2.3.3.1
Micronucleus	Mouse (CD-1)	3M/3F[a] 12M/12F[a]	SC	0, 500, 1000, 2000	Single	Yes	[redacted]	2019N419174 (505358-AS09)	m4.2.3.3.2

Note: All studies were conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358), unless noted otherwise.

Key:
F: female. GLP: Good Laboratory Practice. M: male. NA = Not applicable. SC = Subcutaneous.
a = 3 animals/sex/group were dosed in the dose range finding part of the study; 12 animals/sex/group dosed in the definitive micronucleus study.

Testing Facility:
[redacted] = [redacted]

4.2. In vitro 試験

4.2.1. 細菌を用いる復帰突然変異試験

ベピロビルセンの変異原性について、ネズミチフス菌（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 株）及び大腸菌（WP2 *uvrA* 株）を用いてプレート法により評価した（2019N419124、4.2.3.3.1）。5 又は 10%ラット肝 S9-mix の存在下及び非存在下で各菌株をベピロビルセンの 0（媒体）、78.1、156.3、312.5、625、1250、2500、5000 µg/plate とインキュベートした。陽性対照には、アジ化ナトリウム（0.5 µg/plate）、2-ニトロフルオレン（2 µg/plate）、9-アミノアクリジン（50 µg/plate）、4-ニトロキノリン N-オキシド（0.5 又は 1 µg/plate）、2-アミノアントラセン（2 又は 4 µg/plate）、ベンゾ[a]ピレン（2 µg/plate）を用いた。被験物質の媒体には蒸留水を、対照物質の媒体には蒸留水（アジ化ナトリウム）又は DMSO（それ以外）を用いた。試験の概要を 2.6.7 表 19 に示す。

陰性対照（蒸留水）群の値は試験施設の背景値の範囲内であり、陽性対照の値はバリデーション試験の結果と一致した。いずれの用量でも S9-mix の存在下及び非存在下ともに細胞毒性は認められなかった。プレインキュベーション終了後、被験物質をトップアガーと混合し、48 時間インキュベートした際、いずれの菌株でもすべての濃度で濁り及び沈殿は観察されなかった。

ベピロビルセンはいずれの菌株［ネズミチフス菌（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 株）及び大腸菌（WP2 *uvrA* 株）］においても、ラット肝 S9-mix の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加を引き起こさなかったことから、ベピロビルセンは変異原性を示さないと考えられた。

4.2.2. 哺乳類細胞を用いる染色体異常試験

ベピロビルセンの染色体異常誘発性について検討するため、CHL 細胞をベピロビルセンの 0（溶媒：蒸留水）、62.5、125、250、500 µg/mL と S9-mix の存在下で 6 時間、S9-mix の非存在下で 6 及び 22 時間インキュベートした（2019N419080、4.2.3.3.1）。代謝活性化系としては、Aroclor 1254 で酵素誘導したラット肝臓 S9 を用いた。試験の概要を 2.6.7 表 20 に示す。S9-mix の存在下では、シクロホスファミド（CPA、6 µg/mL）を陽性対照として用いた。S9-mix の非存在下では、メタンスルホン酸エチル（EMS）を陽性対照として用い、6 時間のインキュベーションでは 800 µg/mL、22 時間のインキュベーションでは 600 µg/mL の濃度で処理した。

CHL 細胞を用いた検討において、ベピロビルセンは最高 500 µg/mL までの濃度で、S9-mix の有無にかかわらず、染色体異常誘発性を示さなかった。ベピロビルセンはいずれの濃度においても、S9-mix の有無にかかわらず、細胞毒性を示さず、構造又は数的異常を有する分裂中期細胞数の増加は認められなかった（媒体として用いた蒸留水と比較）。一方、陽性対照群の CPA 及び EMS では、分裂中期像が異常な細胞数の有意な増加が認められた。

本試験条件下では、ベピロビルセンは最大 500 µg/mL の濃度において培養 CHL 細胞で染色体異常を誘発しなかった。

4.3. In vivo 試験

4.3.1. マウス小核試験

ベピロビルセンの小核を有するマウス多染性赤血球（MNPCE）の出現頻度への影響について検討するため、CD-1 マウス（各群雌雄 12 例）にベピロビルセンの 0（媒体）、500、1000 及び 2000 mg/kg を単回皮下投与した（2019N419174、4.2.3.3.2）。陽性対照群の CD-1 マウス（雌雄各 6 例）には、CPA の 70 mg/kg を腹腔内投与した。試験の概要を 2.6.7 表 21 に示す。

この試験 2 つのフェーズからなり、第 1 フェーズでは、小核試験（本試験）のための用量設定試験を実施した。用量設定試験では、マウス（各群雌雄各 3 例）にベピロビルセンの 0（媒体）、500、1000 及び 2000 mg/kg（投与量 10 mL/kg）を皮下投与した。いずれの用量でも死亡は認められなかった。この結果に基づき、小核試験（本試験）では、ベピロビルセンの用量として 500、1000、2000 mg/kg を設定した。

試験期間中、すべての動物に対して 1 日 2 回（作業開始時及び終了時）、生存性確認を実施した。一般状態観察（生存性、外観、行動変化を含む）では、観察された所見並びにその日時／時間及び期間を記録した。体重測定は試験開始前、試験 1～3 日に実施した。

死亡は認められなかった。骨髄採取のため、各群雌雄各 6 例を投与 24 及び 48 時間後に安楽死させた。骨髄標本は Schmid の方法[Schmid, 1975]に従って作製した。

1 例あたり 4000 個の多染性赤血球（PCE）について小核の有無を評価した。いずれの用量でも MNPCE の発現頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。2000 mg/kg 群で投与後 48 時間における総赤血球数［PCE+正染性赤血球（NCE）］に対する PCE の相対比に有意な変化がみられたが、陰性対照（溶媒）群の背景値範囲内であったことから、この変化は細胞毒性によるのではなく、通常の変動と考えられた。

投与約 24 及び 48 時間後に各群雌雄各 3 例から肝臓を採取し、ベピロビルセンの肝臓中濃度を測定した。その結果、雄で 317.1～579.1 µg/g、雌で 276.4～491.8 µg/g であった。組織（肝臓）中濃度に関するデータについては、2.6.4.3.3.1.1 に示す。

以上より、本試験条件下において、ベピロビルセンを最大 2000 mg/kg の用量で単回皮下投与しても、CD-1 マウス骨髄細胞における小核出現頻度の増加は認められなかった。

4.4. 配列解析

オリゴヌクレオチドであるベピロビルセンがトリプレックス形成を介して二本鎖ゲノム DNA と配列依存的に直接相互作用し、部位特異的な突然変異を引き起こす可能性[EMA, 2024]; Berman, 2016]について検討した。トリプレックス形成には厳格な配列基準（トリプレックス形成オリゴヌクレオチド内で 12 個以上のポリプリン又はポリピリミジンヌクレオチドの連続配列、及び標的 DNA 領域内で少なくとも 10 個の連続配列）が必要であり[Kuan, 2004; Jain, 2008; Berman, 2016]、また、1 つのミスマッチが結合親和性を 150 倍低下させる可能性がある[Hansen, 2009]。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の連続配列が含まれていない（図 1）。したがって、トリプレックス形成による部位特異的突然変異が生じる可能性はない。

2.6.6. 毒性試験の概要文

配列解析及びその後の in vitro 評価の結果、ベピロビルセンは HBV RNA に対して極めて特異的であり、ヒト mRNA への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（2.6.2.3.1.1）。これらの解析では、DNA 修復、細胞周期制御又は有糸分裂キナーゼに関与するタンパク質をコードする RNA 等の遺伝毒性リスクを有する mRNA は特定されなかった。

図 1　ベピロビルセンの構造

Bepirovirsen sequence: 5'-gCagaggTgaagCgaagUgC-3'

Key: Purine (lower case) or pyrimidine (upper case)

4.5. 遺伝毒性不純物の合成経路の評価

オリゴヌクレオチド関連化合物（中間体、不純物、分解生成物等）は ICH M7 ガイドラインの対象外である。[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。しかしながら、製造工程に関与する低分子の出発原料、試薬、溶媒、副生成物については ICH M7 に従って評価した。

市販用製剤の原薬を合成する過程で存在する可能性があり、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）について、ICH M7 ガイドラインに従って評価した。QSAR 評価及び ICH M7 に基づく低分子中間体及び不純物のクラス分類については、3.2.S.2.6.6 に示す。試験の概要を 8.3 項に示す。実施した試験の一覧を GLP 適合状況及び報告書格納場所とともに表 14 に示す。

ベピロビルセンナトリウムの原薬中にニトロソアミンが存在するリスクは確認されなかった（3.2.S.2.6）。

4.5.1. 出発原料、中間体及び試薬

[redacted]（synthesis reagent）、[redacted]（[redacted]、synthesis reagent impurity）及び[redacted]（synthesis by-product）は、変異原性不純物（ICH M7 のクラス 1 及び 2）と特定された。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（3.2.S.2.6.6）。以下のベピロビルセンの合成に使用される出発原料、不純物及び試薬は、QSAR 評価の結果、変異原性を示さないと予測され、また、Ames 試験の結果、非変異原性（ICH M7 のクラス 5）であることが確認されている（8.3 項）。

- [redacted]（starting material）[Report 2017N333905、4.2.3.7.6]
- [redacted]（starting material）[Report 2017N333913、4.2.3.7.6]

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.6. 毒性試験の概要文

- [redacted]（starting material）[Report 2017N333922、4.2.3.7.6]
- [redacted]（starting material）[Report 2017N333878、4.2.3.7.6]
- [redacted]（starting material）[Report 2017N333925、4.2.3.7.6]
- [redacted]（starting material）[Report 2017N333926、4.2.3.7.6]
- [redacted]（starting material）[Report 2017N333944、4.2.3.7.6]
- [redacted]（starting material）[Report 2017N333876、4.2.3.7.6]
- [redacted]（[redacted]、starting material synthesis）[Report 2017N337273、4.2.3.7.6]
- [redacted]（[redacted]、starting material synthesis）[ECHA [redacted]]
- [redacted]（starting material synthesis）[ECHA [redacted]]
- [redacted]（starting material synthesis）[ECHA [redacted]]
- [redacted]（starting material synthesis）[ECHA [redacted]]
- [redacted]（[redacted]、synthesis reagent）[ECHA [redacted]]
- [redacted]（[redacted]、synthesis reagent）[Vitic Intermediates 2024.1.0 database [redacted]]
- [redacted]（[redacted]、synthesis reagent）[[redacted] [redacted]]

その他の出発原料、不純物及び試薬はいずれも変異原性を示すことが知られている又は疑われる化合物ではなく、したがって、非変異原性（クラス 5）に分類された。

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 6　遺伝毒性試験で用いたベピロビルセンのバッチ番号及び処方

Batch or Lot Number(s)	Study Type	Species (Strain) or Test System	Duration of Dosing	Report No. (Study No.)	Dose (mg/mL)	Formulation
[redacted]	Bacterial Mutation Assay (Ames)	S. typhimurium E. coli	N/A	2019N419124 (505358-IS01)	78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate	Distilled water
	Chromosome Aberration Assay	Chinese Hamster Lung cells	N/A	2019N419080 (505358-IS02)	62.5, 125, 250, 500 µg/mL	Distilled water
	Micronucleus	Mouse (CD-1)	Single	2019N419174 (505358-AS09)	50, 100, 200	0.9% Saline

Note: The synthetic route was 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 toxicology studies were representative of the batches proposed for clinical use.
All studies have been conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) unless otherwise noted.

表 7　遺伝毒性試験で用いたバッチ中の不純物含量

In vivo

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**
2019N419174 (505358-AS09)	Micronucleus	Single dose	500, 1000, 2000	[redacted]	A[a] 2.4	28.57, 57.14, 114.28
					B[a] 2.0	41.66, 83.33, 166.66
					C[a] 1.1	45.83, 91.66, 183.33
					D[a] 1.8	50.00, 100.00, 200.00
					E[b] 1.4	58.33, 116.66, 233.33
					F[b,c] 1.2	25.00, 50.00, 100.00
					G[b,c] 0.67	27.91, 55.83, 111.66
					H[c] ≤ 0.76	25.33, 50.66, 101.33[e]
					I[c] ≤ 0.76	
					J[d] 14.9	82.77, 165.55, 331.11

表 7　遺伝毒性試験で用いたバッチ中の不純物含量（続き）

*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 exposure to 300 mg/week (Week 1 and Week 2: the proposed recommended dose is 300 mg bepirovirsen, twice a week. Weeks 3-24: the recommended dose is 300 mg bepirovirsen, once a week) of bepirovirsen administered SC as a Bepirovirsen solution for injection, 150 mg/mL SSD (safety syringe device) (equivalent to 6 mg/kg/day 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] (i.e., worst case situation). The recommended clinical daily dosage regimen is 6 mg/day of bepirovirsen.

a. Impurity measured by [redacted]
b. Impurity measured by [redacted]
c. May also incorporate the [redacted] impurity population 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. がん原性試験

5.1. 緒言

ベピロビルセンのがん原性を検討するため、CD-1 マウスを用いた 104 週間（2 年間）皮下投与によるがん原性試験を実施した。本試験の用量は、本試験に先立ち実施したマウス 13 及び 26 週間投与試験の結果（それぞれ 3.2.1.2 及び 3.2.1.5）に基づき選択した。いずれの試験も GLP に準拠して実施した。がん原性試験に用いる動物種としては、病理組織学的な背景所見や、多種多様な医薬品（ベピロビルセンのような 2'-MOE ASO を含む）に対する反応に関する豊富なデータが利用可能なマウスを選択した。また、ベピロビルセンの薬物動態及び代謝の観点からも、マウスが適切な動物種であることが確認されている（2.6.4）。

規制当局とのベピロビルセンのがん原性試験に関する相談結果に基づき、CD-1 マウスを用いた 2 年間がん原性試験を実施した[EMA, 2021; FDA, 2020; PMDA, 2020; CDE, 2019]。当初、rasH2-Tg マウスを用いた 6 ヵ月間投与試験を実施する予定であったが、FDA、PMDA 及び EMA との協議の結果、マウスを用いた 2 年間がん原性試験を実施すれば、少なくとも 1 種類のげっ歯類において生涯投与による影響を評価することが可能であり、当初予定していた rasH2-Tg マウスを用いた 6 ヵ月間投与試験よりも意義があると考えられた。また、ラットは慢性進行性腎症（CPN）の増悪及び皮下投与による悪性肉腫を生じやすく、その結果、2 年間投与試験において生存率が低下することから、ベピロビルセンのがん原性評価に適した動物種ではないことも合意されている。

実施した試験の一覧を GLP 適合状況及び報告書格納場所とともに表 8 に示す。また、試験で評価に供した組織一覧及び動物の生存／死亡率を Appendix 2 のそれぞれ表 A2.1 及び表 A2.2 に示す。

ベピロビルセンのロット番号及び処方に関する情報を表 9 に、各ロットに含まれる不純物の詳細を表 10 に示す。

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 8　ベピロビルセンのがん原性試験一覧

Type of Study	Species (Strain)	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose)[a]	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
2-year carcinogenicity	Mouse (CD-1)	70M + 6M tissue analysis	SC	0, 3, 10, 30	104 weeks[a]	Yes	[redacted]	2021N489170 (8003091)	m4.2.3.4.1

Note: All studies were conducted with bepirovirsen sodium the parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) unless otherwise noted.

Testing Facility:
[redacted] = [redacted]

Key: F: Female. GLP: Good Laboratory Practice. M: Male. SC = SC.
a = SC injection/ once a day on Days 1, 4, 8, and 11 then once weekly starting Day 15.

5.2. マウス

5.2.1. 104 週間がん原性試験

ベピロビルセンが腫瘍の発現頻度及び形態に及ぼす影響について検討するため、CD-1 マウス（各群雌雄 70 例；組織中濃度測定として各群雌雄 6 例）にベピロビルセンの 0（媒体：0.9%生理食塩液）、3、10 及び 30 mg/kg/回を 104 週間（試験 1、4、8、11 日、その後、試験 15 日から週 1 回）皮下投与した（2021N489170、4.2.3.4.1）。生存性確認、一般状態観察（投与後、詳細な状態及び触知可能な腫瘤の観察を含む）、体重測定、眼科学的検査、生体試料中薬物濃度測定（肝臓及び腎臓）、剖検及び病理組織学的検査を実施した。血液塗抹標本も作製し、保管した。試験の概要を 2.6.7 表 22 に示す。

試験 92 日の投与後に全投薬群から採取した肝臓及び腎臓組織中にベピロビルセンが検出された。肝臓及び腎臓中濃度を表 19 及び 2.6.4.3.3.1.1 に示す。

一般状態への影響として、10 mg/kg/回以上の群の雄及び 3 mg/kg/回以上の群の雌では、皮膚蒼白、並びに痂皮を伴う背側頸部、胸部及び肩甲骨間の粗毛がみられ、発現頻度に用量依存性が認められた。また、30 mg/kg/回群の雄及び 10 mg/kg/回以上の群の雌で頭部に、10 mg/kg/回以上の群の雌で鼻口部に粗毛がみられ、30 mg/kg/回群の雌では背骨隆起が認められた。

30 mg/kg/回群の雌雄で投薬に関連した体重低値がみられ、体重増加量は雄（試験−1 日～試験 700 日）で対照群の 0.64 倍、雌（試験−1 日～試験 728 日）で対照群の 0.73 倍であった。

30 mg/kg/回群の雄では投薬に関連した死亡の増加が認められた（試験 102 週の生存率は 21%であり、対照群の雄では 50%）。本所見は肝腫瘍（肝細胞癌及び血管肉腫）並びに投与部位及び皮膚の線維肉腫によるものと考えられた。雌では投薬に関連した死亡／生存率への影響は認められなかった。

投薬に関連した腫瘍性病変として、10 mg/kg/回以上の群の雄及び 30 mg/kg/回群の雌で肝細胞癌、30 mg/kg/回群の雌雄で肝細胞腺腫、全投薬群の雄及び 30 mg/kg/回群の雌で肝血管肉腫、並びに 30 mg/kg/回群の雄で肝血管腫の発現頻度の増加が認められた。10 mg/kg/回群以上の雄では投与部位に線維肉腫がみられ、30 mg/kg/回群の雄では投与部位に近接する皮膚で線維肉腫がみられた。30 mg/kg/回群の雌雄では全身性血管肉腫及び血管肉腫／血管腫（併合）、並びに 10 mg/kg/回群の雌では全身性血管肉腫の増加がみられた。

全投薬群の雌雄で肝臓に非腫瘍性病変（巨大核／細胞質変化伴う肝細胞肥大及び好塩基性顆粒を有するクッパー細胞等）が用量依存的に認められ、いずれの用量群においても発現頻度及び／又は程度は、雌よりも雄で高かった。その他の投薬に関連した肝臓での非腫瘍性病変として、30 mg/kg/回群の雌雄で単細胞壊死、並びに 30 mg/kg/回群の雄及び 10 mg/kg/回以上の群の雌で有糸分裂像及び単核細胞浸潤の増加が認められた。30 mg/kg/回群の雌雄で軽微～重度の変異細胞巣の発現頻度及び／又は程度の増強が認められた（雄：好塩基性、明細胞性又は好酸性、雌：好酸性及び好塩基性）。

全投薬群の雌雄で腎臓の尿細管上皮細胞に軽微～軽度の好塩基性顆粒が用量依存的にみられ、30 mg/kg/回群の雄では間質に好塩基性顆粒を有するマクロファージの集簇（軽微～軽

度）が認められた。また、30 mg/kg/回群の雄では、げっ歯類においてASOのクラスエフェクトとして知られているCPN [Frazier, 2015]の増悪が認められた。全投薬群の雌雄で複数の組織（投与部位、心臓、耳下腺及び下顎唾液腺、皮膚、膀胱、膵臓、舌、骨格筋、リンパ節、精巣上体、精巣、前立腺、精嚢、包皮腺、子宮、腟、盲腸、及び脳の脈絡叢）において、軽微～軽度の好塩基性顆粒を有するマクロファージの集簇が認められた。10 mg/kg/回以上の群の雌雄において、投与部位に軽微な線維化の発現頻度の増加がみられた。30 mg/kg/回群の雌では、乳腺において異型過形成（3 例）、小葉腺胞過形成及び乳管拡張の発現頻度及び／又は程度の増大がみられた。

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 9　がん原性試験で用いたベピロビルセンのバッチ番号及び処方

Batch or Lot Number(s)	Study Type	Species (Strain)	Duration of Dosing	Report No. (Study No.)	Concentration (mg/mL)	Formulation
[redacted]	Carcinogenicity	Mouse (CD-1)	104 weeks[a]	2021N489170 (8003091)	0.3[b]/0.4; 1; 3	0.9% Saline

Note: The synthetic route was 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 toxicology studies were representative of the batches proposed for clinical use.
All studies were conducted with bepirovirsen sodium the parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358).
Key:
a = SC injection/ Once on Days 1, 4, 8, and 11 then once weekly starting Day 15
b = Starting at Week 5, animals in Group 2 were dosed at a dose volume of 10 mL/kg and a dose concentration of 0.3 mg/mL, based on stability data, to be consistent with the dose volume of all other groups.

表 10 がん原性試験で用いたバッチ中の不純物含量

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**
2021N489170 (8003091)	Mouse (CD-1)	104 weeks	0, 3, 10, 30	[redacted]	A[a] 1.7	0.12, 0.40, 1.21
					B[a] 1.6	0.20, 0.66, 2.00
					C[a] 0.50	0.12, 0.41, 1.25
					D[a] 0.20	0.03, 0.11, 0.33
					E[b] 1.2	0.30, 1.00, 3.00
					F[b, c] 1.2	0.15, 0.50, 1.50
					G[b, c] 0.42	0.10, 0.35, 1.05
					H[c] ≤ 0.57	0.11, 0.38, 1.14[e]
					I[c] ≤ 0.57	
					J[d] 9.7	0.32, 1.07, 3.23

表 10　　がん原性試験で用いたバッチ中の不純物含量（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**
2021N489170 (8003091)	Mouse (CD-1)	104 weeks	0, 3, 10, 30	[redacted]	A[a] 2.4	0.17, 0.57, 1.71
					B[a] 2.7	0.33, 1.12, 3.37
					C[a] 0.64	0.16, 0.53, 1.60
					D[a] 0.20	0.03, 0.11, 0.33
					E[b] 1.1	0.27, 0.91, 2.75
					F[b,c] 1.3	0.16, 0.54, 1.62
					G[b, c] 0.51	0.12, 0.42, 1.27
					H[c] ≤ 0.45	0.09, 0.3, 0.9[e]
					I[c] ≤ 0.45	
					J[d] 11.3	0.37, 1.25, 3.76

表 10　　がん原性試験で用いたバッチ中の不純物含量（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 exposure to 300 mg/week (Week 1 and Week 2: the proposed recommended dose is 300 mg bepirovirsen, twice a week. Weeks 3-24: the recommended dose is 300 mg bepirovirsen, once a week) of bepirovirsen administered SC as a Bepirovirsen solution for injection, 150 mg/mL SSD (safety syringe device) (equivalent to 6 mg/kg/day 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] (i.e., worst case situation). The recommended clinical daily dosage regimen is 6 mg/day of bepirovirsen.

***= Based on drug concentration analysis dates, batch [redacted] was used from Day 1 until Week 52 whilst batch [redacted] was used from Week 53 to Week 104
a = Impurity measured by [redacted]
b = Impurity measured by [redacted]
c = May also incorporate the [redacted] impurity population 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]%)

6. 生殖発生毒性試験

6.1. 緒言

ベピロビルセンが哺乳類の生殖発生に及ぼす影響について検討するため、CD-1 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、NZW ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験、並びに CD-1 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を実施した。生殖発生毒性試験はいずれも臨床投与経路である皮下投与で実施した。

実施した試験の一覧を GLP 適合状況及び報告書格納場所とともに表 11 に示す。試験の概要を 2.6.7 表 23～26 に示す。

ベピロビルセンのロット番号及び処方に関する情報を表 12 に、各ロットに含まれる不純物の詳細を表 13 に示す。

TK 結果については 2.6.4.3.3.2.1 及び 2.6.4.3.3.3.2 で考察する。

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 11 ベピロビルセンの生殖発生毒性試験一覧

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
Combined fertility and development	Mouse (CD-1)	25M/25 +6M/6F[TK]	SC	0, 3, 15, 25	Males: 71 days (35 doses) Females: 31-36 days (16 or 17 doses)[a]	Yes	[redacted]	2017N337889 (505358-AS07)	m4.2.3.5.1
PPND	Mouse (CD-1)	24F+6F[TK]	SC	0, 3, 15, **25**[c]	From GD 6 up to GD 18 or from GD 6 to LD 21[c]	Yes	[redacted]	2023N530614 (9002027)	m4.2.3.5.3
DRF	Rabbit (NZW)	7F	SC	0, 5, 15, 30	13 days (GD 6 to GD 18)[b]	No	[redacted]	2017N337852 (505358-AS08P)	m4.2.3.5.2
Definitive EFD	Rabbit (NZW)	22F+3F[TK]	SC	0, 6, 12.6, 25.2	13 days (GD 6 to GD 18)[b]	Yes	[redacted]	2017N337736 (505358-AS08)	m4.2.3.5.2

Note: All studies have been conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) unless otherwise stated.
NOAEL is indicated in **BOLD**.
Key: DRF = Dose Range Finding. EFD = Embryofetal Development. F: Female. GD = Gestation Day. GLP: Good Laboratory Practice. LD = Lactation Day. M: Male. NZW = New Zealand White. PPND: Pre and Post Natal Development. SC = Subcutaneous. TK = Toxicokinetic.
a = Males were dosed every other day for 71 days. Females were dosed every other day for 31-36 days (2 weeks prior to mating, mating period through GD 15, dose every other day, 16 or 17 doses).
b = Females were dosed every other day from GD 6 to GD 18.
c = Animals were dosed once every two days from GD6 up to 18 (time-mated females that did not deliver a litter) or from GD 6 up to LD 21 (dams that delivered a litter). All animals were dosed SC with a dosing volume of 10 mL/kg based on daily body weight and average dose of 10.5, 52.5, 87.5 mg/kg/week.

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

6.2. 受胎能及び胚・胎児発生に関する併合試験

6.2.1. マウス

各群雌雄 25 例の CD-1 マウスを用いて、ベピロビルセンの受胎能及び胚・胎児発生への影響を評価した。ベピロビルセンの 0（媒体）、3、15 及び 25 mg/kg/回を、雄には交配開始 4 週間前から試験 71 日まで、雌には交配開始 2 週間前から器官形成期を通して隔日皮下投与した（それぞれ 10.5、52.5 及び 87.5 mg/kg/週）（2017N337889、4.2.3.5.1）。試験の概要を 2.6.7 表 24 に示す。TK 結果については 2.6.4.3.3.2.1 で考察する。

試験期間を通じて一般状態観察、体重・摂食量測定及び性周期観察を実施した。同用量群に割り付けた雌雄は、試験 15 日（雌）又は 29 日（雄）にペアリングし、交尾確認又は 14 日間の交配期間終了のいずれか早い時点まで同居させた。

雄は試験 71 日に、雌は妊娠 18 日に安楽死させた。肉眼的観察所見を記録し、特定の器官／組織を採取し、重量を測定した。また、剖検時に血液学的及び血液生化学的検査のために採血を行った。毒性評価に割り付けられた雄では、精子数、精子運動性、精子濃度及び精子形態を評価した。毒性及び TK 評価に割り付けられた雌では、妊娠の有無を確認し、器官重量を測定した。毒性評価に割り付けられた妊娠雌では、子宮重量、黄体数及び着床痕（着床数、早期吸収／後期吸収／生存胎児／死亡胎児の分類）を評価した。生存胎児及び胎盤の重量を測定し、外表検査を実施した。各同腹児の約半数を骨格検査、残りの胎児を内蔵検査に供した。TK 評価に割り付けた雌雄から肝臓及び腎臓を採取し、胎盤並びに同腹児（最大 10 例）の胎児肝臓及び腎臓を採取した。

ベピロビルセンは、87.5 mg/kg/週までの用量において、概して良好な忍容性を示し、受胎能及び胚・胎児発生に対する悪影響は認められなかった。一般状態、受胎率、性周期、着床率、胚死亡率、胎児の外表／骨格／内臓異常、精子形態、精子濃度及び精子運動性に影響はみられなかった。

投薬に関連する所見は F0 雄のみに認められ、高用量群では肝酵素及び肝重量の高値が認められた。52.5 及び 87.5 mg/kg/週群の血清肝酵素濃度は対照群と比較して、ALP がそれぞれ 1.5 及び 1.8 倍、ALT が 4.5 及び 17 倍、AST がそれぞれ 6.5 及び 26 倍高値であった。また、52.5 及び 87.5 mg/kg/週群で肝絶対重量及び相対重量（体重に対する相対重量）の高値（それぞれ最大 9.0 及び 17%）も認められた。これらの用量に応じた ALT 及び AST 並びに肝重量の高値は、高用量における肝毒性の発現を示唆している。また、52.5 及び 87.5 mg/kg/週群では脾臓重量の高値も認められた（39～58%）。

F0 雌で認められた所見は、全投薬群においてみられた体重及び体重増加量の高値（14%以下）、52.5 及び 87.5 mg/kg/週群でみられた脾臓の相対重量のわずかな高値（それぞれ 15 及び 29%）のみであった。これらの変化に関連した一般状態への影響はみられなかったこと、及び所見の程度も考慮し、投与に関連する影響と判断しなかった。

母動物におけるベピロビルセンの肝臓及び胎盤中濃度は用量依存的に増加した（表 20 及び 2.6.4.3.3.2.1）。ベピロビルセンはいずれの胎児肝臓サンプルからも検出されなかったが、52.5 及び 87.5 mg/kg/週群の動物の胎盤組織ではごくわずかに（母動物肝臓中濃度の

5.4%以下）検出された。雄マウスの肝臓では、ベピロビルセン濃度は用量に応じて増加した。

以上のように、ベピロビルセンは本試験において生殖能（雌雄）、母動物の一般状態、胚・胎児発生に悪影響を及ぼさなかった。組織中濃度測定の結果、胚又は胎児への曝露は示されなかった、又はごくわずかであった。F0 雄の 52.5 及び 87.5 mg/kg/週群でのみ悪影響が認められたが、これは雄へのベピロビルセンの長期投与に起因するものと考えられる。

6.3. 胚・胎児発生に関する試験

6.3.1. ウサギ

6.3.1.1. 用量設定試験

各群 7 例の妊娠 NZW ウサギにベピロビルセンの 0（媒体）、5、15 及び 30 mg/kg/回を妊娠 6～18 日に隔日皮下投与した（それぞれ 17.5、52.5 及び 105 mg/kg/週）（2017N337852、4.2.3.5.2）。試験の概要を 2.6.7 表 23 に示す。

ベピロビルセンは概して良好な忍容性を示し、母動物に死亡及び剖検所見は認められず、母動物の一般状態、受胎率、胎児の外表検査及び胎盤形成に影響は認められなかった。

15 及び 30 mg/kg 群では、母動物の摂餌量及び体重増加量の低値が認められた。妊娠及び胚・胎児発生への悪影響はみられなかったが、30 mg/kg 群の平均胎児体重は対照群より低値（14.4%）であった。胎児体重の低値は、胚・胎児発生への直接的な影響ではなく、母動物の摂餌量及び体重増加量の低値による二次的な影響であると考えられた。

全投薬群において、赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン量）の軽度低値及び赤血球分布幅、網状赤血球数（絶対値及び相対値）、クレアチニンの軽度高値が認められた。また、全投薬群で肝臓及び脾臓重量（絶対重量及び相対重量）の高値が認められ、脾臓重量は対照群の約 1.2～1.3 倍であった。これらの剖検及び臨床病理検査において認められた所見は悪影響とは判断しなかった。

6.3.1.2. 胚・胎児発生に関する試験（本試験）

ベピロビルセンが胚・胎児発生に及ぼす影響について検討するため、各群 22 例の妊娠 NZW ウサギにベピロビルセンの 0（媒体）、6、12.6 及び 25.5 mg/kg/回を、妊娠 6～18 日に隔日皮下投与した（それぞれ 21、44.1 及び 88.2 mg/kg/週）（2017N337736、4.2.3.5.2）。試験の概要を 2.6.7 表 25 に示す。

ベピロビルセンは概して良好な忍容性を示し、母動物の一般状態、器官重量、生殖能及び胚・胎児発生に影響は認められなかった。

25.5 mg/kg 群では、妊娠 18/19 日及び 20/21 日に摂餌量の低値が認められた。また、対照群と比較して統計学的に有意ではないものの、妊娠期間中に体重増加量の低値傾向が認められた。これに伴い、平均胎児体重（同腹児ごと雌雄合算）の低値（対照群と比較して 10.3%）が認められた。胎児の体重低値は、母動物の体重増加量及び摂餌量の低値によるものと考えられた。胚・胎児死亡又は発生への影響（外表、内臓及び骨格検査）を示唆する所見はみられなかった。

2.6.6. 毒性試験の概要文

全投薬群で赤血球系パラメータ（赤血球、ヘマトクリット、ヘモグロビン量）の軽度であるが有意な低値がみられ、25.5 mg/kg 群で最も顕著であった（最大 13.2%）が、所見の程度から悪影響とは判断しなかった。

12.6 及び 25.5 mg/kg 群では、びまん性に腎臓及び肝臓の退色がみられたが（25.5 mg/kg 群でより高頻度）、これらの所見と関連する明らかな臨床病理所見は認められず、悪影響とは判断しなかった。

母動物肝臓中のベピロビルセン濃度は用量に応じて増加した。胎盤組織においてわずかに（母動物肝臓中濃度の 7%以下）曝露が認められたが、いずれの群においても胎児中肝臓では定量されなかった（0.100 µg/g 未満）であった。胎盤移行及び母動物／胎児の肝臓中濃度の概要については、2.6.4.3.3.2.2 に示す。

以上より、最高用量である 88.2 mg/kg/週までの投与において胎児への悪影響は認められなかった。

6.4. 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

6.4.1. マウス

ベピロビルセンが出生前及び出生後の発生に及ぼす影響について検討するため、各群 24 例の雌 CD-1 マウスにベピロビルセンの 0（媒体）、3、15 又は 25 mg/kg/回を妊娠 6～18 日（出産しなかった交配済みの雌）又は妊娠 6 日～分娩後 21 日（出産した母動物）に隔日皮下投与した（それぞれ 10.5、52.5 及び 87.5 mg/kg/週）（2023N530614、4.2.3.5.3）。サテライト群（6 例）には分娩後 10 日（剖検日）まで投与し、生体試料中薬物濃度測定のため、乳汁及び肝臓検体を採取した（表 20）。試験の概要を 2.6.7 表 26 に示す。

母動物の肝臓中ベピロビルセン濃度は用量依存的に増加した。乳汁中（分娩後 10 日）並びに分娩後 10 日（生後 10 日）及び分娩後 21 日（生後 21 日）の出生児の肝臓ではわずかに曝露がみられており（母動物肝臓中濃度の 1.0%未満）、15 mg/kg/回以上の群では乳汁及び出生児肝臓中において定量下限値以上の濃度のベピロビルセンが検出された（2.6.4.3.3.2.1）。

母動物では、25 mg/kg/回群の雌 1 例でケージ内に出血がみられたため、妊娠 16 日に安楽死させたが、本例を除く全例は予定剖検日まで生存した。

被験物質に関連した母動物毒性、並びに母動物の妊娠期間、分娩及び授乳に対する影響はみられなかった。すべての用量で、F1 世代の成長及び発達（生存、反射発達、身体的発達、神経行動、生殖機能、妊娠、分娩及び授乳）に対する影響はみられず、F2 世代の生存、成長及び発達に対する影響も認められなかった。

母動物の生殖能、並びに F1 及び F2 世代の出生前及び出生後の成長及び発達に対する NOAEL はともに 25 mg/kg/回（87.5 mg/kg/週）と推定された（この用量での F0 世代における分娩後 21 日の肝臓中の平均濃度は 898.8 µg/g）。

15 mg/kg 以上の群の乳汁中（分娩後 10 日）並びに分娩後／生後 10 日及び分娩後／生後 21 日の出生児肝臓中では、定量下限値を超える濃度のベピロビルセンが検出された（母動物肝臓中濃度の 1.0%未満）。

6.5. 幼若動物を用いた毒性試験

本承認申請は 18 歳以上の患者における 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。

表 12 生殖発生毒性試験で用いたベピロビルセンのバッチ番号及び処方

Batch or Lot Number(s)	Study Type	Species (Strain) or Test System	Duration of Dosing	Report No. (Study No.)	Concentration (mg/mL)	Formulation
[redacted]	Combined fertility and development	Mouse (CD-1)	Males: 71 days (35 doses) Females: 31-36 days (16 or 17 doses)[a]	2017N337889 (505358-AS07)	0.3, 1.5, 2.5	0.9% Saline
	Prenatal and postnatal development	Mouse (CD-1)	GD 6 up to LD 21[c]	2023N530614 (9002027)	0.3, 1.5, 2.5	0.9% Saline
	DRF	Rabbit (NZW)	13 days (GD 6 to GD 18)[b]	2017N337852 (505358-AS08P)	20, 60, 120	0.9% Saline
	Definitive EFD	Rabbit (NZW)	13 days (GD 6 to GD 18)[b]	2017N337736 (505358-AS08)	20, 60, 120	0.9% Saline

Note: The synthetic route was 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 toxicology studies were representative of the batches proposed for clinical use.
All studies have been conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) unless otherwise stated.
Key:
DRF = Dose Range Finding. EFD = Embryofetal Development. GD = Gestation Day. NZW = New Zealand White
a = Males were dosed every other day for 71 days. Females were dosed every other day for 31-36 days (2 weeks prior to mating, mating period through GD 15, dose every other day, 16 or 17 doses).
b = Females were dosed every other day from GD 6 to GD 18.
c = Animals were dosed once every two days from GD6 up to 18 (time-mated females that did not deliver a litter) or from GD 6 up to LD 21 (dams that delivered a litter). All animals were dosed SC with a dosing volume of 10 mL/kg based on daily body weight and average dose of 10.5, 52.5, 87.5 mg/kg/week.

表 13 生殖発生毒性試験で用いたバッチ中の不純物含量

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**
2017N337889 (505358-AS07)	Mouse (CD-1)	Males: 71 days (35 doses) Females: 31-36 days (16 or 17 doses)[a]	0, 3, 15, 25	[redacted]	A[d] 2.4	0.17, 0.85, 1.42
					B[d] 2.0	0.25, 1.25, 2.08
					C[d] 1.1	0.27, 1.37, 2.29
					D[d] 1.8	0.30, 1.5, 2.50
					E[e] 1.4	0.35, 1.75, 2.91
					F[e, f] 1.2	0.15, 0.75, 1.25
					G[e, f] 0.67	0.16, 0.83, 1.39
					H[f] ≤ 0.76	0.15, 0.76, 1.26[h]
					I[f] ≤ 0.76	
					J[g] 14.9	0.49, 2.48, 4.13

表 13　　生殖発生毒性試験で用いたバッチ中の不純物含量（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**
2023N530614 (9002027)	Mouse (CD-1)	GD 6 up to LD 21[c]	0, 3, 15, 25	[redacted]	A[d] 1.7	0.12, 0.60, 1.01
					B[d] 1.6	0.20, 1.00, 1.66
					C[d] 0.50	0.12, 0.62, 1.04
					D[d] 0.20	0.03, 0.16, 0.27
					E[e] 1.2	0.30, 1.50, 2.50
					F[e,f] 1.2	0.15, 0.75, 1.25
					G[e,f] 0.42	0.10, 0.52, 0.87
					H[f] ≤ 0.57	0.11, 0.57, 0.95[h]
					I[f] ≤ 0.57	
					J[g] 9.7	0.32, 1.61, 2.69

表 13　　生殖発生毒性試験で用いたバッチ中の不純物含量（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**
2017N337736 (505358-AS08)	Rabbit (NZW)	13 days (GD 6 to GD 18)[b]	6, 12.6, 25.2	[redacted]	A[d] 2.4	0.34, 0.72, 1.44
					B[d] 2.0	0.50, 1.05, 2.1
					C[d] 1.1	0.55, 1.15, 2.31
					D[d] 1.8	0.60, 1.26, 2.52
					E[e] 1.4	0.70, 1.47, 2.94
					F[e,f] 1.2	0.30, 0.63, 1.26
					G[e,f] 0.67	0.33, 0.70, 1.40
					H[f] ≤ 0.76	0.30, 0.63, 1.27[h]
					I[f] ≤ 0.76	
					J[g] 14.9	0.99, 2.08, 4.17

表 13　　生殖発生毒性試験で用いたバッチ中の不純物含量（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 exposure to 300 mg/week (Week 1 and Week 2: the proposed recommended dose is 300 mg bepirovirsen, twice a week. Weeks 3-24: the recommended dose is 300 mg bepirovirsen, once a week) of bepirovirsen administered SC as a Bepirovirsen solution for injection, 150 mg/mL SSD (safety syringe device) (equivalent to 6 mg/kg/day 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] (i.e., worst case situation). The recommended clinical daily dosage regimen is 6 mg/day of bepirovirsen.

