

アンチセンス医薬品の薬物動態評価の現状

岩崎 紀彦^{*1,*2}, 小平 浩史^{*1,*3}, 後藤 昭彦^{*1,*4}, 山中 陽介^{*1,*5}, 佐藤 正延^{*1,*6},
宮澤 憲浩^{*1,*7}, 庭山 裕孝^{*1,*8}, 設楽 悦久^{*1,*9}, 関口 裕太朗^{*1,*10}, 田村 直美^{*1,*11},
高草 英生^{*1,*12}, 角辻 賢太^{*1,*13}, 今井 峻司^{*1,*14}, 深野 泰史^{*1,*15}, 福原 慶^{*1,*16},
蓼原 吉輝^{*1,*17}, 吉田 徳幸^{*18,*19}, 小比賀 聡^{*19}, 西川 元也^{*20}, 井上 貴雄^{*18,*19}

Current Status of Pharmacokinetic Assessment for Antisense Oligonucleotide Therapeutics

Norihiko IWAZAKI^{*1,*2}, Hiroshi KODAIRA^{*1,*3}, Akihiko GOTO^{*1,*4}, Yosuke YAMANAKA^{*1,*5},
Masanobu SATO^{*1,*6}, Norihiro MIYAZAWA^{*1,*7}, Yutaka NIWAYAMA^{*1,*8}, Yoshihisa SHITARA^{*1,*9},
Yutaro SEKIGUCHI^{*1,*10}, Naomi TAMURA^{*1,*11}, Hideo TAKAKUSA^{*1,*12}, Kenta KADOTSUJI^{*1,*13},
Shunji IMAI^{*1,*14}, Yasuhumi FUKANO^{*1,*15}, Kei FUKUHARA^{*1,*16}, Yoshiki TADEHARA^{*1,*17},
Tokuyuki YOSHIDA^{*18,*19}, Satoshi OBIKA^{*19}, Makiya NISHIKAWA^{*20} and Takao INOUE^{*18,*19}

*1 日本製薬工業協会 核酸医薬動態評価タスクフォース

*2 田辺三菱製薬株式会社 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 (〒 227-0033)

Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, 1000, Kamoshida-cho, Aoba-ku, Yokohama, Kanagawa 227-0033, Japan

*3 協和キリン株式会社 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188 (〒 411-8731)

Kyowa Kirin Co., Ltd, 1188, Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka 411-8731, Japan

*4 武田薬品工業株式会社 神奈川県藤沢市村岡東 2-26-1 (〒 251-8555)

Takeda Pharmaceutical Company Limited, 26-1, Muraoka-Higashi 2-chome, Fujisawa, Kanagawa 251-8555, Japan

*5 アステラス製薬株式会社 茨城県つくば市御幸が丘 21 (〒 305-8585)

Astellas Pharma Inc., 21, Miyukigaoka, Tsukuba, Ibaraki 305-8585, Japan

*6 MSD 株式会社 東京都千代田区九段北 1-13-12 (〒 102-8667)

MSD K.K. 1-13-12 Kudan-kita, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8667, Japan

*7 大塚製薬株式会社 徳島県徳島市川内町加賀須野 463-10 (〒 771-0192)

Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 463-10, Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima, Tokushima 771-0192, Japan

*8 杏林製薬株式会社 栃木県下都賀郡野木町野木 1848 (〒 329-0114)

Kyorin Pharmaceutical CO., LTD. 1848 Nogi, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0114, Japan

*9 サノフィ株式会社 東京都新宿区西新宿 3-20-2 東京オペラシティタワー (〒 163-1488)

Sanofi K.K., Tokyo Opera City Tower, 3-20-2, Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-1488, Japan

*10 株式会社三和化学研究所 三重県いなべ市北勢町塩崎 363 (〒 511-0406)

SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO., LTD. 363 Shiosaki, Hokusei-cho, Inabe, Mie 511-0406, Japan

*11 塩野義製薬株式会社 大阪府豊中市二葉町 3-1-1 (〒 561-0825)

SHIONOGI & CO., LTD. 3-1-1, Futaba-cho, Toyonaka, Osaka 561-0825, Japan

*12 第一三共株式会社 東京都品川区広町 1-2-58 (〒 140-8710)

Daiichi Sankyo Co., Ltd. 1-2-58, Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo 140-8710, Japan

*13 大日本住友製薬株式会社 大阪府大阪市此花区春日出中 3-1-98 (〒 554-0022)

Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., 3-1-98 Kasugade-naka, Konohana-ku, Osaka, Osaka 554-0022, Japan