GD = Gestation Day. NZW = New Zealand White.
a = Males were dosed every other day for 71 days. Females were dosed every other day for 31-36 days (2 weeks prior to mating, mating period through GD 15, dose every other day, 16 or 17 doses).
b = Females were dosed every other day from GD 6 to GD 18.
c = Animals were dosed once every two days from GD6 up to 18 (time-mated females that did not deliver a litter) or from GD 6 up to LD 21 (dams that delivered a litter). All animals were dosed SC with a dosing volume of 10 mL/kg based on daily body weight and average dose of 10.5, 52.5, 87.5 mg/kg/week.
d = Impurity measured by [redacted]
e = Impurity measured by [redacted]
f = May also incorporate the [redacted] impurity population due to similar mass. Improvements in amidite manufacture and process knowledge indicate this impurity is predominantly [redacted] impurity population ([redacted]).
g = Sum of total impurities measured by [redacted] and total impurities measured by [redacted]
h = 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]%)

7. 局所刺激性試験

ベピロビルセンの局所刺激性を評価するための独立した試験は実施していない。投与部位の一般状態観察及び病理組織学的評価は、マウス及びサルを用いた反復投与毒性試験（それぞれ 3.2 及び 3.3 項）、並びにマウスを用いた 2 年間がん原性試験（5.2 項）の一環として実施した。各試験の概要を 2.6.7 表 13～18（主要反復投与毒性試験）及び 2.6.7 表 22（がん原性試験）に示す。

8. その他の毒性試験

ベピロビルセンを投与したときのサイトカイン及びケモカイン応答について検討するため、マウス脾臓細胞を用いた in vitro サイトカイン放出試験を実施した。また、ベピロビルセンの合成過程で生じる様々な中間体の遺伝毒性について評価するため、Ames 試験を実施した。

試験はいずれも GLP の一般原則に基づいて実施した。

実施した試験の一覧を GLP 適合状況及び報告書格納場所とともに表 14 示す。各試験の概要を 2.6.7 表 27 及び 28 に示す。

ベピロビルセンのロット番号及び処方に関する情報を表 15 に示す。

ベピロビルセンの抗原性、免疫毒性、毒性発現の機序及び依存性について検討した試験は実施していない。また、ベピロビルセンの代謝物を用いた試験も実施していない。

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 14 ベピロビルセンのその他の毒性試験一覧

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./ Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Test Article	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Ames assay	*S. typhimurium*, *E. coli*	NA	In vitro	50 to 500 µg/plate	[redacted]	NA	No	GSK	2017N333905 (Ames-2867)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium*, *E. coli*	NA	In vitro	50 to 500 µg/plate		NA	No	GSK	2017N333913 (Ames-2868)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium*, *E. coli*	NA	In vitro	50 to 500 µg/plate		NA	No	GSK	2017N333922 (Ames-2869)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium*, *E. coli*	NA	In vitro	50 to 5000 µg/plate		NA	No	GSK	2017N333878 (Ames-2866)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium*, *E. coli*	NA	In vitro	50 to 5000 µg/plate		NA	No	GSK	2017N333925 (Ames-2870)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium*, *E. coli*	NA	In vitro	50 to 500 µg/plate		NA	No	GSK	2017N333926 (Ames-2871)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium*, *E. coli*	NA	In vitro	50 to 500 µg/plate		NA	No	GSK	2017N333944 (Ames-2872)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium*, *E. coli*	NA	In vitro	50 to 5000 µg/plate		NA	No	GSK	2017N333876 (Ames-2865)	m4.2.3.7.6

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 14　　ベピロビルセンのその他の毒性試験一覧（続き）

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./ Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Test Article	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Ames assay	*S. typhimurium, E. coli*	NA	In vitro	50 to 500 µg/plate	[redacted]	NA	No	GSK	2017N337273 (Ames-2876)	m4.2.3.7.6
Cytokine Release Assay	Murine splenocytes	NA	In vitro	40, 100, 200, 1000 µg/mL	B[a]	24 hours	No	GSK	2023N532925 (V73021N)	m4.2.3.7.7

Note:
a = Study conducted with bepirovirsen sodium parent form (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) and with GSK4421747A, the sodium salt is a chimeric 2'-MOE ASO targeted to hepatitis B virus ribonucleic acid. It has the same sequence and chemistry as bepirovirsen but has been synthesized to have only [redacted]% of the [redacted] present.
Key: A: Sodium Salt. B: Bepirovirsen parent compound. GLP: Good Laboratory Practice. NA – Not applicable. X: Parent Compound.

8.1. サイトカイン放出試験

ベピロビルセンのサイトカイン及びケモカイン応答について検討するため、マウス脾臓細胞にベピロビルセンの 40、100、200、1000 µg/mL を 24 時間処理した（2023N532925、4.2.3.7.7）。試験の概要を 2.6.7 表 27 に示す。

ベピロビルセンの 200 又は 1000 µg/mL の処理により、サイトカイン及びケモカイン（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。しかしながら、より関連性の高い in vitro 試験系であるヒト PBMC を用いて詳細な評価が実施されていること（2.6.2.3.1.2）を考慮すると、マウス細胞を用いた in vitro 試験成績の臨床的意義は極めて低いと考えられる。

8.2. 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, 2014]）］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、海外で皮下投与製剤として承認されている他の 2'-MOE ASO [Mipomersen, 2013; Inotersen, 2017; Volanesorsen, 2019]と同様、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、光毒性を示唆する所見は認められていない（3 項）［ベピロビルセン濃度が比較的高くなることが予測される投与部位を含む[Geary, 2009]（9.9 項）］。また、投与部位周囲の皮膚以外では、2'-MOE ASO（ベピロビルセン等）の主要分布組織に皮膚及び眼（光毒性が最も発現する可能性が高い組織[ICH S10, 2013]）は含まれていない[Geary, 2009; Post, 2019]。

8.3. 不純物の試験

ベピロビルセン市販用製剤の製造工程に用いられる以下の出発原料及び合成試薬の Ames 試験を実施した。

- [redacted]（starting material）
- [redacted]（starting material）
- [redacted]（starting material）
- [redacted]（starting material）
- [redacted]（starting material）
- [redacted]（starting material）
- [redacted]（starting material）
- [redacted]（starting material）
- [redacted]（[redacted]; starting material for the synthesis of [redacted], [redacted], [redacted] and [redacted] phosphoramidites）

8.3.1. 復帰突然変異試験（Ames 試験）

ベピロビルセンの出発原料及び合成中間体がネズミチフス菌（TA98、TA100、TA1535、TA1537）及び WP2 *uvrA*（pKM101）において、in vitro で遺伝子変異を誘発する可能性について検討するため、以下に示す試験を実施した。以下の要約においては、各不純物／分解生成物又は合成中間体は、特記しない限り、各菌株に対して 50、150、500、1500、2500 及び 5000 µg/mL の濃度で処理した。各試験の概要を 2.6.7 表 28 に示す。なお、試験には適切な陰性（DMSO）及び陽性対照を用いており、いずれの試験も妥当であることが確認された。

8.3.1.1. [redacted]（starting material）

[redacted]は、細菌を用いる復帰突然変異試験において、S9-mix の有無にかかわらず変異原性を示さなかった（2017N333905、4.2.3.7.6）。最高濃度は沈殿（インキュベーション終了時に目視で確認）が認められた用量とし、S9-mix の有無にかかわらず、500 µg/plate であった。

8.3.1.2. [redacted]（starting material）

[redacted]は、細菌を用いる復帰突然変異試験において、S9-mix の有無にかかわらず変異原性を示さなかった（2017N333913、4.2.3.7.6）。最高濃度は沈殿（インキュベーション終了時に目視で確認）が認められた用量とし、S9-mix の有無にかかわらず、500 µg/plate であった。

8.3.1.3. [redacted]（starting material）

[redacted]は、細菌を用いる復帰突然変異試験において、S9-mix の有無にかかわらず変異原性を示さなかった（2017N333922、4.2.3.7.6）。最高濃度は沈殿（インキュベーション終了時に目視で確認）が認められた用量とし、S9-mix の有無にかかわらず、500 µg/plate であった。

8.3.1.4. [redacted]（starting material）

[redacted]は、細菌を用いる復帰突然変異試験において、S9-mix の有無にかかわらず変異原性を示さなかった（2017N333878、4.2.3.7.6）。最高濃度は沈殿（インキュベーション終了時に目視で確認）が認められた用量とし、S9-mix の存在下では、TA100 及び TA98 で 5000 µg/plate、TA1535、TA1537 及び WP2 *uvrA*（pKM101）で 1500 µg/plate、S9-mix の非存在下では、TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び WP2 *uvrA*（pKM101）で 1500 µg/plate であった。

8.3.1.5. [redacted]（starting material）

[redacted]は、細菌を用いる復帰突然変異試験において、S9-mix の有無にかかわらず変異原性を示さなかった（2017N333925、4.2.3.7.6）。最高濃度は沈殿（インキュベーション終了時に目視で確認）が認められた用量とし、S9-mix の存在下では、TA100 及び TA98 で 5000 µg/plate、TA1535、TA1537 及び WP2 *uvrA*（pKM101）で 1500 µg/plate、S9-mix の非存

在下では、TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び WP2 *uvrA*（pKM101）で 1500 µg/plate であった。

8.3.1.6. [redacted]（starting material）

[redacted] は、細菌を用いる復帰突然変異試験において、S9-mix の有無にかかわらず変異原性を示さなかった（2017N333926、4.2.3.7.6）。最高濃度は沈殿（インキュベーション終了時に目視で確認）が認められた用量とし、S9-mix の有無にかかわらず、500 µg/plate であった。

8.3.1.7. [redacted]（starting material）

[redacted] は、細菌を用いる復帰突然変異試験において、S9-mix の有無にかかわらず変異原性を示さなかった（2017N333944、4.2.3.7.6）。最高濃度は沈殿（インキュベーション終了時に目視で確認）が認められた用量とし、S9-mix の有無にかかわらず、500 µg/plate であった。

8.3.1.8. [redacted]（starting material）

[redacted] は、細菌を用いる復帰突然変異試験において、S9-mix の有無にかかわらず変異原性を示さなかった（2017N333876、4.2.3.7.6）。最高濃度は沈殿（インキュベーション終了時に目視で確認）が認められた用量とし、S9-mix の存在下では、TA100 及び TA98 で 5000 µg/plate、TA1535、TA1537 及び WP2 *uvrA*（pKM101）で 1500 µg/plate、S9-mix の非存在下では、TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び WP2 *uvrA*（pKM101）で 1500 µg/plate であった。

8.3.1.9. [redacted]（[redacted]）（starting material for the synthesis of [redacted], [redacted], [redacted] and [redacted] phosphoramidites）

[redacted] は、細菌を用いる復帰突然変異試験において、S9-mix の有無にかかわらず変異原性を示さなかった（2017N337273、4.2.3.7.6）。最大濃度は、ガイドラインで従って、S9-mix の有無にかかわらず 5000 µg/plate であった。

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 15 その他の毒性試験で用いたベピロビルセンのバッチ番号及び処方

Batch or Lot Number(s)	Study Type	Species (Strain) or Test System	Duration of Dosing	Report No. (Study No.)	Concentration (mg/mL)	Formulation
[redacted]	Cytokine Release Assay	Murine splenocytes	24 hours	2023N532925 (V73021N)	2.5	0.9% Saline

Note: Study conducted with bepirovirsen sodium parent form (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) and with GSK4421747A, the sodium salt is a chimeric 2'-MOE ASO targeted to hepatitis B virus ribonucleic acid. It has the same sequence and chemistry as bepirovirsen but has been synthesized to have only [redacted]% of the [redacted] present

9. 考察及び結論

ベピロビルセンの毒性プロファイルを評価するため、週 1 回皮下投与による安全性薬理試験（中枢神経系、心血管系及び呼吸系に関する試験：2.6.2.4）、並びに CD-1 マウスを用いた最長 26 週間（100 mg/kg/回まで）及びカニクイザルを用いた最長 39 週間（40 mg/kg/回まで）の反復投与毒性試験を実施した。CByB6F1 WT マウス及び CD-1 マウスを用いた 13 週間投与試験（ベピロビルセン関連不純物の安全性確認を含む）では、他の反復投与毒性試験と一致する所見が認められた。2 系統のマウスを用いた試験における毒性所見は、糸球体腎症（CD-1 マウスでみられ、CByB6F1 WT 系統では認められず）を除き、概ね類似していた。これらのことから、げっ歯類における毒性プロファイルとしては、より感受性の高い CD-1 マウスで観察された所見を中心に示す。

In vitro 試験においてベピロビルセンの hERG 電流に対する影響を評価した。ベピロビルセンの変異原性及び染色体異常誘発性について、細菌及び哺乳類培養細胞を用いた in vitro 試験並びにマウスを用いた in vivo 小核試験により評価した。

2’-MOE ASO（ベピロビルセン等）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、海外で既に承認されている他の 2’-MOE ASO [Mipomersen, 2013; Inotersen, 2017; Volanesorsen, 2019]と同様、ベピロビルセンの単回投与毒性試験は実施していない。CD-1 マウス（in vivo 小核試験）で最大 2000 mg/kg、サル（呼吸系／心血管系に関する安全性薬理試験）で最大 40 mg/kg を単回投与したときの忍容性は良好であった。

ベピロビルセンのがん原性について、マウスを用いた 2 年間投与試験により評価した（ラットはがん原性評価において適した動物ではないと判断）。また、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。

オリゴヌクレオチドは ICH S10 の対象外であり、光毒性を示すリスクは極めて低いと考えられることから、ベピロビルセンの光毒性試験は実施していない。

ベピロビルセンは、慢性 HBV 患者における標準治療薬である核酸アナログと併用して投与される。ベピロビルセンの併用投与毒性試験は実施していないが、併用投与による毒性又は標的器官の重複する可能性に関する非臨床評価については 9.15 項に示す。

主要毒性所見及び影響量／無影響量を表 18 に示す。マウス及びサルにおけるベピロビルセン反復投与時の全身曝露量、肝臓及び腎臓中濃度、並びに妊娠動物及び胎児における組織中濃度をそれぞれ表 21、表 19 及び表 20 に示す。

げっ歯類は、一般的に、ヒトを含む霊長類と比較して 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いため、安全域の算出に適切な動物種ではないと考えられている[Henry, 2008]。一方、サルにおける ASO 代謝及び薬物動態プロファイルはヒトへの外挿性を有していることから、安全域の算出が可能である。マウス及びサルの反復投与試験では、2’-MOE ASO の投与により生じることが知られているクラスエフェクト[Henry, 2008]と同様の毒性所見が認められた。サルを用いた試験では、ASO の血清蛋白への結合及び阻害に伴う一過性の APTT 延長及び APC 活性化による急性期所見（最高血漿中濃度に関連）がみられたが[Sheehan, 1998; Shen, 2014]、その他のクラスエフェクトはいずれも反復投与後に認められた。2’-MOE ASO（ベピロビルセン等）の組織中濃度は、約 8～10 回の投与後に定常状

態に達する[Geary, 2009]。このことは、主要な標的器官における蓄積による影響を特徴づけるには、反復投与時の評価が重要であることを示している。

安全性薬理試験において、ベピロビルセンは hERG 電流の阻害作用を示さず、マウスの神経行動学的機能並びにサルの心血管系（血圧、心拍数、ECG）及び呼吸系パラメータ（呼吸数、動脈血ガス）に影響を及ぼさなかった。

9.1. 投与中止及び死亡

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、投与に関連した死亡／瀕死例が認められた。

7 例（3 mg/kg/回群 1 例、20 mg/kg/回群 6 例）では、9 ヵ月間の投与完了前に死亡した／安楽死させた／投与を中止した。

投薬とは関連しない理由により雌 2 例を早期安楽死させた。3 mg/kg/回群の雌 1 例を自然発生的な腎障害により試験 240 日に、20 mg/kg/回群の雌 1 例を投薬に直接関連しない直腸脱の外科的処置に伴う合併症（血小板減少は本例でも観察された）により試験 113 日に安楽死させた。自然発生的な腎障害により安楽死させた 3 mg/kg/回群の雌 1 例では、休薬期間において、補体活性化（持続的な C3 低値及び Bb 高値）及びそれに関連した全身性炎症（重度のアルブミン低値と一致）が認められた。この動物でみられた低アルブミン血症は、カニクイザルで自然発生的な所見として知られている糸球体硬化症及び続発性腎盂腎炎（多くのサルでみられる加齢性変化）に起因する尿中蛋白排泄量の増加により著しく増悪したものであり、投薬との関連性はないと考えられる[Drevon-Gaillot, 2006; Chamanza, 2010; Frazier, 2015]。

20 mg/kg/回群の雄 1 例を重度の血小板減少のため安楽死させた。20 mg/kg/回群の 2 例（雌雄各 1 例）を持続的な血清アルブミン低値及び補体活性化のため安楽死させた。このうち 1 例では、重度の血小板減少並びに子宮及び腎尿細管腔の出血に起因すると考えられる重度の赤血球減少が認められた。また、別の 1 例では、休薬開始から 10 週間後に死亡発見された。死因は肺動脈血栓及び肺における急性かつ重度の出血と考えられたが、これらの所見の原因は不明であった。持続的な血小板減少のため早期に投与を中止した別の雌 1 例では、持続的な補体活性化（試験 91 日以降）、全身性炎症を示唆する所見（試験 135 日まで）及び腎臓への影響（試験 233 日まで）も認められた。これらの変化の大部分は試験 455 日までに概ね回復したが、尿中蛋白排泄量の高値は持続的に認められ、剖検での腎臓所見と一致した。

10 mg/kg/回群の雄 1 例では、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、休薬期間中に安楽死させた。これらの所見の原因は持続的にみられた尾部損傷及びその修復に起因した可能性が考えられたが、一部は投薬に関連したものと考えられた。

以上のように、この試験では死亡率の増加（特に 20 mg/kg/回群）がみられたものの、死亡／安楽死の原因は、いずれも補体活性化による血管周囲の炎症に起因するものではなかった。

2.6.6. 毒性試験の概要文

マウスを用いた 2 年間がん原性試験において、30 mg/kg/回群の雄で統計学的に有意な死亡率の増加（生存率の減少）が認められた。死因と考えられる主要な腫瘍性病変は、肝細胞癌及び血管肉腫、並びに投与部位及び皮膚の線維肉腫であったが、これらの腫瘍のヒトへの外挿性は低いと考えられる（9.14 項）。

9.2. 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、複数例で血管／血管周囲の炎症が認められた。サル 13 週間投与試験では、12 mg/kg/回群の雌 2 例で投与期間終了時、40 mg/kg/回群の 2 例で休薬期間終了時に血管／血管周囲の炎症がみられた。これらの動物では、アルブミン低値、グロブリン高値及びそれに伴う A/G 比の低値、並びにベピロビルセン投与後には一過性の補体因子 Bb 高値及び C3 の低値が認められた。また、これらの動物では MCP-1 及び CRP の高値も認められた（特に 40 mg/kg/回群）。

サル 39 週間投与試験では、最高 20 mg/kg/回の投与により、56 例中 21 例（早期死亡例 7 例中 6 例を含む）で血管／血管周囲の炎症が認められた。しかしながら、早期死亡の原因は血小板減少（9.3 項）及び持続的な重度のアルブミン低値（3.3.1.2）等によるものであり、血管炎が直接的な死因ではないと考えられた。血管炎は複数の用量群で多臓器に認められ、用量の増加に伴い程度及び範囲が増加した。補体活性化（Bb の高値及び C3 の低値）は慢性かつ持続的にみられ、関連する炎症マーカー（CRP、MCP-1、MIP-1β 及び IFNγ、高用量群で IL-6）の高値が認められた。

投与中止／死亡の一因として、外傷性皮膚病変もみられたが、多くの死因は血小板減少又は低アルブミン血症と考えられた。早期死亡／安楽死例の 6 例では、いずれも血管病変、Bb 及び C3 の変化並びに炎症マーカーの変化が認められた。生存例 15 例においても血管周囲の炎症が認められたが、早期死亡／安楽死例と比較して、より軽度かつ病変の発現部位は限定的であった。これらの 15 例以外の生存例 7 例では、投与部位の血管周囲のみに炎症細胞の浸潤がみられ（他の器官ではみられず）、そのうち 6 例で Bb の高値、5 例で C3 の低値が認められた。

サルは、ヒトよりも Factor H による APC 抑制が弱いため、2’-MOE ASO による APC の活性化が生じやすい[Shen, 2014]。この違いにより、サルでは ASO による補体活性化が持続し、重要な血漿補体因子の枯渇や、補体介在性の血管損傷が引き起こされる[Shen, 2016]。

臨床試験では、ベピロビルセンに関連した補体マーカーへの影響がみられたが、APC 活性化を示唆する所見は認められなかった（2.7.4.2）。また、血管炎の増加がみられたが（2.7.4.1.1.2.4）、ヒトでは APC 活性化との関連性は示されていないことから、サルにおける血管炎の発現機序とは異なると考えられる。

9.3. 血小板への影響

2'-MOE ASO（ベピロビルセン等）においては、2 種類の血小板減少が報告されおり、一つは急速に進行し、予測困難な免疫介在型で軽度から重度の出血を引き起こす可能性があるものであり、もう一つはより一般的な漸進的な血小板減少であり、血小板のクリアランスの促進及び／又は捕捉によるもので、通常、無症状である。これらの影響は、ヒトよりもサル

で高頻度にみられ[Henry 2017]、一般的にヒトでは軽度（免疫介在型の重症例は ASO 投与患者では稀である）であり、血小板機能への影響はみられず、臨床においてモニタリングが可能である[Crooke, 2017]。

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みられたが、同様の変化は他の動物（高用量の 40 mg/kg/回群を含む）では認められなかった。

サル 39 週間投与試験では、20 mg/kg/回群で血小板数の低値（4 例ではこれに関連した死亡、早期安楽死、投与中止）がみられ、10 mg/kg/回群の 1 例でも血小板数の低値が認められた。10 mg/kg/回群の 1 例及び 20 mg/kg/回群の 2 例では、軽度／中等度の血小板減少がみられ、漸進的な減少を特徴とし、投与を再開してもより顕著な血小板への影響は認められなかった。20 mg/kg/回群の 3 例では、免疫介在性の特徴を示し、急速な血小板減少及びそれに伴う出血又は投与中止後の血小板数の回復遅延が認められた。20 mg/kg/回群の 1 例は、肺動脈血栓及び重度の急性肺出血により死亡したため不明であったが、死亡前 14 週間の血小板数は安定しており、軽度／中等度の血小板減少であった。2'-MOE ASO である ISIS 104838 を用いた試験でも軽度／中等度の血小板減少がみられ、TLR 活性化を介した B 細胞及び／又は単球の用量依存的な活性化による肝臓及び脾臓での血小板のクリアランス及び補足の増加に起因することが示されている[Narayanan, 2018]。これにより IgM の増加が起こり、一部の抗体が血小板と交差反応を起こし、細網内皮系でのクリアランスの増加を誘導すると考えられる。サル 39 週間投与試験では、ベピロビルセンの 6 mg/kg/回及び 10 mg/kg/回を超える用量を投与した時に、それぞれ MCP-1 の増加及び IgM のわずかな増加がみられており、このことは血小板のクリアランス及び／又は捕捉の増加による機序を裏付けるものと考えられる。

臨床試験では、ベピロビルセン投与患者の最大 5%で血小板減少（主にグレード 1 又は 2）が報告されている（2.5.5.7.1.2）。重篤な血小板減少（SAE）は 2 件のみであり、そのうち免疫介在型は 1 件のみであることが確認されており、このことは、ヒトはサルよりも 2'-MOE ASO による血小板への影響が生じにくいこと[Crooke, 2017]と一致する。

以上を踏まえ、ベピロビルセンの臨床使用に際しては、投与開始前に血小板数を確認し、投与期間中もモニタリングを実施する必要があり、添付文書（案）では、適切なモニタリングの頻度及びそれに応じた用量調節を実施することを規定することとした。

9.4. 肝臓への影響

雄 CD-1 マウスを用いた 4 週間投与試験（非 GLP）では、40 mg/kg/回の投与により、ALT 及び GLDH の増加がみられ、これに関連して肝臓の組織学的変化（クッパー細胞及び肝細胞への影響：細胞質変化、肥大、単細胞壊死）が認められた。これらの所見は長期反復投与試験で観察されたものと一致していたが、発現頻度及び程度は低く、増殖性又は再生性の変化は認められなかった。

マウス 13 週間投与試験では、40 mg/kg/回以上の群でアミノトランスフェラーゼの有意な高値（対照群の約 2～4 倍）及びトリグリセリドの低値（約 52%）が認められた。アミノトランスフェラーゼの高値は、休薬期間終了後までに回復した。肝臓の組織学的所見として、クッパー細胞内の好塩基性顆粒（≥12 mg/kg/回）、肝細胞肥大（≥12 mg/kg/回）、単細胞壊

死（≥40 mg/kg/回）及び単核細胞浸潤（≥4 mg/kg/回）が認められた。これらの変化は用量依存性であり、マウスにおける ASO に対する炎症反応に起因すると考えられた（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[Henry, 2008]、悪影響とは判断せず）。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／程度は概ね軽減した（100 mg/kg/回群の雄での肝細胞肥大及び巨大核を除く）。

マウス 26 週間投与試験では、30 及び 60 mg/kg/回群の雄で、対照群と比較して AST 及び ALT の高値が認められた（それぞれ 2.6 及び 4.7 倍）。雌では全投薬群で AST 及び ALT の高値が認められたが、散発的であり、休薬期間終了時までに回復した。60 mg/kg/回群の雌雄でトリグリセリドの軽度低値（最大 51%）が認められた。肝臓での組織学的所見として、クッパー細胞内の好塩基性顆粒の蓄積、肝細胞の細胞質変化・肥大、巨大核、有糸分裂像の増加がみられ、高用量群では単細胞壊死が認められた。10 mg/kg/回以上の群の雌雄で好塩基性顆粒の蓄積並びにそれに関連した肥大及び空胞化がみられた。30 mg/kg/回以上の群で肝細胞の細胞質変化がみられ、その程度は、雄で軽微～中等度、雌で軽微～軽度であった。その他、雄において軽微～軽度の肝細胞肥大（≥30 mg/kg/回）及び軽度の巨大核（60 mg/kg/回）が低頻度でみられ、投薬群でみられた肝重量増加の一因と考えられた。

CByB6F1 WT マウスを用いた 13 週間投与試験（GLP）においても、同様の肝臓所見が観察された。

マウス 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の発現頻度及び／又は程度の増大が認められた。これらの変化は、概して雄でより顕著にみられ、ベピロビルセンを投与したマウスにおける多様な肝細胞の組織学的変化の一部と考えられるが、ヒトへの外挿性は低いと考えられる。

サルを用いた試験では、数例で肝臓に血管周囲炎［サルで顕著に認められる APC 活性に関連（9.2 項）］がみられ、13 週間投与試験では、12 及び 40 mg/kg/回群の各 1 例に、39 週間投与試験では、3 及び 20 mg/kg/回群の各 1 例で認められた。13 及び 39 週間の投与期間終了後には全投薬群でクッパー細胞内の好塩基性顆粒の蓄積もみられたが、これに関連する肝酵素への影響は認められなかった。

マウスで観察された肝臓への影響は、ASO の免疫刺激作用に対してマウスは感受性が高いことに起因すると考えられている[Henry, 2008; Frazier, 2015]。臨床試験では、ベピロビルセンによる ALT 上昇は一過性であり、投与を継続しても回復性を示したことから、薬物性肝障害（DILI）ではなく、ウイルスクリアランスに関連したものと考えられ（2.5.4.4.7 及び 2.5.5.7.1.1）、マウスで認められた、より長期間の投与により症状が進行する持続的な肝細胞障害とは異なる。

9.5. 腎臓への影響

マウス及びサルの反復投与毒性試験において、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腎機能を評価した。マウス及びサルの 13 週間投与試験では、それぞれ 12 mg/kg/回（中用量）及び 40 mg/kg/回（高用量）まで、腎臓に対する悪影響は認められなかった。

2.6.6. 毒性試験の概要文

マウスの 13 及び 26 週間投与試験では、投薬に関連した組織学的変化として、尿細管上皮細胞及び間質内マクロファージ内の好塩基性顆粒の蓄積、尿細管上皮細胞の空胞化、糸球体腎症（細胞外マトリックスの増加）が認められた。尿細管上皮細胞及びマクロファージの好塩基性顆粒の蓄積は、細胞への ASO の取り込みを示すものと考えられ、休薬期間終了までに回復性が認められたことから、悪影響ではないと考えられた[Henry, 2008]。糸球体でみられた変化は、マウスが ASO による慢性的な炎症反応及び toll 様受容体の活性化を生じやすいこと並びにマウスが背景的にアミロイドーシスを有することに関連したマウス特異的な変化であり[Frazier, 2018]、ヒトへの外挿性は低いと考えられる。

マウスを用いた 2 年間がん原性試験では、30 mg/kg/回群の雄で投薬に関連した中等度の CPN の増悪が認められた。CPN はげっ歯類に特異的変化であり、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が、ヒトへの外挿性は低いと考えられている[Frazier, 2012; Frazier, 2015; Henry, 2008; Mipomersen, 2013]。

サルでは、投薬群で近位尿細管上皮細胞に好塩基性顆粒がみられたが、変性及び壊死は認められなかった。13 週間投与試験におけるサルの腎臓中ベピロビルセン濃度は、40 mg/kg/回群で 2240 µg/g であり、これは他の 2'-MOE ASO をサルに投与した時の変性が発現する閾値におおよそ相当する[Henry, 2008]。39 週間投与試験では、腎臓の間質において、血管及び血管周囲の炎症が数例で認められたが、これらは補体活性化による血管炎症に関連した変化であり、ヒトへの外挿性は低いと考えられた[Frazier, 2015; Shen, 2014; Engelhardt, 2015]。10 mg/kg/回の 39 週間投与時に腎臓で悪影響は認められなかった［この時の曝露量は、ヒト最大推奨臨床用量（MRHD）投与時の AUC の 4.9 倍］。20 mg/kg/回群の腎炎に関連する死亡／安楽死例（9.1 項）では、重度の低アルブミン血症及び尿中バイオマーカーの変化（尿中アルブミン、総蛋白及び尿蛋白／クレアチニン比の増加、尿沈渣中の RBC）が認められた。

臨床試験では、腎機能パラメータ及び APC 活性のモニタリングを実施したが、ヒトで腎臓への悪影響を示唆する所見は認められなかった。MRHD 投与時の腎臓における推定曝露量は、高用量のサルに高用量を投与したときよりも著しく低く、ヒトで腎尿細管において変性が生じる可能性は低いと考えられる。

9.6. 乳腺への影響

マウス 2 年間がん原性試験において、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／又は程度の増大が認められた。また、同用量の雌 3 例で軽微～軽度の小葉過形成及び軽微～中等度の異型過形成の発現頻度の増加が認められた。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、乳腺変化がホルモンに起因する可能性は低いと考えられる。注目すべき点は、乳腺変化は腫瘍を伴っていなかったことである。同様の乳腺変化は、volanesorsen 又は mipomersen を 2 年間投与した CD-1 マウスでも認められていることから、2’-MOE ASO のクラスエフェクトである可能性が示唆される[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2018; Volanesorsen, 2019]。これらの 2'-MOE ASO を用いたマウス 6 ヵ月間投与毒性試験では、乳腺の変化は認められていない。

これらの所見の臨床的な意義は不明であるが、ベピロビルセンの最高 60 mg/kg/回（2 年間がん原性試験で用いた高用量の 2 倍）を 26 週間投与後又は 13 週間の休薬期間終了後のマウスで同様の所見は認められなかった。臨床ではベピロビルセンは最長 24 週間投与されているが、現在までにヒトにおいて懸念される兆候は認められていない。

9.7. その他の血液学的パラメータへの影響

マウス 13 週間投与試験では、40 mg/kg/回以上の群の雄で赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット）の低値（対照群と比較して最大 14%）が認められた。これらの変化に関連した組織学的所見はみられていないことから、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/回群の雄及び 10 mg/kg/回以上の群の雌で、投薬に関連した赤血球系パラメータの軽微～軽度低値（最大 21%）が認められたが、休薬期間終了までに概ね回復した。30 mg/kg/回以上の群の雌では、脾臓で赤脾髄の細胞密度の増加がみられた。これらは脾臓における髄外造血の増加を示唆するものと考えられる。

サル 13 週間投与試験では、8 mg/kg/回以上の群で網状赤血球数の低値（対照群と比較して最大 40%）がみられたが、この変化に関連した赤血球系パラメータの変化及び病理組織学的変化は認められなかった。

ウサギ胚・胎児発生試験（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、ヘモグロビン量）の低値（最大 13.2%）がみられたが、軽度であるため悪影響ではないと判断された。

9.8. 血液凝固への影響

サル 13 週間投与試験では、40 mg/kg/回群で試験 91 日に悪影響ではない一過性の APTT 延長が認められた。本所見は 2’-MOE ASO において既知のクラスエフェクトである[Henry, 2008]。サル 39 週間投与試験では同様の変化は認められていないが、その理由として、試験に用いた用量が低いことを考慮すると、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。

9.9. 投与部位への影響

マウス 2 年間がん原性試験では、10 mg/kg/回以上の群の雌雄において、投与部位に軽微な線維化が認められた。本所見は 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。

9.10. 遺伝毒性

ベピロビルセンは in vitro 遺伝毒性試験及びマウス小核試験で遺伝毒性を示さなかった。また、in vitro 試験において、ベピロビルセンは HBV RNA に対して非常に特異的であり、ベ

ピロビルセンがヒト mRNA に結合して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（2.6.2.3.1.1）。また、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示す可能性があるオフターゲット mRNA は確認されなかった。

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おらず、ベピロビルセンがトリプレックス形成を介して二本鎖ゲノム DNA と直接相互作用する可能性はないため、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。

以上より、ベピロビルセンが遺伝毒性を引き起こす可能性は極めて低いと考えられる。

9.11. 受胎能、胚・胎児発生、並びに出生前及び出生後の発生への影響

ベピロビルセンの受胎能及び胚・胎児発生への影響について検討するため、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、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験を実施した。

マウスでは、ベピロビルセンの 25 mg/kg/回までの用量で雌雄受胎能及び初期胚発生に対する影響はみられなかった。投薬に関連した流産はみられず、胎児の外表、骨格及び内臓の奇形・変異の発生頻度への影響も認められなかった。胎盤及び胎児肝臓中濃度測定の結果、胎児への曝露は示されなかった、又はごくわずかであった。

皮下投与によるウサギの胚・胎児発生試験（本試験）において、88.2 mg/kg/週群までの用量で胚・胎児発生への影響はみられず、着床率、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。中用量（44.1 mg/kg/週）群で明らかな母動物毒性は認められなかった。母動物におけるベピロビルセンの肝組織中濃度は用量に応じて増加した。胎盤組織中濃度は低く（母動物肝臓中濃度の 7%以下）、胎児肝臓中濃度は定量下限未満であった。

マウスの出生前及び出生後の発生に関する試験において、母動物毒性並びに妊娠期間、分娩及び授乳に対する影響はみられず、F1 及び F2 世代の発達に対する影響も認められなかった。母動物の生殖能並びに F1 及び F2 世代の出生前及び出生後の成長及び発達に対する NOAEL はともに 85.5 mg/kg/週と推定された。分娩後 21 日の母動物の肝臓中の平均ベピロビルセン濃度は 898.8 µg/g であり、分娩後／生後 10 日及び分娩後／生後 21 日の乳汁及び出生児の肝臓中にベピロビルセンがわずかに（母動物肝臓中濃度の 1.0%未満）検出された。

9.12. 局所刺激性

反復投与毒性試験において、全投薬群で皮下投与部位に ASO の取り込みを示唆するマクロファージ内の好塩基性顆粒の蓄積が認められたが、毒性学的に意義のある変化ではないと考えられる[Frazier, 2015]。マウス 13 及び 26 週間投与試験では、投与部位における空胞化マクロファージの集簇及び混合細胞浸潤の発現頻度及び／又は程度の増強がみられた。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]。

2.6.6. 毒性試験の概要文

サル 13 週間投与試験では、最大 40 mg/kg/回の皮下投与においても、投薬に関連した投与部位の肉眼的所見はみられなかった。病理組織学的検査では、投与部位に単核又は混合性炎症細胞浸潤、出血、浮腫及び／又線維化がみられたが、ベピロビルセンではなく投与操作に関連したものと考えられた。

サル 39 週間投与試験では、最大 20 mg/kg/回の皮下投与により、一過性の皮膚反応（変色、痂皮形成、腫脹、打撲／擦過傷等）がみられ、一部の動物では持続的に認められた。組織学的には炎症及び線維化がみられ、10 mg/kg/回以上の群では好中球浸潤及び皮膚の肥厚が認められた。

マウス及びサルの反復投与毒性試験で観察された上記の投与部位の変化は、いずれも悪影響ではないと判断された。

9.13. T 細胞依存性抗体反応

サル 39 週間投与試験において、抗 KLH IgM 抗体産生の結果にばらつきがみられたが、全群で概ね同程度の反応がみられた。試験 268 日の抗 KLH IgG 抗体価は全投薬群で対照群よりも低かった（20 mg/kg/回群では有意）。試験 275 日の抗 KLH IgG 抗体価は、全投薬群で対照群の平均値と比較して有意に低値であり、休薬期間終了後（試験 455 日）においても、10 及び 20 mg/kg/回群では有意に低値であった。動物の一般状態に本所見に関連する明らかな影響（易感染性を示唆する所見はみられず）は認められていないが、本所見のヒトへの外挿性は不明である。

9.14. がん原性

規制当局の助言に基づき、少なくとも 1 種類のげっ歯類において生涯投与による影響を評価するため、反復投与毒性試験に用いた系統と同じ CD-1 マウスを用いた 2 年間がん原性試験を実施した。この試験では、投薬に関連した肝腫瘍の発現頻度の増加がみられ、肝細胞癌（10 mg/kg/回以上の群の雄、30 mg/kg/回群の雌）、肝細胞腺腫（30 mg/kg/回群）、肝血管肉腫（全投薬群の雄、30 mg/kg/回群の雌）、及び肝血管腫（30 mg/kg/回群の雄）が認められた。また、線維肉腫が投与部位（10 mg/kg/回以上の群の雄）及び投与部位に近接する皮膚（30 mg/kg/回群の雄）に認められた。30 mg/kg/回群の雌雄では、全身性血管肉腫及び血管肉腫／血管腫（併合）の増加がみられ、10 mg/kg/回群の雌では、全身性血管肉腫の増加が認められた。

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概ね定性的に類似していたが[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2018]、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臨床的な意義は低いと考えられる。

9.14.1. 肝細胞腫瘍

CHB 患者では肝細胞癌を発症するリスクが著しく高い[Song, 2019]。そのため、マウスにおける 2'-MOE ASO に関連する肝細胞腫瘍の機序と、CHB 患者の素因となる表現型には関連性がある可能性がある。注目すべき点として、ベピロビルセンの最高 60 mg/kg/回（マウスの 2 年間がん原性試験で用いた高用量の 2 倍）を 26 週間投与したマウス及び、26 週間投与後に 13 週間休薬したマウスの肝臓で投薬に関連した腫瘍性病変は認められていない。臨床においては、標準治療薬である核酸アナログ（NA）とともに、ベピロビルセンは最長 24 週間にわたり単独投与される。ヒトでは、肝細胞腺腫（非悪性腫瘍）が肝細胞癌に進行することはまれであり[Stoot, 2010; Mipomersen, 2013]、マウスの肝細胞腺腫のヒトへの外挿性は低いと考えられている[McClain, 1989; Greaves, 2007]。

ベピロビルセンをマウスに 26 週間投与したときの肝臓所見として、肝細胞の細胞質変化、肥大及び単細胞壊死がみられ、増殖性変化としては、肝細胞有糸分裂像の増加（トランスアミナーゼ増加を伴う）のみが認められた。サルでは、マウスよりも高い曝露量を示したが、最長 39 週間投与後においても同様の肝細胞への影響はみられていない。肝臓での増殖性変化（マウスの肝腫瘍を含む）は、幹細胞集団の細胞増殖及びターンオーバーの亢進と関連しており、特にマウスは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、これらの腫瘍が必ずしも臨床的に意義のあるものではない[Greaves, 2007]。

マウスの肝細胞における一連の影響（単細胞壊死及びこれに関連した血漿中トランスアミナーゼの上昇並びに増殖性又は再生性変化）は、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]。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大がみられており、これに関連して肝腫瘍の発現頻度も高かった。

ベピロビルセンは、mipomersen 及び volanesorsen と比較して、マウスにおいてより強い肝毒性を示しており、このことは、マウスの肝細胞腫瘍は 2'-MOE ASO により誘発された肝細胞傷害に続発した変化である可能性を支持するものと考えられる。臨床では、ベピロビルセン投与による ALT 増加がみられているものの、ウイルスのクリアランスを伴う一過性の変化であったことから、ALT 増加は薬物性肝障害を示唆するものではなく、治療によるフレア現象と考えられる。そのため、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毒性とは異なるものであり、マウスの肝細胞腺腫及び肝細胞癌のヒト（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。