- *¹⁴ 日本新薬株式会社 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 14 (〒 601-8550)
NIPPON SHINYAKU CO., LTD., 14 Nishinoshō-Monguchi-cho, Kisshoin, Minami-ku, Kyoto, Kyoto 601-8550, Japan
- *¹⁵ 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社 兵庫県神戸市中央区港島南町 6-7-5 (〒 650-0047)
Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd., 6-7-5, Minatojima-Minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan
- *¹⁶ ファイザー R&D 合同会社 東京都渋谷区代々木 3-22-7 新宿文化クイントビル (〒 151-8589)
Pfizer R&D Japan, Shinjuku Bunka Quint Bldg. 3-22-7, Yoyogi, Shibuya-ku, Tokyo 151-8589, Japan
- *¹⁷ ヤンセンファーマ株式会社 東京都千代田区西神田 3-5-2 (〒 101-0065)
Janssen Pharmaceutical K.K., 3-5-2, Nishi-kanda, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0065, Japan
- *¹⁸ 国立医薬品食品衛生研究所 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-5-26 (〒 210-9501)
National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan
- *¹⁹ 大阪大学大学院薬学研究科 大阪府吹田市山田丘 1-6 (〒 565-0871)
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
- *²⁰ 東京理科大学薬学部 千葉県野田市山崎 2641 (〒 278-8510)
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

1. はじめに

1.1 背景

吸収、分布、代謝、排泄及び薬物相互作用 (DDI) の観点から医薬品の体内動態を検証する薬物動態評価は、有効性及び安全性を担保した医薬品の開発において極めて重要である¹⁾。近年、新たなモダリティとして定着した核酸医薬品 (アンチセンス, siRNA 等) は、化学的に合成される分子量 6,000 ~ 13,000 程度の中分子医薬品である。その動態学的特性の概要は、本誌 2021 年 2 号の「核酸医薬品の薬物動態特性とその評価」²⁾ で述べた通りであり、低分子医薬品や抗体医薬品と異なる特徴的な性質を持つ。核酸医薬品の特徴を踏まえた動態評価のあり方を考察するためには、既承認の核酸医薬品についてどのような薬物動態関連試験が行われ、どのような結果が得られているかを理解することが有用と考えられる。しかしながら、これらの情報を包括的に調査した報告はない。

以上を踏まえ、核酸医薬動態評価タスクフォース (核酸動態 TF) は AMED「アンチセンス医薬品の品質及び安全

性評価に関する研究」班 (代表：井上貴雄) と連携し、核酸医薬品の薬物動態評価の現状を把握するための調査研究を実施した。具体的には、核酸医薬品の中で既承認品目が最も多いアンチセンス医薬品について、その審査報告書や原著論文の調査を行い、吸収、分布、代謝、排泄並びに DDI の各項目の評価がどのように行われているかを、非臨床を中心に体系的にとりまとめた。

1.2 調査対象アンチセンスの構造と投与経路

Table 1 に今回調査対象とした既承認アンチセンス医薬品と参照資料を示した。Mipomersen, inotersen, volanesorsen, nusinersen は、いずれも全てのリン酸ジエステル部分の O 原子を S 原子に変換した S 化オリゴ核酸 (S オリゴ) である。このうち、mipomersen, inotersen, volanesorsen は S オリゴの両端に 2'-O-methoxyethyl (2'-MOE) を導入した gapmer であり、「5 (2'-MOE) + 10 (DNA) + 5 (2'-MOE) = 20 塩基長」の構造を有する。すなわち、これら三つのアンチセンスは塩基長並びに修飾核酸の導入パターンが同一であり、配列だけが異なっている。

Table 1 調査対象のアンチセンス医薬品一覧

一般名	商品名	修飾形態	適応症	投与経路	承認年/国	参照資料
Mipomersen	Kynamro®	2'-MOE gapmer 型 PS 結合	家族性高コレステロール血症	SC (皮下)	2013/米	3
Eteplirsen	Exondys 51®	モルフォリノ核酸	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	IV (静脈内)	2016/米	4, 5
Nusinersen ヌシネルセン	Spinraza® スピラザ®	2'-MOE 全修飾型 PS 結合	脊髄性筋萎縮症	IT (髄腔内)	2016/米 2017/EU・日	6, 7, 8
Inotersen	Tegsedi®	2'-MOE gapmer 型 PS 結合	家族性アミロイドーシス	SC	2018/EU・米	9, 10
Volanesorsen	Waylivra®	2'-MOE gapmer 型 PS 結合	家族性高コレステロール血症	SC	2019/EU	11
Golodirsen	Vyondys 53®	モルフォリノ核酸	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	IV	2019/米	12
Viltolarsen ビルトラルセン	Viltepso® ビルテプソ®	モルフォリノ核酸	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	IV	2020/日・米	13, 14