9.14.2. 血管肉腫／血管腫

マウスは、ヒトを含む他の動物種と比較して、遺伝学的に血管肉腫／血管腫を生じやすいことが知られており[Cohen, 2009]、一般的に、マクロファージの活性化及び低酸素により生じる血管新生異常が関与すると考えられている。マウスは 2'-MOE ASO の免疫反応に対する感受性が高く[Henry, 2008]、肝臓等の主要な分布組織では慢性的なマクロファージの活性化が生じている可能性が考えられる[Geary, 2015]。

ベピロビルセンのマウスを用いた 13 及び 26 週間投与試験では、肝臓でのマクロファージの活性化を示唆するクッパー細胞の細胞質空胞化・肥大を伴う好塩基性顆粒の増加が認められた[Frazier, 2015]。また、赤血球系パラメータの減少は、慢性的な低酸素負荷を示す。マウ

ス 26 週間投与試験における低酸素負荷レベルは、mipomersen のマウス 2 年間がん原性試験と概ね同程度であり、mipomersen のマウス 2 年間投与試験でもマクロファージの活性化及び低酸素が認められている[Mipomersen, 2013]。また、マクロファージの活性化及び低酸素は、マウスにおける血管肉腫の形成を促進させる可能性があることが示唆されている[Cohen, 2009]。

ヒトにおいてベピロビルセンの投与により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、及びマウスは遺伝学的に血管肉腫形成に対する感受性が高いことを考慮すると、これらの腫瘍のヒトへの外挿性は低いと考えられる。注目すべき点として、CHB と発がんリスクの関連性を調査した大規模研究において、血管肉腫の発現頻度の増加は認められておらず[Song, 2019]、CHB 患者においてこの腫瘍の発現リスクは上昇しないことが示されている。また、FDA 及び EMA によるそれぞれ mipomersen 及び volanesorsen の審査においても、マウスを用いた 2 年間がん原性試験でみられた血管肉腫のヒトへの外挿性は懐疑的であることが示されている[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2018]。

9.14.3. 皮膚／皮下線維肉腫

げっ歯類では、ASO を慢性的に皮下投与することにより、ASO に関連した免疫系の持続的刺激により線維芽細胞の増殖性変化が生じ、その結果、マウス及びラットで皮下肉腫が生じる可能性がある[Mipomersen, 2013]。この発現機序は、持続的な刺激／炎症及びサイトカイン放出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ている[Rundhaug, 2010]。これに一致すると考えられる所見として、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の用量依存的な集積（種々の程度の細胞質空胞化を伴う）が認められている。FDA による mipomersen の審査では、これらの腫瘍のヒトへの外挿性は懐疑的であることが示されている[Mipomersen, 2013]。

9.14.4. ベピロビルセンにおいて他の 2'-MOE ASO よりも腫瘍の発現頻度の高値を示した理由

ベピロビルセン、mipomersen 及び volanesorsen は、CD-1 マウスにおいてこのクラス（2'-MOE ASO）の薬物で典型的な毒性を示し、マウスはこれらの免疫反応に対する感受性がヒトよりも高いことを反映している[Mipomersen, 2013; Volanesorsen, 2019; Frazier, 2015]。しかしながら、これらの毒性の顕在化には配列の違いが関与している可能性がある。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は、2 年間がん原性試験で認められた腫瘍（肝細胞癌／腺腫、血管肉腫／血管腫、投与部位の線維肉腫）の形成促進及び進行に関与している可能性がある。

Mipomersen 及び volanesorsen の反復投与毒性試験で観察された主要な毒性所見を比較した結果、ベピロビルセンでより強い腫瘍形成シグナルを示した理由を説明しうるいくつかの顕著な相違が認められた（表 16 及び表 17）。ベピロビルセンでは肝細胞癌の発現頻度が著しく高く、肝細胞腺腫の発現頻度増加も認められたものの、volanesorsen の発現頻度と概ね同程度であった。ベピロビルセンはより強い肝細胞毒性を示し、反復投与毒性試験では低用

量及び投与初期から特徴的な変化（トランスアミナーゼ増加、細胞質変化、肥大、単細胞壊死及び有糸分裂像増加）が認められた。この強い肝細胞毒性により、ベピロビルセンのマウスの 2 年間がん原性試験では肝細胞癌及び肝細胞腺腫の形成が認められた可能性が考えられる。

このクラスの薬物に関連する血管肉腫／血管腫の形成を促進する主な毒性としては、組織マクロファージの活性化及び低酸素が考えられる。ベピロビルセン、volanesorsen 及び mipomersen のいずれにおいても組織マクロファージの活性化を示す形態学的変化が認められている。マウス 13 週間投与試験では、ベピロビルセンで赤血球数減少がみられたが、volanesorsen では認められていない。26 週間投与試験では、3 薬物のいずれにおいても概ね同様の赤血球への影響が認められたが、ベピロビルセンではより長期的に赤血球系パラメータに影響を及ぼした結果、血管肉腫／血管腫の発現頻度の高値を示した可能性が考えられる。ただし、mipomersen の 13 週間投与試験データは公開されていないため、これらの評価は部分的なものであることに注意する必要がある。

投与部位への影響として、ベピロビルセンを投与したマウスでは、volanesorsen と比較して、低用量及び早期から好塩基性顆粒を有するマクロファージ及び単核細胞浸潤が認められた。これらの変化はマクロファージの活性化を示唆しており、げっ歯類では、ASO の慢性的な曝露により線維肉腫が生じる可能性がある[Rundhaug, 2010; Mipomersen, 2013]。ベピロビルセンにおいて投与部位所見がより早期に観察されたことが、他の薬物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。

表 16　ベピロビルセン、mipomersen 又は volanesorsen の CD-1 マウスを用いた 13 週間投与試験における主要所見比較

Finding	Bepirovirsen	Mipomersen*	Volanesorsen
Increased ALT/AST	≥40 mg/kg/week	Not available	100 mg/kg/week (transient)
Hepatocellular SCN	≥40 mg/kg/week	Not available	None
Other Hepatocellular changes	≥12 mg/kg/week (hypertrophy) ≥40 mg/kg/week (Cytoplasmic alteration, mitosis)	Not available	None
Reduced RBC mass	≥40 mg/kg/week	Not available	None
Injection site changes	≥4 mg/kg/week	Not available	≥40 mg/kg/week

*Although conducted, the findings of the 13-week toxicity study in CD-1 mice for mipomersen are not detailed in the publicly available literature

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 17 ベピロビルセン、mipomersen 又は volanesorsen の CD-1 マウスを用いた 26 週間投与試験における主要所見比較

Finding	Bepirovirsen	Mipomersen	Volanesorsen*
Increased ALT/AST	≥30 mg/kg/week	≥75mg/kg	**Study 1:** ≥30 mg/kg/week **Study 2:** ≥50 mg/kg/week ['necrosis' at 60 mg/kg, not characterized]
Hepatocellular SCN	≥30 mg/kg/week	None	**Study 1:** None Study 2: 60 mg/kg, necrosis (not characterized)
Other Hepatocellular changes	≥30 mg/kg/week (cytoplasmic alteration, mitosis in males, hypertrophy, karyomegaly) ≥10 mg/kg/week mitosis in females	None	**Study 1:** None **Study 2:** ≥50 mg/kg/week, cytoplasmic alteration; 60 mg/kg/week, hypertrophy, karyomegaly
Reduced RBC mass	Males 60 mg/kg/week, females ≥10mg/kg/week, up to 21%	≥10 mg/kg (13-27%)	**Study 1:** ≥30 mg/kg/week **Study 2:** ≥50 mg/kg/week
Injection site changes	≥3 mg/kg/week	≥10 mg/kg/week	**Study 1:** ≥10mg/kg/week **Study 2:** 60mg/kg/week

*Two 26-week toxicity studies were run in CD-1 mice for volanesorsen; **Study 1** assessed doses of 3, 10 and 30 mg/kg/week (with 80 mg/kg/week not being tolerated) and **Study 2** assessed doses of 50 and 60 mg/kg/week

ベピロビルセンの CD-1 マウスを用いた 2 年間がん原性試験では、肝臓腫瘍（肝細胞癌、腺腫、血管肉腫、血管腫）及び投与部位の線維肉腫の増加が認められた。他の 2'-MOE ASO（mipomersen、volanesorsen）での所見と定性的に類似しているものの、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。しかしながら、これらの所見は、マウスが 2'-MOE ASO による影響に対して感受性が高いこと、マウスにおける特異的な腫瘍形成の機序が関与していること、並びに霊長類を用いた非臨床試験及び臨床試験において同様の所見が認められていないことを考慮すると、ヒトへの外挿性は低いと考えられる。他の 2'-MOE ASO と比較して、ベピロビルセンで腫瘍の発現頻度が高い理由としては、肝細胞毒性がより顕著に認められていること、及びマウスにおける投与部位の炎症が早期に発現したことに起因すると考えられる。

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

ベピロビルセン及び慢性 HBV 治療の標準治療薬として使用される核酸アナログ（NA：TDF、TAF 又はエンテカビル）の毒性試験における標的臓器を比較した結果、両薬物で共通して影響がみられた主要な標的臓器は、腎臓（TDF、TAF、エンテカビル）及び肝臓（エンテカビルのみ）であった。

TDF では、ラット、イヌ及びサルで腎尿細管上皮細胞の巨大核がみられ、イヌが最も感受性が高かった。イヌの慢性毒性試験では、尿細管細胞壊死、尿細管拡張、変性／再生及び間質性腎炎が認められた（腎バイオマーカーの変化を伴う）[VIREAD, 2001]。

2.6.6. 毒性試験の概要文

TAF は全体的に TDF と類似した毒性プロファイルを示し、ラット、イヌ及びサルで腎毒性がみられ、イヌが最も感受性が高かった[VEMLIDY, 2016]。肝臓は TDF 又は TAF の標的臓器ではなかった。

エンテカビルでは、ラット及びマウスの 6 ヵ月間投与試験で小葉中心性肝細胞変性がみられたが、より高い曝露量を示したサル及びイヌでは認められていない[Baraclude, 2005]。マウス 6 ヵ月及びイヌ 3 ヵ月間投与試験で明らかな毒性用量で腎臓への影響が認められたが、毒性評価における主要な動物種（ラット及びサル）では認められなかった。

以上の非臨床データに基づくと、ベピロビルセン及び NA の併用による相加的又は相乗的な腎臓への影響は予想されない。ベピロビルセンのマウス及びサルへの投与では、腎尿細管上皮細胞において、オリゴヌクレオチド関連物質の蓄積を示唆する[Henry, 2008]、このクラスの薬物に典型的な変化（悪影響ではない）が認められた。ベピロビルセンを投与したマウス及びサルにおける悪影響と判断される腎臓所見は、種特異的でヒトへの外挿性が低いクラスエフェクト（マウスの糸球体腎症、サルの糸球体腎炎等）であった[Henry, 2008; Frazier, 2012; Frazier, 2015; Frazier, 2018; Shen, 2014; Shen, 2016; Engelhardt, 2015]。

肝臓では、ベピロビルセンを投与したマウスでこのクラスの薬物に関連した、持続的な肝細胞傷害を示唆する肝毒性が認められた。本所見のヒトへの外挿性は低く、ベピロビルセン及び NA を投与した慢性 HBV 患者で認められた、ウイルスクリアランスに関連する一過性の ALT 上昇と一致しない。また、外部専門家による評価は、臨床試験においてベピロビルセンによる薬剤性肝障害（DILI）を示唆する所見は認められていないという結論を支持するものであった（2.5.5.7.1.1）。

一連の in vitro／in silico 及び臨床的評価により、ベピロビルセン投与により臨床的に意義のある薬物動態学的相互作用が生じるリスクはないことが示されており、このことは、NA との併用により、ベピロビルセン又は NA の曝露量への影響や毒性の増強が生じる可能性は低いことを示唆している（2.6.4.6）。

9.16. 結論

マウス及びサルにベピロビルセンを投与したときの毒性所見は、他の 2’-MOE ホスホロチオエート ASO を投与したときの変化と一致していた[Henry, 2008]。マウスにおける標的臓器は肝臓、腎臓、赤血球系、脾臓、リンパ節及び投与部位であった。

安全性薬理試験において、ベピロビルセンは hERG 電流の阻害作用を示さず、マウスの神経行動機能、サルの心血管系及び呼吸系に影響を及ぼさなかった。

In vitro 遺伝毒性試験及びマウス小核試験において、ベピロビルセンは遺伝毒性を示さず、塩基配列に基づく評価においても遺伝毒性リスクは認められなかった。

ベピロビルセンは、雌雄マウスの受胎能並びにマウス及びウサギの胚・胎児発生に影響を及ぼさなかった［体表面積換算で MRHD のそれぞれ 1.4 及び 2.9 倍の用量まで］。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ず、胎盤移行はわずかであることが示された。ウサギにおいて、MRHD の 5.7 倍の用量で発生毒性（胎児体重の低値）がみられたが、これに関連して母動物毒性も認められた。ベ

2.6.6. 毒性試験の概要文

ピロビルセンをマウスの妊娠及び授乳期間に皮下投与したところ、MRHD の 1.4 倍までの用量で妊娠、分娩、授乳及び出生児の発生／発達に悪影響は認められなかった。

サルでは、血小板減少、低アルブミン血症及び持続的な補体活性化を伴う血管炎（ヒトへの外挿性の低い種特異的な変化）の発現頻度の増加が認められた[Shen, 2016; Shen, 2014; Engelhardt, 2015]。マウス及びサルで反復投与後にみられた血液学的検査・血液生化学的検査パラメータの変化は、休薬期間終了時には部分的又は完全に回復した（サルの補体活性化は一部のみ回復）。また、いずれの動物種においても病理組織学的所見は部分的又は完全に回復した。

マウスの 2 年間がん原性試験では、肝腫瘍（肝細胞癌、腺腫及び血管肉腫／血管腫）、投与部位／皮膚の線維肉腫及び全身性血管肉腫の発現頻度の増加がみられ、雌と比較して雄でより顕著であった。この試験で認められた腫瘍は、海外で既に承認されている 2’-MOE ASO で報告されたものと定性的に類似していたが、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、これらの所見はマウス又はげっ歯類に特異的なものである可能性があり、ヒト（CHB 患者を含む）への外挿性は低いと考えられる。ベピロビルセンの臨床試験において同様の腫瘍の発現を示唆する所見は認められていない。CHB 患者には標準診療として肝臓病変のモニタリング（年 1 回）が設けられている。

サル 39 週間投与試験では数例の死亡例がみられ、1 例は自然発生的に認められる糸球体硬化症に関連する重度の蛋白尿がみられたため安楽死させ、別の 1 例は投薬との関連性はない直腸脱の外科的処置に伴う合併症により安楽死させた。また、他の 10 及び 20 mg/kg/回群の 3 例では、血小板減少並びにこれに関連した出血／血栓に関連した変化及び／又は低蛋白血症による死亡／安楽死が認められた。これらの毒性はモニタリング可能であり、ヒトでの推定曝露量に対して十分な安全域が担保されている。血管周囲の炎症に起因する死亡／安楽死は認められなかった。

サル 39 週間投与試験における NOAEL である 6 mg/kg を投与したときの雌雄合算 Cmax 及び AUC0-48 は、それぞれ 22.5 µg/mL 及び 197 µg.h/mL であり、これはヒトに 300 mg を投与したときの臨床曝露量のそれぞれ 2.68 及び 2.01 倍に相当する。

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 18 マウス及びサルにおけるベピロビルセン皮下投与時の主要毒性所見

Finding	Mouse		Monkey	
	Effect Dose (mg/kg/week)	No Effect Dose (mg/kg/week)	Effect Dose (mg/kg/week)	No Effect Dose (mg/kg/week)
Thrombocytopenia*	-	-	10	3
Vascular inflammation and complement effects including hypoalbuminemia	-	-	3	NA
Liver toxicity (transaminase increases or degeneration)	30	10	-	-
Renal toxicity	30	10	20	10
Basophilic granules and macrophage vacuolation in organs including injection site	3	NA	3	NA
Hematologic changes	30	10	8 (reticulocytes only)	4
Coagulation: aPTT prolongation	-	-	40	8

Note: All studies were conducted with Bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836). The treatment-related tumors identified in the 2-year mouse carcinogenicity study (refer to 'carcinogenicity' discussion in Section 5.2 and Section 9.13) are not detailed in this table because they are considered to be of low clinical relevance.

Key:

- = Not observed

aPTT = Activated Partial Thromboplastin Time; NA = Not applicable (No effect dose was not established).

* - Minimal platelet decreases were observed at 6 mg/kg/dose in the 39-week monkey study and were considered non-adverse and not noteworthy by the study director. No value fell below 250,000 platelets/µL and where reductions were seen they were typically 10% to 20% (relative to pre-dose baseline readings).

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 19 マウス及びサルにおけるベピロビルセン皮下投与時の肝臓及び腎臓中濃度

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.

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 20 雌マウス及びウサギにおけるベピロビルセン皮下投与時の胎盤及び肝臓中濃度

Species (study type) [Report No; CTD Location]	Dose (mg/kg/Dose)	Gestation Day	N	Maternal Liver (µg/g)	Placenta (µg/g)	Fetal Liver (µg/g)
Mouse	3	GD18	4	39.7	BLQ	BLQ
(FEED)	15	GD18	5	217	4.23	BLQ
[2017N337889; m4.2.3.5.1]	25	GD18	4	328	17.6	BLQ
Rabbit	6	GD20	2	194	BLQ	BLQ
(EFD)		GD28	4	82.5	BLQ	BLQ
[2017N337736; m4.2.3.5.2]	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	3	10	6	77.82	NM	BLQ
(PPND)		21	6	255.83		BLQ
[2023N530614; m4.2.3.5.3]	15	10	5	456.17		0.04
		21	6	476.60		0.05
	25	10	5	830.00		0.18
		21	6	898.83		0.14

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

2.6.6. 毒性試験の概要文

表 21　ベピロビルセン皮下投与時の全身曝露量比較

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 21 ベピロビルセン皮下投与時の全身曝露量比較（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 (**bolded**)

10. 図表

図表は本文中に記載した。

11. 参考文献

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

Capaldi D, Teasdale A, Henry S, et al. Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products. Nucleic Acid Ther. 2017;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, et al. Hemangiosarcoma in rodents: mode-of-action evaluation and human relevance. Toxicol Sci. 2009 Sep;111(1):4-18.

Crooke ST, Baker BF, Wiztum 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.

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.

Engelhardt J, Fant P, Guionaud S, et al. Scientific and Regulatory Policy Committee Points-to-consider paper*: Drug Induced Vascular Injury associated with non-small molecule therapeutics in preclinical development. Part II. Antisense oligonucleotides. Toxicol Pathol. 2015; 43:935-944.

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

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.

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

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

Greaves P, Liver and Pancreas. IN: Histopathology of Preclinical Toxicity Studies, third Edition

(2007). (P Greaves, editor). Elsevier, Amsterdam, pp. 468-475.

Greaves P, Liver and Pancreas. IN: Histopathology of Preclinical Toxicity Studies, third Edition (2012). (P Greaves, editor). Academic Press, pp. 433-535.

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.

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, Kim TW, Kramer-Stickland K, et al. Toxicologic properties of 2′-O-methoxyethyl chimeric antisense inhibitors in animals and man. In Crooke ST, editor, Antisense Drug Technology, Principles, Strategies and Applications. Boca Raton, FL, Taylor & Francis Group, 2nd Ed 2008; 2: 327-364.

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.

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

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

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. 2017; Aug;27(4):183-196.

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.

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. (This reference has not been originally included in m4.3 due to copy right clearance, however it will be provided with the final submission.)

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.

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

Schmid W. The micronucleus test, Mutat. Res. 1975; 31:9-15.

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

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 Dec; 351(3): 709-717.

Shen L, Engelhard J, 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):236-249.

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.

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

References (Available Upon Request)

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

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

Inotersen FDA Nonclinical Review, 2017. Available at: 211172Orig1s000Approv.pdf

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

VIREAD (Tenofovir Disoproxil Fumarate, TDF) FDA Drug Approval Package 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.

Regulatory Guidelines (not provided)

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

European Medicines Agency (EMEA). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP): Guidelines on the Limits of Genotoxic Impurities, 2006. EMEA/CHMP/QWP/251344/2006.

European Medicines Agency (EMEA). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP): CHMP Safety Working Party Question & Answers on the CHMP Guideline on the Limits of

Genotoxic Impurities. EMEA/CHMP/SWP/431994/2007.

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

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

ICH M3 (R2) (CPMP/ICH/286/95): Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. June 2009.

ICH Q3A(R2) (CPMP/ICH/2737/99): Impurities in New Drug Substances. October 2006.

ICH S2(R1) (CHMP/ICH/126642/08): Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use (2008).

ICH S1A (CPMP/ICH/140/95): Guideline on the Need for Carcinogenicity Studies, November, 1995.

ICH S9 (CHMP/ICH/646107/2008): Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals. October, 2009.

ICH S10 (EMA/CHMP/ICH/752211/2012): Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. June, 2014.

FDA Guidance for Industry. The Need for Long-term Rodent Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals, 1996.

Regulatory Feedback (not provided)

CDE: written feedback following pre-IND meeting for B-Assured study, 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 ADDITIONAL INFORMATION

The following reports have been reviewed within GlaxoSmithKline (GSK) and the information is considered to have no bearing on safety. These reports are not included in the study listing tables for the following reasons:

Table A1.1 List of Studies Conducted with bepirovirsen that are not Included this Submission

Report No. (Study No.)	Title	Reason for Exclusion from Study Listing Tables
2019N419385 (505358-CS01BA01)	Hybridisation ELISA analysis of ISIS 505358 in human plasma samples from ISIS Study 505358-CS1	Stability reports for formulations used in the nonclinical toxicology studies
2019N419629 505358-CS01BA02)	Hybridisation ELISA analysis of ISIS 505358 in human urine samples from ISIS Study 505358-CS1	
2019N418875 (505358-MV06)	Qualification of an HPLC method for the determination of ISIS 505358 in rabbit tissue	
FD2004/00028 (Z25089)	GSK3228836A: Analytical Method Validation of GSK3228836 Followed by Formulation Accuracy and Stability Assessment in0.9% (w/v) Aqueous Sodium Chloride	Performed to support use of the compound in different formulations
2023N539593	Mutation Assay in mouse lymphoma cells	Performed to inform on worker safety and did not inform the GRA process/classification
2023N544405	Mutation Assay in mouse lymphoma cells	Performed to inform on worker safety and did not inform the GRA process/classification

Studies listed in m2.6.6 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.

APPENDIX 2 CARCINOGENICITY TABLES

Table A2.1 List of Tissues Studied in Carcinogenicity Studies

Tissue	Mouse (Report No. 2021N489170)
Liver	+
Site Injection	+
Neoplastic Lesions	+
Brain	+
Epididymis	+
Gland, mammary	+
Gland, preputial	+
Gland, prostate	+
Gland, salivary, mandibular	+
Gland, salivary, parotid	+
Gland, seminal vesicle	+
Heart	+
Kidney	+
Large intestine, cecum	+
Lymph node, axillary	+
Lymph node, mandibular	+
Lymph node, mesenteric	+
Lymph node, pancreatic	+
Lymph node, tracheobronchial	+
Muscle, skeletal	+
Pancreas	+
Skin	+
Testis	+
Tongue	+
Urinary bladder	+
Uterus	+
Vagina	+

Table A2.2 Carcinogenicity Study in Mouse - Summary of Survival and Fate of Animals

Group	Males		Females	
	Mortality	Survival	Mortality	Survival
1	35/70	50%	49/70	30%
2	37/70	47%	46/70	34%
3	35/70	50%	54/70	23%
4	55/70	21%	51/70	27%

1. TOXICOLOGY: OVERVIEW FOR BEPIROVIRSEN

Table 1 List of Single Dose Toxicity Studies Performed with Bepirovirsen

No single dose toxicity studies have been performed with bepirovirsen.

Table 2 List of Repeat Dose Toxicity 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
4-Weeks[h]	Mouse (CD-1)	11M+3M[TK]	SC	0, 40	4-weeks[g]	No	GSK	2023N535316 (M73070N)	m4.2.3.2
13 Weeks	Mouse (CD-1)	10M/10F +6M/6F[R]	SC	0, 4, **12**, 40, 100[a]	13 Weeks	Yes	[redacted]	2019N417087 (505358-AS01)	m4.2.3.2
13 Weeks (bridging study)	Mouse (CByB6F1 [Wild Type])	12M/12F +18M/18F[TK]	SC	0, 4, 12, **40**	13 Weeks	Yes	[redacted]	2019N406770 (M71693G)	m4.2.3.2
13 Weeks (qualification study)	Mouse (CD-1)	12M/12F+6M/6F[f]	SC	0, **12**[e]	13 Weeks	Yes	[redacted]	2021N488385 (M72229G)	m4.2.3.2
26 Weeks	Mouse (CD-1)	12M/12F+6M/6F[R]	SC	0, 3, **10**, 30, 60[b]	26 Weeks	Yes	[redacted]	2019N419097 (505358-AS06)	m4.2.3.2
13 Weeks	Monkey (cynomolgus)	3M/3F+2M/2F[R] 3M/3F+2M/2F[R] 7M/7F[TK]	IV/SC SC SC	0, 4, **8**, 12[c] 0, 40[c] **8**[d]	13 Weeks	Yes	[redacted]	2019N417078 (505358-AS02)	m4.2.3.2
39 Weeks	Monkey (cynomolgus)	4M/4F 7M/7F	SC	0, 3, **6**[b] 0, 10, 20[b]	39 Weeks	Yes	[redacted]	2019N419364 (505358-AS05)	m4.2.3.2

List of Repeat Dose Toxicity Studies Performed with Bepirovirsen (Continued)

Note. All studies were conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358), unless noted otherwise.
NOAEL is indicated in **BOLD.**
Key: F: Female. GLP: Good Laboratory Practice. IV = Intravenous. M: male. NA = Not applicable. R = Recovery. SC = SC. TK = Toxicokinetic.
a = 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.
b = Animals dosed on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly from Day 21 in Week 3 to Day 273 (Week 39).
c = Bepirovirsen was administered to the 4, 8 and 12 mg/kg/dose groups on Days 1, 3, and 5 by IV (1 hour infusion), then SC once weekly on Day 7 through Day 91. Bepirovirsen was SC administered to the 40 mg/kg/dose group on Days 1, 3, and 5, then SC once weekly on Day 7 through Day 91. Bepirovirsen was SC administered to the TK group at 8 mg/kg/dose on Days 1, 3, 5, and 7.
d = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7 only.
e = Animals dosed on Days 1, 3, 5, and 7, and then once weekly doses of 12 mg/kg/week thereafter through Day 91.
f = 12 terminal timepoint animals per sex per group (0 and 12 mg/kg) and 6 satellites animals per sex for terminal liver and kidney bepirovirsen tissue level assessment.
g = 11 male main study animals and 3 males used for terminal bepirovirsen tissue bioanalysis. Animals were dosed on Days 1, 3, 5, 7, 14, 21 and 28.
h = Study conducted with bepirovirsen and GSK4421747A (the sodium salt is a chimeric 2'-MOE ASO targeted to hepatitis B virus ribonucleic acid. It has the same sequence and chemistry as bepirovirsen but has been synthesized to have only [redacted]% of the [redacted] present).

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

Table 3 List of Genotoxicity Studies Performed with Bepirovirsen

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Bacterial Mutation Assay (Ames)	*S. typhimurium* *E. coli*	NA	In vitro	0, 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate	NA	Yes	[redacted]	2019N419124 (505358-IS01)	m4.2.3.3.1
Chromosome Aberration Assay	Chinese Hamster Lung cells	NA	In vitro	0, 62.5, 125, 250, 500 µg/mL	NA	Yes	[redacted]	2019N419080 (505358-IS02)	m4.2.3.3.1
Micronucleus	Mouse (CD-1)	3M/3F[a] 12M/12F[a]	SC	0, 500, 1000, 2000	Single	Yes	[redacted]	2019N419174 (505358-AS09)	m4.2.3.3.2

Note: Early screening studies completed on multiple compounds during the candidate selection phase and prior to in license of bepirovirsen have not been reviewed.
All studies were conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358), unless noted otherwise.
Key: F: female. GLP: Good Laboratory Practice. M: male. NA = Not applicable. SC = Subcutaneous.
A = Bepirovirsen (also known as GSK3228836 and ISIS 505358).
a = 3 animals/sex/group were dosed in the dose range finding part of the study; 12 animals/sex/group dosed in the definitive micronucleus study.

Testing Facility:
[redacted] = [redacted]

Table 4 List of Carcinogenicity Studies Performed with Bepirovirsen

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/day) or Concentration[a]	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
2-year carcinogenicity	Mouse (CD-1)	70M+6M tissue analysis	SC	0, 3, 10, 30	104 weeks[a]	Yes	[redacted]	2021N489170 (8003091)	m4.2.3.4.1

Note: All studies were conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) unless otherwise noted.
Key: F: Female. GLP: Good Laboratory Practice. M: Male. SC = Subcutaneous.
a = SC injection/ once a day on Days 1, 4, 8, and 11 then once weekly starting Day 15.

Testing Facility:
[redacted]= [redacted]

Table 5 List of Reproductive and Developmental Toxicity Studies Performed with Bepirovirsen

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./ Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Combined FEED	Mouse (CD-1)	25M/25 +6M/6F^{TK}	SC	0, 3, 15, 25	Males: 71 days (35 doses) Females: 31-36 days (16 or 17 doses)[a]	Yes	[redacted]	2017N337889 (505358-AS07)	m4.2.3.5.1
PPND	Mouse (CD-1)	24F+6F^{TK}	SC	0, 3, 15, **25**[c]	From GD 6 up to GD 18 or from GD 6 to LD 21[c]	Yes	[redacted]	2023N530614 (9002027)	m4.2.3.5.3
DRF	Rabbit (NZW)	7F	SC	0, 5, 15, 30	13 days (GD 6 to GD 18)[b]	No	[redacted]	2017N337852 (505358-AS08P)	m4.2.3.5.2
Definitive EFD	Rabbit (NZW)	22F+3F^{TK}	SC	0, 6, 12.6, 25.2	13 days (GD 6 to GD 18)[b]	Yes	[redacted]	2017N337736 (505358-AS08)	m4.2.3.5.2

Note: All studies have been conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) unless otherwise stated.
NOAEL is indicated in **BOLD.**
Key: FEED = Fertility and Embryofetal Development. DRF = Dose Range Finding. EFD = Embryofetal Development. F: Female. GD = Gestation Day. GLP: Good Laboratory Practice. LD = Lactation Day. M: Male. NZW = New Zealand White. PPND: Pre and Post Natal Development. SC = Subcutaneous. TK = Toxicokinetic.
a = Males were dosed every other day for 71 days. Females were dosed every other day for 31-36 days (2 weeks prior to mating, mating period through GD 15, dose every other day, 16 or 17 doses).
b = Females were dosed every other day from GD 6 to GD 18.
c = Animals were dosed once every two days from GD6 up to 18 (time-mated females that did not deliver a litter) or from GD 6 up to LD 21 (dams that delivered a litter). All animals were dosed SC with a dosing volume of 10 mL/kg based on daily body weight and average dose of 10.5, 52.5, 87.5 mg/kg/week.

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

Table 6 List of Local Tolerance Studies Performed with Bepirovirsen

No Local Tolerance studies have been performed with bepirovirsen and the assessment was integrated into the definitive repeat dose toxicity studies.

Table 7 List of Other Toxicity Studies Performed with Bepirovirsen

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./ Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Test Article	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Ames assay	*S. typhimurium, E. coli*	NA	In vitro	50 to 500 µg/plate	[redacted]	NA	No	GSK	2017N333905 (Ames-2867)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium, E. coli*	NA	In vitro	50 to 500 µg/plate	[redacted]	NA	No	GSK	2017N333913 (Ames-2868)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium, E. coli*	NA	In vitro	50 to 500 µg/plate	[redacted]	NA	No	GSK	2017N333922 (Ames-2869)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium, E. coli*	NA	In vitro	50 to 5000 µg/plate	[redacted]	NA	No	GSK	2017N333878 (Ames-2866)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium, E. coli*	NA	In vitro	50 to 5000 µg/plate	[redacted]	NA	No	GSK	2017N333925 (Ames-2870)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium, E. coli*	NA	In vitro	50 to 500 µg/plate	[redacted]	NA	No	GSK	2017N333926 (Ames-2871)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium, E. coli*	NA	In vitro	50 to 500 µg/plate	[redacted]	NA	No	GSK	2017N333944 (Ames-2872)	m4.2.3.7.6
Ames assay	*S. typhimurium, E. coli*	NA	In vitro	50 to 5000 µg/plate	[redacted]	NA	No	GSK	2017N333876 (Ames-2865)	m4.2.3.7.6

List of Other Toxicity Studies Conducted with Bepirovirsen (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./ Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Test Article	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Ames assay	*S. typhimurium, E. coli*	NA	In vitro	50 to 500 µg/plate	[redacted]	NA	No	GSK	2017N337273 (Ames-2876)	m4.2.3.7.6
Cytokine Release Assay	Murine splenocytes	NA	In vitro	40, 100, 200, 1000 µg/mL	B[a]	24 hours	No	GSK	2023N532925 (V73021N)	m4.2.3.7.7

Note:
a = Study conducted with bepirovirsen sodium parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) and with GSK4421747A, the sodium salt is a chimeric 2'-MOE ASO targeted to hepatitis B virus ribonucleic acid. It has the same sequence and chemistry as bepirovirsen but has been synthesized to have only [redacted]% of the [redacted] present.
Key: A: Sodium Salt. B: Bepirovirsen parent compound. GLP: Good Laboratory Practice. NA – Not applicable. X: Parent Compound.

2. TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS STUDIES

Table 8 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Repeat dose toxicity	Mouse (CD-1)	SC	0, 40	No	2023N535316 (M73070N)	m4.2.3.2
Repeat dose toxicity	Mouse (CD-1)	SC	0, 4, 12, 40, 100[h]	Yes[f,g]	2019N417087 (505358-AS01)	m4.2.3.2
Repeat dose toxicity	Mouse (CByB6F1 WT)	SC	0, 4, 12, 40[a]	Yes	2019N406770 (M71693G)	m4.2.3.2
Repeat dose toxicity	Mouse (CD-1)	SC	0, 12[i]	Yes	2021N488385 (M72229G)	m4.2.3.2
Repeat dose toxicity	Mouse (CD-1)	SC	0, 3, 10, 30, 60[j]	Yes[k]	2019N419097 (505358-AS06)	m4.2.3.2
Repeat dose toxicity	Monkey (cynomolgus)	IV/SC SC	0, 4, 8, 12[c] 8[d], 40[c]	Yes[e]	2019N417078 (505358-AS02)	m4.2.3.2
Repeat dose toxicity	Monkey (cynomolgus)	SC	0, 3, 6, 10, 20[b]	Yes[e]	2019N419364 (505358-AS05)	m4.2.3.2
Micronucleus	Mouse (CD-1)	SC	0, 500, 1000, 2000	Yes	2019N419174 (505358-AS09)	m4.2.3.3.2
2-year (104 weeks) carcinogenicity	Mouse (CD-1)	SC	0, 3, 10, 30	Yes	2021N489170 (8003091)	m4.2.3.4.1
Reproductive and Developmental Toxicity (Combined FEED)	Mouse (CD-1)	SC	0, 3, 15, 25	Yes[l]	2017N337889 (505358-AS07)	m4.2.3.5.1
Reproductive and Developmental Toxicity (PPND)	Mouse (CD-1)	SC	0, 3, 15, 25	Yes	2023N530614 (9002027)	m4.2.3.5.3

Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies (Continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity (Definitive EFD)	Rabbit (NZW)	SC	0, 6, 12.6, 25.2[m]	Yes[n]	2017N337736 (505358-AS08)	m4.2.3.5.2

Note. All studies were conducted with bepirovirsen sodium the parent form (also known as GSK3228836 and ISIS 505358), unless noted otherwise. Studies listed comprise those conducted during the formal research and development of the compound

Key: EFD = Embryofetal Development. FEED = Fertility and Embryofetal Development. GLP = Good Laboratory Practice. IV = Intravenous. NZW = New Zealand White. PPND = Pre and Postnatal Development. SC = subcutaneous.

a = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7, then weekly from Day 14 (Week 2) to Day 91 (Week 13).

b = Animals dosed on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly from Day 21 (Week 3) to Day 182 (Week 26) or Day 273 (Week 39).

c = Bepirovirsen was administered to the 4, 8 and 12 mg/kg/dose groups on Days 1, 3, and 5 by IV (1 hour infusion), then SC once weekly on Day 7 through Day 91. Bepirovirsen was SC administered to the 40 mg/kg/dose group on Days 1, 3, and 5, then SC once weekly on Day 7 through Day 91.

d = Bepirovirsen was SC administered to the TK group at 8 mg/kg/dose on Days 1, 3, 5, and 7

e = Bepirovirsen analysis in tissue and/or plasma samples was conducted using a non-validated method and is therefore not considered to be GLP

f = The analysis of bepirovirsen in kidney samples was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP.

g = The evaluation of samples from the 100 mg/kg group for the presence of metabolites was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP.

h = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7, then weekly from Day 14 (Week 2) to Day 91 (Week 13).

i= Bepirovirsen was SC administered to the TK group at 8 mg/kg/dose on Days 1, 3, 5, and 7.

j= Animals dosed on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly from Day 21 (Week 3) to Day 182 (Week 26) or Day 273 (Week 39).

k = The analysis of bepirovirsen in kidney samples was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP.

l = The analysis of bepirovirsen in placentae samples was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP.

m = Animals dosed on Gestation Day (GD) 6, GD 8, GD 10, GD 12, GD 14, GD 16 and GD 18.

n = Bepirovirsen analysis in tissue and/or plasma samples was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP.

3. TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS DATA

Table 9 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data

Dose (mg/kg/dose) [Report number, (CTD location)]	AUC0-t (µg.h/mL)					
	Mouse		Monkey		Human	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
4	**Day 1**: 6.31 **Day 91**: 7.68	**Day 1**: 4.73 **Day 91**: 6.86	-	-	-	-
12	**Day 1**: 24.2 **Day 91**: 29.4	**Day 1**: 20.6 **Day 91**: 25.8	-	-	-	-
40 [2019N406770 (m4.2.3.2)]	**Day 1**: 91.5 **Day 91**: 132	**Day 1**: 82.9 **Day 91**: 102	-	-	-	-
4	-	-	IV (**Day 1**)[a]: 67.3 SC (**Day 91**)[a]: 70.5	IV (**Day 1**)[a]: 76.7 SC (**Day 91**)[a]: 60.3	-	-
8	-	-	IV (**Day 1**)[a]: 178 SC (**Day 91**)[a]: 201	IV (**Day 1**)[a]: 152 SC (**Day 91**)[a]: 156	-	-
12	-	-	IV (**Day 1**)[a]: 243 SC (**Day 91**)[a]: 257	IV (**Day 1**)[a]: 220 SC (**Day 91**)[a]: 350	-	-
40	-	-	SC (**Day 1**)[a]: 840 SC (**Day 91**)[a]: 973	SC (**Day 1**)[a]: 856 SC (**Day 91**)[a]: 1030	-	-
8 [2019N417078 (m4.2.3.2)]	-	-	SC (**Day 1**)[a]: 149 SC (**Day 7**)[a]: 137	SC (**Day 1**)[a]: 131 SC (**Day 7**)[a]: 120	-	-

Toxicokinetics: Overview of Subcutaneous Toxicokinetics Data (Continued)

Dose (mg/kg/dose) [Report number, (CTD location)]	AUC0-t (µg.h/mL)					
	Mouse		Monkey		Human	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
3	-	-	**Day 1**[b]: 45.50 **Day 273**[b]: 97.90	**Day 1**[b]: 29.40 **Day 273**[b]: 64.10	-	-
6	-	-	**Day 1**[b]: 130.00 **Day 273**[b]: 204.00	**Day 1**[b]: 97.50 **Day 273**[b]: 190.00	-	-
10	-	-	**Day 1**[b]: 220.00 **Day 273**[b]: 470.00	**Day 1**[b]: 196.00 **Day 273**[b]: 491.00	-	-
20 [2019N419364 (m4.2.3.2)]	-	-	**Day 1**[b]: 516.00 **Day 273**[b]: 1860.00	**Day 1**[b]: 434.00 **Day 273**[b]: 626.00	-	-
300[c]	-	-	**-**	**-**	98.2[c]	

Note: Toxicokinetic and exposure has been evaluated in the 13 weeks mouse repeat dose toxicity study (GSK Study Report 2019N406770 (m4.2.3.2)] and the 13 and 39 weeks cynomolgus monkey repeat dose toxicity study [GSK Study Report 2019N417078 (m4.2.3.2) and 2019N419364 (m4.2.3.2), respectively].
Key: AUC: Area Under the Curve. IV: Intravenous. SC: Subcutaneous.
a = Bepirovirsen was administered to the 4, 8 and 12 mg/kg/dose groups on Days 1, 3, and 5 by IV (1 hour infusion), then SC once weekly on Day 7 through Day 91. Bepirovirsen was SC administered to the 40 mg/kg/dose group on Days 1, 3, and 5, then SC once weekly on Day 7 through Day. Bepirovirsen was SC administered to the TK group at 8 mg/kg/dose on Days 1, 3, 5, and 7.
b = Animals dosed on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly from Day 21 (Week 3) to Day 182 (Week 26) or Day 273 (Week 39).
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).