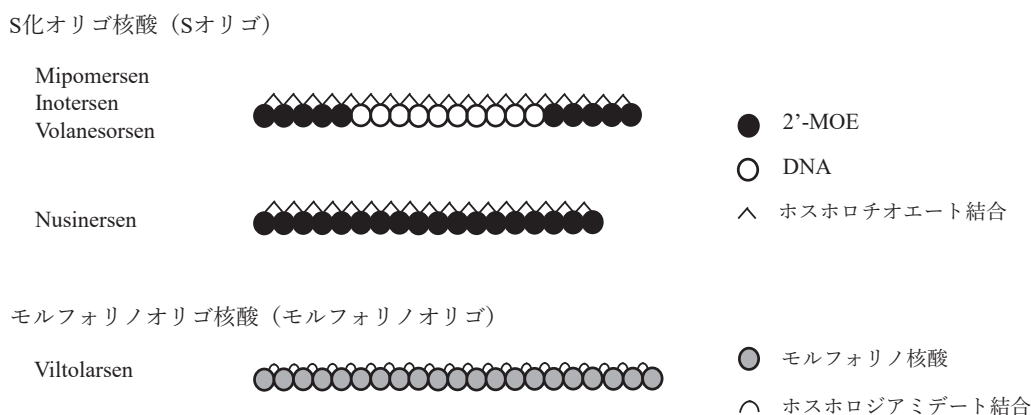


Fig. 1. 代表的なアンチセンス医薬品の構造

これら3剤はいずれも皮下投与される。NusinersenはSSO (splice-switching oligonucleotide) として機能する18塩基長のSオリゴであり、全ての核酸に2'-MOEが導入されている。今回の調査対象の中では唯一、局所投与(髄腔内投与)である。

Eteplirsen, golodirsen, viltolarsenはモルフォリノ核酸がホスホロジアミデート結合により連結されたモルフォリノオリゴである。モルフォリノオリゴは結合部に電荷を持たないため電的に中性で、また、ヌクレアーゼによる切断を受けないため安定である。Eteplirsen, golodirsen, viltolarsenの塩基長はそれぞれ30, 25, 21であり、いずれも静脈内投与される。

以上の構造的特徴(Fig. 1)並びに投与経路を念頭に、本誌2号²⁾で述べた核酸医薬品の薬物動態学的特性も踏まえながら、以降の調査結果をお読み頂きたい。なお、Sオリゴとモルフォリノオリゴで動態特性に明確な違いがある場合には両者を分けて記載したが、大きな違いがないと考えられる項目については、Sオリゴとモルフォリノオリゴの両方を包含する用語として「アンチセンス」を用いた。

2. 既承認アンチセンス医薬品の薬物動態評価

2.1 吸収(血漿中動態)

Table 2に調査結果を示した。血漿中動態は、放射性標識体(nusinersenを除く)及び非標識体を用いた薬物動態試験並びに非標識体を用いたトキシコキネティクス試験で評価されていた。動物種はげっ歯類としてマウス及びラット、非げっ歯類としてサルがほぼ全ての薬剤で使われており、mipomersenではイヌも使われていた。Nusinersenはサルのみで、げっ歯類の検討はなかった。

前述の通り、アンチセンス医薬品は種々の化学修飾によって生体内での安定化が図られている¹⁵⁾。静脈内投与後の非標識体の全身クリアランスは61.6～835 mL/h/kgと

薬剤や動物種によらず肝血流量の15%以下であった。一方で、消失半減期は化学修飾の種類によって異なる傾向があった。Sオリゴであるmipomersen及びvolanesorsenは単回投与後、血漿中から緩徐に消失し、その消失半減期はそれぞれ5～19日及び1.3～13日であった。モルフォリノオリゴであるeteplirsen, golodirsen, viltolarsenでは、消失半減期が7時間以下と速やかに消失した。薬剤によって血漿中濃度を評価した時間が異なるため一概には比較できないが、モルフォリノオリゴはSオリゴと比べて血漿蛋白結合率が低く(2.2.3項)、腎排泄されやすいため、消失が速いと考えられる。皮下投与後の薬剤は速やかに吸収され、血漿中濃度はおおむね投与後2時間までに最高となった。皮下からの吸収性は高く、サルにおけるバイオアベイラビリティはmipomersen及びeteplirsenではほぼ100%、volanesorsenでは66%～110%であった。

S化SSOであるnusinersenでは、成熟及び幼若サルを用いて、臨床投与経路である髄腔内投与時の血漿中及び脳脊髄液中薬物動態が検討されていた。

2.2 分布

2.2.1 アンチセンスの組織分布に関連する知見

アンチセンスの組織への取り込みは、血中のアンチセンスが組織内の血管内皮を通過して、組織を構成する細胞表面に到達し、細胞内に取り込まれるという一連の過程を経て達成される。このうち、血管内皮を通過する過程については、血管内皮に存在する間隙の大きさで説明されるが、細胞内へ移行する分子機構に関しては不明な点が多い。アンチセンスは低分子医薬品と比較して膜透過性が低いため、受動拡散ではなくエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる(Fig. 2)。エンドソーム内に移行したアンチセンスは、エンドソームがリソソームに成熟する過程の中でエンドソーム膜を通過して細胞質へと入り(エンドソーム脱出)、核内にある標的遺伝子に結合する。エンド

Table 2-1 承認されたアンチセンス医薬品の各動物種での単回投与後の血漿中動態 –IV 投与–

化合物	動物種	投与量 (mg/kg)	PKパラメータ					備考 ^(2,3)	
			CL (mL/h/kg)	Vd (mL/kg)	t _{1/2} (h)	C ₀ or C _{max} /Dose ⁽¹⁾ (ng/mL)/(mg/kg)	AUC/Dose ⁽¹⁾ (ng·h/mL)/(mg/kg)		
Mipomersen	非標識体	ラット(♂)	5	135	604	126	1518	7420	
		サル(♂/♀)	4	61.6	112	-	9800	16875	
	標識体 ^(3H)	ラット(♂)	5	13.6	7881	457	1702	50000	0-672h
Eteplirsen	非標識体	ラット(♂)	100	-	-	1.93	5840	3780	0-inf
		サル(♂/♀)	5	303	397	1.59	4320	3420	0-t
		サル(♂/♀)	5	137	380	1.93	6505	7607	0-36h
	標識体 ^(14C)	マウス(♂)	120(300 mCi/kg)	348	175	6.03	20750	2870	0-inf
Golodirsen	標識体 ^(14C)	マウス(♂)	120	-	-	-	4533	1517	0-t
	非標識体	マウス(♂)	12	-	-	-	3290	1130	0-t
	非標識体	サル(♂)	5	-	-	-	5320	6360	0-48h
	非標識体	マウス(♂)	60	835	474	0.393	3270	1200	0-t
	非標識体	ラット(♂)	60	-	-	0.642	2420	1420	0-24h
Viltolarsen	非標識体	サル(♂)	6	160	185	2.1	11300	6380	0-inf
	非標識体	ラット(♂)	125	-	-	-	5130	2180	0-24h
	非標識体	マウス(♂)	15	-	-	-	3850	1360	0-24h
	標識体 ^(14C)	ラット(♂)	6	358	201	1.19	5400	2920	0-inf
	非標識体	サル(♂)	20	-	-	1.7	1500	8150	0-inf

各薬剤について、動物種ごとに単回投与後の血漿中動態パラメータが示された最低用量での結果を掲載した。

(1) 標識体では、(ng eq./mL)/(mg/kg)又は(ng eq.·h/g)/(mg/kg)。

(2) 0-t: 評価可能な最終時点までのデータを基に算出。

(3) AUC及びCLの算出時の評価時間を示す。

Table 2-2 承認されたアンチセンス医薬品の各動物種での単回投与後の血漿中動態 –SC 投与–

化合物	動物種	投与量 (mg/kg)	PKパラメータ					備考 ^(2,3)		
			CL/F (mL/h/kg)	Vd/F (mL/kg)	t _{1/2} (h)	T _{max} (h)	C _{max} /Dose ⁽¹⁾ (ng/mL)/(mg/kg)		AUC/Dose ⁽¹⁾ (ng·h/mL)/(mg/kg)	
Mipomersen	非標識体	マウス	5	-	-	-	0.5	760	1482	
		ラット(♂)	3	-	-	-	0.5	1497	2707	0-24h
		イヌ(♂/♀)	2	-	-	-	1.25	900	2600	0-24h
		サル(♂/♀)	1	-	-	-	2	817	5250	
Eteplirsen	非標識体	サル(♂/♀)	320	-	-	7	7.3	0.243	5060	0-t
Inotersen	非標識体	マウス(♂)	10	-	-	-	0.5	1210	2130	0-48h
		ラット(♂)	15	108	-	-	1	2150	9270	0-48h
		サル(♂/♀)	3	84.9	-	-	2	3180	12100	0-48h
	標識体 ^(3H)	ラット(♂)	5	63.5	31800	-	1	1800	13400	0-t
	非標識体	マウス(♂/♀)	3	897	-	-	0.5	727	1110	0-48h
Volanesorsen	標識体 ^(3H)	ラット(♂)	5	97.7	-	30.2	1	1390	8160	0-48h
	非標識体	サル(♂/♀)	3	67.3	-	305	2	3260	15100	0-48h
Golodirsen	非標識体	マウス(♂)	120	-	-	-	0.5	814	1100	0-24h