4. TOXICOLOGY: DRUG SUBSTANCE

Table 10 Toxicology: Drug Substance

Batch Number	Purity (%)	Specified Impurities (% w/w)										Report No. (Study No.)	Type of Study
		A[a]	B[a]	C[a]	D[a]	E[b]	F[b,c]	G[b,c]	H[c]	I[c]	J[d]		
PROPOSED SPECIFICATION		≤ 7	≤ 4	≤ 2	≤ 3	≤ 2	≤ 4	≤ 2	≤ 1%	≤ 1.5%	≤ 15%		
[redacted]		4.2	1.3	0.61	0.82	0.40	0.74	0.77	≤0.20	≤0.20	9.4	2023N535316 (M73070N)	Repeat Dose (CD-1 mouse, SC, 4-week)
[redacted]	88.6	2.4	2.0	1.1	1.8	1.4	1.2	0.67	≤ 0.76	≤ 0.76	14.9	2019N417087 (505358-AS01)	Repeat dose (CD-1 mouse, SC, 13-week)
[redacted]	86.1[a]	4.5	2.5	1.0	0.91	0.50	1.6	0.6	≤ 0.47	≤ 0.47	13.4	2019N406770 (M71693G)	Repeat dose (CByB6F1 WT mouse, SC, 13-week)
[redacted]	78.5	3.0	1.4	1.2	0.48	0.85	1.7	4.0	≤ 0.76	≤ 0.76	27.7	2021N488385 (M72229G)	Repeat dose (CD-1 mouse, SC, 13-week)
[redacted]	88.6	2.4	2.0	1.1	1.8	1.4	1.2	0.67	≤ 0.76	≤ 0.76	14.9	2019N419097 (505358-AS06)	Repeat dose (CD-1 mouse, SC, 26-week)
[redacted]	88.6	2.4	2.0	1.1	1.8	1.4	1.2	0.67	≤ 0.76	≤ 0.76	14.9	2019N417078 (505358-AS02)	Repeat dose (monkey, IV/SC, 13-week)
[redacted]	88.6	2.4	2.0	1.1	1.8	1.4	1.2	0.67	≤ 0.76	≤ 0.76	14.9	2019N419364 (505358-AS05)	Repeat dose (monkey, SC, 39-week)

Toxicology: Drug Substance (Continued)

Batch Number	Purity (%)	Specified Impurities (% w/w)										Report No. (Study No.)	Type of Study
		A[a]	B[a]	C[a]	D[a]	E[b]	F[b,c]	G[b,c]	H[c,e]	I[c,e]	J[d]		
PROPOSED SPECIFICATION		≤ 7	≤ 4	≤ 2	≤ 3	≤ 2	≤ 4	≤ 2	≤ 1%	≤ 1.5%	≤ 15%		
[redacted]	88.6	2.4	2.0	1.1	1.8	1.4	1.2	0.67	≤ 0.76	≤ 0.76	14.9	2019N419124 (505358-IS01)	Bacterial Mutation Assay (Ames)
[redacted]	88.6	2.4	2.0	1.1	1.8	1.4	1.2	0.67	≤ 0.76	≤ 0.76	14.9	2019N419080 (505358-IS02)	Chromosome Aberration Assay
[redacted]	88.6	2.4	2.0	1.1	1.8	1.4	1.2	0.67	≤ 0.76	≤ 0.76	14.9	2019N419174 (505358-AS09)	In vivo Micronucleus (CD-1 mouse)
[redacted]		1.7	1.6	0.50	0.20	1.2	1.2	0.42	≤0.57	≤0.57	9.7	2021N489170 (8003091)	104-week carcinogenicity (CD-1 mouse)
[redacted]		2.4	2.7	0.64	0.20	1.1	1.3	0.51	≤0.45	≤0.45	11.3	(as above)	(as above)
[redacted]	88.6	2.4	2.0	1.1	1.8	1.4	1.2	0.67	0.76	0.76	14.9	2017N337889 (505358-AS07)	Combined fertility and development (CD-1 mouse)
[redacted]		1.7	1.6	0.50	0.20	1.2	1.2	0.42	≤0.57	≤0.57	9.7	2023N530614 (9002027)	PPND (CD-1 mouse)
[redacted]	88.6	2.4	2.0	1.1	1.8	1.4	1.2	0.67	0.76	0.76	14.9	2017N337736 (505358-AS08)	Definitive EFD (Rabbit NZW)

Toxicology: Drug Substance (Continued)

Key: EDF: Embryo Fetal Development. PPND: Pre and Post Natal Development. WT: Wild Type.
a: purity 86.1% (% area on anhydrous basis) and 81.4% (% area as free acid on anhydrous basis).

a= Impurity measured by [redacted]
b = Impurity measured by [redacted]
c = May also incorporate the 2'-*O*-ethoxyethyl ([redacted]) impurity population 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 = 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. SINGLE DOSE TOXICITY

Table 11 Single Dose Toxicity

No studies appropriate to this category have been performed with bepirovirsen.

6. REPEAT DOSE TOXICITY: NON-PIVOTAL STUDIES

Table 12 Repeat Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies

Species/Strain	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Number of Animals/Sex	Noteworthy Findings*	Report No. (Study No.)
Mouse (CD-1)	SC (0.9% Saline)	4-weeks	0, 40	11M+3M[TK]	Clinical signs seen in bepirovirsen-treated animals were limited to individual mice and comprised agitation/restlessness when handled, swollen snout, scab at/around the injection site, hyperactivity, hair loss and raised skin (to the dorsal neck region). Changes in clinical pathology parameters comprised increases in mean alanine amino transferase, glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase activities, accompanied by small increases in mean liver weights (both absolute and relative to body) compared to control animals. Terminal Kill Animals: Bepirovirsen-related accumulations of basophilic granules in Kupffer cells were present in all animals. Test-article related hepatocellular findings included multifocal cytoplasmic alteration, hepatocellular hypertrophy and single cell necrosis in a single animal. These findings correlated with increased alanine amino transferase, aspartate aminotransferase and glutamate dehydrogenase activities. The findings associated with bepirovirsen were anticipated and consistent with data generated from previous studies, given the dosing regimen implemented during this study.	2023N535316 (M73070N)

Key: M: male. SC: subcutaneous.

*Study conducted with bepirovirsen and GSK4421747A (the sodium salt is a chimeric 2'-MOE ASO targeted to hepatitis B virus ribonucleic acid. It has the same sequence and chemistry as bepirovirsen but has been synthesized to have only [redacted]% of the [redacted] present). Bepirovirsen was used as a comparator 2'-MOE ASO in this study and only findings for this molecule are presented in this table.

7. REPEAT DOSE TOXICITY: PIVOTAL STUDIES

Table 13 13-Week Repeat Dose Toxicity Study with a 13 Week Recovery

Report Title: **A 13-Week Repeat Dose Toxicity Study of ISIS 505358 (bepirovirsen sodium; GSK3228836) in Mice with a 13-Week Recovery**		**Study No. 505358-AS01**
Species / Strain: Mouse/*Crl:CD1* (ICR)	Duration of Dosing: 13 weeks	**Location in CTD: m4.2.3.2**
Initial Age: Approximately 6 weeks at receipt	Duration of Post-dose: 13 weeks	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: February 28, 2013	Method of Administration: Subcutaneous injection	**GSK Document Number:** 2019N417087
Vehicle / Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP		
Special Features: Tissue Oligonucleotide Concentration Analysis		
Conclusion: The findings observed were dose related, generally considered minimal to moderate in severity, and were largely due to the potential for antisense oligonucleotides, such as ISIS 505358, to produce low grade proinflammatory effects in rodents.		

Dose (mg/kg/week)[a]:	**0 (Control)**		**4**		**12**		**40**		**100**	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals:	16	16	10	10	16	16	10	10	16	16
Tissue oligonucleotide concentration (µg/g)										
Number Evaluated[b]:	M: 0	F: 0	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Liver										
Day 93	NA		16.2 ± 7.92		57.7 ± 13.8		192 ± 55.6		381 ± 111	
Day 182	NA		NA		BLQ		NA		2.54 ± 6.25	
Kidney										
Day 93	NA		45.7 ± 14.4		95.8 ± 47.2		125 ± 57.5		299 ± 215	
Day 182	NA		NA		BLQ		NA		BLQ	
Noteworthy Findings										
Died or sacrificed moribund	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

13-Week Repeat Dose Toxicity Study with a 13 Week Recovery (Continued)

Dose (mg/kg/week)[a]:	0 (Control)		4		12		40		100	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Hematology[c]:										
Number Evaluated:										
Day 93	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5
Day 182	3	3	NA	NA	3	2	NA	NA	3	3
Erythrocytes (10^6/µL)										
Day 93	9.810	9.322	9.205	9.108	9.424	8.678	9.304	9.006	9.088	9.224
Day 182	10.160	9.317	NA	NA	8.980	9.475#	NA	NA	8.687	8.683
Hemoglobin (g/dL)										
Day 93	14.98	14.90	14.20	14.52	14.16	13.96	13.64*	13.96	12.98**	13.98
Day 182	15.63	14.87	NA	NA	14.03	14.80#	NA	NA	12.97*	13.73
Hematocrit (%)										
Day 93	52.60	50.12	48.70	49.30	49.84	47.10	47.28**	47.74	45.04**	48.08
Day 182	52.17	49.00	NA	NA	46.83	48.90#	NA	NA	43.50	45.60
Serum Chemistry[c]:										
Number Evaluated:										
Day 93	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Day 182	3	3	NA	NA	3	3	NA	NA	3	3
AST (U/L)										
Day 93	74.0	201.0	75.8	176.6	73.0	91.4	183.8	230.6	207.4	645.2
Day 182	74.7	958.7	NA	NA	123.7	263.7	NA	NA	96.0	360.3
ALT (U/L)										
Day 93	35.8	110.6	32.0	90.4	51.4	48.0	92.0	146.2	152.6**	280.4
Day 182	54.3	649.0	NA	NA	66.0	177.7	NA	NA	62.3	167.3

13-Week Repeat Dose Toxicity Study with a 13 Week Recovery (Continued)

Dose (mg/kg/week)[a]:	0 (Control)		4		12		40		100	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Organ Weights[d] (%)										
Number Evaluated:										
Day 93	10	10	9	10	10	10	10	10	10	10
Day 182	6	6	NA	NA	6	6	NA	NA	6	6
Liver (g)										
Day 93	2.048	1.751	-2	-0	+1	+1	+4	+12	+14	+19
Day 182	2.027	1.806	NA	NA	+8	-2	NA	NA	+12	+8
Liver/BWt (%)										
Day 93	5.3067	5.5667	+3	+3	+4	+2	+7	+11	+13**	+17**
Day 182	4.8626	5.4218	NA	NA	+18	-1	NA	NA	+19	+9
Liver/BrWt (ratio)										
Day 93	4.4023	3.4822	-5	+2	-4	+4	-0	+13	+10	+19
Day 182	3.8914	3.5462	NA	NA	+13	-3	NA	NA	+18	+7
Spleen (g)										
Day 93	0.095	0.118	+11	+17	+16	+9	+29*	+40*	+38**	+55**
Day 182	0.106	0.132	NA	NA	+4	-6	NA	NA	+160	+23
Spleen/BWt (%)										
Day 93	0.2446	0.3772	+17	+20	+19	+10	+34**	+37**	+39**	+52**
Day 182	0.2545	0.3946	NA	NA	+14	-5	NA	NA	+175	+26*
Spleen/BrWt (ratio)										
Day 93	0.2036	0.2340	+8	+21	+11	+13	+24	+41*	+33**	+55**
Day 182	0.2019	0.2590	NA	NA	+10	-7	NA	NA	+171	+22

13-Week Repeat Dose Toxicity Study with a 13 Week Recovery (Continued)

Dose (mg/kg/week)[a]:	0 (Control)		4		12		40		100	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Organ Weights[d] (%) (Continued)										
Thymus (g)										
Day 93	0.030	0.040	+13	+2	+23	+18	+20	+15	+0	-33
Day 182	0.050	0.040	NA	NA	-26	-20	NA	NA	-42*	-15
Thymus/BWt (%)										
Day 93	0.0783	0.1283	+17	+6	+27	+17	+23	+14	-5	-33
Day 182	0.1182	0.1194	NA	NA	-15	-19	NA	NA	-38	-16
Thymus/BrWt (ratio)										
Day 93	0.0639	0.0791	+12	+7	+19	+23	+17	+15	-2	-31
Day 182	0.0948	0.0783	NA	NA	-21	-22	NA	NA	-38*	-17
Gross Pathology:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology[e,f]:										
Number Evaluated:										
Day 93	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Day 182	6	6	NA	NA	6	6	NA	NA	6	6
Injection Site 1										
Basophilic granules, macrophages – Minimal to mild										
Day 93	0	0	3	5	8	10	10	10	10	8
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	5	4
Basophilic granules, macrophages – Moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	0	0

13-Week Repeat Dose Toxicity Study with a 13 Week Recovery (Continued)

Dose (mg/kg/week)[a]:	0 (Control)		4		12		40		100	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Injection Site 1 (Continued)										
Infiltration, mononuclear cell - Minimal										
Day 93	0	0	0	0	1	0	1	1	2	0
Day 182	0	0	NA	NA	1	0	NA	NA	0	0
Injection Site 2										
Basophilic granules, macrophages – Minimal to mild										
Day 93	0	0	8	9	8	10	10	9	10	6
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	5	6
Basophilic granules, macrophages – Moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	0	0
Infiltration, mononuclear cell - Minimal										
Day 93	0	0	1	0	2	0	1	0	1	0
Day 182	0	0	NA	NA	0	1	NA	NA	0	1
Injection Site 3										
Basophilic granules, macrophages – Minimal to mild										
Day 93	0	0	4	7	9	10	10	10	10	10
Day 182	0	0	NA	NA	0	1	NA	NA	4	5
Infiltration, mononuclear cell – Minimal to mild										
Day 93	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	1	1

13-Week Repeat Dose Toxicity Study with a 13 Week Recovery (Continued)

Dose (mg/kg/week)[a]:	0 (Control)		4		12		40		100	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Injection Site 4										
Basophilic granules, macrophages – Minimal to mild										
Day 93	0	0	6	10	9	10	9	10	10	6
Day 182	0	0	NA	NA	1	1	NA	NA	5	6
Basophilic granules, macrophages – Moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	0	0
Infiltration, mononuclear cell - Minimal										
Day 93	0	0	3	1	1	0	4	1	2	2
Day 182	1	0	NA	NA	0	1	NA	NA	1	0
Kidneys										
Basophilic granules, macrophages - Minimal										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	8	7
Day 182	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Basophilic granules, tubular cell – Minimal to mild										
Day 93	0	0	0	0	1	4	6	10	9	8
Day 182	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Basophilic granules, tubular cell – Moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	0	0

13-Week Repeat Dose Toxicity Study with a 13 Week Recovery (Continued)

Dose (mg/kg/week)[a]:	0 (Control)		4		12		40		100	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Kidneys										
Glomerulopathy - Minimal										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	3	0
Glomerulopathy - Moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	1	0
Liver										
Basophilic granules, Kupffer cell – Minimal to mild										
Day 93	0	0	0	0	7	1	10	9	10	5
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	6	6
Basophilic granules, Kupffer cell – Moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	0	0
Cytoplasmic alteration, hepatocytes – Minimal to mild										
Day 93	0	0	0	0	0	0	3	0	7	9
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	2	0
Cytoplasmic alteration, hepatocytes – Moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	0	0

13-Week Repeat Dose Toxicity Study with a 13 Week Recovery (Continued)

Dose (mg/kg/week)[a]:	0 (Control)		4		12		40		100	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Liver										
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular – Minimal										
Day 93	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	1	1
Hypertrophy, hepatocyte, panlobular – Minimal to mild										
Day 93	0	0	0	0	0	1	0	1	3	2
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	3	0
Hypertrophy, hepatocyte, panlobular – Moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	1	0
Infiltration, mononuclear cell – Minimal to mild										
Day 93	4	3	5	7	7	9	8	8	9	9
Day 182	5	4	NA	NA	4	6	NA	NA	6	6
Karyomegaly – Minimal to mild										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	3	1
Karyomegaly - Moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	1	0
Mitotic figures, increased – Minimal to mild										
Day 93	0	0	0	0	0	0	1	1	4	6
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	1	0

13-Week Repeat Dose Toxicity Study with a 13 Week Recovery (Continued)

Dose (mg/kg/week)[a]:	0 (Control)		4		12		40		100	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Liver (Continued)										
Necrosis, individual hepatocyte – Minimal to mild										
Day 93	0	0	0	0	0	0	4	0	8	10
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	3	1
Spleen										
Hematopoiesis, extramedullary, increased – Minimal to mild										
Day 93	0	1	2	3	0	2	0	5	3	4
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	2	0
Hematopoiesis, extramedullary, increased – Moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	1	0
Thymus										
Depletion, lymphoid, cortex – Minimal to mild										
Day 93	0	1	1	2	0	4	2	3	6	8
Day 182	3	4	NA	NA	2	5	NA	NA	5	6
Depletion, lymphoid, cortex – Moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	0	0
Depletion, lymphoid, cortex – Severe										
Day 93	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	0	0

13-Week Repeat Dose Toxicity Study with a 13 Week Recovery (Continued)

Key:
ALT = Alanine Aminotransferase; AST = Aspartate Aminotransferase; BLQ = Below Limit of Quantitation; BWt = Body weight; BrWt = Brain weight;
NA = Not Applicable; - = No Noteworthy Findings; * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$; # = No statistics performed due to lack of variability or sample size

a The loading dose during the first week was expressed as mg/kg/dose, while the maintenance doses for Weeks 2 to 13 were expressed as mg/kg/week. The animals were dosed on Days 1, 3, 5, and 7, and then once weekly thereafter through Day 91

b Tissue samples were collected from the first 6 study animals/sex/group from all groups during necropsy on Days 93 and 182. No samples from the control group were analyzed. Results are presented as combined gender values

c Group means are shown

d For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data not on the percent differences. All percent difference values are rounded to the nearest whole number

e Reported as number observed

f Dose-dependent accumulation of macrophages containing basophilic granules occurred in tissues throughout the body with no evidence of associated cellular necrosis at all ISIS 505358 doses at the terminal necropsy, and was consistent with uptake of test article. These macrophages containing basophilic granules were present in the dermis and subcutis of the skin, the sinuses of the lymph nodes and spleen, the lamina propria, submucosa, and muscularis of the urinary and gastrointestinal tracts, and the interstitium/connective tissue of the lungs, glandular and reproductive organs, heart, skeletal muscle and other tissues, and the choroid plexus of the brain, and these macrophages were often observed in perivascular regions within these tissues. Macrophages containing basophilic granules were most prominent in the liver, injection sites, and lymph nodes, and were often rare and barely detectable in most other tissues. At recovery necropsy, the overall incidence and magnitude of accumulation of basophilic granules within tissue macrophages was greatly reduced.

Table 14 13-Week Impurities Qualification Toxicity Study

Study Type: Repeat Dose Toxicity	**Report Title:** GSK3228836: 13-Week (Once Weekly) Subcutaneous Injection Pre-carcinogenicity and Toxicity Bridging Study in CByB6F1 (Wild Type) Mice	**Test Item: bepirovirsen sodium (GSK3228836 and ISIS 505358)**
Species/Strain: Mouse/Wild type rasH2 (CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic wild type)	**Duration of Dosing:** 13 weeks	**Batch No.:** [redacted] **GSK Study No.:** M71693G **Location in CTD: m4.2.3.2**
Initial Age: 9 to 10 weeks old	**Route/Frequency:** Subcutaneous injection/ on Days 1, 3, 5 and 7 and then once weekly thereafter through Day 91	**GSK Document Number:** 2019N406770
Date of First Dose: 04 September 2019	**Vehicle/Formulation:** 0.9% (w/v) Sodium Chloride for Injection (USP)	**Study in Compliance with GLP:** Yes

Data Collected: Clinical observations; body weights; food consumption measurements; hematology and clinical chemistry; organ weights; and macroscopic and microscopic examinations. Toxicokinetic evaluation was performed on samples collected on Days 1 and 91. Liver and kidney samples were also collected for GSK3228836 concentration analysis.

Conclusion: GSK3228836A (sodium salt), was given to CByB6F1 (Wild Type) mice (12/sex/group) at 0 (vehicle), 4, 12 or 40 mg/kg/dose via subcutaneous injection on Days 1, 3, 5 and 7 and then once weekly thereafter through Day 91 (for a total of 16 doses). Eighteen (18) animals/sex were added at each dose level for toxicokinetic evaluation.

One female given 12 mg/kg/dose was found dead on Day 92 and the cause of death remained undetermined based on gross or microscopic findings, however, a non-treatment-related procedural effect could not be excluded based on lack of adverse findings in any animal on study.

GSK3228836-related hematology and clinical chemistry changes were noted at ≥4 mg/kg/dose and there were organ weight changes and microscopic findings (generally consistent with those expected with antisense oligonucleotide administration) noted at ≥4 mg/kg/dose in the kidneys, liver, spleen, lymph nodes (axillary, mandibular and mesenteric), lungs, aorta, heart, femorotibial joint synovium, parotid and mandibular salivary glands, pancreas, urinary bladder, stomach, cecum, gastrocnemius and soleus muscles, sciatic nerve, skin, injection sites and thymus, as well as the seminal vesicles, prostate, epididymis and testes in males and vagina in females. However, all the findings were considered non-adverse based on low magnitude of severity.

Based on the absence of any adverse findings, the no observed adverse effect level (NOAEL) was considered to be 40 mg/kg/dose, correlating with GSK3228836 mean plasma $AUC_{0\text{-}t}$ values of 116 µg.h/mL, and C_{max} values of 42.4 µg/mL and a GSK3228836 mean liver concentration of 232000 ng/g and mean kidney concentration of 272500 ng/g on Day 93 (based on gender-averaged values).

13-Week Impurities Qualification Toxicity Study (Continued)

Study Type: Repeat Dose Toxicity					**GSK Reference No.:** M71693G			
	Male				**Female**			
Dose (mg/kg/dose)[a]	0	4	12	40	0	4	12	40
Main	12	12	12	12	12	12	12	12
Toxicokinetic	18	18	18	18	18	18	18	18
AUC(0-t) (µg·h/mL) Day 1	NC	6.31	24.2	91.5	NC	4.73	20.6	82.9
Day 91	NC	7.68	29.4	132	NC	6.86	25.8	102
C_{max} (µg/mL) Day 1	NC	4.65	18.1	54.4	NC	4.82	13.9	51.3
Day 91	NC	3.70	15.2	47.2	NC	5.06	12.7	40.7
Concentrations of GSK3228836 in liver and kidney								
Kidney (ng/g)	NC	67400	94400	168000	NC	103000	223000	377000
Liver (ng/g)	NC	30000	119000	251000	NC	28200	136000	213000
Noteworthy Findings								
Unscheduled Deaths	0	0	0	0	0	0	1[b]	0
Hematology – Day 93								
White Blood Cell (10^9/L)	4.805	3.614	3.181	3.008	3.308	3.103	3.234	3.243
Lymphocyte (10^9/L)	3.995	2.958	2.598	2.384	2.775	2.593	2.699	2.663
Red Blood Cell (10^{12}/L)	8.824	9.106*	9.083*	9.086*	9.548	9.193**	9.256**	9.224**
Hemoglobin (g/L)	133.6	136.8	135.4*	131.4**	145.6	138.0*	139.1*	135.1**
Hematocrit (L/L)	0.4300	0.4404	0.4358*	0.4260**	0.4709	0.4510**	0.4522**	0.4439**
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	48.76	48.36	47.98*	46.90**	49.33	49.07	48.87	48.13**
Red Cell Distribution Width (%)	11.80	11.77	11.90	12.18**	11.53	11.52	11.56	12.09**
Reticulocyte (10^9/L)	219.48	226.31	212.14	202.83**	267.61	267.11	228.84	259.73
Clinical Chemistry – Day 93								
Aspartate Aminotransferase (U/L)	40.4	36.4	38.0	99.4**	44.3	44.7	45.0	65.1**

13-Week Impurities Qualification Toxicity Study (Continued)

Study Type: Repeat Dose Toxicity					**GSK Reference No.:** M71693G			
	Male				**Female**			
Dose (mg/kg/dose)[a]	0	4	12	40	0	4	12	40
Alanine Aminotransferase (U/L)	30.7	28.7	31.6	76.3**	25.5	23.8	25.7	41.2**
Glutamate Dehydrogenase (U/L)	6.57	5.63	5.37	144.68**	4.72	5.60	5.18	17.16**
Glucose (mmol/L)	13.156	11.380	11.324*	9.983**	11.839	12.351	11.410	11.281
Cholesterol (mmol/L)	3.597	3.758	3.991*	3.562	2.700	2.735	2.943*	3.189**
Triglyceride (mmol/L)	2.012	1.550	1.864	0.974**	2.135	1.813	1.554	1.153
Total Protein (g/L)	51.7	51.7	52.7	52.3	50.5	50.6	52.2	53.6**
Albumin (g/L)	33.5	33.3	34.1	34.3	34.4	35.3	36.1	38.2**
Organ Weights[c] (Xcontrol)								
Liver								
Absolute (g)	1.7343	1.01X	1.04X	1.10X	1.4311	0.95X	1.03X	1.08X
Relative to brain weight (%)	366.80091	0.99X	1.03X	1.07X	292.31934	0.95X	1.02X	1.09X
Relative to body weight (%)	4.25812	1.01X	1.08X**	1.17X**	4.53420	1.01X	1.04X	1.10X**
Spleen								
Absolute (g)	0.0883	1.06X	1.19X**	1.42X**	0.1003	1.04X	1.19X**	1.36X**
Relative to brain weight (%)	18.65274	1.04X	1.18X**	1.38X**	20.46720	1.04X	1.18X**	1.37X**
Relative to body weight (%)	0.21769	1.06X	1.24X**	1.52X**	0.31883	1.10X	1.20X**	1.39X**
Thymus								
Absolute (g)	0.0427	0.98X	0.89X	0.73X**	0.0447	1.00X	0.89X	0.73X**
Relative to brain weight (%)	9.03182	0.95X	0.88X	0.71X**	9.12587	1.00X	0.89X	0.73X**
Relative to body weight (%)	0.10514	0.97X	0.93X	0.78X**	0.14172	1.05X	0.91X	0.75X**

13-Week Impurities Qualification Toxicity Study (Continued)

Study Type: Repeat Dose Toxicity					**GSK Reference No.:** M71693G			
	Male				**Female**			
Dose (mg/kg/dose)[a]	0	4	12	40	0	4	12	40
Microscopic Examination (number of animals)	12	12	12	12	12	12	11	12
Artery, Aorta								
Basophilic granules; perivascular, macrophage								
Minimal	0	0	1	6	0	0	0	4
Bone, Femur								
Basophilic granules; synovial, macrophage; joint								
Minimal	0	0	5	10	0	1	0	10
Epididymis								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	0	0	12	-	-	-	-
Gland, Prostate								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	4	3	11	-	-	-	-
Gland, Salivary, Mandibular								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	3	2	10	0	0	2	11

13-Week Impurities Qualification Toxicity Study (Continued)

Study Type: Repeat Dose Toxicity					**GSK Reference No.:** M71693G			
	Male				**Female**			
Dose (mg/kg/dose)[a]	0	4	12	40	0	4	12	40
Gland, Salivary, Parotid								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	4	9	11	0	5	6	12
Gland, Seminal Vesicle								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	5	6	10	-	-	-	-
Heart								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	4	6	11	0	6	1	8
Kidney								
Basophilic granules; tubular								
Minimal	0	0	0	11	0	0	4	12
Large Intestine, Cecum								
Basophilic granules; submucosal, macrophage								
Minimal	0	0	3	12	0	0	2	12

13-Week Impurities Qualification Toxicity Study (Continued)

Study Type: Repeat Dose Toxicity					**GSK Reference No.:** M71693G			
	Male				**Female**			
Dose (mg/kg/dose)[a]	0	4	12	40	0	4	12	40
Liver								
Degeneration; hepatocellular								
Minimal	0	0	0	6	0	0	0	11
Mild	0	0	0	6	0	0	0	0
Hypertrophy; centrilobular, hepatocellular								
Minimal	0	0	1	9	0	0	0	2
Necrosis								
Minimal	1	1	1	0	0	1	1	1
Vacuolation; centrilobular, hepatocellular								
Minimal	8	5	2	3	0	0	0	0
Infiltration, mononuclear cell								
Minimal	5	7	11	12	8	12	11	6
Mild	0	0	0	0	0	0	0	6
Single cell necrosis								
Minimal	0	0	0	8	0	0	0	8
Mild	0	0	0	4	0	0	0	0
Increased mitoses								
Minimal	0	0	0	2	0	0	0	0
Basophilic granules; hepatocellular								
Minimal	0	0	0	12	0	0	0	12
Basophilic granules; Kupffer cell								
Minimal	0	0	12	12	0	0	7	12

13-Week Impurities Qualification Toxicity Study (Continued)

Study Type: Repeat Dose Toxicity					**GSK Reference No.:** M71693G			
	Male				**Female**			
Dose (mg/kg/dose)[a]	0	4	12	40	0	4	12	40
Lung								
Basophilic granules; perivascular, macrophage								
Minimal	0	6	5	11	0	2	7	4
Lymph Node, Axillary								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	0	2	8	0	0	0	12
Mild	0	0	0	3	0	0	0	0
Lymph Node, Mandibular								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	0	1	11	0	0	0	12
Lymph Node, Mesenteric								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	0	7	12	0	0	4	12
Muscle, Gastrocnemius								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	1	0	8	0	4	2	9
Muscle, Soleus								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	0	1	8	0	0	1	6
Nerve, Sciatic								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	1	2	10	0	0	0	10

13-Week Impurities Qualification Toxicity Study (Continued)

Study Type: Repeat Dose Toxicity					**GSK Reference No.:** M71693G			
	Male				**Female**			
Dose (mg/kg/dose)[a]	0	4	12	40	0	4	12	40
Pancreas								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	0	0	5	0	0	0	7
Site, Injection								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	12	12	12	0	12	11	5
Mild	0	0	0	0	0	0	0	7
Skin								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	0	6	9	0	0	7	10
Mild	0	0	0	1	0	0	0	2
Spleen								
Extramedullary hematopoiesis; increased								
Minimal	0	0	3	8	0	1	3	9
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	0	0	12	0	0	0	11
Stomach								
Basophilic granules; submucosal, macrophage								
Minimal	0	4	2	12	0	2	2	12

13-Week Impurities Qualification Toxicity Study (Continued)

Study Type: Repeat Dose Toxicity					**GSK Reference No.:** M71693G			
	Male				**Female**			
Dose (mg/kg/dose)[a]	0	4	12	40	0	4	12	40
Testis								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	0	0	11	-	-	-	-
Thymus								
Decreased cellularity; lymphoid								
Minimal	0	0	0	2	0	0	0	9
Urinary Bladder								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	0	3	5	12	0	1	1	12
Vagina								
Basophilic granules; macrophage								
Minimal	-	-	-	-	0	0	0	12

Key:
* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; NC = Not calculated
- Not measured, not examined, not applicable or no test item-related effect.

a Doses are expressed in terms of GSK3228836. Animals received GSK3228836 via subcutaneous injection on Days 1, 3, 5 and 7 and then once weekly thereafter through Day 91 (for a total of 16 doses).

b One female given 12 mg/kg/dose (Animal No. 3501) was found dead on Day 92 (last dose received on Day 91) and the cause of death was considered undetermined. The animal had stable body weight and food consumption; and there were no significant clinical signs observed prior to death. None of the gross or microscopic findings were considered to have contributed to this animal's mortality and a procedural effect cannot be excluded. Microscopic findings considered related to GSK3228836 consisted of minimal kidney tubular basophilic granules and minimal to mild granular macrophages in the mandibular salivary gland, sciatic nerve, and at the injection sites. There also was minimal mononuclear cell infiltration of the liver. Other microscopic findings were considered incidental and of no toxicological significance.

c For controls, group means are presented. For test item-treated groups, fold-change from control is shown (statistical significance is based on actual data and not change from control).

Table 15 13-Week Impurities Qualification study

Study Type: Repeat Dose Toxicity	**Report Title:** GSK3228836A: 13 Week by Subcutaneous Injection (Weekly) Study in Crl:CD1 (ICR) Mice	**Test Article:** **bepirovirsen sodium (GSK3228836 and ISIS 505358)** **Batch No.:** [redacted]
Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR)	**Duration of Dosing:** 13 weeks	**GSK Reference No.: M72229G**
Initial Age: 6 (Satellite) to 7 (Main Study) weeks	**Route/Frequency:** Subcutaneous injection/Once on Days 1, 3, 5, 7, and once weekly thereafter (Days 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, and 91)	**GSK Document Number:** 2021N488385 **Location in CTD: m4.2.3.2**
Date of First Dose: 30 August 2021 (Satellite); 02 September 2021 (Main Study Males); 03 September 2021 (Main Study Females)	**Vehicle/Formulation:** 0.9% (w/v) Sodium Chloride for Injection, USP	**Study in Compliance with GLP:** Yes

Data Collected: Clinical observations, body weight, food consumption, ophthalmoscopy, hematology, clinical chemistry, organ weights, macroscopic and microscopic pathology, bioanalytical analysis of kidney and liver.

Conclusion: GSK3228836A (0 (control) or 12 mg/kg/dose) was given subcutaneously to male and female mice on Days 1, 3, 5, and 7, and once weekly thereafter for a total of 13 weeks. Based on the non-adverse hematologic (decreases in red blood cell count, hemoglobin; and hematocrit in males and females; lymphocyte and white blood cell count in individual animals) and microscopic (macrophages containing basophilic granules in the heart, mandibular lymph node, administration site, inguinal skin, and urinary bladder; basophilic granules in the liver, and kidney) findings, the no observed adverse effect level (NOAEL) was 12 mg/kg/dose, which is consistent with findings in previous studies with this compound. At 12 mg/kg/dose, the mean GSK3228836 concentration in the kidney was 70000 and 198000 ng/g for satellite males and females respectively, and in the liver was 48800 and 42900 ng/g for satellite males and females respectively on Day 92.

13-Week Impurities Qualification study(Continued)

Study Type: Repeat Dose Toxicity			**GSK Reference No.:** M72229G	
	Male		**Female**	
Daily Dose (mg/kg/dose)	0	12	0	12
Numbers of Animals: Main **Satellite**	12 6	12 6	12 6	12 6
GSK3228836 Concentration (ng/g)				
Kidney Day 92	<50.0	70000	<50.0	198000
Liver Day 92	<50.0	48800	<50.0	42900
Noteworthy Findings				
Hematology				
Hematocrit (%)	46.30	42.35**	45.93	44.15
Hemoglobin (g/dL)	13.48	12.28**	13.62	12.90*
Lymphocytes (10^3/µL)	1.885	1.770 [0.37[a]]	2.232	2.415 [0.55, 0.81[b]]
Red blood cells (10^6/µL)	8.982	8.602	8.958	8.458
White blood cells (10^3/µL)	2.412	2.323 [0.52[a]]	2.683	2.868 [0.69, 0.98[b]]
Organ Weights[c]				
Spleen				
Absolute	0.0852g	1.31X	0.1093g	1.17X
Relative to body weight	0.19298%	1.42X**	0.32101%	1.18X*
Relative to brain weight	16.73731%	1.32X	21.42405%	1.20X*
Microscopic Examination (number of animals)	12	12	12	12
Heart	12	12	12	12
Basophilic granules; macrophage	0	1	0	0
Minimal	0	1	0	0

13-Week Impurities Qualification Study (Continued)

Study Type: Repeat Dose Toxicity			**GSK Reference No.:** M72229G	
Daily Dose (mg/kg/dose)	**Male**		**Female**	
	0	12	0	12
Kidney	12	12	12	12
Basophilic granules, tubular	0	12	0	12
Minimal	0	12	0	12
Liver	12	12	12	12
Basophilic granules, Kupffer cells	0	10	0	10
Minimal	0	10	0	10
Lymph node, mandibular	12	12	12	12
Basophilic granules, macrophage	0	0	0	4
Minimal	0	0	0	4
Site, administration	12	12	12	12
Basophilic granules; macrophage	0	12	0	11
Minimal	0	7	0	2
Mild	0	5	0	9
Skin (inguinal)	12	12	12	12
Basophilic granules; macrophage; subcutaneous tissue	0	11	0	12
Minimal	0	11	0	12
Urinary bladder	12	12	12	12
Basophilic granules; macrophage	0	11	0	3
Minimal	0	10	0	3
Mild	0	1	0	0

* $p < 0.05$
** $p < 0.01$
[a] Decreased lymphocyte and white blood cell counted noted for 1 male [individual animal values presented in brackets].
[b] Decreased lymphocyte and white blood cell counted noted for 2 females [individual animal values presented in brackets].
[c] For controls, group means are shown for absolute and relative weights. For test article-treated groups, fold change from control is shown. Statistical significance is based on actual data, not change from control data.

Table 16 26 Week Toxicity Study with a 13 Week Recovery Period

Study Type: Repeat Dose Toxicity	**Report Title:** A 26 Week Repeat Dose Toxicity Study of ISIS 505358 in Mice with a 13 Week Recovery	**Test Articles: bepirovirsen sodium (GSK3228836 and ISIS 505358)** **Batch No.:** [redacted]
Species/Strain: Mouse/Crl:CD1®(ICR)	**Duration of Dosing:** 26 weeks **Duration of Recovery:** 13 weeks	**Sponsor Study No**.: 505358-AS06
Initial Age: Approximately 7 weeks	**Route/Frequency:** Subcutaneous injection, on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly beginning on Day 21	**GSK Document Number:** 2019N419097 **Location in CTD: m4.2.3.2**
Date of First Dose: 7th January 2014	**Vehicle/Formulation:** 0.9% w/w Sodium Chloride for Injection, USP	**Study in Compliance with GLP:** Yes

Data Collected: Toxicokinetics (liver and kidney ISIS 505358 oligonucleotide concentration), clinical observations, body weight, food consumption, ophthalmoscopy, hematology, clinical chemistry, cytokine/chemokine analysis, immunoglobulin analysis, organ weights, macroscopic and microscopic pathology

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Conclusion:

Treatment with ISIS 505358 for 26 weeks was generally well tolerated at doses of up to 60 mg/kg/week. The changes documented in this study were dose-dependent, typically minimal to moderate, and were most prominent at the 60 mg/kg/week dose level. There were no definitive treatment-related effects on survival, clinical findings, body weights, food consumption, ophthalmoscopic examinations, or macroscopic evaluations during the study.

ISIS 505358 test-article related changes at 60 mg/kg/week included increases in liver and spleen weights, decreases in thymus weights, and the presence of infiltrates of macrophages containing cytoplasmic basophilic granules in various/numerous tissues throughout the body, as well as the typical presence of basophilic granules in liver and kidney. Males exhibited mild increases in the hepatic enzymes ALT and AST, however fluctuations in the females were not statistically significant nor dose responsive. There were also mild decreases in triglyceride, and mild decreases in red cell mass observed in both sexes. The basophilic granulation observed in Kupffer cells and kidney tubular epithelial cells was considered evidence of oligonucleotide uptake, and are not considered a toxicologically significant observation.

Changes observed in mice at 30 mg/kg/week ISIS 505358 were often similar to those at 60 mg/kg/week but of lesser incidence and severity, and included the presence of infiltrates of macrophages containing cytoplasmic basophilic granules in various/numerous tissues throughout the body, as well as the presence of basophilic granules in the liver and kidney; also noted were mild increases in ALT and AST and mild decreases in red cell mass in males only. Organ weight changes were limited to the liver and spleen at this dose level.

At 10 mg/kg/week ISIS 505358, no meaningful changes were noted. Some changes were similar to those at 30 mg/kg/week (e.g., presence of basophilic granule accumulation) but of a lesser incidence and severity and in fewer tissues, and with clinical pathology alterations limited to females only (mild increases in red cell mass). Organ weight changes were limited to liver and spleen and females only at this dose level.

At 3 mg/kg/week ISIS 505358, no meaningful changes were noted, as the small incidences of proinflammatory effects were inconsequential. No organ weight changes were noted at this dose level.

ISIS 505358 was extensively distributed into the kidney and liver, which are the major organs of distribution for the oligonucleotide class of compounds. In general, kidney concentrations were similar to, or slightly elevated, relative to liver concentrations of ISIS 505358 across all doses examined. Tissue concentrations appeared to be dose-dependent and increased with increasing dose (3 to 60 mg/kg/week). The observed increases were less than dose proportional for kidney and greater than dose proportional for liver tissue. Clearance of ISIS 505358 from tissues was observed during the recovery period. In general, kidney concentrations of ISIS 505358 were higher in female mice relative to male mice, while male mice appeared to have higher liver concentrations relative to female mice.

Thus, the toxicities observed were dose related, and mostly seen at doses ≥ 30 mg/kg/week. They were generally considered to be minimal to moderate in severity, and were largely due to accumulation of oligonucleotide in the liver and kidneys and the known proinflammatory effects of oligonucleotide treatment in rodents, but generally diminished in incidence and severity at recovery.