各薬剤について、動物種ごとに単回投与後の血漿中動態パラメータが示された最低用量での結果を掲載した。

(1) 標識体では、(ng eq./mL)/(mg/kg)又は(ng eq.·h/g)/(mg/kg)で評価。

(2) 0-t: 評価可能な最終時点までのデータを基に算出。

(3) AUC及びCLの算出時の評価時間を示す。

Table 2-3 承認されたアンチセンス医薬品の各動物種での単回投与後の血漿中動態 –IM(筋肉内)投与–

化合物	動物種	投与量 (mg/kg)	PKパラメータ					備考 ⁽¹⁾		
			CL/F (mL/h/kg)	Vd/F (mL/kg)	t _{1/2} (h)	T _{max} (h)	C _{max} /Dose (ng/mL)/(mg/kg)		AUC/Dose (ng·h/mL)/(mg/kg)	
Viltolarsen	非標識体	サル(♂)	20	-	-	2.7	1	1220	7000	0-inf
	非標識体	サル(♂)	1	-	-	-	0.8	1940	3910	0-24h

単回投与後の血漿中動態パラメータが示された最低用量での結果を掲載した。

(1) AUC及びCLの算出時の評価時間を示す。

Table 2-4 承認されたアンチセンス医薬品の各動物種での単回投与後の血漿中動態 —IT 投与—

化合物	動物種	投与量 (mg)	PK パラメータ					備考 ⁽¹⁾
			CL/F (mL/h) (CSF)	Vd/F (mL)	t _{1/2} (day) (CSF)	T _{max} (h) (CSF)	C _{max} /Dose (ng/mL/mg) (ng·h/mL/mg)	
Nusinersen	非標識体 サル(♂/♀)	3	1.99 (CSF)	-	11.35 (CSF)	0.310 (CSF)	197000 (CSF) 578000 (CSF)	0-48h

単回髄腔内投与後の脳脊髄液 (CSF) 中動態パラメータが示された用量での結果を掲載した。

(1) AUC 及び CL の算出時の評価時間を示す。

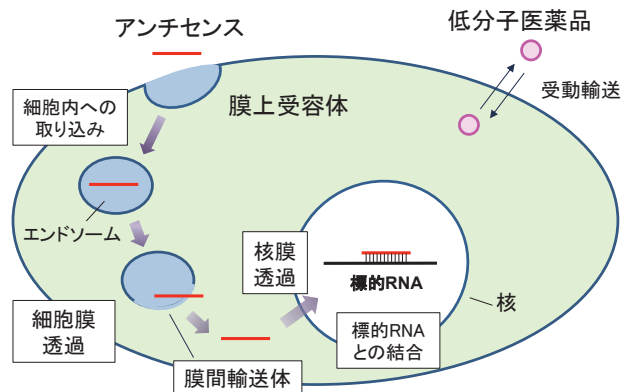


Fig. 2. 一本鎖アンチセンスの細胞内取り込み機構の模式図 (標的 RNA 結合まで)

サイトーシスに関与する分子として、Sオリゴでは肝臓の類洞内皮細胞やマクロファージの表面上に発現しているクラス H のスカベンジャー受容体 (Stabilin-1 及び Stabilin-2) が、モルフォリノオリゴではジストロフィン欠乏筋管及び筋線維に発現しているクラス A1 のスカベンジャー受容体が報告されている^{16,17)}。

このように、アンチセンスでは一つもしくは複数の受容体を介して様々な細胞に取り込まれていると考えられるが、細胞内取り込みに関与する分子の全容は明らかになっていない。

2.2.2 臓器内及び組織内濃度

Table 3 に分布の評価に関する調査結果を示した。分布試験は nusinersen 以外の 6 剤が標識体を用いて評価されており、いずれの薬剤でも非臨床薬物動態試験ガイドライン¹⁸⁾において分布試験法の一つとして記載されている定量的全身オートラジオグラフィ (QWBA) により評価されていた。Nusinersen 以外の 6 剤は静脈内もしくは皮下投与後、速やかに全身に分布しており、最も分布した臓器は動物種に関係なく全ての薬剤で腎臓であった。次いで肝臓で高く、Sオリゴの 3 剤 (mipomersen, inotersen, volanesorsen) については腸間膜リンパ節でも分布割合が高かった。

Nusinersen 以外の全身投与型の 6 剤は脳への移行性が低かったが、髄腔内投与で分布試験を行っている

nusinersen では腰髄、胸髄及び頸髄等の脊髄や大脳皮質、脳橋及び小脳等の脳へ広範に分布していた。このことから、全身投与型のアンチセンスの場合、全身から脳への薬物の移行性が血管内皮の特性 (血液脳関門) により制限されていると考えられた。アンチセンスの臓器及び組織中の消失半減期は一般的な低分子医薬品と比較して非常に長く、最も分布した腎臓では inotersen で 39.5 時間 (ラット)、volanesorsen で 23.0 日 (ラット) 及び viltolarsen で 139 ~ 367 時間 (サル) であった。また、nusinersen では髄腔内投与後の中枢神経系組織での半減期も長く、サルに単回投与後の大脳皮質では 54.0 日であった。アンチセンスは低分子医薬品に比べて分子量が大きく、水溶性も高いことから組織から血液への戻りが遅く、また、ヌクレアーゼによる分解も受けにくいから、組織中での消失半減期が長くなると考えられる。

反復投与後の分布試験が実施されていた薬剤は mipomersen, nusinersen, viltolarsen であった。Mipomersen 及び nusinersen では単回と反復投与時の組織中濃度を比較できるデータがなく、蓄積性について考察が困難であった。一方、viltolarsen (¹⁴C, サル) では静脈内反復投与 (週 1 回, 8 週間) 時における大部分の組織中の放射能濃度が単回投与時と比べて高かったが、その差は顕著ではなく、投与後 504 時間の濃度が定量下限付近まで低下していたことから、反復投与による蓄積性はないと判断されていた。

以上から、細胞内取り込み機構が十分に解明されていない現状では、アンチセンスの分布評価として、QWBA のような標識体を用いた網羅的な分布解析が有用と考えられる。その際、アンチセンスの組織中半減期を踏まえて、十分な評価時間を設定することが重要であろう。アンチセンスは組織・細胞毎に異なる分子を介して細胞内に取り込まれる可能性があり、これが不均一な組織分布を規定する一つの要因と考えられる。低分子医薬品で実施される従来の分布評価に加えて、細胞種ごとの移行量や細胞内の局在量等々を評価する方法について、今後の評価研究が望まれる。