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Numbers of Animals:										
Main	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Recovery (13 weeks)-	6	-	6	-	6	6	-	6	-	6
ISIS 505358 oligonucleotide concentration (µg/g)										
Kidney										
Main – Day 184	-	31.7	58.4	89.9	134	-	38.1	131	215	470
Recovery – Day 273	-	-	-	BLQ	BLQ	-	-	-	BLQ	BLQ
Liver										
Main – Day 184	-	9.50	68.3	183	315	-	9.33	40.1	113	221
Recovery – Day 273	-	-	-	BLQ	9.02	-	-	-	BLQ	BLQ
Noteworthy Findings										
Unscheduled Deaths	0	0	1[b]	0	0	0	0	0	1[b]	0

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity							ISIS Study Number: 505358-AS06				
		Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)		0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Haematology											
Haematocrit(%)	Week 26[#]	54.90	54.63	51.48	50.02	48.92	52.75	51.63	45.38[d]	46.82[d]	41.43[d]
	Week 13(R)	50.63	-	-	55.77	47.80	48.07	-	-	44.87	47.37
Haemoglobin (g/dL)	Week 26	15.68	15.37	14.50	14.18	13.97	16.17	15.68	14.23[d]	14.20[d]	13.10[d]
	Week 13(R)	14.77	-	-	15.93	13.37	15.00	-	-	14.30	15.37
Erythrocytes (x10^6/L)	Week 26[#]	9.900	9.785	9.468	9.523	9.528	10.252	10.153	8.852[c]	9.310	8.385[d]
	Week 13(R)	9.457	-	-	10.547	9.420	9.357	-	-	9.023	9.483
Clinical Chemistry											
AST (U/L)	Week 26	70.8	91.2	94.6	112.3	182.2[c]	83.3	135.5	177.0	120.2	106.5
	Week 13(R)	86.0	-	-	95.7	85.3	203.3	-	-	176.5[#]	139.3
ALT (U/L)	Week 26	29.8	36.3	32.0	71.0	138.8[d]	28.8	109.0	49.2	57.5	69.5
	Week 13(R)	58.7	-	-	60.7	46.7	156.0	-	-	146.5[#]	72.0
Triglycerides (mg/dL)	Week 26	230.0	254.7	278.0	172.3	171.2	137.5	133.0	118.7	93.3	67.2[c]
	Week 13(R)	223.0	-	-	229.7	136.3	138.0	-	-	107.5[#]	192.3

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity	ISIS Study Number: 505358-AS06									
	Male					**Female**				
Organ Weights[e] (% change relative to control) - **terminal necropsy**										
Liver (absolute (g))	2.264	-	-	-	-	1.820	-	-	↑17.64[d]	-
(relative to body weight (%))	4.8394	-	-	-	↑8.65[c]	4.5532	-	↑13.03[c]	↑23.95[d]	↑22.76[d]
(relative to brain weight (ratio)	4.5711	-	-	-	-	3.5489	-	-	↑16.00[c]	-
Spleen										
(absolute (g))	0.102			↑28.43[d]	↑43.14[d]	0.124	-	-	↑49.19[d]	↑35.48[c]
(relative to body weight (%))	0.2206			↑28.24[c]	↑54.58	0.3129		↑40.20[c]	↑57.05[d]	↑54.39[d]
(relative to brain weight (ratio))	0.2059			↑24.14[c]	↑38.03	0.2415			↑47.49[d]	-
Dose[a] **(mg/kg/week)**	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Thymus (absolute (g))	-	-	-	-	-	0.056	-	-	-	↓42.86[c]
(relative to brain weight (ratio))	-	-	-	-	-	0.1085	-	-	-	↓42.95[c]
Organ Weights (% change relative to control)[e] - **Recovery Necropsy (13 weeks)**										
Liver (absolute (g))	-	-	-	-	-	1.51	-	-	-	↑31.62[d]
(relative to brain weight (ratio))	-	-	-	-	-	3.1347	-	-	-	↑31.17[d]
Macroscopic Examination (number of animals) – terminal and Recovery necropsies	No test article-related findings									

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Microscopic Examination – terminal necropsy (Week 13), (number of animals)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Bone, sternum Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1
Bone marrow, femur Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	9	12	0	0	0	1	11
Bone marrow, sternum Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	11	12	0	0	0	2	9
Brain Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
Epididymides Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	12	0	-	-	-	-	-
-mild	0	0	0	0	12	-	-	-	-	-
Gallbladder Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	1	3	0	0	0	1	1
Heart Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	1	11	12	0	0	0	8	12

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Injection site 1 Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	12	11[f]	8	4	0	12	9	4	2
-mild	0	0	1	3	8	0	0	3	8	9
-moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Injection site 2 Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	12	12[f]	9	4	0	12	10	4	2
-mild	0	0	0	2	8	0	0	2	8	10
Joint, tibiofemoral Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	3	10	0	0	0	0	8
Cecum Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	7	9	0	0	0	8	12
Colon Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	4	8	0	0	0	2	9
Kidney Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	0	2	0	0	9	12	0
Basophilic granules, tubular cell										
-minimal	0	0	8	12	12	0	0	9	12	6
-mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
-moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
-severe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Increased glomerular matrix										
-minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
-mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Vacuolation, tubular										
-minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
-mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Lacrimal gland, exorbital Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	6	8	0	0	0	0	3
Larynx Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	0	7	0	0	0	0	3
Liver Cytoplasmic alteration										
-minimal	0	0	0	3	0	0	0	0	3	5
-mild	0	0	0	5	7	0	0	0	1	2
-moderate	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
Basophilic granules, Kupffer cell										
-minimal	0	0	11	6	0	0	0	11	6	1
-mild	0	0	0	6	11	0	0	0	5	10
-moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Hypertrophy, hepatocyte, panlobular										
-minimal	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
-mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mitotic figures, increased										
-minimal	0	0	0	5	7	0	0	1	1	4
Necrosis, individual hepatocyte										
-minimal	0	0	0	8	11	0	0	0	1	9
Karyomegaly										
-mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Lung										
Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
Lymph node, mandibular										
Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	8	4	0	0	0	6	2
-mild	0	0	0	0	8	0	0	0	0	9
Lymph node, mesenteric										
Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	12	2	0	0	0	5	3
-mild	0	0	0	0	9	0	0	0	0	8
-moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Mammary gland										
Basophilic granules, macrophages										
-minimal	-	-	-	-	-	0	0	0	11	12

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Oviducts Basophilic granules, macrophages										
-minimal	-	-	-	-	-	0	0	0	1	9
-mild	-	-	-	-	-	0	0	0	0	3
Pancreas Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	6	10	0	0	0	3	12
Pituitary gland Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	0	6	0	0	0	0	3
Prostate gland Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	6	10	-	-	-	-	-
Rectum Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	9	7	0	0	0	9	10
Salivary gland, parotid Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	6	11	0	0	0	0	9
Salivary gland, sublingual Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Salivary gland, mandibular Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Sciatic nerve Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	1	9	0	0	0	2	8
Seminal vesicles Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	1	8	-	-	-	-	-
Skeletal muscle, biceps femoris Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	1	4	0	0	0	2	4
Skin Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	1	11	6	0	0	0	5	1
-mild	0	0	0	0	6	0	0	0	7	11
Spleen Increased cellularity, red pulp										
-minimal	0	0	0	0	2	0	2	1	4	7
-mild	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	5	12	0	0	0	2	11
Stomach, glandular Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	1	2	0	0	0	1	1

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Stomach, nonglandular										
Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	0	2	0	0	0	1	4
Testes										
Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	12	0	-	-	-	-	-
-mild	0	0	0	0	12	-	-	-	-	-
Thymus										
Depletion, lymphoid, cortex										
-minimal	4	4	2	4	3	5	7	6	10	7
-mild	0	1	0	4	6	0	1	1	0	2
-moderate	0	0	0	1	3	0	1	0	0	1
Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	0	6	0	0	0	0	1
Thyroid gland										
Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	0	9	0	0	0	0	9
Tongue										
Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	3	9	0	0	0	3	11

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Trachea Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Urinary bladder Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	0	0	11	10	0	0	0	12	2
-mild	0	0	0	0	2	0	0	0	0	10
Uterus with cervix Basophilic granules, macrophages										
-minimal	-	-	-	-	-	0	0	0	3	6
-mild	-	-	-	-	-	0	0	0	0	6
Vagina Basophilic granules, macrophages										
-minimal	-	-	-	-	-	0	0	0	8	6
-mild	-	-	-	-	-	0	0	0	0	6
Microscopic Examination – Recovery necropsy (number of animals)	6	-	-	6	6	6	-	-	6	6
Brain Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	0	1	0	-	-	0	0
Epididymides Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	6	0	-	-	-	-	-
-mild	0	-	-	0	6					

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Heart Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	0	2	0	-	-	0	0
Injection site 1 Basopohilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	3	6	0	-	-	5[g]	4
Injection site 2 Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	6	5	0	-	-	6[g]	6
Joint, tibiofemoral Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	0	1	0	-	-	0	0
Kidneys Basophilic granules, tubular cell										
-minimal	0	-	-	1	0	0	-	-	1[g]	0
Increased glomerular matrix										
-minimal	0	-	-	0	0	0	-	-	0	1
Lacrimal glands, exorbital Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	0	1	0	-	-	0	0
Liver Basophilic granules, Kupffer cell										
-minimal	0	-	-	6	3	0	-	-	4	5
-mild	0	-	-	0	3	0	-	-	1[g]	1

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Cytoplasmic alteration		-	-				-	-		
-minimal	0	-	-	0	2	0	-	-	0	0
-mild	0	-	-	0	1	0	-	-	0	0
Hypertrophy, hepatocellular, panlobular										
-minimal	0	-	-	0	1	0	-	-	0	0
Karyomegaly										
-minimal	0	-	-	1	3	0	-	-	0	1
Mitotic figures, increased										
-minimal	0	-	-	0	0	0	-	-	1	0
Necrosis, individual hepatocyte										
-minimal	0	-	-	2	3	0	-	-	1[g]	0
Lymph node, mandibular Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	0	3	0	-	-	0	0
Lymph node, mesenteric Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	1	0	0	-	-	1[g]	0
Mammary gland Basophilic granules, macrophages										
-minimal	-	-	-	-	-	0	-	-	1[g]	0

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Nerve, sciatic Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	0	5	0	-	-	0	2
Pituitary gland Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	0	1	0	-	-	0	0
Prostate gland Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	0	3	-	-	-	-	-
Salivary gland, mandibular Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	0	2	0	-	-	0	0
Salivary gland, parotid Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	0	3	0	-	-	0	0
Skeletal muscle, biceps femoris Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	0	3	0	-	-	0	0
Skin Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	4	6	0	-	-	5[g]	5
Spleen Increased cellularity, red pulp										
-minimal	0	-	-	0	2	0	-	-	0	1

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat Dose toxicity						ISIS Study Number: 505358-AS06				
	Male					**Female**				
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Stomach, glandular Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	0	1	0	-	-	0	0
Testes Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	6	2	-	-	-	-	-
-mild	0	-	-	0	4	-	-	-	-	-
Thymus Depletion, lymphoid, cortex										
-minimal	0	-	-	4	3	2	-	-	4	2
-mild	1	-	-	1	0	2	-	-	1	2
-moderate	0	-	-	0	3	0	-	-	0	1
-severe	0	-	-	0	0	0	-	-	1[g]	0
Urinary bladder Basophilic granules, macrophages										
-minimal	0	-	-	2	5	0	-	-	1[g]	1
Vagina Basophilic granules, macrophages										
-minimal	-	-	-	-	-	0	-	-	1[g]	3

26 Week Toxicity Study with 13 Week Recovery Period (Continued)

Key:
a = The vehicle control and test article were given via subcutaneous injections twice weekly through Day 14 (once per day on Days 1, 5, 10 and 14) and then once weekly thereafter through Day 184 terminal necropsy. The loading doses during the first two weeks were expressed as mg/kg/dose, while the maintenance doses through the Day 182 terminal necropsy were expressed as mg/kg/week.
b = Animals euthanized for welfare reasons on Day 14 and Day 213 (male given 10 mg/kg/day and female given 30 mg/kg/day respectively). These early deaths are considered likely to be incidental rather than definitively test article related.
c = Significantly different from control; ($p<0.05$)
d = Significantly different from control; ($p<0.01$)
e = For controls, group mean values are presented. For test article groups, % change relative to controls is shown. Organs for groups/sexes given the test article with changes considered to be test article-related only, are presented.
f = Including one animal euthanized on Day 14 for welfare reasons; this early death was considered not test article related.
g = Including one animal euthanized on Day 213 for welfare reasons; this early death was considered not test article related.

BLQ Below limit of quantification of assay (LLOQ<10µg/g); # = No statistical analysis performed due to lack of variability or sample size; ↑ = Increase; ↓ = Decrease; R = Recovery phase

Table 17 13-Week Toxicity Study with a 13 Week Recovery Period

Report Title: A 13-Week Repeat Dose Toxicity Study of ISIS 505358 (bepirovirsen sodium; GSK3228836) in Cynomolgus Monkeys with a 13-Week Recovery Period		**Study No. ISIS 505358-AS02** **GSK Document Number:** 2019N417078
Species / Strain: Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*)	Duration of Dosing: 13 weeks	**Location in CTD: m4.2.3.2**
Initial Age: 3-4 years	Duration of Postdose: 13 weeks	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: March 12, 2013 (males); March 13, 2013 (females)	Method of Administration: Main tox animals treated with 0, 4, 8, and 12 mg/kg: IV infusion on Days 1, 3, and 5. SC injection on Day 7 and weekly thereafter Main tox animals treated with 40 mg/kg: SC injection on Days 1, 3, 5, 7, and weekly thereafter	
Vehicle / Formulation: Sterile saline / Pre-formulated ISIS 505358 dosing solutions (Ranging from 1-3 mg/mL for IV infusion and 10-100 mg/mL for SC injection)		
No Observed Adverse Effect Level: No adverse effects were seen in the animals, except for one male in the 12 mg/kg group which presented with idiosyncratic thrombocytopenia[a].		

Dose:	**0 (Control)**		**4 mg/kg**		**8 mg/kg**		**12 mg/kg**		**40 mg/kg**	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals:	5	5	3	3	3	3	5	5	5	5
Terminal animals (D93 necropsy)	3	3	3	3	3	3	3[a]	3	3	3
Recovery animals (D182 necropsy)	2	2	0	0	0	0	2	2	2	2
Toxicokinetics: (plasma)[b]										
Cmax (µg/mL ± SD)										
Day 1	NA	NA	40.5 ± 9.53		67.8 ± 8.38		119 ± 16.6		80.7 ± 20.8	
Day 91	NA	NA	11.4 ± 5.05		27.0 ± 7.58		34.4 ± 9.41[a]		61.8 ± 10.7	
Tmax (hr, median with range)										
Day 1	NA		1.0		1.0		1.0		3.0	
Day 91	NA		2.0		2.0		4.0[a]		4.0	
$AUC_{0\text{-}48\ hrs}$ (µg* hr /mL ± SD)										
Day 1	NA		72.0 ± 20.3		165 ± 17.1		231 ± 42.1		848 ± 94.4	
Day 91	NA		65.4 ± 23.0		179 ± 45.0		309 ± 132[a]		1470 ± 757	

13-Week Toxicity Study with a 13 Week Recovery Period (Continued)

Dose:	0 (Control)		4 mg/kg		8 mg/kg		12 mg/kg		40 mg/kg	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Toxicokinetics: (tissue)										
Kidney (µg/g ± SD)										
Day 93	NA		420 ± 129		623 ± 59.1		1020 ± 314[a]		2240 ± 613	
Day 182	NA		N/A		N/A		15.5 ± 1.46[a]		44.1 ± 36.5	
Liver (µg/g ± SD)										
Day 93	NA		241 ± 51.4		467 ± 46.5		581 ± 178[a]		1040 ± 291	
Day 182	NA		N/A		N/A		26.1 ± 27.5[a]		42.0 ± 32.4	
Noteworthy Findings[c]										
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology[d]:										
Reticulocytes Absolute										
Day 93	0.054	0.055	0.049	0.045	0.040*	0.037*	0.052	0.037	0.038*	0.031*
Day 182	0.067	0.061	NA	NA	NA	NA	0.064	0.057	0.060	0.052
Reticulocytes Percent										
Day 93	1.1	1.2	0.9	1.0	0.7*	0.7*	0.9*	0.8*	0.7*	0.6*
Day 182	1.3	1.1	NA	NA	NA	NA	1.0	1.1	1.1	1.0
Serum Chemistry[d]:										
Albumin (g/dL)										
Day 93	4.2	4.1	4.3	4.2	4.4	4.0	4.0	3.8	3.9	3.9
Day 182	4.6	4.5	NA	NA	NA	NA	3.9	4.5	4.4	4.0

13-Week Toxicity Study with a 13 Week Recovery Period (Continued)

Dose:	0 (Control)		4 mg/kg		8 mg/kg		12 mg/kg		40 mg/kg	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Serum Chemistry[d] (Continued):										
A/G ratio										
Day 93	1.7	1.6	1.7	1.5	1.7	1.5	1.5	1.3	1.1	1.3
Day 182	2.7	2.1	NA	NA	NA	NA	1.5	2.5	1.9*	1.5*
C-reactive protein (mg/dL)										
Day 93	0.5	NA	0.8	BL	BL	BL	1.3	BL	1.0*	3.1*
Day 182	BL	BL	NA	NA	NA	NA	6.1	BL	BL	1.1
APTT (Day 91)[d]										
0 hr	19.9	19.0	20.3	18.7	18.7	19.6	18.5	18.6	17.9	16.9
1 hr	19.6	19.2	20.6	19.8	19.1	21.5	18.6	20.4	21.9	21.5
4 hr	20.3	19.6	20.6	19.6	19.1	22.0	20.1	20.6	25.8*	25.5*
8 hr	20.0	19.7	20.2	19.4	19.2	21.1	19.0	20.5	24.8*	25.2*
24 hr	18.9	18.7	18.7	18.5	17.3	19.0	17.2	18.3	19.3	19.8
Complement C3 (mg/mL) (predose)[d,e]										
Day 1	1.169	1.084	1.018	1.121	1.092	1.053	1.150	1.032	1.221	1.166
Day 91	1.215	1.034	0.973	1.073	1.008	1.020	1.010	0.825	0.954	0.830
Complement Bb (Day 1)[d,e]										
0 hr	1.02	0.69	1.11	1.30	0.93	1.03	1.13	1.19	1.10	1.11
1 hr	1.29	0.97	1.54	1.75	1.62	2.24	5.86	3.35	1.42	1.32
4 hr	1.82	1.49	2.50	2.38	2.47	2.42	4.88	3.20	4.20	3.90
8 hr	1.93	1.55	2.49	2.58	2.82	2.23	3.70	2.93	4.91	5.81
24 hr	1.64	0.95	2.34	2.61	1.86	1.56	1.89	1.62	2.13	2.10
MCP-1 (pg/mL)[d,e]										
Day -13	251.7		175.6		135.5		355.3		131.5	
Day 93	175.1		189.9		156.5		309.5		844.8	

13-Week Toxicity Study with a 13 Week Recovery Period (Continued)

Dose:	0 (Control)		4 mg/kg		8 mg/kg		12 mg/kg		40 mg/kg	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Organ Weights[f]										
Liver/Bwt (%)										
Day 93	1.9181	1.9950	+5	+9	+4	+19	+10	+14	+27*	+31*
Day 182	1.8865	1.8874	NA	NA	NA	NA	+13	+1	+13	+20
Spleen/Bwt (%)										
Day 93	0.1120	0.0967	+45	+20	+17	+34	+46*	+112*	+89*	+90*
Day 182	0.1012	0.0933	NA	NA	NA	NA	+55	-13	+95	+77
Histopathology[g]:										
Injection Sites, Lower L&R										
Diffuse edema, minimal or mild										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Fibrosis, diffuse,minimal or mild										
Day 93	0	0	0	0	0	1	2	1	3	2
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Multifocal or diffuse hemorrhage, minimal or mild										
Day 93	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Multifocal mononuclear cell infiltrate of the dermis, minimal or mild										
Day 93	0	0	0	1	2	2	2	3	2	1
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	1	2	2	1
Multifocal mononuclear cell infiltrate, perivascular, minimal or mild										
Day 93	0	0	2	3	1	1	3	1	1	0
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0

13-Week Toxicity Study with a 13 Week Recovery Period (Continued)

Dose:	0 (Control)		4 mg/kg		8 mg/kg		12 mg/kg		40 mg/kg	
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Injection Sites, Upper L&R										
Diffuse edema, minimal or mild										
Day 93	0	0	1	1	1	0	2	0	2	2
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Diffuse edema, moderate										
Day 93	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Fibrosis, diffuse, minimal or mild										
Day 93	0	0	0	0	0	1	2	3	3	2
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Multifocal or diffuse hemorrhage, minimal or mild										
Day 93	0	0	1	1	0	2	2	2	3	2
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Multifocal mononuclear cell infiltrate of the dermis, minimal or mild										
Day 93	0	0	1	2	1	2	2	3	2	0
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	1	0	1	1
Multifocal mononuclear cell infiltrate, perivascular, minimal or mild										
Day 93	1	0	1	1	1	1	2	1	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Kidney										
Basophilic granule accumulation in the proximal tubule, minimal or mild										
Day 93	0	0	3	3	3	3	1	0	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	1	1

13-Week Toxicity Study with a 13 Week Recovery Period (Continued)

Dose:	0 (Control)		4 mg/kg		8 mg/kg		12 mg/kg		40 mg/kg	
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Basophilic granule accumulation in the proximal tubule, moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	2	3	3	2
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Basophilic granule accumulation in the proximal tubule, severe										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Liver										
Basophilic granule accumulation										
Day 93	0	0	2	3	3	3	3	3	3	3
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Minimal or mild Kupffer cell hypertrophy										
Day 93	0	0	2	3	3	2	3	0	1	0
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Moderate Kupffer cell hypertrophy										
Day 93	0	0	0	0	0	1	0	3	2	3
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Mandibular Lymph Node										
Basophilic granule accumulation										
Day 93	0	0	1	3	3	3	3	3	3	3
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	2	2	1

13-Week Toxicity Study with a 13 Week Recovery Period (Continued)

Dose:	0 (Control)		4 mg/kg		8 mg/kg		12 mg/kg		40 mg/kg	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Mandibular Lymph Node (Continued)										
Minimal or mild hypertrophy of the sinusoidal histiocytes										
Day 93	0	0	1	3	3	3	3	2	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	2	2	1
Moderate hypertrophy of the sinusoidal histiocytes										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	1	3	3
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Increased cellularity, germinal center, minimal or mild										
Day 93	0	0	0	1	0	2	0	3	2	3
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Mesenteric Lymph Node										
Basophilic granule accumulation										
Day 93	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	2	2	2	2
Minimal or mild hypertrophy of the sinusoidal histiocytes										
Day 93	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	2	2	2	2
Moderate hypertrophy of the sinusoidal histiocytes										
Day 93	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0

13-Week Toxicity Study with a 13 Week Recovery Period (Continued)

Dose:	0 (Control)		4 mg/kg		8 mg/kg		12 mg/kg		40 mg/kg	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Mesenteric Lymph Node (Continued)										
Increased cellularity, germinal center, minimal or mild										
Day 93	0	0	0	2	0	3	0	3	1	3
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Increased cellularity, germinal center, moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Spleen										
Increased cellularity, germinal center, minimal or mild										
Day 93	0	0	0	2	1	2	2	3	0	3
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	1	1	2	2
Increased cellularity, germinal center, moderate										
Day 93	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Day 182	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0
Thymus										
Involution, minimal or mild										
Day 93	0	1	0	1	0	2	0	3	2	3
Day 182	2	2	NA	NA	NA	NA	1	2	1	2

13-Week Toxicity Study with a 13 Week Recovery Period (Continued)

NA = Not Applicable; - = No Noteworthy Findings; BL = Below Linearity; * = $p<0.05$ (Statistically significant change compared to control group at the same time point for combined sexes)

a One male in the 12 mg/kg/week group presented with a pronounced reduction in platelets (from a mean of 499 x 10^3/µL during acclimation) was first observed on Day 65 (45 x 10^3/µL), associated with an increase in the mean platelet volume (MPV) to 13.3 fL. Dosing was discontinued for this animal after Day 63. The platelet level decreased to a minimum of 16 x 10^3/µL on Day 73, followed by a gradual reversal to levels comparable to the animal's baseline by the end of the recovery phase. Mean TK calculations collected on Day 91 and afterwards did not include values from this animal

b For the toxicokinetic values presented, the Day 1 data presented are relative to intravenous infusion for the main tox animals in the 4, 8 and 12 mg/kg groups. All other values are relative to SC administrations

c Additional findings discussed in the report that were minor, limited to one animal, and/or not considered test article-related are not presented

d Group means are shown

e Statistical evaluations not performed on these parameters

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

g Reported as number observed

Table 18 39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period

Study Type: Repeat-Dose Toxicity		**Report Title:** 39 Week Repeat Dose Toxicity Study of ISIS 505358 in Cynomolgus Monkeys with a 26 Week Recovery (GLP)	**Test Item: bepirovirsen sodium (GSK3228836 and ISIS 505358)** **Batch No.:** [redacted]
Species/Strain: macaque/cynomolgus		**Duration of Dosing:** 39 weeks **Duration of Recovery:** 26 weeks	**Sponsor Study No.:** 505358-AS05
Initial Age: 2 to 4 years		**Route/Frequency:** Subcutaneous injection on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly beginning on Day 21	**GSK Document Number:** 2019N419364 **Location in CTD:** m4.2.3.2
Date of First Dose:	07 January 2014 (males) 08 January 2014 (females)	**Vehicle/Formulation:** 0.9% sodium chloride for injection (USP)	**Study in Compliance with GLP:** yes

Data Collected: clinical observations; injection site observations; body weights; ophthalmology; electrocardiography; clinical pathology (urinalysis with urine chemistry, hematology, coagulation, serum chemistry with immunoglobulin IgG and IgM, and complement component 3 [C3]); complement split products Bb and C4a; cytokines/chemokines; anti-keyhole limpet hemocyanin (KLH) antibody response; anti-drug antibody (ADA) levels; platelet sensitivity to adenosine diphosphate (ADP) stimulation at acclimation; reticulated platelet assay; polymerase chain reaction (PCR) assay for simian plasmodium; organ weights; and macroscopic and microscopic observations. Toxicokinetic evaluation was conducted on plasma collected on Days 1, 10, 14, 42, 98,147, 182, 217 and 273 of the dosing phase (all groups), as well as on Days 280, 287, 294, 301, 322, 329, 343, 385, and 455 of the recovery phase (Groups 1, 4 and 5). Samples of the brain, heart, kidney (cortex and medulla), liver, lung, mesenteric lymph node, ovaries, spleen, testes and uterus were collected for potential analysis of ISIS 505358; only the kidney (cortex) and liver were analyzed.

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Conclusion: A total of 56 animals were used in the study. Seven animals (one at 3 mg/kg/week; and six at 20 mg/kg/week) did not complete the Protocol-required 9-month dosing regimen through Day 273, and were either euthanized on an unscheduled basis, found dead or placed in to early recovery phase. One animal at 10 mg/kg/week completed the 9-month dosing phase but not the recovery phase. Of these, six animals (five from the 20 mg/kg dose level, and one from the 10 mg/kg dose level) had findings directly attributed to ISIS 505358 administration. Of the 20 mg/kg/week animals, Animal 52 (male) was sacrificed on Day 86 due to consequences of severe decreases in platelet counts. Animals 47 (female) was sacrificed on Day 240 and Animal 4 (male) on Day 241 because of persistent, marked decrease in serum albumin, which occurred in the presence of persistent complement activation (sustained decrease in C3, increased Bb), systemic inflammation and renal involvement. Animal 50 (male), found dead on Day 258 after a 10-week treatment free period, had persistently low platelets and indications of systemic inflammation. The immediate cause of death was a thrombus in the pulmonary artery and acute severe hemorrhage in the lungs. The cause of the thrombus and hemorrhage in the lung was not clear. Animal 51 (female) was placed on recovery early (Day 133) because of persistently low platelets, which were also observed in the presence of persistent complement activation, low C3 and indications of systemic inflammation. Although most of these changes had largely recovered by Day 455, the increases in urine protein excretion persisted consistent with the microscopic renal lesions found at necropsy. Animal 32 (male, 10 mg/kg dose level) was sacrificed on Day 354 (12 weeks after the end of the dosing phase). This animal had indications of persistent complement activation, systemic inflammation, loss of body weight, renal injury, and inflammatory involvement of knee and wrist joints, which were considered at least in part, consequences of chronic test article administration, in addition to a potential contribution from the tail injury and repeated surgical repair in this monkey. The immediate reason for euthanasia was severely decreased serum albumin with increased CRP, and acute involvement of the knee and wrist joints. Twelve of the 12 animals in the control group (saline), 7 of 8 in the 3 mg/kg group, 8 of 8 in the 6 mg/kg group, 14 of 14 in the 10 mg/kg group, and 8 of 14 in the 20 mg/kg group completed the 9-month dosing regimen. Of these, one female (Animal 41, 10 mg/kg), completed the dosing phase after two dose-free episodes due to platelet decreases. This animal is included with those that completed dosing without interruption. In these animals, no test article-related effects were identified during ante mortem assessments of clinical observations, body weights, injection sites, electrocardiography, or ophthalmology.

In the animals that completed the dosing regimen, test article-related ante mortem effects were identified in clinical pathology and cytokine analysis. The clinical pathology findings included decreases in platelet counts in one animal at the 10 mg/kg, decreases in C3, serum albumin, albumin/globulin ratio, and increases in serum globulins, IgG and/or IgM, CRP and urinary proteins. Overall, the predominant ante mortem findings in these animals were complement activation, and systemic inflammatory responses with or without renal involvement, most notably in the animals in the 10 and 20 mg/kg groups. These effects had partially reversed in the 10 and 20 mg/kg groups at the end of the 6-month dose-free recovery period.

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Conclusion (Continued):

At the terminal necropsy, test article-related anatomic effects were primarily inflammatory changes in various organs including kidney, injection sites, lungs, liver, spleen, uterus, mesenteric lymph nodes, arteries of various organs, and mononuclear cell infiltration in various organs and tissues. These anatomic changes were observed in all test article-treated groups, but severity increased with dose administered. In addition, there was accumulation of basophilic granules (likely test article-related material) in proximal tubular epithelium of the kidneys, Kupffer cells of the liver, and histiocytes of the mesenteric and/or mandibular lymph nodes in all test article-treated animals. The accumulation of basophilic granules was not associated with any obvious detrimental effects. The Group 2 (3 mg/kg) terminal animals had no obvious test article-related detrimental effects. In Group 3 (6 mg/kg), only one female (Animal 21) had a minimal proliferation of arterial intima in the heart.

By the end of the 26-week dose-free recovery period the test article-related effects identified in clinical pathology and anatomic pathology assessments were still present but severity was reduced compared to at terminal necropsy for both 10 and 20 mg/kg dose groups evaluated. Results from the available toxicokinetics analysis demonstrated that:

• Mean plasma C_{max} generally increased in a dose proportional manner over the range of doses (3 to 20 mg/kg).

• Mean AUC_{last} values increased greater than dose proportionally.

• Mean pre-dose (trough) plasma concentrations increased dose-dependently during the course of repeated dosing.

• A post-distribution plasma $t_{1/2}$ value for the 10 and 20 mg/kg groups estimated to be 35 and 44 days, respectively.

• In tissues, ISIS 505358 was well distributed into the liver and kidney, with the mean tissue concentrations being higher in the kidney cortex than in liver at all dose levels. In general, the increases over the 6.7-fold range of doses (3 - 20 mg/kg) were less than dose proportional (3.9- and 2.6-fold in kidney and a 3.8- and 1.5-fold increase in the liver in female and male monkeys, respectively).

• There was no clear evidence of a gender difference in kidney or liver concentrations, with the possible exception of the livers from the 20 mg/kg group, in which mean concentrations were 2.5-fold higher in the females.

• At the end of the recovery period (Day 455), ISIS 505358 concentrations in the liver and kidney cortex were below the level of detection at the 10 and 20 mg/kg dose levels.

In summary, test article-related effects under the conditions of this study were considered to include incidents of adverse platelet decreases at ≥10 mg/kg (reversible upon dose withdrawal), and evidence of systemic inflammation (including persistent complement activation, vascular effects) at ≥6 mg/kg (being most severe at the 10 and 20 mg/kg), and renal effects at the 20 mg/kg dose level.

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity							**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Numbers of Animals: Main	4	4	4	5	5	4	4	4	5	5
Recovery	2	0	0	2	2	2	0	0	2	2
AUC_{last} (ng.h/mL) **Day 1**	NQ	45500	130000	220000	516000	NQ	29400	97500	196000	434000
Day 273	NQ	97900	204000	470000	1860000[k]	NQ	64100[j]	190000	491000	626000[k]
C_{max} (ng/mL) **Day 1**	NQ	10400	27300	29300	51100	NQ	7190	20300	28500	54200
Day 273	NQ	8640	22800	24600	79700[k]	NQ	6470[j]	22300	37600	46100[k]
ISIS 505358 oligonucleotide concentration (µg/g)										
Kidney Main - Day 275	-	294	777	871	764[j]	-	341[j]	640	951	1340[j]
Recovery - Day 455	-	-	-	-	NQ	-	-	-	-	NQ
Liver Day 275	-	173	302	446	251[j]	-	215[j]	403	435	814[j]
Recovery - Day 455	-	-	-	-	NQ	-	-	-	-	NQ
Noteworthy Findings										
Mortality	0	0	0	1[c]	3[d]	0	1[b]	0	0	2[d]
Hematology										
Hemoglobin (g/dL)										
Day -5	13.5	12.3	12.8	12.7	12.7	13.2	12.5	12.8	12.6	12.2
Day 93	13.8	13.6	12.9	13.2	13.1	13.3	12.6	12.5	12.7	12.4
Day 184	14.1	12.9	13.1	13.3	12.8	13.2	12.2	12.3	12.9	11.9
Day 275	13.6	12.9	12.6	12.0	12.0	12.5	11.7	11.7	11.6	11.2
Day 315	14.3	-	-	13.6	13.0[h]	14.0	-	-	12.7	12.8
Day 455	14.9	-	-	13.7[h]	13.9[h]	14.1	-	-	12.7	13.8

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Hematocrit (%)										
Day -5	43.3	39.4	40.8	41.2	41.5	42.9	40.1	40.7	40.6	39.3
Day 93	43.7	42.7	40.5	41.9	41.0	42.6	39.4	39.5	39.6	38.7
Day 184	46.4	41.9[e]	42.9	44.2	42.6[e]	43.4	40.5	40.4	42.0	39.5
Day 275	42.9	39.9	40.0	38.8	38.4	40.3	37.8	37.7	37.0	36.2
Day 315	45.8	-	-	44.9	43.2[h]	45.4	-	-	41.4	42.0
Day 455	48.5	-	-	44.6[h]	45.4[h]	45.4	-	-	41.7	45.3
Red Blood Cell Count (x10^6/µL)										
Day -5	5.70	5.22	5.24	5.49	5.37	5.78	5.35	5.38	5.31	5.33
Day 93	5.86	5.87	5.33	5.70	5.57	5.76	5.40	5.37	5.26	5.43
Day 184	5.95	5.56	5.45	5.82	5.64	5.64	5.35	5.27	5.45	5.33
Day 275	5.71	5.54	5.24	5.44	5.32	5.41	5.11	5.19	5.00	5.13
Day 315	5.95	-	-	6.17	5.90[h]	6.10	-	-	5.71	5.79
Day 455	6.24	-	-	5.70[h]	5.90[h]	6.13	-	-	5.61	6.10
Reticulocyte Count (10^6/µL)										
Day -5	0.085	0.087	0.061	0.103	0.082	0.073	0.066	0.091	0.114[e]	0.075
Day 93	0.050	0.039	0.031	0.041	0.041	0.041	0.033	0.044	0.043	0.030
Day 184	0.060	0.048	0.043	0.051	0.055	0.053	0.062	0.061	0.055	0.055
Day 275	0.052	0.042	0.029	0.041	0.047	0.056	0.034	0.052	0.046	0.056
Day 315	0.054	-	-	0.036	0.069[h]	0.062	-	-	0.052	0.055
Day 455	0.059	-	-	0.059[h]	0.081[h]	0.057	-	-	0.054	0.048

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Platelet Count (10^3/µL)										
Day -5	448	435	427	463	432	453	480	435	441	444
Day 93	420	390	343	394	307	408	388	363	335	316
Day 184	401	377	340	337	275	417	459	404	361	329
Day 275	447	409	326	460	280[e]	455	462	416	376	337
Day 315	417	-	-	547	322[h]	400	-	-	310	379
Day 455	481	-	-	597[h]	396[h]	427	-	-	343	473
Mean Platelet Volume (fL)										
Day -5	10.2	9.7	9.7	9.5	9.5	9.0	9.5	9.3	9.6	9.0
Day 93	9.9	9.5	9.8	9.8	9.5	9.4	9.3	9.4	10.0	9.6
Day 184	10.0	9.7	10.1	10.0	9.8	9.3	9.3	9.3	9.6	9.4
Day 275	9.4	9.0	9.2	10.0	8.8	8.8	8.7	9.1	9.3	8.8
Day 315	9.1	-	-	10.7	8.5[h]	8.8	-	-	10.2	8.6
Day 455	9.5	-	-	8.4[h]	8.4[h]	10.5	-	-	11.4	10.2
Red Cell Distribution Width (%)										
Day -5	12.4	12.5	12.4	12.4	12.8	12.2	12.4	12.2	12.8	12.4
Day 93	13.3	13.0	13.0	13.0	13.3	12.7	13.2	12.6	12.9	12.7
Day 184	12.8	13.0	13.0	12.7	13.6	12.5	12.8	12.6	12.8	13.0
Day 275	12.8	13.1	12.9	13.3	14.2[e]	12.5	12.9	12.8	13.0	13.3
Day 315	12.9	-	-	15.5	15.4[h]	11.9	-	-	14.2	12.4
Day 455	13.3	-	-	14.3[h]	13.7[h]	11.6	-	-	12.7	11.3

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Clinical Chemistry										
Globulin (calculated; g/dL)										
Day -5	2.6	2.4	2.6	2.5	2.3	2.4	2.4	2.3	2.4	2.4
Day 93	2.7	2.6	2.8	3.0	3.0	2.8	2.8	2.7	2.8	2.9
Day 184	2.7	2.5	2.8	3.4	4.0[f]	2.7	2.8	3.3	3.0	3.5
Day 275	2.7	2.7	2.9	3.8[f]	4.2[f]	2.7	2.8	3.8[e]	3.2	3.4
Day 315	2.7	-	-	4.3	4.4[h]	3.1	-	-	3.6	3.4
Day 455	2.4	-	-	2.7[h]	2.9[h]	2.6	-	-	2.6	2.7
Albumin (g/dL)										
Day -5	4.4	4.4	4.7	4.6	4.5	4.5	4.4	4.3	4.5	4.5
Day 93	4.1	4.3	4.4	4.2	3.9	4.3	4.2	4.0	4.0	4.0
Day 184	4.5	4.5	4.6	4.2	3.3[f]	4.4	4.3	3.6	4.1	3.8
Day 275	4.0	4.0	4.1	3.5	3.2	4.1	3.9	3.2[e]	3.5	3.4
Day 315	4.7	-	-	3.8	3.8[h]	4.1	-	-	3.9	3.2
Day 455	4.8	-	-	4.3[h]	4.1[h]	3.9	-	-	3.8	3.5
Albumin/Globulin Ratio										
Day -5	1.8	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.8	2.0	1.9	1.9
Day 93	1.5	1.7	1.6	1.4	1.3	1.6	1.6	1.5	1.4	1.4
Day 184	1.7	1.9	1.6	1.3	0.9[g]	1.7	1.5	1.3	1.4	1.1
Day 275	1.5	1.5	1.4	1.0[e]	0.8[f]	1.5	1.4	0.9[f]	1.1[e]	1.0[e]
Day 315	1.8	-	-	1.0	0.9[h]	1.4	-	-	1.1	1.0
Day 455	2.1	-	-	1.6[h]	1.4[h]	1.6	-	-	1.5	1.3

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
C-Reactive Protein (mg/dL)										
Day -5	0.7[i]	1.2[h]	1.1[h]	1.0[h]	0.9[h]	0.5[h]	NS	0.6[h]	NS	NS
Day 93	NS	0.7[h]	1.4[h]	0.9[j]	1.1[l]	NS	0.6[h]	0.5[i]	0.6[h]	0.7[m]
Day 184	0.7[h]	0.7[j]	1.4[h]	0.8[k]	3.1[m]	NS	2.6[i]	1.0[j]	NS	0.8[k]
Day 275	NS	0.7[h]	3.2[h]	4.1[k]	4.0[k]	1.0[h]	NS	2.2[i]	7.4[i]	1.9[j]
Day 315	NS	-	-	NS	0.5[h]	NS	-	-	NS	NS
Day 455	NS	-	-	NS	NS	NS	-	-	NS	NS
Total IgG (mg/dL)										
Day -12	824	666	849	875	781	845	826	818	873	860
Day 184	890	765	918	1279	1452[f]	897	901	1195	1050	1284
Day 247	918	852	991	1552[e]	1840[e]	900	982	1523	1221	1273
Day 275	903	817	970	1446[e]	1658	899	959	1538[e]	1225	1272
Day 455	853	-	-	1211[h]	1132[h]	995	-	-	1053	875
Urinalysis/Urine Chemistry										
	Test article-related findings in urinalysis/urine chemistry included blood in urine, red blood cells in sediment, and protein (qualitative and quantitative). These effects were observed in two animals dosed at 20 mg/kg (Animal 46, male and Animal 49, female), and were associated with the presence of a grade of 3 RBC in urine sediment.									