2.2.3 蛋白結合・血球移行性

蛋白結合の評価方法は、7 剤中 5 剤が限外ろ過法、1 剤が超遠心法であり、残り 1 剤は方法が記載されていなかった

Table 3 承認されたアンチセンス医薬品の組織分布

化合物	動物種	投与経路	投与量 (mg/kg)	分布組織	組織中半減期	
Mipomersen	非標識体	サル(♂/♀)	SC	2 (反復, 2日に1回)	肝臓>腎皮質>腎髄質>骨髄>脾臓>血漿	-
		サル(♂/♀)	SC	20 (反復, 2日に1回×4→4日に1回)	腎皮質>肝臓>腎髄質>腸間膜リンパ節>脾臓>骨髄>子宮>骨髄>心臓>肺>卵巣>精巣 ⁽³⁾	-
	標識体 ^(3H)	マウス(♂)	IV	22.3 (単回)	腎皮質>腎外髄質>腎臓>皮膚>リンパ節>甲状腺>骨髄>胃>脾臓>肝臓>大腸>前立腺>小腸>膵臓>心筋	-
		ラット(♂)	IV	23.1 (単回)	腎皮質>腎臓>腎外髄質>リンパ節>肝臓>甲状腺>大腸>脾臓>骨髄>皮膚	-
	ラット(♀)	IV	24.5 (単回)	リンパ節>腎皮質>腎臓>腎外髄質>肝臓>卵巣>骨髄>甲状腺>大腸>皮膚	-	
Eteplirsen ⁽¹⁾	標識体 ^(14C)	マウス(♂) ⁽²⁾	IV	120 (単回)	尿>腎皮質>腎髄質>大腸内容物>盲腸内容物>副腎>肺>小腸内容物>球状尿道腺>肝臓>大腸>色素性皮膚>リンパ節>精巣上体>盲腸>骨髄>唾液腺>脾臓	-
		マウス(♂) ⁽²⁾	IV	120 (単回)	腎臓>大腿二頭筋>横隔膜>心臓>大腿四頭筋>上腕前脛骨筋>上腕二頭筋脳	-
Nusinersen	非標識体	サル(♂/♀)	IT	3 mg/body (単回)	腰髄>胸髄>肝臓>大脳皮質>頸髄>小脳>脳橋	頸髄 37.9 日, 胸髄 32.7 日, 小脳 47.1 日, 大脳皮質 54.0 日, 脳橋 31.2 日, 肝臓 12.2 日
		サル(♂)	IT	1 mg/body (反復, 週 1 回)	腰髄>胸髄及び頸髄領域>前頭皮質及び側頭皮質領域. 脳幹, 小脳, 海馬及び被殻にはより低濃度で分布.	脳脊髄液 102 日, 中枢神経系組織 116 日(範囲: 74.4~275 日) 日, 血漿 52.2 日
		幼若サル(♂/♀)	IT	4 mg/body (反復, 週 1 回)	腎皮質>腰髄(投与部位)>海馬>大脳皮質>胸髄>小脳>頸髄>脳橋>肝臓	脳脊髄液 111 日, 血漿 55.8 日
Inotersen	標識体 ^(3H)	ラット(♂)	SC	5 (単回)	腎臓>肝臓>腸間膜リンパ節>骨髄>甲状腺>胸腺>骨>膵臓, 脳及び脊髄には低分布	副腎 44.2 時間, 骨 24.9 時間, 骨髄 47.1 時間, 脳 36.7 時間, 眼球 36.2 時間, 脂肪組織(腎周囲) 19.4 時間, 脂肪組織(皮下) 19.2 時間, 心臓 33.2 時間, 腎臓 39.5 時間, 肝臓 12.0 時間, 肺 22.8 時間, 腸間膜リンパ節 34.0 時間, 骨格筋 26.4 時間, 膵臓 20.8 時間, 脳下垂体 52.1 時間, 前立腺 23.7 時間, 皮膚 23.0 時間, 脊髄 221 時間, 脾臓 160 時間, 精巣 75.4 時間, 甲状腺 16.6 時間
Volanesorsen	標識体 ^(3H)	ラット(♂)	SC	5 (単回)	腎臓>投与部位>肝臓>腸間膜リンパ節>骨髄	肝臓 13.6 日, 腎臓 23.0 日, その他組織 10.5~77.9 日
Golodirsen	標識体 ^(14C)	マウス(♂) ⁽²⁾	IV	120 (単回)	腎臓に最も高い分布	-
Viltolarsen	標識体 ^(14C)	マウス(♂)	IV	20 (単回)	腎臓, 大動脈, 血液, 血漿及び皮膚等に高分布	-
		サル(♂)	IV	20 (単回)	腎皮質での分布が最も高い副腎, 甲状腺, 肝臓及び脾臓等にも高分布	腎皮質 366.9 時間, 血漿 2.6 時間, 血液 0.9 時間
		サル(♂)	IV	20 (反復, 週 1回×8)	腎臓での分布が最も高い	腎皮質 139 時間, 血液 510 時間

(1) 上段は定量的全身オートラジオグラフィ(QWBA)の結果, 下段は液体シンチレーションカウンターの結果を示す.

(2) C57BL/10ScSn-DMDmdx

(3) 投与 33 日後の結果を示す.

た。蛋白結合試験に用いられた血漿の動物種は inotersen を除く 6 剤でげっ歯類(マウス及びラット)及び非げっ歯類(サル及びヒト)で実施されていたが, inotersen は非げっ歯類のみであった。S オリゴは S 化していない天然型オリゴに比べ、種々の血漿蛋白に対してより強い結合能を有することが知られている¹⁹⁾。今回調査した薬剤においても、S オリゴである 4 剤はどの動物種も 84% 以上の高い血漿蛋白結合率を示した。一方、モルフォリノオリゴの 3 剤は血漿蛋白結合率が最大でも 40% 程度であり、S オリゴの 4 剤に比べて血漿蛋白結合率が低かった。Nusinersen は脳脊髄液中の蛋白結合が検討されていたが、その蛋白結合率は血漿に比べて低く、最高でも 25% 程度であった。一般的に脳脊髄液はアルブミンやグロブリン等の蛋白濃度が血漿に比べて 1/100 以下と低いことから²⁰⁾、nusinersen の結合に関与する蛋白濃度が低いことに起因して、蛋白結合率が低くなったと考えられる。

血球移行性試験は 3 剤で実施されており、そのうち golodirsen 及び volanesorsen の 2 剤では *in vivo* で評価されていた。血球移行性が評価された薬剤はいずれも血液/血漿中濃度比が 1 未満であり、血球へはほとんど移行していなかった。

2.2.4 胎盤・胎児移行性

胎盤・胎児移行性試験は、S オリゴである mipomersen, nusinersen, inotersen, volanesorsen の 4 剤が評価されていた。非標識体を用いて妊娠マウス又は妊娠ウサギにおける臓器(肝臓もしくは腎臓)、胎盤及び胎児の臓器(主に肝臓もしくは腎臓)中の未変化体濃度が測定されていたが、いずれの薬剤においても、胎盤中濃度は妊娠動物の臓器中濃度に比べて低く、胎児の臓器中濃度は検出下限未満であった。少なくともこれら 4 剤は母体から胎児へほとん