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Complement Activation Bb (µg/mL)										
Day 1: predose	1.633	1.316	1.333	1.440	1.614	1.556	1.453	1.992	1.417	1.525
Day 1: 4 hours postdose	2.504	2.217	2.108	2.900	3.221	3.038	2.562	2.396	2.942	3.311
Day 1: 24 hours postdose	2.150	1.886	1.870	2.455	2.843	2.108	1.549	2.184	1.826	1.711
Day 86	-	-	-	-	15.063[h] (Animal No. 52)	-	-	-	-	-
Day 91	1.465	1.431	1.412	1.577	2.592[m]	1.271	1.433	2.058	1.627	2.098
Day 113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.529[h] (Animal No. 53)
Day 182	1.803	1.794	1.837	2.793	4.481[l]	1.881	1.715	3.316	2.228	3.341[m]
Day 240	-	-	-	-	-	-	3.238[h] (Animal No. 19)	-	-	3.811[h] (Animal No. 47)
Day 241	-	-	-	-	6.178[h] (Animal No. 4)	-	-	-	-	-
Day 273	1.780	1.793	2.027	2.736	4.724[k]	1.791	2.265	3.311	3.112	3.568[l]
Day 287	1.690	-	-	3.327	4.773[h]	1.360	-	-	4.104	3.291
Day 301	1.409	-	-	3.151	4.409[h]	1.436	-	-	3.166	3.443
Day 354	-	-	-	1.638[h] (Animal No. 32)	-	-	-	-	-	-
Day 455	1.334	-	-	2.375[h]	2.811[h]	1.269	-	-	1.777	2.576

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
C3 (mg/dL)										
Day 1: predose	110	112	112	115	117	130	125	122	119	122
Day 1: 24 hours postdose	122	121	126	124	128	131	127	124	122	124
Day 91: predose	122	111	118	106	102	116	111	111	102	98
Day 91: 24 hours postdose	118	109	116	104	98	121	112	112	105	95[f]
Day 182: predose	128	118	117	84[e]	81[e]	132	135	91	107	82[f]
Day 182: 24 hours postdose	134	117	115	84[e]	76[f]	137	134	93[e]	109	82[f]
Day 273: predose	128	114	97	77[e]	75[e]	131	117	85[e]	99	73[f]
Day 273: 24 hours postdose	125	112	95	74[f]	65[f]	132	116	83[e]	95[e]	71[f]
Day 287	135	-	-	71	39[h]	124	-	-	105	51
Day 301	139	-	-	61	38[h]	122	-	-	84	55
Day 354	-	-	-	96[h]	-	-	-	-	-	-
Day 455	144	-	-	50[h]	48[h]	125	-	-	115	81
Anti-KLH IgG (µg/mL)[n]										
Dose (mg/kg/week)	0		3		6		10		20	
Day -5	1.3		0.7		0.1		0.3		0.0	
Day 247	3.5		0.4		0.6		0.7		1.1	
Day 268	111.1		40.5		40.6		50.6		31.1	
Day 275	678.4		189.4[e]		197.1[e]		215.8[e]		205.4[e]	
Day 455	66.3		-		-		8.9[e]		4.3[e]	

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Cytokines[o]										
Dose (mg/kg/week)	0		3		6		10		20	
IFN-γ (pg/mL)										
Day -5 minimum	32.98		31.64		BLQ		37.33		BLQ	
maximum	57.52		80.15		BLQ		181.56		BLQ	
Day 184 minimum	70.55		83.53		46.52		33.82		31.84	
maximum	70.55		104.58		61.47		355.80		962.42	
Day 275 minimum	34.12		40.01		44.84		31.58		30.89	
maximum	98.23		499.95		2461.32		131.63		277.41	
Day 455 minimum	49.04		-		-		BLQ		33.53	
maximum	56.28		-		-		BLQ		33.53	
MCP-1 (pg/mL)										
Day -5 minimum	200.05		214.97		163.94		179.99		124.80	
maximum	612.83		503.25		468.69		582.53		752.77	
Day 184 minimum	160.92		239.59		213.42		205.26		133.66	
maximum	415.95		508.17		584.12		653.48		1339.32	
Day 275 minimum	173.77		243.29		302.58		174.80		119.92	
maximum	475.84		553.64		688.29		1769.51		619.82	
Day 455 minimum	120.69		-		-		226.66		222.63	
maximum	405.81		-		-		308.28		309.43	
MIP-1β (pg/mL)										
Day -5 minimum	BLQ		128.18		BLQ		140.74		BLQ	
maximum	BLQ		302.06		BLQ		140.74		BLQ	
Day 184 minimum	BLQ		149.82		100.48		110.40		96.01	
maximum	BLQ		339.70		120.11		428.95		780.31	
Day 275 minimum	101.43		239.07		104.85		124.24		162.25	
maximum	120.24		559.97		491.60		368.36		432.01	
Day 455 minimum	80.70		-		-		BLQ		BLQ	
maximum	80.70		-		-		BLQ		BLQ	

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Organ Weights (X control[p]) – terminal necropsy										
Liver										
Absolute (g)	65.8842	-	-	-	1.5[f]	-	-	-	-	-
Spleen										
Absolute (g)	3.4581	-	-	2.4[e]	4.7[g]	-	-	-	-	-
Macroscopic Examination – unscheduled decedents (number of animals)	0	0	0	1[c]	3[d]	0	1[b]	0	0	2[d]
Cecum										
Mucosa; hemorrhage; multifocal, mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Epididymides										
Discoloration; dark	-	-	-	0	1	-	-	-	-	-
Gallbladder										
Discoloration; dark red	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
General condition										
Thin	-	-	-	1	0	-	0	-	-	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Heart										
Atrium; increased size; right, moderate	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Endocardium; septum; hemorrhage; left	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Artery; obstruction	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Injection site(s)										
Hemorrhage; left, mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Hemorrhage; right, moderate	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Joint (knee)										
Swelling	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Kidney										
Discoloration; pale	-	-	-	0	1	-	1	-	-	0
Discoloration; mottled dark red to tan	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Liver										
Discoloration; brown	-	-	-	0	2	-	0	-	-	1
Increased size	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Lungs										
Discoloration; dark red; focally extensive	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Hemorrhage; multifocal, mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Skin										
Subcutaneous; hindlimb; hemorrhage; left, moderate	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Subcutaneous; submandibular; hemorrhage, mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Spleen										
Increased size, mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	1
Stomach										
Mucosa; fundus; hemorrhage; multifocal, mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Testes										
Discoloration; dark	-	-	-	0	1	-	-	-	-	-
Uterus										
Increased size, moderate	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1
Vagina										
Contents; hemorrhagic, mild	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Microscopic Examination – unscheduled decedents (number of animals)	0	0	0	1[c]	3[d]	0	1[b]	0	0	2[d]
Kidney										
Glomeruli; infiltration, neutrophils										
Minimal	-	-	-	0	0	-	1	-	-	1
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Glomeruli; hypertrophy										
Minimal	-	-	-	1	0	-	0	-	-	1
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	1
Tubular lumen; cast, proteinaceous										
Minimal	-	-	-	0	0	-	1	-	-	1
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Tubular lumen; hemorrhage										
Minimal	-	-	-	1	1	-	1	-	-	0
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	1
Papilla; infiltration, neutrophils										
Mild	-	-	-	0	0	-	1	-	-	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Pelvis; hemorrhage										
Minimal	-	-	-	0	0	-	1	-	-	0
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	1	-	1	-	-	0
Mild	-	-	-	1	2	-	0	-	-	1
Vascular, perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Mild	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Erythroid precursors; hematopoiesis										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Basophilic granules; tubular epithelium; accumulation										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	2
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Tubules; regeneration										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Mild	-	-	-	0	0	-	1	-	-	0
Moderate	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Intima; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Adventitia; artery; proliferation										
Mild	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Heart										
Atrium; congestion, right	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Ventricle; fibrosis, right										
Moderate	-	-	-	0	0	-	1	-	-	0
Intima; artery; proliferation										
Mild	-	-	-	1	0	-	1	-	-	1
Moderate	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Adventitia; artery; proliferation										
Mild	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	1	-	1	-	-	0
Mild	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Atrioventricular valve; hematopoiesis										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Artery; thrombus										
Marked	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Atrioventricular valve; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Mild	-	-	-	1	0	-	0	-	-	1
Endocardium; hemorrhage										
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Epicardium; hemorrhage										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Infiltration, mononuclear cells										
Mild	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Bone marrow, sternum										
Lymphoid; follicles; proliferation										
Minimal	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Mild	-	-	-	0	0	-	1	-	-	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Erythroid precursors; increased cellularity										
Minimal	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Mild	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Stomach										
Mucosa; submucosa; ulceration										
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Mucosa; hemorrhage										
Moderate	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Spleen										
Erythroid precursors; hematopoiesis	-	-	-	0	1	-	0	-	-	1
Lymphocytes; follicles; increased cellularity										
Minimal	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Mild	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Moderate	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Liver										
Brown pigment; intracellular										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Kupffer cell; hypertrophy										
Minimal	-	-	-	1	0	-	0	-	-	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells	-	-	-	0	0	-	1	-	-	0
Basophilic granules; Kupffer cell; accumulation										
Minimal	-	-	-	1	1	-	0	-	-	1
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Moderate	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Infiltration; mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	0	-	1	-	-	1
Mild	-	-	-	1	1	-	0	-	-	1
Intima; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	0	0	-	1	-	-	0
Mild	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Adventitia; artery; proliferation	-	-	-	0	0	-	1	-	-	1
Hepatocyte; decreased size; glycogen	-	-	-	1	1	-	0	-	-	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Mandibular lymph node										
Basophilic granules; histiocytes, accumulation										
Minimal	-	-	-	0	3	-	0	-	-	2
Mesenteric lymph node										
Basophilic granules; histiocytes, accumulation										
Minimal	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Mild	-	-	-	0	3	-	0	-	-	2
Uterus										
Lumen; hemorrhage										
Mild	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1
Infiltration; mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	-	-	-	1	-	-	0
Moderate				-	-		0	-	-	1
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Mild	-	-	-	-	-	-	1	-	-	0
Adventitia; artery; proliferation										
Mild	-	-	-	-	-	-	1	-	-	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Cervix										
Lumen; hemorrhage										
Mild	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1
Infiltration; mononuclear cells										
Mild	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1
Lungs										
Hemorrhage										
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Marked	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Artery; thrombus										
Marked	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Intima; artery; proliferation										
Moderate	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Infiltration; mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	1	1	-	0	-	-	2
Moderate	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Pancreas										
Adipocyte; necrosis										
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Acinar cell; decreased secretion zymogen granules										
Mild	-	-	-	1	1	-	0	-	-	1
Adrenal gland										
Zona fasciculata; hypertrophy										
Minimal	-	-	-	1	0	-	0	-	-	1
Mild	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Thymus										
Atrophy										
Mild	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Hemorrhage										
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Duodenum										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Mild	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Adventitia; artery; proliferation										
Mild	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Ileum										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Mild	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Adventitia; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	1	0	-	0	-	-	1
Jejunum										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	1	0	-	1	-	-	1
Adventitia; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	1	0	-	1	-	-	1
Intima; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	0	0	-	1	-	-	0
Oviducts										
Infiltration, mononuclear cells										
Mild	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Mild	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Adventitia; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	-	-	-	1	-	-	0
Intima; artery; proliferation										
Mild	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1
Ovaries										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Mild	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1
Adventitia; artery; proliferation										
Mild	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1
Intima; artery; proliferation										
Mild	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Vagina										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	-	-	-	1	-	-	0
Adventitia; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	-	-	-	1	-	-	0
Intima; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	-	-	-	1	-	-	0
Gallbladder										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	1	-	0	-	-	1
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	0	-	1	-	-	0
Perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Adventitia; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	0		-	1	-	-	1
Intima; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	0		-	1	-	-	1
Colon										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	0	-	1	-	-	0
Adventitia; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Tongue										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Adventitia; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Intima; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Thyroid										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Intima; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Epididymides										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Mild	-	-	-	1	0	-	-	-	-	-
Adventitia; artery; proliferation										
Mild	-	-	-	1	0	-	-	-	-	-

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Injection site(s)										
Subcutaneous; infiltration, macrophages										
Mild	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Subcutaneous; hemorrhage										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Moderate	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Subcutaneous; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	1	2	-	0	-	-	1
Dermis; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	2	-	0	-	-	0
Mild	-	-	-	1	1	-	1	-	-	1
Muscle; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Mild	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0
Subcutaneous; fibrosis										
Mild	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Eyes										
Sclera; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	1	2	-	1	-	-	1
Choroid; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Lacrimal gland										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	3	-	0	-	-	1
Mild	-	-	-	0	0	-	1	-	-	1
Mammary gland										
Infiltration, mononuclear cells										
Mild	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1
Sciatic nerve										
Perineurium; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	1	2	-	0	-	-	1
Esophagus										
Submucosa; infiltration, mononuclear cells										
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Submandibular salivary gland										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	0	1	-	1	-	-	0
Mild	-	-	-	1	2	-	0	-	-	0
Moderate	-	-	-	0	0	-	0	-	-	1
Pituitary gland										
Pars nervosa; infiltration, mononuclear cells										
Mild	-	-	-	0	1	-	0	-	-	0
Seminal vesicles										
Infiltration, mononuclear cells										
Mild	-	-	-	0	1	-	-	-	-	-
Joint, knee										
Synovial membrane; infiltration, mixed inflammatory cells										
Moderate	-	-	-	1	0	-	0	-	-	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Macroscopic Examination – terminal necropsy (number of animals)	4	4	4	5	3	4	3	4	5	3
Injection site(s)										
Increased thickness										
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
Kidney										
Discoloration; pale	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Discoloration; red, multifocal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Rough surface										
Mild	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0
Lungs										
Discoloration; red, multifocal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Lobe, discoloration; red, posterior, focal	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mesenteric lymph node										
Increased size										
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Spleen										
Increased size										
Mild	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Uterus										
Increased size, Moderate	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1
Macroscopic Examination – recovery necropsy (number of animals)	2	0	0	1	1	2	0	0	2	2
Kidney										
Discoloration; pale	0	-	-	0	1	0	-	-	0	0
Spleen										
Discoloration; pale	0	-	-	0	1	0	-	-	0	0
Microscopic Examination – terminal necropsy (number of animals)	4	4	4	5	3	4	3	4	5	3
Bone marrow, sternum										
Lymphoid; follicles; proliferation										
Minimal	0	2	1	3	1	0	0	4	3	2
Mild	0	1	0	1	2	0	1	0	1	0
Brain										
Choroid plexus; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	1	2	0	2	1	0	1	4	1	0
Mild	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Cervix										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	-	-	0	2	1	1	2
Mild	-	-	-	-	-	0	0	3	2	1
Polyp	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1
Duodenum										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Adventitia; artery, proliferation										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Ileum										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Adventitia; artery, proliferation										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Jejunum										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Adventitia; artery, proliferation										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Colon										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Adventitia; artery, proliferation										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Rectum										
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Intima; artery, proliferation										
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Adventitia; artery, proliferation										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Epididymides										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	2	2	1	-	-	-	-	-
Mild	0	0	0	1	1	-	-	-	-	-
Esophagus										
Submucosa; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	2	1	1	2	0	0	0	1	1	1
Mild	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0
Perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Marked	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Eyes										
Sclera; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	2	3	1	0	0	2	1	3

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Choroid; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	2	1	0	0	2	0	0
Ciliary body; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	1	1	3	0	1	1	1	0
Gallbladder										
Perivascular; infiltration, mixed inflammatory cells										
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2
Mild	0	0	0	1	1	0	0	2	0	0
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Intima; artery, proliferation										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Adventitia; artery, proliferation										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Heart										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	2	3	2	2	0	2	2	1	2	2
Mild	0	0	1	1	2	0	0	2	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Atrioventricular valve; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	2	1	0	1	1	1	1
Mild	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Intima; artery; proliferation										
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Injection site(s)										
Subcutaneous; infiltration, macrophages										
Minimal	0	1	0	1	2	0	0	0	1	1
Mild	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
Subcutaneous; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	1	1	0	0	1	2	2	2
Mild	0	1	2	3	2	0	0	2	3	1
Moderate	0	2	1	1	1	0	1	0	0	0
Dermis; infiltration, mononuclear cells										
Mild	0	1	2	3	1	0	3	3	4	3
Moderate	0	3	2	2	2	0	0	1	1	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	1	1	3	0	0	3	1	2	2
Subcutaneous; fibrosis										
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	1	3	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Kidney										
Tubular lumen; cast, proteinaceous										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Tubular lumen; hemorrhage										
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	4	2	3	2	0	3	1	1	3	2
Mild	0	2	1	2	1	0	1	2	2	1
Moderate	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
Marked	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Vascular, perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Basophilic granules; tubular epithelium; accumulation										
Minimal	0	3	2	4	2	0	2	3	2	0
Mild	0	0	2	1	1	0	0	1	3	3
Tubules; regeneration										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Intima; artery; proliferation										
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Adventitia; artery; proliferation										
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Lacrimal gland										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	4	3	3	1	1	2	3	0	3	1
Mild	0	0	1	2	2	0	0	4	2	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Liver										
Kupffer cell; hypertrophy										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Hepatocyte; necrosis										
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Basophilic granules; Kupffer cell; accumulation										
Minimal	0	3	3	3	3	0	2	3	3	1
Mild	0	0	1	1	0	0	0	1	2	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	3	2	2	2	0	1	0	1	1	2
Mild	0	2	1	3	2	0	3	3	4	0
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Lungs										
Brown pigment, intracellular										
Minimal	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Mild	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Hemorrhage										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Mild	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	1	0	3	2	0	0	0	2	0
Mild	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Intima; artery; proliferation										
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
ledia, artery; proliferation										
Mild	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mammary gland										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	-	-	0	0	1	1	1
Mild	-	-	-	-	-	0	0	1	0	1
Mandibular lymph node										
Basophilic granules; histiocytes, accumulation										
Minimal	0	0	4	3	1	0	0	0	3	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Histiocyte; sinus, hypertrophy										
Minimal	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Mesenteric lymph node										
Basophilic granules; histiocytes, accumulation										
Minimal	0	2	1	3	3	0	1	2	3	0
Mild	0	0	3	1	0	0	0	1	2	3
Histiocyte; sinus, hypertrophy										
Minimal	0	2	2	2	2	0	0	1	1	0
Mild	0	0	2	1	1	0	0	1	2	3

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Oviducts										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	-	-	0	1	0	3	3
Mild	-	-	-	-	-	0	0	1	1	0
Parathyroid gland										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Pituitary gland										
Pars distalis; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pars nervosa; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	1	1	2	1	0	1	1	0	1
Mild	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
Prostate gland										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	1	1	2	1	2	-	-	-	-	-
Mild	0	0	1	1	1	-	-	-	-	-
Moderate	0	0	0	1	0	-	-	-	-	-

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-
Sciatic nerve										
Perineurium; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	2	2	1	0	0	4	1	1
Mild	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Seminal vesicles										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-
Mild	0	0	0	1	1	-	-	-	-	-
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Mild	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-
Intima; artery; proliferation										
Minimal	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-
Adventitia; artery; proliferation										
Minimal	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Skeletal muscle										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	1	1	4	4	1	0	0	2	2	1
Mild	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Spleen										
Lymphocytes; follicles, increased cellularity										
Minimal	0	1	0	2	0	0	1	3	1	1
Mild	0	0	1	3	2	0	1	1	3	2
Moderate	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Marked	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Submandibular salivary gland										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	3	1	3	2	1	0	3	1	3	1
Mild	0	2	1	2	2	0	0	2	1	2
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
Thyroid gland										
Intima; artery; proliferation										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Uterus										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	-	-	0	2	0	2	1
Mild	-	-	-	-	-	0	1	2	2	1
Moderate	-	-	-	-	-	0	0	2	1	1
Microscopic Examination – recovery necropsy (number of animals)	2	0	0	1	1	2	0	0	2	2
Brain										
Choroid plexus; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	-	-	1	0	0	-	-	1	0
Cervix										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	-	-	0	-	-	2	1
Eyes										
Sclera; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	-	-	1	1	0	-	-	0	2

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Injection site(s)										
Subcutaneous; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	-	-	1	1	0	-	-	2	2
Dermis; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	-	-	1	1	0	-	-	2	2
Kidney										
Tubular lumen; cast, proteinaceous										
Minimal	0	-	-	0	0	0	-	-	0	1
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	2	-	-	1	0	1	-	-	2	1
Mild	0	-	-	0	1	0	-	-	0	1
Glomeruli; hypertrophy										
Minimal	0	-	-	0	0	0	-	-	0	1
Lacrimal gland										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	2	-	-	0	0	1	-	-	0	2
Mild	0	-	-	1	1	0	-	-	2	0

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Liver										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	1	-	-	1	1	2	-	-	1	1
Mild	0	-	-	0	0	0	-	-	0	1
Basophilic granules; Kupffer cell; accumulation										
Minimal	0	-	-	0	0	0	-	-	0	1
Lungs										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	1	-	-	1	0	2	-	-	1	0
Mild	0	-	-	0	1	0	-	-	0	1
Mandibular lymph node										
Basophilic granules; histiocytes, accumulation										
Minimal	0	-	-	0	0	0	-	-	0	2
Mesenteric lymph node										
Basophilic granules; histiocytes, accumulation										
Minimal	0	-	-	0	0	0	-	-	1	0
Mild	0	-	-	0	0	0	-	-	0	1
Optic nerve										
Perineurium; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	-	-	1	0	0	-	-	0	0
Oviducts										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	-	-	0	-	-	1	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Study Type: Repeat-Dose Toxicity						**Sponsor Study No.:** 505358-AS05				
	Male					**Female**				
Dose (mg/kg/week)[a]	0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Sciatic nerve										
Perineurium; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	0	-	-	1	1	0	-	-	1	1
Submandibular salivary gland										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	2	-	-	1	0	1	-	-	2	2
Mild	0	-	-	0	1	0	-	-	0	0
Uterus										
Infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	-	-	0	-	-	1	0
Mild	-	-	-	-	-	0	-	-	1	2
Vagina										
Submucosa; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	-	-	2	-	-	1	1
Mild	-	-	-	-	-	0	-	-	1	1
Vascular; perivascular; infiltration, mononuclear cells										
Minimal	-	-	-	-	-	0	-	-	0	1
Intima; artery; proliferation										
Minimal	-	-	-	-	-	0	-	-	0	1

39 Week Toxicity Study with a 26 Week Recovery Period (Continued)

Key:

NQ: Not Quantifiable; BLQ: Below Limit of Quantitation; NS: No Sample; -: Not Evaluated

a. . The vehicle control and test article were given via subcutaneous injections once per day on Days 1, 5, 10 and 14 and then once weekly thereafter through Day 273. The loading doses during the first two weeks were expressed as mg/kg/dose, while the maintenance doses through Day 273 are expressed as mg/kg/week.
b. Animal 19 (female given 3 mg/kg/week) was euthanized unscheduled on Day 240 due to a persistent, pronounced decrease in serum albumin, decreased serum total protein, and increased urine total protein and albumin.
c. Animal 32 (male given 10 mg/kg/week) was euthanized unscheduled on Day 354 due to severe, acute swelling of knee joints, decreased serum albumin and substantially increased CRP.
d. Animal 51 (20 mg/kg/week female) was effectively placed in early recovery after the last dose on Day 133 due to persistently low platelet counts. Animal 52 (male given 20 mg/kg/week) was euthanized on an unscheduled basis on Day 86, due to severely decreased platelet counts and red blood cell (RBC) parameters, associated with severe bruises. Animal 53 (female given 20 mg/kg/week) was euthanized on an unscheduled basis on Day 113 due to complications from surgical repair (intestinal resection and anastomosis) of a prolapsed rectum. Animal 47 (female given 20 mg/kg/week) was euthanized on Day 240 due to marked decreases in serum albumin, platelets, red blood cells, hematocrit and hemoglobin. This animal was dosed at 20 mg/kg on Days 1, 5, 10, and 14, then once weekly from Day 21 until Day 233. The animal was not dosed on Day 238 due to severely depleted platelets and decreased serum albumin noted at the scheduled collection on Day 233. Animal 4 (male given 20 mg/kg/week) was euthanized unscheduled on Day 241 due to persistent, marked decrease in serum albumin and increased urine total protein and albumin. Animal 50 (male given 20 mg/kg/week) was found dead on Day 258, after a 10-week cessation of dosing (due to persistently low platelet counts) starting Day 189. The immediate cause of death was considered to be a thrombus in the pulmonary artery and acute severe hemorrhage in the lungs.
e. Significantly different from control; ($p<0.05$)
f. Significantly different from control; ($p<0.01$)
g. Significantly different from control; ($p<0.001$)
h. N = 1
i. N = 2
j. N = 3
k. N = 4
l. N = 5
m. N = 6
n. Anti-KLH IgG values were gender-averaged.
o. Cytokine values were gender-averaged and reported as minimum and maximum for the combined values.

8. GENOTOXICITY: IN VITRO

Table 19 Bacterial Reverse Mutation Assay (AMES)

Report Title: Evaluation of ISIS 505358 (bepirovirsen sodium; GSK3228836) in Bacterial Reverse Mutation Assay		**Study No. 505358-IS01**
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	No. of Independent Assays: 2	**Location in CTD: m4.2.3.3.1**
Species: *Salmonella typhimurium / Escherichia coli*	No. of Replicate Cultures: 3	GLP Compliance: Yes
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9	No. of Cells Analyzed/Cultured: N/A	**GSK Document Number:** 2019N419124
Vehicles: for Test Article: Distilled water	For Positive Controls: Dimethyl sulfoxide, except water for sodium azide	
Treatment: Plate incorporation, with or without metabolic activation using S-9 mixture (5% Assay #1 and 10% Assay #2)		Date of Treatment: 13 March 2013 (Assay #1); 27 March 2013 (Assay #2)
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Assay #1 - Revertant Colony Counts (mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvr*A**
Without Activation	Vehicle	0	21 ± 2	129 ± 9	13 ± 2	7 ± 1	21 ± 2
	ISIS 505358	78.1	22 ± 3	128 ± 8	12 ± 2	7 ± 0	25 ± 7
		156.3	22 ± 1	132 ± 6	14 ± 1	6 ± 0	26 ± 6
		312.5	24 ± 1	141 ± 9	13 ± 3	7 ± 1	20 ± 2
		625	23 ± 1	137 ± 9	16 ± 1	7 ± 2	23 ± 6
		1250	23 ± 3	141 ± 8	14 ± 2	7 ± 2	25 ± 3
		2500	23 ± 2	140 ± 5	15 ± 3	7 ± 1	24 ± 4
		5000	21 ± 2	131 ± 10	16 ± 3	7 ± 2	23 ± 3
	2-Nitrofluorene[a]	2	384 ± 15				
	Sodium azide[a]	0.5		489 ± 41	324 ± 8		
	9-Aminoacridine[a]	50				83 ± 8	
	4-Nitroquinoline N-oxide[a]	0.5					82 ± 9
	4-Nitroquinoline N-oxide[a]	1					309 ± 45
	2-Aminoanthracene[a]	2			11 ± 2		

Bacterial Reverse Mutation Assay (AMES) (Continued)

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay #1 - Revertant Colony Counts (mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvr*A
Without Activation	Benzo(a)pyrene[a]	2	19 ± 4				
With Activation	Vehicle	0	34 ± 6	130 ± 9	9 ± 1	13 ± 2	29 ± 1
	ISIS 505358	78.1	35 ± 4	137 ± 6	9 ± 1	11 ± 1	32 ± 1
		156.3	32 ± 5	138 ± 9	9 ± 2	11 ± 1	28 ± 6
		312.5	35 ± 2	135 ± 6	11 ± 2	11 ± 1	28 ± 3
		625	32 ± 2	131 ± 3	9 ± 1	11 ± 2	33 ± 1
		1250	34 ± 3	130 ± 14	10 ± 2	13 ± 1	27 ± 6
		2500	32 ± 0	136 ± 4	9 ± 1	13 ± 1	28 ± 1
		5000	29 ± 3	143 ± 5	9 ± 2	11 ± 1	31 ± 1
	2-Aminoanthracene[a]	2			168 ± 32		
	Benzo(a)pyrene[a]	2	413 ± 37	762 ± 26		208 ± 11	
	2-Aminoanthracene[a]	4					148 ± 21
			Assay #2 - Revertants per Plate (mean ± SD)				
Without Activation	Vehicle	0	20 ± 2	134 ± 3	12 ± 3	7 ± 2	28 ± 1
	ISIS 505358	78.1	20 ± 2	121 ± 12	10 ± 1	7 ± 1	25 ± 1
		156.3	20 ± 2	133 ± 6	11 ± 2	7 ± 2	23 ± 3
		312.5	20 ± 3	138 ± 11	10 ± 2	6 ± 0	23 ± 4
		625	21 ± 2	132 ± 13	12 ± 1	6 ± 1	22 ± 5
		1250	21 ± 3	131 ± 7	12 ± 3	6 ± 1	23 ± 3
		2500	22 ± 2	131 ± 8	14 ± 3	8 ± 2	23 ± 2
		5000	19 ± 1	130 ± 10	11 ± 1	6 ± 0	21 ± 1
	2-Nitrofluorene[a]	2	337 ± 17				
	Sodium azide[a]	0.5		395 ± 9	349 ± 29		
	9-Aminoacridine[a]	50				161 ± 14	
	4-Nitroquinoline N-oxide[a]	0.5					81 ± 6

Bacterial Reverse Mutation Assay (AMES) (Continued)

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay #2 - Revertants per Plate (mean ± SD) (Continued)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvr*A
Without Activation	4-Nitroquinoline N-oxide[a]	1					185 ± 10
	2-Aminoanthracene[a]	2			14 ± 3		
	Benzo(a)pyrene[a]	2	19 ± 5				
With Activation	Vehicle	0	35 ± 2	126 ± 2	12 ± 2	13 ± 2	28 ± 3
	ISIS 505358	78.1	32 ± 1	138 ± 6	11 ± 2	13 ± 2	27 ± 3
		156.3	36 ± 6	137 ± 3	13 ± 3	12 ± 1	25 ± 4
		312.5	35 ± 1	141 ± 4	12 ± 3	11 ± 2	26 ± 4
		625	39 ± 4	139 ± 3	13 ± 1	15 ± 1	25 ± 3
		1250	32 ± 3	137 ± 4	12 ± 2	13 ± 1	29 ± 3
		2500	32 ± 3	138 ± 4	11 ± 3	12 ± 2	25 ± 3
		5000	34 ± 2	138 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	29 ± 2
	2-Aminoanthracene[a]	2			110 ± 5		
	Benzo(a)pyrene[a]	2	409 ± 15	473 ± 37		153 ± 11	
	2-Aminoanthracene[a]	4					93 ± 9

a Positive control

Table 20 Chromosome Aberration Assay

Report Title: Evaluation of ISIS 505358 (bepirovirsen sodium ; GSK3228836) in Chinese Hamster Lung (CHL) Cells for Induction of Chromosome Aberrations		**Study No. 505358-IS02**
Test for Induction of: Chromosome aberrations	No. of Independent Assays: 1	Location in CTD: m4.2.3.3.1
Strains: Chinese Hamster Lung (CHL) Cells	No. of Replicate Cultures: 2	GLP Compliance: Yes
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9	No. of Cells Analyzed/Cultured: 5 x 10^5 cells/25 cm^2	
Vehicles: for Test Article: Distilled water	For Positive Controls: Distilled water	**GSK Document Number:** 2019N419080
Treatment: Incubation for 6 or 22 hours		Date of Treatment: 18 March 2013
Cytotoxic Effects: Negative at concentrations up to 500 µg/mL		
Genotoxic Effects: Negative in both the presence and absence of Aroclor-induced rat liver S9		

			6 Hours - Aberrant Metaphases				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Time[b] (hours)**	**Mean Aberrant Metaphases**	**Mean Total Aberrations**	**Mean of PP + ER**	**Relative Cell Counts (%)**
With Activation	Vehicle	0	6-18	1.0/1.0[c]	1.0/1.0	1.0 + 0.0	100
	ISIS 505358	62.5	6-18		Not Counted		
		125	6-18	2.0/2.0	4.5/4.5	1.5 + 0.0	96
		250	6-18	0.0/0.0	0.0/0.0	1.5 + 0.5	98
		500	6-18	0.5/0.5	1.0/1.0	2.5 + 0.0	95
	Cyclophosphamide[a]	6	6-18	20.0/18.5**	23.5/22.0	1.5 + 0.0	75
Without Activation	Vehicle	0	6-18	1.0/0.5	1.0/0.5	1.5 + 0.0	100
	ISIS 505358	62.5	6-18		Not Counted		
		125	6-18	2.0/1.0	2.5/1.5	1.5 + 0.0	96
		250	6-18	1.0/0.5	1.5/1.0	1.5 + 0.0	101
		500	6-18	2.0/2.0	2.0/2.0	3.0 + 0.0	95
	Ethyl methanesulfonate[a]	800	6-18	30.5/30.5**	51.0/50.0	0.5 + 0.0	58

Chromosome Aberration Assay (Continued)

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/mL)	22 Hours - Aberrant Metaphases				
			Time[b] (hours)	Mean Aberrant Metaphases	Mean Total Aberrations	Mean of PP + ER	Relative Cell Counts (%)
Without Activation	Vehicle	0	22-2	0.5/0.0	0.5/0.0	0.5 + 0.0	100
	ISIS 505358	62.5	22-2	Not Counted			
		125	22-2	2.0/1.0	2.5/1.5	1.0 + 0.0	99
		250	22-2	3.0/1.0	3.0/1.0	1.0 + 0.0	91
		500	22-2	1.0/0.0	1.0/0.0	2.0 + 0.0	89
	Ethyl methanesulfonate[a]	600	22-2	52.0/51.0**	95.0/91.5	1.0 + 0.0	39

**Significantly different from the control at *P*<0.01
Vehicle versus test article-treated groups: After carrying out χ2-test, performed Fisher's exact test, if *P*<0.05.
Dose-response: If significant χ2-test and Fisher's exact test, Cochran-Armitage trend test was used.
Vehicle versus positive control groups: Fisher's exact test.
a Positive control
b Treatment time-recovery time
c Gaps included/excluded, means of duplicate cultures; 100 metaphases were examined per culture.
Abbreviations: PP, Polyploid; ER, Endoreduplication; +, Presence of S-9 activation; –, Absence of S-9 activation

9. GENOTOXICITY: IN VIVO

Table 21 Mammalian Micronucleus Assay in Bone Marrow Erythrocytes in Mice

Genotoxicity: In Vivo

Report Title: GSK3228836 (ISIS 505358): Mammalian Micronucleus Assay in Bone Marrow Erythrocytes Following Subcutaneous Injection in ICR Mice

Test Article: bepirovirsen sodium (GSK3228836, or ISIS 505358)
Batch Number: [redacted]

Test for Induction of: Micronuclei in polychromatic erythrocytes (PCE) from bone marrow

Treatment Schedule: Single doses (vehicle, test article & positive control).

KIT Study No.: G116173
GSK Document No.: 2019N419174

Species/Strain: Mouse: ICR/CrljOri:CD1

Sampling Time: 24 hr post-dose (all groups)
48hr post-dose (vehicle control and test article groups)

Location in CTD: m4.2.3.3.2

Approximate Age: Approximately 7 weeks at time of dosing

Method of Administration: Subcutaneous injection (vehicle & test article). Intraperitoneal injection (positive control)
Dose volume: 10 mL/kg

Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes (PCE)

Vehicle/Formulation: Sterile 0.9% sodium chloride

GLP Compliance: Yes (with the exception of liver bioanalysis)

No. of Cells Analysed/Animal: 4000 PCE

Date of Dosing: November 2016

Special Features: None
Toxic/Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: Not Genotoxic
Evidence of Exposure: Bioanalysis of frozen liver samples from the first 3 mice/sex/time point from all groups were collected at approximately 24 and 48 hours post-dose. The concentration of GSK3228836 measured and ranged from 317.1 to 579.1 µg/g and 276.4 to 491.8 µg/g, in males and females respectively.

G116173: 24 Hours Sampling

Test Article	Dose (mg/kg/day)	No. of Animals Analysed	Group Mean PCE:NCE Ratio[1]	Group Mean MPCE/4000 PCE[2]
Vehicle control	0	6M	0.54	6.17
Vehicle control	0	6F	0.52	7.00
GSK3228836	500	6M	0.56	6.33
GSK3228836	500	6F	0.55	6.50
GSK3228836	1000	6M	0.56	7.00
GSK3228836	1000	6F	0.60	7.00
GSK3228836	2000	6M	0.58	5.83
GSK3228836	2000	6F	0.58	7.67
Cyclophosphamide	70	6M	0.51	133.33[3]
Cyclophosphamide	70	6F	0.50	114.17[3]

Mammalian Micronucleus Assay in Bone Marrow Erythrocytes in Mice (Continued)

Genotoxicity: In Vivo

Report Title: ISIS 505358 (GSK3228836): Mammalian Micronucleus Assay in Bone Marrow Erythrocytes Following Subcutaneous Injection in ICR Mice

Test Article: bepirovirsen sodium (GSK3228836, or ISIS 505358)
Batch Number: [redacted]

G116173: 48 Hours Sampling

Test Article	Dose (mg/kg/day)	No. of Animals Analysed	Group Mean PCE:NCE Ratio[1]	Group Mean MPCE/4000 PCE[2]
Vehicle control	0	6M	0.50	6.17
Vehicle control	0	6F	0.53	7.50
GSK3228836	500	6M	0.53	7.00
GSK3228836	500	6F	0.53	5.83
GSK3228836	1000	6M	0.55	6.67
GSK3228836	1000	6F	0.56	6.33
GSK3228836	2000	6M	0.66[3]	5.83
GSK3228836	2000	6F	0.62[3]	7.50

F = Female, M = Male, NCE = Normochromatic erythrocytes.

1. Group mean PCE:NCE Ratio = PCE/(PCE+NCE)
2. Group mean number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MPCE).
3. Statistically significant increase in the group mean PCE:NCE ratio ($P<0.05$) when compared to the group mean vehicle control, but within the laboratory historical control range [95% limit 0.42-0.68 males; 0.41-0.75 females].

10. CARCINOGENICITY

Table 22 104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice

Study Type: Carcinogenicity	**Report Title:** GSK3228836A: A 2-Year (Once Weekly) Subcutaneous Injection Carcinogenicity Study in CD-1 Mice	**Test Item: bepirovirsen sodium (GSK3228836 and ISIS 505358)** **Batch No.:** [redacted] / [redacted]
Species/Strain: Mouse/Crl:CD-1 (ICR) **Initial Age:** 8 weeks	**Duration of Dosing:** 2 years (104 weeks) **Route/Frequency:** Subcutaneous injection/ Once on Days 1, 4, 8, and 11 then once weekly starting Day 15	**GSK Reference No.:** M72326G **GSK Document Number:** 2021N489170 **Location in CTD:** m4.2.3.4.1
Date of First Dose: 21 Oct 2021	**Vehicle/Formulation:** 0.9% (w/v) Aqueous Sodium Chloride for Injection, USP/Solution	**Study in Compliance with GLP:** Yes

Data Collected: Mortality, clinical observations (including postdose observations, detailed clinical observations, and palpable mass observations), body weight, ophthalmoscopy, bioanalysis (liver and kidney), blood smears (not evaluated), macroscopic and microscopic observations.

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Conclusion: GSK3228836A (sodium salt) given to CD1 mice by subcutaneous injection once weekly for 104 weeks at doses of 0 (vehicle), 3, 10, and 30 mg/kg/dose resulted in increased mortality in males at 30 mg/kg/dose.

GSK3228836-related neoplastic microscopic findings included an increased incidence of hepatocellular carcinoma in males given ≥ 10 mg/kg/dose and females given 30 mg/kg/dose, hepatocellular adenoma in males and females given 30 mg/kg/dose, liver hemangiosarcoma in males at all doses and females given 30 mg/kg/dose, and liver hemangioma in males given 30 mg/kg/dose. Fibrosarcoma were noted at the injection site in males given ≥ 10 mg/kg/dose and in skin that was in proximity to the injection sites in males given 30 mg/kg/dose. At 30 mg/kg/dose, both sexes had an increase in whole body hemangiosarcoma and combined hemangiosarcoma/hemangioma, and females given 10 mg/kg/dose had an increase in whole body hemangiosarcoma. Non-neoplastic microscopic changes (hepatocellular hypertrophy generally with karyocytomegaly, hepatocellular cytoplasmic alteration, and Kupffer cells with basophilic granules) were observed in the liver of both sexes in all dose groups in a dose-dependent manner, although the incidence and/or severity of findings was greater in males compared to those in females in each dose group. Other non-neoplastic GSK3228836-related microscopic changes in the liver consisted of single cell necrosis observed in both sexes at 30 mg/kg/dose and increased mitoses and mononuclear cell infiltration in males at 30 mg/kg/dose and females at ≥ 10 mg/kg/dose. Hepatic foci of alteration were increased in incidence and/or severity in both sexes at 30 mg/kg/dose. Tubular epithelial basophilic granules were observed in the kidneys of both sexes in all dose groups in a dose-dependent manner. Exacerbation of chronic progressive nephropathy, a known class effect of ASOs, was also observed in males at 30 mg/kg/dose. There were minimal to mild macrophages with cytoplasmic basophilic granules in multiple tissues [injection sites, heart, parotid and mandibular salivary glands, skin, urinary bladder, pancreas, tongue, skeletal muscle, lymph nodes (mandibular, mesenteric, axillary, tracheobronchial and pancreatic), epididymides, testes, prostate, seminal vesicles, preputial gland, uterus, vagina, cecum and brain choroid plexus] of males and females at all doses. The injection site had an increased incidence of minimal fibrosis in males and females at ≥ 10 mg/kg/dose. The mammary gland of females given 30 mg/kg/dose had an increased incidence and/or severity of ectasia and lobuloalveolar hyperplasia with atypical hyperplasia in 3 animals.

A GSK3228836-related decrease in mean body weight was observed in males and females at 30 mg/kg/dose. The incidence of GSK3228836-related clinical signs increased with dose.

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Study Type: Carcinogenicity					**GSK Reference No.:** M72326G			
	Male				**Female**			
Dose (mg/kg/dose)[a]	0	3	10	30	0	3	10	30
Numbers of Animals:								
Main	70	70	70	70	70	70	70	70
Tissue Analysis	6	6	6	6	6	6	6	6
GSK3228836 Concentration (ng/g)								
Kidney Day 92	NQ	28200	76700	85700	NQ	44900	147000	229000
Liver Day 92	NQ	14400	43600	161000	NQ	14400	43600	121000
Noteworthy Findings								
Died/Killed Moribund	35	37	35	55	49	46	54	51
Survival (%) Week 102 (M)/104(F)	50	47	50	21	30	34	23	27
Major cause of demise in preterminal decedent animals								
Number examined	35	37	35	55	49	46	54	51
Undetermined	3	5	1	7	2	0	6	3
Chronic progressive nephropathy	0	3	3	4	4	3	3	5
Inflammation/abscess/skin ulceration/sepsis								
Obstructive uropathy	8	2	3	4	1	1	1	0
Ovary hemorrhage/hemorrhagic cyst or bursa dilatation	6	7	5	4	0	0	0	0
Ovary/oviduct inflammation	N/A	N/A	N/A	N/A	3	5	4	2
All other non-neoplastic causes	N/A	N/A	N/A	N/A	10	5	9	3
Neoplastic:	7	5	2	4	6	5	7	7
Histiocytic sarcoma								
Injection site, fibrosarcoma	0	1	1	1	2	3	1	2
Liver, hemangiosarcoma	0	0	2	3	0	0	0	0
Liver, hepatocellular carcinoma	2	4	4	6	0	0	0	2
Lung, bronchioloalveolar carcinoma	1	3	2	9	0	0	0	1
Lymphoma, malignant	5	2	3	1	2	0	5	3
Skin, fibrosarcoma	1	0	1	2	8	7	9	4
Uterus/cervix, hemangiosarcoma	1	0	1	5	1	4	0	1
All other neoplastic causes	N/A	N/A	N/A	N/A	1	4	3	3
	2	2	7	5	9	9	7	15

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

	Male				Female			
Dose (mg/kg/dose)[a]	**0**	**3**	**10**	**30**	**0**	**3**	**10**	**30**
Clinical Observations								
Backbone Prominent								
Number of animals	18	17	21	18	22	20	20	35
Number of observations	71	78	58	91	79	83	46	114
Fur, Thin Cover, Dorsal Cervical								
Number of animals	21	21	34	43	27	30	28	47
Number of observations	286	210	352	594	215	195	401	872
Fur, Thin Cover, Dorsal Thoracic								
Number of animals	16	11	32	31	18	17	13	35
Number of observations	120	49	296	417	116	67	64	544
Fur, Thin Cover, Interscapular								
Number of animals	12	8	24	29	13	11	13	40
Number of observations	84	49	193	486	69	43	99	598
Fur, Thin Cover, Cranium								
Number of animals	13	8	15	12	10	16	16	39
Number of observations	52	93	85	123	35	45	156	572
Skin pallor								
Number of animals	16	19	28	30	20	30	29	39
Number of observations	46	46	78	167	34	84	65	149
Skin, Scab, Dorsal Cervical								
Number of animals	14	14	26	38	8	15	13	28
Number of observations	113	91	155	286	39	26	51	182
Skin, Scab, Dorsal Thoracic								
Number of animals	17	8	24	27	6	4	6	20
Number of observations	52	23	104	175	17	13	15	127
Skin, Scab, Interscapular								
Number of animals	9	5	15	28	4	4	7	25
Number of observations	30	22	70	182	14	9	21	169
Body Weight (Xcontrol[b])	g				g			
Day 392	51.12	1.01	1.05	0.98	41.75	0.97	1.00	0.90*
Day 504	50.07	1.03	1.04	0.94*	40.48	1.01	1.02	0.93
Day 560	48.79	1.03	1.04	0.93*	39.61	1.04	0.98	0.96
Day 616	49.17	1.01	1.03	0.90*	40.16	1.03	1.03	0.91*

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Clinical Observations								
Day 644	48.69	1.02	1.03	0.91*	40.56	1.03	1.02	0.89*
Day 672	47.75	1.03	1.05	0.91*	39.58	1.04	1.04	0.91
Day 700	47.46	1.01	1.04	0.91*	38.47	1.08	1.07	0.95
Body Weight Gains (Xcontrol[b])	g							
Day -1 to 700	12.83	0.97	1.13	0.64*	N/A	N/A	N/A	N/A
Day -1 to 728	12.77	0.98	1.05	0.32*	12.40	1.08	0.95	0.73
Macroscopic Examination								
Liver (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Focus, dark	1	1	9	10	2	7	8	4
Focus, raised	4	4	3	13	3	4	1	1
Mass	14	18	21	36	2	2	4	7
Nodule	4	6	11	6	4	2	4	7
Site, injection (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Mass	0	0	0	2	0	0	1	0
Microscopic Examination Neoplastic lesions								
Adipose tissue (No. Examined)	1	2	3	1	3	7	4	2
Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Hemangiosarcoma	0	0	0	1	0	0	1	0
Islet cell carcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Leiomyosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Lipoma; angiomatous	0	0	1	0	0	0	0	0
M-Lymphoma	0	0	0	0	1	3	1	1
Artery, aorta (No. Examined)	66	66	68	68	68	61	61	61
Bronchioloalveolar carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
M-Lymphoma	2	0	0	1	5	6	4	0
Body cavity, abdominal (No. Examined)	1	1	0	0	0	2	2	0
Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
M-Lymphoma	0	0	0	0	0	1	0	0

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Microscopic Examination **Neoplastic lesions**								
Body cavity, nasal (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	69
Adenoma	1	0	0	0	0	0	0	0
M-Lymphoma	0	1	0	1	2	2	2	0
Odontoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Body cavity, thoracic (No. Examined)	2	0	0	0	0	1	1	1
Bronchioloalveolar carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
M-Lymphoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Body cavity, pelvic (No. Examined)	4	1	1	0	0	0	0	0
Adenoma; bulbourethral gland	0	0	1	0	0	0	0	0
Bone (No. Examined)	0	2	1	2	0	0	1	2
Osteosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Bone marrow (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Hemangiosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	2
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	1	1	1	1
Leukemia, granulocytic	1	0	0	0	0	0	0	1
M-Lymphoma	1	1	1	2	5	9	5	3
M-Lymphoma, plasmacytic	0	0	1	0	0	0	0	0
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Brain (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
B-Meningioma	0	1	0	0	0	0	0	1
Bronchioloalveolar carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Carcinoma, pars distalis	0	0	0	0	2	0	0	0
Carcinoma, pars intermedia	1	0	0	3	0	2	1	0
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
M-Glioma; not otherwise specified	1	0	0	0	0	0	0	0
M-Lymphoma	0	1	0	0	1	3	4	0
M-Meningioma	0	0	0	0	0	1	1	1
M-Oligodendroglioma	1	0	1	0	0	0	0	0

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Microscopic Examination **Neoplastic lesions**								
Cervix (No. Examined)					69	70	69	70
Endometrial adenocarcinoma					0	1	0	0
Endometrial stromal sarcoma					0	0	1	0
Fibrosarcoma					1	0	0	0
Hemangiosarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0
Histiocytic sarcoma					2	0	1	1
Leiomyoma					0	0	1	0
M-Lymphoma					5	7	4	0
Squamous cell carcinoma					2	0	0	0
Epididymis (No. Examined)	70	70	70	70				
Histiocytic sarcoma	0	1	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A
Interstitial (leydig) cell adenoma	1	0	0	0				
M-Lymphoma	1	0	0	3				
Eye (No. Examined)	69	70	68	69	70	70	70	69
M-Lymphoma	0	0	0	2	1	5	2	0
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Gallbladder (No. Examined)	67	68	69	70	70	70	69	68
Adenoma; papillary	0	1	0	0	0	0	1	0
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
M-Lymphoma	1	0	0	1	2	5	2	0
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Gland, adrenal (No. Examined)	70	70	68	70	69	70	70	70
B-Pheochromocytoma	0	1	2	1	2	0	0	2
B-Subcapsular adrenal tumor	8	6	7	5	1	2	0	3
Cortical adenoma	0	0	2	1	0	0	0	0
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	1	0	0	1
M-Lymphoma	1	1	1	2	6	9	3	3
M-Pheochromocytoma	0	0	0	0	0	0	1	1
Gland, clitoral (No. Examined)					70	69	69	69
Hemangioma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1	0	0
M-Lymphoma					1	4	3	3

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Microscopic Examination **Neoplastic lesions**								
Gland, harderian (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	69
Adenoma	8	7	10	9	2	2	3	0
Adenocarcinoma	1	1	3	0	1	2	1	1
M-Lymphoma	1	0	0	1	4	3	2	0
Gland, lacrimal (No. Examined)	4	2	1	2	3	1	0	2
Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	1
B-Schwannoma	2	1	0	0	0	0	0	0
M-Lymphoma	0	0	0	0	1	1	0	0
Gland, mammary (No. Examined)	13	14	13	23	70	69	69	68
Adenoma	0	0	0	0	0	1	0	1
Adenocarcinoma	0	0	0	0	3	4	4	3
M-Lymphoma	0	0	0	0	0	6	3	1
Gland, parathyroid (No. Examined)	67	65	66	66	63	66	64	65
Adenoma	0	0	0	0	0	1	0	1
M-Lymphoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Gland, pituitary (No. Examined)	70	70	68	69	69	70	66	67
Adenoma, pars distalis	1	1	1	0	5	5	1	9
Adenoma, pars intermedia	0	0	1	0	5	0	1	4
Carcinoma, pars distalis	0	0	0	0	2	0	0	0
Carcinoma, pars intermedia	1	0	0	3	0	2	1	0
M-Lymphoma	0	0	0	1	0	1	2	0
Gland, preputial (No. Examined)	70	70	69	70				
Fibrosarcoma	0	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
Hemangiosarcoma	1	0	0	0				
M-Lymphoma	1	0	0	3				
Gland, prostate (No. Examined)	69	69	70	70				
Adenoma	1	0	0	0				
Adenocarcinoma	1	0	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
Histiocytic sarcoma	0	1	0	0				
M-Lymphoma	1	1	0	3				

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Microscopic Examination **Neoplastic lesions**								
Gland, salivary, mandibular (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	69
M-Lymphoma	1	0	0	2	7	9	2	5
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Gland, salivary, parotid (No. Examined)	70	70	70	70	69	70	69	69
M-Lymphoma	1	0	0	2	5	6	3	0
Gland, salivary, sublingual (No. Examined)	70	70	70	70	70	69	70	69
M-Lymphoma	1	0	0	1	2	4	2	1
Gland, seminal, vesicle (No. Examined)	70	70	70	70				
Histiocytic sarcoma	0	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
Leiomyosarcoma	1	0	0	0				
M-Lymphoma	1	1	1	3				
Gland, thyroid (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	69
C-cell adenoma	0	2	0	0	0	0	0	0
Follicular cell adenoma	0	0	0	0	1	0	0	1
Follicular cell carcinoma	0	0	0	1	0	1	0	0
M-Lymphoma	1	0	0	2	2	3	2	0
Heart (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	69
Bronchioloalveolar carcinoma	2	0	0	0	0	0	2	0
Hemangiosarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
M-Lymphoma	2	0	0	2	5	6	5	1
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Osteosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Hemolymphoreticular tissue (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Histiocytic sarcoma	1	1	1	2	3	3	2	3
Leukemia, granulocytic	1	0	0	0	0	0	0	1
M-Lymphoma	2	2	1	4	12	12	10	13
M-Lymphoma; plasmacytic	0	0	1	0	0	0	0	0

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Microscopic Examination **Neoplastic lesions**								
Joint (No. Examined)	68	70	69	69	70	70	70	70
M-Lymphoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Kidney (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
B-Oncocytoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Bronchioloalveolar carcinoma	0	0	0	0	0	0	2	0
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Endometrial stromal sarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Histiocytic sarcoma	0	1	1	0	2	1	1	3
Leiomyosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Leukemia, granulocytic	0	0	0	0	0	0	0	1
M-Lymphoma	1	2	1	2	9	11	8	5
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Transitional cell carcinoma	0	0	1	1	0	0	0	0
Tubular cell adenoma	2	0	0	2	0	0	0	0
Large intestine, cecum (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
M-Lymphoma	0	0	0	1	3	1	2	0
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Large intestine, colon (No. Examined)	70	70	69	70	70	70	70	70
M-Lymphoma	0	0	0	1	2	2	0	0
Large intestine, rectum (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	0	0	1	0	0
M-Lymphoma	0	0	0	2	4	4	2	0
Larynx (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	69
M-Lymphoma	1	0	0	2	2	3	3	1

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Microscopic Examination **Neoplastic lesions**								
Liver (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Fibrosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Hepatocellular adenoma	12	11	14	27	1	3	0	10
Hepatocellular carcinoma	6	13	21	26	0	0	0	2
Hemangioma	0	1	1	3	0	0	1	1
Hemangiosarcoma	3	7	7	14	0	4	2	5
Histiocytic sarcoma	1	1	1	1	2	3	2	2
Leiomyosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Leukemia, granulocytic	1	0	0	0	0	0	0	1
M-Lymphoma	1	2	1	2	6	10	7	9
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Osteosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Lung (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	69
Adenocarcinoma	0	0	0	0	1	0	1	1
Bronchioloalveolar adenoma	15	13	17	10	7	9	8	7
Bronchioloalveolar carcinoma	24	16	16	10	6	8	9	9
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Fibrosarcoma	0	0	0	0	1	1	0	0
Hepatocellular carcinoma	0	0	0	1	0	0	0	0
Histiocytic sarcoma	1	0	1	1	2	2	1	1
M-Lymphoma	2	1	1	3	9	11	10	9
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Osteosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Lymph node (No. Examined)	4	3	11	12	16	10	14	21
Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Histiocytic sarcoma	1	0	1	1	0	1	0	2
M-Lymphoma	0	1	1	0	5	3	2	8
Lymph node, axillary (No. Examined)	6	7	6	14	11	19	13	20
Histiocytic sarcoma	1	0	1	0	2	1	1	0
M-Lymphoma	1	1	0	1	4	6	3	6

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Microscopic Examination **Neoplastic lesions**								
Lymph node, mandibular (No. Examined)	69	69	69	66	69	68	67	68
Hemangiosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Histiocytic sarcoma	1	0	0	1	1	0	0	0
M-Lymphoma	1	1	1	2	8	8	5	5
Lymph node, mesenteric (No. Examined)	70	70	69	68	67	68	68	70
Hemangioma	2	0	1	1	0	1	0	1
Hemangiosarcoma	1	0	0	1	0	1	1	2
Histiocytic sarcoma	0	0	0	1	1	1	1	1
M-Lymphoma	1	1	1	3	8	7	6	4
Lymph node, tracheobronchial (No. Examined)	11	6	9	7	16	8	14	17
Bronchioloalveolar carcinoma	1	0	0	0	0	0	1	0
Histiocytic sarcoma	1	0	0	0	1	1	0	1
M-Lymphoma	1	1	1	1	7	4	4	5
Mesentery (No. Examined)	0	1	0	0	2	0	0	1
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
M-Lymphoma	0	0	0	0	2	0	0	0
Muscle, skeletal (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Bronchioloalveolar carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Hemangiosarcoma	0	0	1	1	0	0	0	0
Leukemia, granulocytic	1	0	0	0	0	0	0	0
M-Lymphoma	1	1	0	2	2	7	3	2
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Nerve, sciatic (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Leukemia, granulocytic	1	0	0	0	0	0	0	0
M-Lymphoma	0	0	0	1	2	5	3	1

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Microscopic Examination **Neoplastic lesions**								
Ovary (No. Examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	68	70	70	70
B-Granulosa cell tumor					0	1	2	0
Bronchioloalveolar carcinoma					0	0	2	0
B-Sertoli cell tumor					0	1	1	0
Cystadenoma					2	2	3	2
Endometrial adenocarcinoma					1	0	1	0
Endometrial stromal sarcoma					1	0	0	0
Hemangioma					1	0	1	2
Hemangiosarcoma					0	0	1	0
Histiocytic sarcoma					1	1	0	1
Leiomyoma					2	1	0	0
Leiomyosarcoma					0	1	0	0
Luteoma					1	0	0	0
M-Lymphoma					5	8	8	5
Oviduct (No. Examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	1	0
M-Lymphoma					0	0	1	0
Pancreas (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	69
Bronchioloalveolar carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Histiocytic sarcoma	0	1	0	0	0	1	0	2
Islet cell adenoma	1	0	1	0	1	0	0	0
Islet cell carcinoma	0	0	1	0	0	0	0	1
Leiomyosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
M-Lymphoma	1	0	0	2	7	7	5	4
Pericardium (No. Examined)	0	0	0	0	0	0	1	1
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Site, injection (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Fibroma	0	0	1	0	0	0	0	0
Fibrosarcoma	0	0	2	7	0	0	0	0
Hemangioma	1	0	1	0	0	0	0	0
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Lipoma	1	0	0	0	0	0	0	0
M-Lymphoma	0	0	0	2	3	5	3	4
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Microscopic Examination **Neoplastic lesions**								
Skin (No. Examined)	70	69	67	69	70	68	70	70
Fibrosarcoma	1	0	1	6	1	4	0	1
Hemangiosarcoma	0	0	1	1	0	2	0	1
Histiocytic sarcoma	0	0	1	0	1	0	0	0
Keratoacanthoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Lipoma; angiomatous	0	0	1	0	0	0	0	0
M-Basal cell tumor	0	0	0	0	0	1	1	0
M-Lymphoma	1	2	0	2	3	4	4	3
Osteosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Sebaceous cell adenoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Squamous cell carcinoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Squamous cell papilloma	1	0	0	0	0	1	0	1
Small intestine, duodenum (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Adenoma	0	0	0	0	0	1	0	1
Adenocarcinoma	0	0	0	0	2	0	0	0
Leiomyosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
M-Lymphoma	0	0	0	0	6	2	1	0
Small intestine, ileum (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
M-Lymphoma	0	1	0	0	3	1	1	0
Small intestine, jejunum (No. Examined)	69	69	69	68	70	68	69	69
Adenoma	0	0	0	1	0	0	0	0
Adenocarcinoma	1	0	1	0	0	0	0	0
M-Lymphoma	0	1	0	0	3	1	1	0
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Spinal cord, lumbar (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
B-Meningioma	0	0	0	0	0	1	0	0
M-Lymphoma	0	0	0	0	0	0	1	1
M-Meningioma	0	0	0	0	0	1	0	0

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Microscopic Examination **Neoplastic lesions**								
Spleen (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Adenocarcinoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Hemangiosarcoma	3	1	6	5	1	2	4	5
Histiocytic sarcoma	1	1	0	1	1	0	0	1
Leiomyosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Leukemia, granulocytic	1	0	0	0	0	0	0	1
M-Lymphoma	1	2	1	4	10	12	6	10
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Stomach (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Adenoma	0	0	0	5	0	0	0	0
Adenocarcinoma	0	2	0	1	0	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	1	1	0	0
Leiomyosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Leukemia, granulocytic	1	0	0	0	0	0	0	0
M-Lymphoma	1	0	0	2	7	8	5	2
M-Mast cell tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Squamous cell carcinoma	0	1	0	1	0	0	0	0
Squamous cell papilloma	0	1	0	0	0	0	0	0
Subcutis (No. Examined)	2	3	3	0	1	3	2	4
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
M-Lymphoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Tail (No. Examined)	1	0	1	3	1	0	1	1
B-Basal cell tumor	0	0	1	0	0	0	0	0
Fibrosarcoma	1	0	0	1	0	0	1	1
Osteosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Testis (No. Examined)	70	70	70	70				
Interstitial (leydig) cell adenoma	2	2	5	3	N/A	N/A	N/A	N/A
Interstitial (leydig) cell carcinoma	0	0	1	0				
M-Lymphoma	0	0	0	1				

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Microscopic Examination Neoplastic lesions								
Thymus (No. Examined)	66	66	67	67	68	68	70	68
Bronchioloalveolar carcinoma	1	0	0	0	0	0	1	0
B-Thymoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
M-Lymphoma	1	0	1	3	11	11	6	9
Tongue (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	69	69
Leukemia, granulocytic	1	0	0	0	0	0	0	1
M-Lymphoma	1	0	0	1	0	0	0	0
Trachea (No. Examined)	69	70	70	70	70	70	69	69
Bronchioloalveolar carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
M-Lymphoma	1	0	0	1	3	5	3	2
Ureter (No. Examined)	1	2	6	0	1	0	0	2
M-Lymphoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Urinary bladder (No. Examined)	70	70	69	70	64	70	68	70
Endometrial stromal sarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Hemangiosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Histiocytic sarcoma	0	1	0	0	0	1	0	1
Leukemia, granulocytic	1	0	0	0	0	0	0	0
M-Lymphoma	1	1	0	2	7	9	4	4
Transitional cell carcinoma	0	0	2	0	0	0	0	0

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Microscopic Examination **Neoplastic lesions**								
Uterus (No. Examined)					69	70	70	70
B-Mixed muellerian tumor					0	1	0	0
Endometrial adenoma					0	0	0	1
Endometrial adenocarcinoma					5	5	3	3
Endometrial stromal polyp					4	4	4	3
Endometrial stromal sarcoma					3	4	1	2
Fibroma					0	0	0	1
Hemangioma					1	2	0	0
Hemangiosarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	4	8	4	5
Histiocytic sarcoma					3	2	1	1
Leiomyoma					5	4	5	3
Leiomyosarcoma					1	1	3	0
M-Deciduoma					0	0	0	1
M-Lymphoma					8	8	6	2
M-Schwannoma					0	0	0	1
Polyp; glandular					3	2	3	2
Squamous cell carcinoma					1	0	0	0
Vagina (No. Examined)					69	69	70	67
Endometrial adenocarcinoma					0	1	0	0
Histiocytic sarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	2	0	0	0
Leiomyosarcoma					0	1	0	0
M-Lymphoma					3	8	3	0
Squamous cell carcinoma					1	0	0	0
Non-neoplastic lesions								
Brain (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Basophilic granules; macrophage; choroid plexus	0	0	0	36	0	0	0	21
Minimal	0	0	0	36	0	0	0	21
Epididymis (No. Examined)	70	70	70	70				
Basophilic granules; macrophage	0	2	5	67	N/A	N/A	N/A	N/A
Minimal	0	2	5	66				
Mild	0	0	0	1				

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Non-neoplastic lesions								
Gland, mammary (No. Examined)	13	14	13	23	70	69	69	68
Ectasia	1	0	0	0	11	16	20	31
Minimal	1	0	0	0	9	14	19	22
Mild	0	0	0	0	2	2	1	8
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Hyperplasia; atypical	0	0	0	0	0	1	0	3
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	1	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Hyperplasia; lobuloalveolar	0	0	0	0	0	2	1	9
Minimal	0	0	0	0	0	1	1	4
Mild	0	0	0	0	0	1	0	5
Gland, preputial (No. Examined)	70	70	69	70				
Basophilic granules; macrophage	0	0	0	19	N/A	N/A	N/A	N/A
Minimal	0	0	0	19				
Gland, prostate (No. Examined)	69	69	70	70				
Basophilic granules; macrophage	0	2	7	58	N/A	N/A	N/A	N/A
Minimal	0	2	7	58				
Gland, salivary, mandibular (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	69
Basophilic granules; macrophage	0	7	14	62	0	0	10	50
Minimal	0	7	14	61	0	0	10	50
Mild	0	0	0	1	0	0	0	0
Gland, salivary, parotid (No. Examined)	70	70	70	70	69	70	69	69
Basophilic granules; macrophage	0	12	52	63	0	5	41	60
Minimal	0	12	52	63	0	5	41	60
Gland, seminal vesicle (No. Examined)	70	70	70	70				
Basophilic granules; macrophage	0	0	0	3	N/A	N/A	N/A	N/A
Minimal	0	0	0	3				

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Non-neoplastic lesions								
Heart (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	69
Basophilic granules; macrophage	0	2	44	68	0	0	14	61
Minimal	0	2	44	54	0	0	14	61
Mild	0	0	0	14	0	0	0	0
Kidney (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Basophilic granules; epithelial, tubular	0	13	36	62	0	3	57	68
Minimal	0	13	36	57	0	2	56	60
Mild	0	0	0	5	0	1	1	8
Basophilic granules; interstitial, macrophage	0	0	0	5	0	0	0	0
Minimal	0	0	0	4	0	0	0	0
Mild	0	0	0	1	0	0	0	0
Chronic progressive nephropathy	67	67	68	65	64	66	62	67
Minimal	36	33	45	30	51	47	50	41
Mild	28	27	18	26	7	14	7	18
Moderate	3	4	2	3	1	2	2	3
Marked	0	3	3	6	5	3	3	5
Large intestine, cecum (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Basophilic granules; macrophage	0	0	0	1	0	0	0	0
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	0
Liver (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Basophilic granules; Kupffer cell	0	17	55	68	0	15	38	62
Minimal	0	17	51	24	0	14	35	36
Mild	0	0	4	40	0	1	3	25
Moderate	0	0	0	4	0	0	0	0
Marked	0	0	0	0	0	0	0	1
Cytoplasmic alteration; hepatocellular	1	22	35	63	1	10	17	51
Minimal	1	14	27	20	1	10	17	36
Mild	0	8	8	43	0	0	0	14
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	**3**	**10**	**30**	**0**	**3**	**10**	**30**
Non-neoplastic lesions								
Focus of cellular alteration basophilic,	5	6	6	21	0	1	0	4
Minimal	4	6	6	16	0	1	0	4
Mild	1	0	0	4	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0
Focus of cellular alteration clear cell,	4	7	2	12	0	1	1	2
Minimal	3	6	2	9	0	1	0	2
Mild	1	1	0	1	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0
Marked	0	0	0	1	0	0	0	0
Focus of cellular alteration, Eosinophilic	1	1	1	8	1	1	3	6
Minimal	1	1	0	3	1	1	2	6
Mild	0	0	1	3	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	2	0	0	0	0
Hypertrophy; hepatocellular	10	26	41	68	1	8	14	38
Minimal	10	22	32	19	1	8	14	30
Mild	0	2	8	22	0	0	0	7
Moderate	0	2	1	26	0	0	0	1
Marked	0	0	0	1	0	0	0	0
Infiltration, mononuclear cell	21	20	23	33	20	20	28	30
Minimal	20	19	22	31	16	15	26	28
Mild	1	0	1	2	3	5	2	2
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Marked	0	1	0	0	0	0	0	0
Mitoses, increased	16	10	12	20	3	4	10	12
Minimal	14	9	9	13	3	4	8	10
Mild	2	1	3	7	0	0	2	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Single cell necrosis	12	15	14	55	2	9	9	17
Minimal	8	14	13	39	1	8	7	14
Mild	3	1	1	14	0	1	2	3
Moderate	1	0	0	2	1	0	0	0

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Non-neoplastic lesions								
Lymph node, axillary (No. Examined)	6	7	6	14	11	19	13	20
Basophilic granules; macrophage	0	0	0	5	0	0	0	0
Minimal	0	0	0	5	0	0	0	0
Lymph node, mandibular (No. Examined)	69	69	69	66	69	68	67	68
Basophilic granules; macrophage	0	11	8	52	0	0	1	28
Minimal	0	11	8	52	0	0	1	28
Lymph node, mesenteric (No. Examined)	70	70	69	68	67	68	68	70
Basophilic granules; macrophage	0	1	2	30	0	0	0	7
Minimal	0	1	2	30	0	0	0	7
Lymph node, pancreatic (No. Examined)	4	3	11	12	16	10	14	21
Basophilic granules; macrophage	0	0	0	1	0	0	0	0
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	0
Lymph node, tracheobronchial (No. Examined)	11	6	9	7	16	8	14	17
Basophilic granules; macrophage	0	0	0	2	0	0	0	0
Minimal	0	0	0	2	0	0	0	0
Muscle, skeletal (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Basophilic granules; macrophage	0	0	0	5	0	0	0	1
Minimal	0	0	0	5	0	0	0	1
Pancreas (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	69
Basophilic granules; macrophage	0	0	4	58	0	0	2	17
Minimal	0	0	4	58	0	0	2	16
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Site, injection (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	70	70
Fibrosis	0	2	7	12	1	1	4	7
Minimal	0	2	7	12	1	1	4	7
Basophilic granules; macrophage	0	69	69	69	0	64	68	69
Minimal	0	69	69	65	0	64	67	67
Mild	0	0	0	4	0	0	1	2

104-Week Carcinogenicity Study in CD-1 Mice (Continued)

Dose (mg/kg/dose)[a]	Male				Female			
	0	3	10	30	0	3	10	30
Non-neoplastic lesions								
Skin (No. Examined)	70	69	67	69	70	68	70	70
Basophilic granules; macrophage	0	11	38	62	0	2	24	63
Minimal	0	11	38	61	0	2	24	63
Mild	0	0	0	1	0	0	0	0
Testis (No. Examined)	70	70	70	70				
Basophilic granules; macrophage	0	0	0	43	N/A	N/A	N/A	N/A
Minimal	0	0	0	42				
Mild	0	0	0	1				
Tongue (No. Examined)	70	70	70	70	70	70	69	69
Basophilic granules; macrophage	0	0	10	66	0	0	2	49
Minimal	0	0	10	66	0	0	2	49
Urinary bladder (No. Examined)	70	70	69	70	64	70	68	70
Basophilic granules; macrophage	0	2	9	58	0	0	5	60
Minimal	0	2	9	58	0	0	5	60
Uterus (No. Examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	69	70	70	70
Basophilic granules; macrophage					0	0	0	9
Minimal					0	0	0	9
Vagina (No. Examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	69	69	70	67
Basophilic granules; macrophage					0	0	0	28
Minimal					0	0	0	27
Mild					0	0	0	1

* $p<0.05$

N/A: not applicable

NQ: not quantifiable (below the lower limit of quantification); B- = Benign; M- = Malignant.

a. Doses expressed in terms of parent compound GSK3228836.

b. For controls group means are shown, for treated groups fold change from controls. Statistical significance is based on actual data, not change from control data.

11. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: NON-PIVOTAL STUDIES

Table 23 Reproductive and Developmental Toxicity: Non-Pivotal Studies

Species/Strain	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Number of Animals/Sex	Noteworthy Findings	Report No. (Study No.)
Rabbit (NZW)	SC (0.9% saline)	13 days (GD 6 to GD 18)[b]	5, 15, 30	7F	Subcutaneous administration of bepirovirsen to pregnant New Zealand white rabbits at doses up to 30 mg/kg given every other day (105 mg/kg/week) during organogenesis (GD6-GD18) was generally well tolerated. Bepirovirsen did not cause maternal mortality or gross pathology lesions, and had no effects on maternal clinical observations, fecundity indices, external fetal observations or placental development. In the 52.5 and 105 mg/kg/week groups, test article-related reductions in maternal food consumption and weight gain were observed. These reductions were not associated with adverse pregnancy outcomes or effects on embryo-fetal development; however mean fetal weights in the 30 mg/kg group were 14.4% lower than the control group. The reduction in fetal weight was considered to be a secondary consequence of the maternal reductions in food consumption and weight gain rather than a specific effect of the test article on embryo-fetal development. Based on these data, it was determined that a dose in the range of 15 to 30 mg/kg (52.5 to 105 mg/kg/week) would be an appropriate high dose level for a definitive rabbit embryo-fetal toxicity study. At these doses, some degree of mild maternal toxicity and reduction in fetal weight would be expected, without a notable reduction in the number of litters available for evaluation.	2017N337852 (505358-AS08P)

Key: F: Female**.** GD: Gestational Day**.** NZW: New Zealand White. SC: Subcutaneous.

12. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: FERTILITY AND EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT TO IMPLANTATION (PIVOTAL)

Table 24 A Combined Fertility and Developmental Toxicity Study of Bepirovirsen Administered by Subcutaneous Injection in CD-1 Mice

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Report Title:** A Combined Fertility and Developmental Toxicity Study of ISIS 505358 (GSK3228836) Administered by Subcutaneous Injection in CD-1 Mice	**Test Article: bepirovirsen sodium (GSK3228836, or ISIS 505358)** **Lot/Batch No.:** [redacted] (Bulk material; not used)
Design Similar to ICH 4.1.1. Yes	**Duration of Dosing:** Males: 10 weeks inclusive (Day 1 to Day 69 encompassing 4 weeks pre-mating, during mating (up to 14 days) and post-mating phases)/ Females: inclusive through 2 weeks prior to mating, during mating phase and through Gestation Day (GD) 14 or GD 15.	Pre-formulated Test Article Solutions: [redacted] (0.3 mg/mL) (1.5 mg/mL) (2.5 mg/mL)
Species/Strain: CD-1 mouse / Crl:CD1(ICR)	**Route/Frequency:** Subcutaneous / Every other day (3 or 4 doses per week)	**Study No.** ISIS 505358-AS07
Initial Age (Males & Females): 60-70 days (at study assignment)	**Method of Administration:** Interscapular Subcutaneous Injection **Vehicle/Formulation:** Sterile saline (0.9% Sodium Chloride Injection, USP) /Solution	**Location in CTD**: m4.2.3.5.1 **GLP Compliance:** Yes
Day of Mating (Sperm/Plug Present): GD 0	**Day of Cesarean Section:** Gestation Day (GD) 18 **Day of Male Necropsy:** Day 71	**GSK Document Number:** 2017N337889
Dates of First Doses: Males (Day 1): 05-Feb-2014 to 26-Feb-2014; Females (Day 1): 19-Feb-2014 to 12-Mar-2014		
Special Features: Clinical pathology (hematology) performed for F0 Toxicology (Tox) males and females in Subset A and the first 4 animals of each sex (by animal number) in Subset C. Clinical pathology (serum chemistry) performed for F0 Tox males and females in Subset B and the last 5 animals of each sex in Subset C. Non-reproductive organ weights (kidney, liver with gallbladder and spleen) performed for F0 Tox and Toxicokinetic (TK) males and females. TK analyses (liver with gallbladder) performed for F0 TK males and females and TK analyses (pooled livers with gallbladder and pooled placentae) performed for F1 generation fetuses.		

A Combined Fertility and Developmental Toxicity Study of Bepirovirsen Administered by Subcutaneous Injection in CD-1 Mice (Continued)

No Observed Adverse-Effect Level: F0 Male/Female Reproduction and Embryo-Fetal Development: 25 mg/kg (87.5 mg/kg/week)
Data Collected: F0 Tox Males: mortality, clinical observations, body weight, food consumption, clinical pathology (hematology/serum chemistry), mating, fertility, gross necropsy, organ weights (paired kidneys, liver with gallbladder, spleen, right epididymis, prostate gland with paired seminal vesicles, left testis and right testis), sperm analysis (count, concentration, motility and morphology); F0 Tox Females: mortality, clinical observations, body weight, food consumption, clinical pathology (hematology/serum chemistry), estrous cycle, mating, pregnancy status, fertility, gross necropsy, organ weights [pregnant only] (gravid uterus, paired kidneys, liver with gallbladder, spleen), cesarean section, corpora lutea and TK tissue analysis (liver); F1 Tox Litters: implantations, resorptions, live and dead fetuses, fetal weight, fetal sex, placental morphology, fetal external, visceral or skeletal morphology; F0 TK Males and Females: mortality, TK tissue analysis (liver); F1 TK Litters: TK tissue analysis (liver and placentae; up to 10 fetuses per litter each tissue type).
Conclusion: Subcutaneous administration of ISIS 505358 at 3, 15, and 25 mg/kg (10.5, 52.5 and 87.5 mg/kg/week, respectively), administered every other day to males until Day 71 and to females for two weeks prior to mating through the organogenesis period of gestation was generally tolerated in adult CD-1 mice. The changes observed during the study were limited to commonly seen oligonucleotide-treated mice at similar doses and durations of treatment. ISIS 505358 was not associated with any adverse effects on fertility or embryo-fetal development. ISIS 505358 had no effects on clinical observations, fertility and fecundity indices, estrous cyclicity, general litter parameters (including implantation rate, embryo-fetal deaths), fetal external/skeletal/visceral findings, sperm morphology, sperm concentration or sperm motility. At the 87.5 mg/kg/week dose level, the most notable changes related to treatment with ISIS 505358 were seen in F0 males and included moderate to marked increases in liver transaminases (ALT/AST) and liver weight, suggestive of some degree of hepatotoxicity. In F0 females, there were increases in body weight, weight gain and spleen weight, but these changes were not considered to be adverse in the absence of any correlated observations. At 52.5 mg/kg/week, the changes observed were similar to the high dose level but were of lesser severity. There were no notable changes related to treatment with ISIS 505358 at the 10.5 mg/kg/week dose level. Dose-dependent concentrations of ISIS 505358 were measured in the maternal and paternal liver. ISIS 505358 was not detected in any of the fetal liver samples but was detected in very small amounts (no more than 5.4% of what was in the maternal liver) in the placental tissue of animals in the 15 and 25 mg/kg ISIS 505358 groups. These results indicate little to no exposure of the ISIS 505358 to the embryo or fetus. Overall, ISIS 505358 had no adverse effects on fertility (male or female), maternal health, or embryo/fetal development under the conditions of this study. Adverse effects were only seen in adult males treated with 52.5 and 87.5 mg/kg/week ISIS 505358, which was attributed to the longer dosing regimen of the males.

A Combined Fertility and Developmental Toxicity Study of Bepirovirsen Administered by Subcutaneous Injection in CD-1 Mice (Continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Study No.** SNBL.090.58 (ISIS Study No.: 505358-AS07)			
Dose (mg/kg/every other day)[a]	**0**	**3**	**15**	**25**
F0 Toxicology Males:				
No. Animals/Group[b]	25	25	25	25
No. Died or Euthanized Moribund	0	0	0	1[c]
Clinical Observations	-	-	-	-
Mean Body Weight (g) - Day 1[d]	33.2	33.4	32.7	33.1
Mean Body Weight (g) - Day 29	37.6	37.1	37.2	38.1
Mean Body Weight (g) - Day 50	38.2	38.0	38.2	39.0
Mean Body Weight (g) - Day 71	41.1	40.6	39.6	39.9
Mean Food Consumption - Week 1 (g/day)	6.0	6.1	6.9	6.1
Mean Food Consumption - Week 4 (g/day)	6.0	6.3	6.6	6.0
Mean Food Consumption - Week 7 (g/day)	6.6	6.5	6.1	6.2
Mean Food Consumption - Week 10 (g/day)	5.6	5.7	5.6	4.9
Necropsy Observations	-	-	-	-
Mean Organ Weights[e]				
Absolute Liver with Gallbladder (g)	1.8836	1.8744	2.0038	2.1903***
Liver with gallbladder to Terminal Body Weight (TBW) Ratio (g) %	4.696	4.717	5.116*	5.499***
Absolute Spleen (g)	0.1028	0.1113	0.1426***	0.1621***
Spleen to TBW Ratio (g) %	0.263	0.283	0.367***	0.406***
Absolute Kidney (Bilateral; g)	0.5822	0.5911	0.6102	0.6400
Kidney to TBW Ratio (g) %	1.475	1.523	1.570	1.603
Absolute Right Testis (g)	0.1341	0.1331	0.1361	0.1358
Absolute Left Testis (g)	0.1255	0.1286	0.1340	0.1333
Absolute Right Epididymis (g)	0.0680	0.0702	0.0702	0.0664
Prostate with Seminal Vesicles to TBW Ratio (g)	1.193	1.244	1.229	1.166

A Combined Fertility and Developmental Toxicity Study of Bepirovirsen Administered by Subcutaneous Injection in CD-1 Mice (Continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Study No.** SNBL.090.58 (ISIS Study No.: 505358-AS07)			
Dose (mg/kg/every other day)[a]	**0**	**3**	**15**	**25**
Mean Clinical Pathology Parameters: Hematology (Day 71)[f,g]				
White Blood Cells (x10^3/µL)	3.88	5.72*	3.63	4.66
Hemoglobin (g/dL)	13.3	12.4**	12.4**	12.0***
Hematocrit (%)	41.9	38.9***	38.3***	36.9***
Mean Corpuscular Volume (MCV) (fL)	48.4	47.9	45.6***	44.1***
Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH) (pg)	15.3	15.2	14.7	14.4**
Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) (g/dL)	31.7	31.8	32.3	32.6*
Platelets (PLT) (x10^3/µL)	1137	1184	1028	936*
Monocytes (Absolute) (x10^3/µL)	0.12	0.18	0.19*	0.27***
Mean Clinical Pathology Parameters: Serum Chemistry (Day 71)[f,h]				
Alkaline Phosphatase (ALP) (U/L)	42	45	61**	76***
Alanine Aminotransferase (ALT) (U/L)[i]	24	27	108***	417***
Aspartate Aminotransferase (AST) (U/L)[i]	35	41	226***	894***
Mean Sperm Parameters:				
Concentration (epididymis) (Mil/mg)	1.22	1.26	1.24	1.20
Sperm Count (10^4/mL)	96	100	101	101
Motility (%)	64.6	63.4	67.2	65.4
Morphology (Normal Sperm-cauda epididymis count) (10^4/mL)	186	185	186	186
Morphology (Abnormal Sperm) (%)	7.2	7.4	6.9	7.4
F0 Toxicology Females:				
No. Animals per Group[b]	25	25	25	25
No. Died or Euthanized Moribund	0	0[j]	0	0
No. Euthanized for Early Delivery	1[k]	0	0	1[k]
Clinical Observations	-	-	-	-

A Combined Fertility and Developmental Toxicity Study of Bepirovirsen Administered by Subcutaneous Injection in CD-1 Mice (Continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Study No.** SNBL.090.58 (ISIS Study No.: 505358-AS07)			
Dose (mg/kg/every other day)[a]	**0**	**3**	**15**	**25**
Mean Premating Body Weight (g) - Day 1	27.7	28.6	28.9	28.1
Mean Premating Body Weight (g) – Day 8	28.4	29.5	29.7	29.1
Mean Premating Body Weight (g) - Day 15	29.2	30.4	31.1	30.2
Mean Gestation Body Weight (g) - GD 0[l]	29.4	30.4	30.6	30.1
Mean Gestation Body Weight (g) - GD 9[l]	34.5	36.2	37.1*	36.6
Mean Gestation Body Weight (g) – GD 18[l]	55.1	60.8**	61.7**	62.8***
Mean Premating Food Consumption (g/day) - Week 1	6.0	7.0	6.6	6.0
Mean Premating Food Consumption (g/day) - Week 2	6.4	6.3	6.8	6.6
Mean Gestation Food Consumption (g/day) - GD 0 to 3	5.7	5.6	6.0	6.3
Mean Gestation Food Consumption (g/day) - GD 5 to 9	7.3	7.7	7.5	8.0
Mean Gestation Food Consumption (g/day) - GD 15 to 17	8.9	9.6	8.9	10.0
Mean Estrous Cycle Length (days) – Pretreatment	4.7	4.8	4.7	4.9
Mean Estrous Cycle Length (days) – Treatment	4.8	4.9	4.4*	4.7
Necropsy Observations:				
Pale Liver and/or Kidneys[m]	0	0	0	1
Mean Organ Weights[e,n]				
Liver with gallbladder (g)	2.4649	2.7340*	2.9077***	3.0253***
Liver with gallbladder to Terminal Body Weight (TBW) Ratio (g) %	4.516	4.497	4.711	4.834*
Spleen (g)	0.1291	0.1375	0.1697**	0.1930***
Spleen to TBW Ratio (g) %	0.239	0.227	0.276*	0.308***
Kidney (g)	0.4269	0.4353	0.4490	0.4786**
Kidney to TBW Ratio (g) %	0.783	0.720	0.729	0.766
Mean Clinical Pathology: Hematology (GD 18)[f,o]	-	-	-	-
Mean Clinical Pathology: Serum Chemistry (GD 18)[f,o]	-	-	-	-

A Combined Fertility and Developmental Toxicity Study of Bepirovirsen Administered by Subcutaneous Injection in CD-1 Mice (Continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Study No.** SNBL.090.58 (ISIS Study No.: 505358-AS07)			
Dose (mg/kg/every other day)[a]	**0**	**3**	**15**	**25**
Mating/Litter Data:				
No. Paired Females[p]	31	31	31	31
No. Mated Females	31	29	29	31
No. Pregnant	26	28	28	29
Fertility Index (%)[q]	83.9	90.3	90.3	93.5
Fecundity Index (%)[r]	83.9	93.1	89.7	93.5
No. of Pregnant Females Evaluated	19	22	20	24
Mean No. Corpora Lutea	13	16** [s]	15* [s]	15
Mean No. Implantations	13	15** [s]	14	14
Implantation Index[t]	92	93	93	93
Mean Embryo-Fetal Mortality Index[u]	13.5	8.7	6.4	8.4
Mean No. Live Fetuses per Litter	11	14** [s]	13	13
Mean No. Live Male Fetuses per Litter	6	8**[s]	8**[s]	6
Sex Ratio (% Male)[v]	52.7	57.1	59.1	49.4
Mean Fetal Weight (g) – Males	1.39	1.41	1.43	1.50*** [w]
Mean Fetal Weight (g) – Females	1.35	1.35	1.39	1.45** [w]
Placental Observations	-	-	-	-
Mean Gravid Uterus Weight (g)	19.264	22.913	22.743	22.895
Fetal Malformations and Variations:				
Fetal External Observations	-	-	-	-
Fetal Visceral Observations	-	-	-	-
Fetal Skeletal Observations	-	-	-	-

A Combined Fertility and Developmental Toxicity Study of Bepirovirsen Administered by Subcutaneous Injection in CD-1 Mice (Continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Study No.** SNBL.090.58 (ISIS Study No.: 505358-AS07)			
Dose (mg/kg/every other day)[a]	**0**	**3**	**15**	**25**
Toxicokinetics[x]:				
Male Liver Concentration (ug/g)[y]	0	65.5	407	607
Female Liver Concentration (µg/g)	0	39.7	217	328
Placentae Concentration (µg/g)[z]	N/a	0	4.23	17.6
Fetal Liver Concentration (µg/g)[z]	N/a	0	0	0

Key:

N/a = Not applicable; GD = gestation day; * = Significant to p < 0.05; ** = Significant to p < 0.01; *** = Significant to p < 0.001; - = no noteworthy findings; TK = Toxicokinetics; Tox = Toxicology.

a = Animals were dosed every other day and received 3 or 4 doses per week. Thus, the weekly dose (mg/kg/wk) was equivalent to 3.5 times the single mg/kg dose or 10.5, 52.5 and 87.5 mg/kg/week, respectively.

b = Toxicology (Tox) groups: 8 animals/sex in Subsets A and B, 9 animals/sex in Subset C. Six additional animals/sex/group assigned to Toxicokinetic (TK) groups. The TK in-life data, except for mating and pregnancy results were not reported.

c = Animal 31 (25 mg/kg Tox male) was found dead on Day 22. The cause of death is unclear; there were no clinical or gross pathology findings to suggest that the animal was in poor health. This death was not considered to be treatment-related.

d = There was a statistically significant increase in male body weight gain in the 25 mg/kg group between Days 1 and 8, but this effect was not sustained and therefore was considered spurious.

e = Organ weights were assessed in Tox males and dams that were pregnant at the time of scheduled necropsy. Organ weights were not recorded from animals found dead or from animals euthanized prior to the intended scheduled necropsy.

f = Hematology was performed on male and female Tox animals in Subset A, and the first 4 animals of each sex (by animal number) in Subset C. Serum Chemistry was performed on male and female Tox animals in Subset B and the last 5 Tox animals of each sex (by animal number) in Subset C.

g = Collectively, the changes in male hematology parameters were not considered to be adverse due to the small magnitude of change and/or the lack of correlation to any clinical observations.

h = Reductions in glucose, cholesterol, triglycerides in males related to treatment with ISIS 505358 reached statistical significance, but the differences from control were not considered to be toxicologically relevant and therefore are not reported.

i = At 25 mg/kg, the most notable changes related to treatment included moderate to marked increases in liver transaminases (ALT/AST) and liver weight in F0 males, suggestive of some degree of hepatotoxicity.

j = Animal 277 (TK female; 3 mg/kg) was euthanized on Day 32. On Day 30, this animal displayed a lack of turgor, and on Day 31, the animal was also lethargic. Upon veterinary evaluation, the animal did appear dehydrated, but was actively drinking. This animal's health did not improve, and due to an overall moribund condition, it was euthanized on Day 32. This death was not considered to be treatment-related.

A Combined Fertility and Developmental Toxicity Study of Bepirovirsen Administered by Subcutaneous Injection in CD-1 Mice (Continued)

Notes: (Cont'd)

k = Two animals (Control Animal 232 Tox female and Animal 171 Tox female at 25 mg/kg) were euthanized on Days 37 and 35, respectively, due to parturition prior to the date of scheduled necropsy (by protocol specification). Overall both animals appeared to be in good health, and there were no gross lesions at necropsy. [The pups were euthanized and discarded without further evaluation. Data from these dams and pups were used to reflect group fertility and fecundity indices only.].

l = Increases in body weight (and body weight gain) were observed in the dams during gestation. The changes were considered test article-related, but not of sufficient magnitude to be considered adverse (<14% over control). However, these increases reached statistical significance on GD3 at 15 mg/kg, and on GD12 at 3 mg/kg and 25 mg/kg.

m = Kidney and/or liver pallor may be test article-related based on previous studies with this class of compound.

n = While the mean kidney absolute weight values for the high dose group females increased statistically, the relative to body weight value decreased and corresponding values for males though increased, the differences were not statistically significant. In females, increases in liver and spleen weights were also observed.

o = Data from non-pregnant animals is not included in the Clinical Pathology Report.

p = Mating and pregnancy results based on combined data from Tox and TK dams.

q = Fertility Index = No. Pregnant / No. Cohabited x 100

r = Fecundity Index = No. Pregnant / No. Confirmed Mated x 100

s = The slight, but statistically significant increase in the number of corpora lutea, implantations, live fetuses (male only and sexes combined) at 3 mg/kg and the number of corpora lutea and live male fetuses at 15 mg/kg were not considered adverse, and due to the small magnitude of the increases and the lack of dose-response they were not considered treatment-related.

t = Implantation Index = (number of implants/number of corpora lutea) x 100

u = Embryo-Fetal Mortality Index = (No. dead embryos and fetuses / No. implants) x 100

v = Sex Ratio % = (No. live male fetuses / No. live fetuses) x 100

w = Slight increases in fetal weight are likely a secondary consequence of the increased maternal weight gain in the 87.5 mg/kg/week group and were not considered to be adverse.

x = TK tissue samples were collected at necropsy on Day 71 for F0 males and GD 18 for F0 females/litters. Final dose administration occurred on Day 69 for F0 males and either GD14 or GD15 for F0 females.

y = ISIS 505358 (GSK3228836) concentrations in maternal and paternal liver tissue increased in a dose dependent manner. The higher tissue concentrations in the males were attributed to a longer duration of dosing.

z = Placentae, fetal liver samples from up to 10 live fetuses per dam were harvested on GD18 then pooled for toxicokinetic analysis; control placentae were collected, but not analyzed. ISIS 505358 was detected in the pooled placental tissue from litters treated with doses of 15 and 25 mg/kg. At the high dose level, this is less than 5.4% the concentration seen in the maternal liver. ISIS 505358 was not detected in fetal liver tissue at any dose level. Overall, these results demonstrate that ISIS 505358 is not readily transported to the embryo or fetus during organogenesis.

13. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: EFFECTS ON EMBRYOFETAL DEVELOPMENT (PIVOTAL)

Table 25 An Assessment of Effects of Bepirovirsen on Embryo-Fetal Development in New Zealand White Rabbits

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Report Title:** An Assessment of Effects of ISIS 505358 (GSK3228836) on Embryo Fetal Development in New Zealand White Rabbits	**Test Article: bepirovirsen sodium (GSK3228836, or ISIS 505358)** **Lot/Batch No.:** [redacted] Pre-Formulated Test Article Solutions (Lot/Batch No.): [redacted] (20 mg/mL) [redacted] (60 mg/mL) [redacted] (120 mg/mL)
Design Similar to ICH 4.1.3. Yes	**Duration of Dosing:** GD6 to GD18	**ISIS Reference No.:** 505358-AS08
Day of Mating: Gestation Day (GD) 0	**Route/Frequency:** Subcutaneous/Every other day (3 or 4 doses per week)	**GSK Document No.:** 2017N337736
Species/Strain: Rabbit / New Zealand White (NZW)	**Day of C-Section:** GD28	**GLP Compliance:** Yes **Location in CTD:** m4.2.3.5.2
Initial Age: 5.5 to 8 months **Date of First Dose:** 25-May-2014	**Method of Administration:** Interscapular subcutaneous injection	**Vehicle/Formulation:** 0.9% Sodium Chloride Injection, USP (sterile saline) / Solution

Special Features: Clinical pathology (hematology or serum chemistry) performed for F0 TK females. TK analyses (kidney, spleen and liver) performed for F0 TK females, and TK analyses (kidney, liver and placentae) performed for F1 generation TK fetuses. Organ weights for F0 Toxicology females (kidney, liver with gallbladder, spleen).

No Observed Adverse-Effect Level: F1 Litters: 25.2 mg/kg (88.2 mg/kg/week)

An Assessment of Effects of Bepirovirsen on Embryo Fetal Development in New Zealand White Rabbits (continued)

Data Collected: F0 Toxicology Females: mortality, in-life observations, body weight, food consumption, pregnancy status, corpora lutea, necropsy, clinical pathology (hematology and serum chemistry), organ weights (gravid uterine, kidney, liver with gallbladder and spleen). F1 Toxicology litters: implantations, resorptions, live and dead fetuses, fetal weight, sex and fetal morphology (external, visceral, and skeletal).

F0 Toxicokinetic (TK) Females: necropsy, ISIS 505358 concentration (liver); F1 TK litters: ISIS 505358 concentration (placenta and fetal liver).

Conclusion: Subcutaneous administration of ISIS 505358 to pregnant New Zealand white rabbits at doses up to 25.2 mg/kg (88.2 mg/kg/week) given every other day during organogenesis (GD6 to GD18) was well tolerated and did not cause any adverse effects on embryo/fetal development. Of the litters available for evaluation (n=15-18 per group), the test article had no effects on uterine weight, the number of corpora lutea, embryo-fetal death, the sex ratio, and the number of live fetuses per litter. There were no test article-related effects seen in the parameters evaluated in the fetal external, placental, visceral, and skeletal examinations. At 88.2 mg/kg/week, there were test article-related, though not consistently statistically significant, reductions in maternal food consumption and body weight gain during gestation. Mean fetal weight (sexes combined, by litter) was reduced in this group to 29.72 grams, compared to the control value of 33.12 grams. This 10.3% reduction in weight was considered secondary to modest maternal food consumption and weight reductions and was not considered to be a direct effect of the test article on embryo/fetal growth. The fetal weight reduction was not statistically significant when fetuses were evaluated by sex, and it was not associated with any adverse findings in the fetuses as seen in the external, visceral, and skeletal examinations. At doses ≤44.1 mg/kg/week (≤12.6 mg/kg/dose) no salient test article-related effects were observed. Under the conditions of this study, no adverse effects were observed up to the highest dose evaluated, 88.2 mg/kg/week (25.2 mg/kg/dose).

An Assessment of Effects of Bepirovirsen on Embryo Fetal Development in New Zealand White Rabbits (continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Study No.** SNBL.090.64 (ISIS Reference No.: 505358-AS08)			
Test Article(s) Daily Dose (mg/kg)[a]	**0**	**6**	**12.6**	**25.2**
F0 Toxicology Females				
No. Animals/Group[b]	22	22	22	22
No. Pregnant Evaluated	18	17	15	18
No. Not Pregnant	4	4	6	4
No. Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0
No. Aborted	0	0	1[c]	0
No. with Total Resorption of Litter	0	1[d]	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Mean Body Weight Gain (g) - GD 6 to 18	0.150	0.060	0.161	0.085
Mean Body Weight Gain (g) - GD 6 to 28	0.183	0.127	0.172	0.091[e]
Mean Food Consumption (g/day) - GD 6 to 20[f]	114.8	107.7	116.9	105.4
Mean Food Consumption (g/day) - GD 6 to 27	110.2	106.4	111.7	100.7
Clinical Pathology				
Mean Hematology Parameters[g]				
Red Blood Cell (10^6/ µL)	6.30	5.75**	5.64***	5.48***
Hematocrit (%)	39.7	36.7**	36.2**	34.8***
Hemoglobin (g/dL)	12.7	11.7**	11.6**	11.0***
Red Blood Cell Distribution Width (%)	12.6	12.6	12.8	13.2*
Reticulocytes (%)	1.6	1.8	1.8	2.4*
Basophils – Absolute (10^3/µL)	0.22	0.17	0.18	0.15*

An Assessment of Effects of Bepirovirsen on Embryo Fetal Development in New Zealand White Rabbits (Continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Study No.** SNBL.090.64 (ISIS Reference No.: 505358-AS08)			
Test Article(s) Daily Dose (mg/kg)[a]	**0**	**6**	**12.6**	**25.2**
Necropsy Observations				
Kidney discoloration	0	0	1	5[h]
Liver discoloration	0	0	1	1[h]
Mean Organ Weights[i]: Kidney, liver with gallbladder, spleen	-	-	-	-
Mean Gravid Uterus Weight (g)	398.1	392.9	433.2	332.4
Mean No. Corpora Lutea	10	9	11	9
Mean No. Implantations	8	8	10	7
Implantation Index (%)[j]	86	88	88	83
Litters: No. Litters Evaluated	18	17	15	18
Mean No. Live Fetuses	8	8	9	7
Mean Embryo-Fetal Mortality Index - (%)[k]	3.6	4.2	4.9	3.7
Sex Ratio (% male)[l]	54.9	51.7	52.2	52.3
Mean Fetal Body Weight (g) – Combined[m]	33.12	32.66	32.44	29.72*
Mean Fetal Body Weight (g) – Males	32.81	32.71	32.47	29.90
Mean Fetal Body Weight (g) – Females	33.45	32.72	32.08	29.55
Placental Observations	-	-	-	-
Fetal Malformation or Variations				
External Examination	-	-	-	-
Visceral Examination	-	-	-	-
Skeletal Examination	-	-	-	-

An Assessment of Effects of Bepirovirsen on Embryo Fetal Development in New Zealand White Rabbits (Continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Study No.** SNBL.090.64 (ISIS Reference No.: 505358-AS08)			
Test Article(s) Daily Dose (mg/kg)[a]	**0**	**6**	**12.6**	**25.2**
Tissue concentrations of ISIS 505358 (GSK3228836; µg/g)				
F0 Females				
Liver (GD20/GD28)	NA	194/82.5	452/160	796/393
F1 Fetuses				
Placenta (GD20/GD28)	NA	BLQ/0	20.6/0	51.5/11.2
Liver (GD20/GD28)	NA	/0	0/0	0/0

Notes:

GD = Gestation Day; '-' = no noteworthy findings; TK = toxicokinetic; BLQ = below lower limit of quantification (<0.100 µg/g)

* = statistical significance ($p \leq 0.05$)

** = statistical significance ($p \leq 0.01$)

*** = statistical significance ($p \leq 0.001$)

a. Animals dosed every other day (7 total occasions; 21.0, 44.1 and 88.2 mg/kg/week, respectively).
b. Three additional mated females (and litters) were assigned to each ISIS 505358 group for toxicokinetic evaluation.
c. Animal 478 (12.6 mg/kg) aborted on GD27.
d. Animal 452 (6 mg/kg) had 100% early resorptions at c-section.
e. Body weight gains at 25.2 mg/kg during post-treatment period (GD18-28) were 81% lower than control.
f. General trend toward lower food consumption after GD13, particularly from GD18 and later but was only statistically significant on GD18/19 and GD20/21, with consumption that was 39.8% and 24.0% lower than control on these days.
g. Minor, statistically significant reductions in red cell mass parameters were not considered adverse due to the small magnitude of the changes. Statistically significant reductions in basophils at 25.2 mg/kg was not definitively attributed to the test article due to the lack of a dose response and the range of values typically seen with this parameter.
h. Discoloration of the kidney and liver were not associated with any clear adverse clinical effects and were therefore not considered adverse. These alterations were also seen in one TK female at 25.2 mg/kg.
i. Data includes assessment of both absolute and relative to body weight values.
j. Implantation Index (%) = (No. of Implantations / No. of Corpora Lutea) x 100
k. Embryo-Fetal Mortality Index (%) = (No. of dead embryos and fetuses / No. of implantations) x 100
l. Sex Ratio % = (number live male fetuses / number of live fetuses) x 100
m. The fetal weight reduction (combined fetal body weight only) was not considered adverse as there were no statistically significant sex-specific fetal weight reductions and was secondary to the test article-related reductions in maternal food cons

14. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: EFFECTS ON PRE- AND POST-NATAL DEVELOPMENT INCLUDING MATERNAL FUNCTION (PIVOTAL)

Table 26 Pre and Postnatal Development Study in Mice

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology
Design similar to ICH S5 (R3) 4.3? Yes

Species/Strain: Mouse/CD-1®IGS (Crl:CD1 [ICR])

Initial Age: 11 weeks

Date of First Dose: 12 April 2023

Special Features: GSK3228836 concentrations in milk (dams) and liver (dams and F_1 generation animals)
No Observed Adverse Effect Level:
- **F_0 Females:** 25 mg/kg/dose
- **F_1 Males:** 25 mg/kg/dose
- **F_1 Females:** 25 mg/kg/dose

Report Title: GSK3228836A: A Subcutaneous Injection Pre and Postnatal Development Study in Mice
Duration of Dosing: Gestation Day (GD) 6 up to Lactation Day (LD) 21
Day of Mating: GD 0
Day of Natural Delivery: LD 0/Postnatal Day (PND) 0
Method of Administration/Frequency: Subcutaneous injection/once every other day
Vehicle/Formulation: 0.9% (w/v) sodium chloride for injection, USP/solution
Litters Culled/Not Culled: Culled to 4/sex/litter on PND 7

Test Item (Batch No.): bepirovirsen sodium (GSK3228836 and ISIS 505358) ([redacted])
Test Facility Study No. 9002027
GSK Reference No. M72827G

Location in CTD: m4.2.3.5.3

GSK Document Number: 2023N530614

GLP Compliance: Yes

Pre and Postnatal Development Study in Mice (Continued)

Data Collected: F_0 females: mortality, clinical observations, body weight, gestation length, parturition and natural delivery observations, lactation and maternal caretaking observations, GSK3228836 concentrations in milk and tissue (liver), uterine examinations (implantation sites/scars), and macroscopic necropsy evaluation; F_1 offspring: viability (pre-weaning) and mortality (post-weaning), clinical observations (including gender and external morphology when applicable), body weight, early physical development (eye opening, pinna detachment) and neurodevelopment (startle reflex and visual function [pupil contraction and visual placing]), physical development landmarks of sexual maturation (vaginal opening in females and balano-preputial skinfold separation in males), neurobehavioral function (auditory startle prepulse inhibition, locomotor activity, and learning and memory using the Modified Biel water maze), estrous cycling, reproductive performance, natural delivery (parturition and lactation), maternal caretaking observations, GSK3228836 concentrations in tissue (liver) of F_1 animals via exposure through dam's milk on PND 10 or on PND 21, uterine examinations, and macroscopic evaluation; F_2 litters: viability, clinical observations (including gender and external morphology), and body weight.
Conclusion: GSK3228836 at 3, 15 and 25 mg/kg/dose (doses expressed as parent compound) was administered by subcutaneous injection every other day to F_0 female mice from Gestation Day (GD) 6 through Lactation Day (LD) 20/21. There was no evidence of test item-related maternal toxicity or effects on F_0 gestation length, parturition or lactation. There were no effects on the development of the F_1 generation, including survival, growth, reflexological and physical development, neurobehavior, reproductive function, gestation, parturition or lactation, and no effects on the survival, growth and development of the F_2 generation at any dose. GSK3228836 was detectable at levels above the limits of quantification in the milk and livers of F1 pups at ≥ 15 mg/kg/dose. As a result, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for both maternal reproduction and for the pre-and postnatal growth and development in the F_1 and F_2 generation mice was 25 mg/kg/dose (F0 generation mean liver concentration was 898833 ng/g on LD 21).

Pre and Postnatal Development Study in Mice (Continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Test Facility Study No.** 9002027; **GSK Reference No**. M72827G			
Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**3**	**15**	**25**
F_0 Females:				
GSK3228836 concentrations				
Liver (ng/g)				
LD 10	N/A	77820	456167	830000
LD 21	BLQ<50.0	255833	476500	898833
Milk (ng/mL)				
LD 10	N/A	BLQ <10.0	11.57	25.98
No. Nonpregnant[i]	6	5	4	2
No. Females/Group	24	24	24	24
No. Pregnant	18	19	20	22
No. Pregnant Survivors to Term (LD 21/22)	18	19	20	21
No. Died or Euthanized	0	0	0	1[a]
Clinical Observations[b]	-	-	-	-
Mean Gestation Body Weight Change[g]				
GDs 6 to 18	25.07 g	0.92X	0.99X	1.03X
Mean Lactation Body Weight Change[g]				
LDs 2 to 21	1.61 g	0.66X	1.42X	1.17X
Mean Duration of Gestation (days)	18.0	18.1	18.0	18.0
Mean No. of Implantations	11.7	11.0	11.2	11.8
Average Pup Delivery Time (minutes)[c]	12.45	8.70	8.90	8.76
Necropsy Observations	-	-	-	-
F_1 Litters: Preweaning				
GSK3228836 concentrations (sex-combined)				
Liver (ng/g)				
PND 10	N/A	BLQ <50.0	41.91	178.10
PND 21	BLQ <50.0	BLQ <50.0	48.11	139.11
No. Viable Litters at Birth (PND 1)	18	19	20	21

Pre and Postnatal Development Study in Mice (Continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Test Facility Study No.** 9002027; **GSK Reference No**. M72827G			
Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**3**	**15**	**25**
No. Viable Litters at Weaning (PND 21)	18	19	20	21
Mean No. Live Pups Born/Litter [j]	11.2	10.5	10.3	10.9
Mean No. Stillbirths/Litter	0.0	0.0	0.1	0.2*[d]
Mean Pup Sex Ratio at Birth (% Males) [j]	47.03	42.82	48.14	52.79
Postnatal Survival Index (% Survival Birth to PND 7)	99.11	98.68	99.29	97.80
Postnatal Lactation Index (% Survival PNDs 7 to 21)	97.92	100.00	100.00	99.40
Mean Weight at PND 1 (g) - Males	1.749	1.759	1.844	1.816
Mean Weight at PND 1 (g) - Females	1.669	1.744	1.769	1.742
Mean Weight at Weaning on PND 21 (g) - Males	13.740	14.211	14.271	13.853
Mean Weight at Weaning on PND 21 (g) - Females	12.950	14.143**[e]	13.914**[e]	13.406
Clinical Observations[b]	-	-	-	-
Early Reflex and Physical Development (sexes combined)				
Mean Age of Eye Opening (days)	14.4	14.1	14.1	14.2
Mean age of Pinna Detachment (days)	4.8	4.6	4.8	4.7
Auditory Startle Response on PND 21 (% Pups with Positive Response)	100%	100%	100%	100%
Visual Placement on PND 21 (% Pups with Positive Response)	100%	100%	100%	100%
Pupil Constriction on PND 21 (% Pups with Positive Response)	100%	100%	100%	100%
F_1 Males: Postweaning				
No. Evaluated	34[f]	33	40[f]	42
Mean Body Weight Gains PNDs 24 to 77[g]	24.30 (g)	0.95X	0.95X	0.99X
Clinical Observations	-	-	-	-
Mean Age of Balano-Preputial Separation (days) – Subset 1[h]	27.5	26.7	26.0**	26.4*

Pre and Postnatal Development Study in Mice (Continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Test Facility Study No.** 9002027; **GSK Reference No**. M72827G			
Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**3**	**15**	**25**
Bodyweight at Maturity (g)	23.72	23.11	22.13	22.48
No. of Males that Mated (Mating Index %) - Subset 1[h]	16/17 (94.1 %)	16/17 (94.1%)	18/19 (94.7%)	21/21 (100.0%)
No. of Fertile Males (Fertility Index %) - Subset 1[h]	16/16 (100.0%)	16/16 (100.0%)	17/18 (94.4%)	20/21 (95.2%)
Sensory function (Startle Auditory Reflex and Visual Function) - Subset 2[h]	-	-	-	-
Motor Activity - Subset 2[h]	-	-	-	-
Auditory Startle Prepulse Inhibition - Subset 2[h]	-	-	-	-
Learning and Memory (Modified Biel Water Maze; Subset 2)[h]	-	-	-	-
F_1 Females: Postweaning				
No. Evaluated	36	37	40	41
Mean Body Weight PNDs 24 to 77[g]	15.52 (g)	1.01X	0.94X	0.94X
Clinical Observations[b]	-	-	-	-
Mean Age of Vaginal Patency (days) - Subset 1[h]	23.3	23.2	23.4	23.8
Bodyweight at Maturity (g)	16.05	16.02	16.57	16.31
Mean No. of Estrous Cycles Premating (14 days) - Subset 1[h]	1.3	1.5	1.3	1.7
Mean No. Days Prior to Mating - Subset 1[h]	2.8	2.3	3.0	2.4
No. of Females Sperm-Positive (Mating Index %) – Subset 1[h]	18/18 (100.0%)	18/19 (94.7%)	20/20 (100.0%)	21/21 (100.0%)
No. of Pregnant Females (Fertility Index %) - Subset 1[h]	17/18 (94.4%)	18/18 (100.0%)	19/20 (95.0%)	20/21 (95.2%)
Mean Gestation Body Weight Change GD 0 to 17 (%[g]) - Subset 1[h]	28.61 g	0.96X	0.98X	1.01X
Mean Lactation Body Weight Change LD 1 to 7 [g] - Subset 1[h]	7.67 g	1.07X	0.98X	1.22X
Mean Duration of Gestation (days) - Subset 1[h]	17.9	18.0	18.0	18.1
Mean No. of Implantations - Subset 1[h]	14.1	14.2	14.0	14.0

Pre and Postnatal Development Study in Mice (Continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Test Facility Study No.** 9002027; **GSK Reference No**. M72827G			
Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**3**	**15**	**25**
Average Pup Delivery Time (minutes)[c] - Subset 1[h]	N/A	11.10	4.80	9.42
Necropsy - Subset 1[h]	-	-	-	-
Sensory function (Startle Auditory Reflex and Visual Function) - Subset 2[h]	-	-	-	-
Motor Activity - Subset 2[h]	-	-	-	-
Auditory Startle Prepulse Inhibition - Subset 2[h]	-	-	-	-
Learning and Memory (Modified Biel Water Maze) - Subset 2[h]	-	-	-	-
F_2 Litters: Preweaning				
No. Litters Evaluated	17	18	19	17[h]
Mean No. Live Pups Born/Litter [j]	13.5	12.5	12.4	13.2
Mean No. Stillbirths/Litter [j]	0.0	0.1	0.0	0.0
Postnatal Viability Index (% Survival PND1 to PND7)	100.00	99.57	99.69	99.22
Mean Pup Sex Ratio at PND 1 (% Males) [j]	55.66	51.69	51.17	45.90
Mean Body Weight at PND 1 (g) Males	1.651	1.702	1.742	1.728
Mean Body Weight at PND 1 (g) Females	1.555	1.621	1.662	1.659
Mean Body Weight at PND 7 (g) Males	4.452	4.387	4.536	4.415
Mean Body Weight at PND 7 (g) Females	4.167	4.225	4.350	4.249
Clinical Observations[b]	-	-	-	-

Key: - No noteworthy findings. GD = Gestation Day; LD = Lactation Day; PND = Postnatal Day; N/A = not applicable.
*= ($p \leq 0.05$); **= ($p \leq 0.01$) Statistical significance is based on raw data (not on the change from controls).

Pre and Postnatal Development Study in Mice (Continued)

Study Type: Reproductive and Developmental Toxicology	**Test Facility Study No.** 9002027; **GSK Reference No**. M72827G			
Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**3**	**15**	**25**

Key (continued):

a. Female No. 482 was euthanized on GD 16 as blood found in the cage. At macroscopic examination, one placental site was enlarged and darkly discolored. The death was considered unrelated to the test item because of its single occurrence and lack of similar macroscopic changes in any other F0 generation female in this study.
b. Clinical observations include any effects on external morphology and/or effects on normal maternal nesting and nursing behaviors.
c. Calculated as the time of observation of the last pup born minus the time of observation of the first pup born divided by the total number of pups observed in a litter between 0800 and 1700 hours. The following naturally delivered litters were excluded from calculations of parturition rate: 1) deliveries that were initiated and completed after 1700 hours; 2) natural deliveries that required more than a single day for completion (delivery initiated between 0800 and 1700 hours but not completed by end of daily observation period); 3) deliveries with additional pups born after natural delivery was determined to be completed. The majority of F0 and F1 parturient mice across all groups delivered their litters after 1700 hours (i.e. occurred outside of daily delivery observation period of 0800 to 1700 hours) therefore reported values for average pup delivery time is based on a limited dataset of 4, 4, 6, and 5 F0 deliveries for control, 3, 15, and 25 mg/kg/dose, respectively and 4, 1, and 3 F1 deliveries for 3, 15, and 25 mg/kg/dose, respectively. As control deliveries occurred in the same manner and as there was no effect on gestation length, number of pups born/litter versus number of implantations, and no effect on pup survival in the hours and days following discovery of birth in any of the groups, parturition was determined not to be affected by GSK3228836 treatment.
d. Although the mean number of stillborn pups was statistically significantly higher at 25 mg/kg/dose than for controls (0.2 vs 0.0), the mean number of dead pups at birth remained within Test Facility historical control range (0.0 to 0.3). Therefore, statistically significant changes were not considered test item-related.
e. Although on occasion litter mean male and female pup body weights were statistically higher than controls at 3 and 15 mg/kg/dose, individual litter values and the rate of body weight gains were comparable across groups at each interval evaluated and there was no dose-dependent trend. Therefore, it statistically significant changes were not considered test item-related.
f. Control Male No. 1018 and was euthanized on PND 24 due to a severe lesion to the tail, and Male No. 3002 in the 15 mg/kg/dose group was euthanized due to poor and deteriorating condition, including abdominal distention, on PND 39. At macroscopic examination, there was dark clear fluid in the abdominal cavity and dark foci in the liver. The cause of morbidity for Male No. 3002 was not identified, however was considered unlikely to be test item-related in the absence of similar severe clinical signs and gross finding in any other F1 generation male and female, including at 25 mg/kg/day, the highest dose tested.
g. For controls, group means are shown. For treated groups, fold change from controls is shown.
h. At 25 mg/kg/dose, 3 females were found to be pregnant by ammonium sulfite staining (No. 4504 with 3 early resorptions, No. 4510 with 1 early resorption, and No. 4519 with 1 early resorption). This was not considered test item-related based on Test Facility Historical Control Data (HCD for dams with 1 or more ER + Dead fetuses = 77.8% and for 3 or more ER + dead fetuses = 33.3%)
i. Prior to Day 1 of dosing, F0 females showed evidence of intravaginal copulatory plug to confirm insemination occurred and were therefore assigned to study. Pregnancy status was determined via uterine staining; no implantation sites identified.
j. The majority of deliveries were not observed as they occurred overnight. First litter evaluation generally occurred on PND1, therefore, the calculation of number of live pups born/litter, number of stillborn pups/litter, and the sex ratio (% males) at birth was primarily based on number of pups present on PND1. Stillborn pups were confirmed using a lung floating test.

15. STUDIES IN JUVENILE ANIMALS

Studies in juvenile animals have not been performed with bepirovirsen.

16. LOCAL TOLERANCE

Local tolerance studies have not been performed with bepirovirsen.

17. OTHER TOXICITY STUDIES

Table 27 Other Toxicity Studies

Species/Strain	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Number of Animals/Sex	Noteworthy Findings*	Report No. (Study No.)
Murine Splenocytes	0.9% saline	24h	40, 100, 200, 1000 µg/mL	NA	A mouse splenocyte cytokine release assay was developed to evaluate potential cytokine induction by GSK4421747 compared to GSK3228836A, and potential synthesis process impurities of GSK4421747 that would not be present in GSK3228836A. Noteworthy increases (concentration dependent, ≥2X, and statistically significant) in cytokines and chemokines IP-10, MIP-1α and TNF-α were detected following incubation with 200 or 1000 µg/mL GSK3228836A. Noteworthy increases (concentration dependent, ≥2X, and statistically significant) in cytokines and chemokines. IP-10, MIP-1α and TNF-α were detected following incubation with 200 or 1000 µg/mL GSK3228836A.	2023N532925 (V73021N)

Key: NA: not applicable.

*Study conducted with bepirovirsen and GSK4421747A (the sodium salt is a chimeric 2'-MOE ASO targeted to hepatitis B virus ribonucleic acid. It has the same sequence and chemistry as bepirovirsen but has been synthesized to have only [redacted]% of the [redacted] present). Bepirovirsen was used as a comparator 2'-MOE ASO in this study and only findings for this molecule are presented in this table.

Table 28 In vitro non-GLP Bacterial Mutation (Ames) Tests on Potential Impurities/Degradants and Synthetic Intermediates of Bepirovirsen

Species (Strain)/ Test System	Strain	Route (Vehicle)	Concentration (µg/plate)	Test Article	Duration of Dosing	Noteworthy Findings	Report No. (Study No.)
S. typhimurium, E. coli	TA98, TA100, TA1535, TA1537 WP2 *uvrA* (pKM101)	In vitro (DMSO)	50 to 500	[redacted]	NA	[redacted] was not mutagenic in the bacterial mutation assay, when tested in either the presence or absence of S9 mix.	2017N333905 (Ames-2867)
S. typhimurium, E. coli	TA98, TA100, TA1535, TA1537 WP2 *uvrA* (pKM101)	In vitro (DMSO)	50 to 500	[redacted]	NA	[redacted] was not mutagenic in the bacterial mutation assay, when tested in either the presence or absence of S9 mix.	2017N333913 (Ames-2868)
S. typhimurium, E. coli	TA98, TA100, TA1535, TA1537 WP2 *uvrA* (pKM101)	In vitro (DMSO)	50 to 500	[redacted]	NA	[redacted] was not mutagenic in the bacterial mutation assay, when tested in either the presence or absence of S9 mix.	2017N333922 (Ames-2869)
S. typhimurium, E. coli	TA98, TA100, TA1535, TA1537 WP2 *uvrA* (pKM101)	In vitro (DMSO)	50 to 5000	[redacted]	NA	[redacted] was not mutagenic in the bacterial mutation assay, when tested in either the presence or absence of S9 mix.	2017N333878 (Ames-2866)

In vitro non-GLP Bacterial Mutation (Ames) Tests on Potential Impurities/Degradants and Synthetic Intermediates of Bepirovirsen (Continued)

Species (Strain)/ Test System	Strain	Route (Vehicle)	Concentration (µg/plate)	Test Article	Duration of Dosing	Noteworthy Findings	Report No. (Study No.)
S. typhimurium, E. coli	TA98, TA100, TA1535, TA1537 WP2 *uvrA* (pKM101)	In vitro (DMSO)	50 to 5000	[redacted]	NA	[redacted] was not mutagenic in the bacterial mutation assay, when tested in either the presence or absence of S9 mix.	2017N333925 (Ames-2870)
S. typhimurium, E. coli	TA98, TA100, TA1535, TA1537 WP2 *uvrA* (pKM101)	In vitro (DMSO)	50 to 500	[redacted]	NA	[redacted] was not mutagenic in the bacterial mutation assay, when tested in either the presence or absence of S9 mix.	2017N333926 (Ames-2871)
S. typhimurium, E. coli	TA98, TA100, TA1535, TA1537 WP2 *uvrA* (pKM101)	In vitro (DMSO)	50 to 500	[redacted]	NA	[redacted] was not mutagenic in the bacterial mutation assay, when tested in either the presence or absence of S9 mix.	2017N333944 (Ames-2872)
S. typhimurium, E. coli	TA98, TA100, TA1535, TA1537 WP2 *uvrA* (pKM101)	In vitro (DMSO)	50 to 5000	[redacted]	NA	[redacted] was not mutagenic in the bacterial mutation assay, when tested in either the presence or absence of S9 mix.	2017N333876 (Ames-2865)
S. typhimurium, E. coli	TA98, TA100, TA1535, TA1537 WP2 *uvrA* (pKM101)	In vitro (DMSO)	50 to 500	[redacted]	NA	[redacted] was not mutagenic in the bacterial mutation assay, when tested in either the presence or absence of S9 mix.	2017N337273 (Ames-2876)

Key: A: Sodium Salt. GLP: Good Laboratory Practice. NA – Not applicable. X: Parent Compound.