ど移行していないと考えられる。胎盤には母体血と胎児血を隔てている血液胎盤関門が存在しており、母体から胎児への物質透過の制御機能を担っている²¹⁾。アンチセンスの負電荷と分子量に起因する生体膜透過性の低さが、母体から胎児への移行性を制限させている一つの要因として考えられる。

2.3 代謝

2.3.1 代謝安定性評価

Table 4 に調査結果を示した。アンチセンスは水溶性が高い中分子化合物であるため、チトクロム P450 (CYP) の基質になりにくい。代謝安定性評価として、S オリゴである mipomersen については CYP の基質とならないことが示されていたが、ラットやヒトの組織ホモジネートを用いた検討では、天然型オリゴよりも安定性は高いものの、経時的な減衰が認められた²²⁾。この減衰は次項で触れる通りヌクレアーゼによるものと考えられ、S オリゴはこれらの酵素の基質になり得ると考えられる。一方、モルフォリノオリゴである eteplirsen, golodirsen, viltolarsen については、肝ミクロソームを用いた CYP 代謝の検討が行われ、いずれも安定であった。また、viltolarsen は精製ヌクレアーゼに対しても安定であったことから、モルフォリノオリゴの特性として、CYP だけでなくヌクレアーゼによる代謝も受けにくいと考えられる。

2.3.2 代謝物プロファイリング評価

Table 5 に調査結果を示した。Eteplirsen を除く 6 剤において、何らかの代謝物プロファイリング評価が実施されており、このうち S オリゴの 4 剤については短鎖代謝物を検出することで、ヌクレアーゼの寄与が考察されていた。

組織における代謝に関する知見として、2'-MOE

Table 4 承認されたアンチセンス医薬品の代謝安定性評価

化合物	反応系	評価濃度	検出法	評価結果	
Mipomersen	<i>in vitro</i> 非標識体	ヒト P450 ラット及びヒト肝ホモジネート	- HPLC・UV	P450 の基質ではなかった ラット及びヒト肝ホモジネートでの CL _{int} はそれぞれ 6.33 及び 6.42 µL/h/mg. Gap 部分に PO 結合を含む類縁アンチセンスと比較して代謝速度が小さかった	
Eteplirsen	<i>in vitro</i> 標識体 (14C)	マウス・ラット・サル・ヒト肝ミクロソーム	8, 80 µmol/L	Radio-HPLC	いずれの動物種においても肝ミクロソームによる顕著な代謝は認められなかった
Golodirsen	<i>in vitro</i> 非標識体	マウス, ラット, サル, ヒト肝ミクロソーム	8, 80 µg/mL	-	時間依存的あるいは NADPH 依存的な代謝は認められなかった
Viltolarsen	<i>in vitro</i> 標識体 (14C)	マウス, ラット, サル, ヒト血清, 肝ミクロソーム, S9, DNase I, PDE I	0.1 mg/mL	Radio-HPLC	未変化体の減少は認められなかった

Table 5 承認されたアンチセンス医薬品の代謝物プロファイリング

化合物	評価組織	投与経路	評価結果 (%は各サンプルでの未変化体及び代謝物の総和に対する割合, 時点について特に記載がない場合は反復投与後の時間を示す)		
Mipomersen	<i>in vitro</i>	非標識体	ラット・ヒト肝ホモジネート	-	代謝物: 5'・9 塩基長, 5'・10 塩基長, リン酸化 3'・10 塩基長 (反応 30 分) Gap 部分のエンドヌクレアーゼによる切断⇒エキソヌクレアーゼによる短鎖化 ラット・ヒトで同様の代謝物プロファイル
	<i>in vivo</i>	非標識体	マウス肝臓, 腎臓, 胎盤	SC	未変化体: いずれの組織も概して >80%(2day) 代謝物: 5~14 塩基長 (2day)
			サル尿	IV/SC	未変化体: 60%以上 (単回投与後 24h) 代謝物: Gap 部分のエンドヌクレアーゼによる切断⇒エキソヌクレアーゼによる短鎖化 (7~14 塩基長, 単回投与後 24h)
	臨床	非標識体	尿	IV	サルと類似. ヒト特異的代謝物はなし.
Nusinersen	<i>in vivo</i>	非標識体	幼若サル血漿, CSF, 腰髄, 脳, 肝臓, 腎皮質	IT	未変化体: 血漿 98%(単回投与後 2h), 97%(反復投与後 2h), CSF 100%(7day), 腰髄・脳・肝臓 79~81%(7day), 腎皮質 79%(7day) 代謝物: 血漿 2.3%[3'N-1(17 塩基長), 単回投与後 2h], 3.1%[3'N-1(17 塩基長), 反復投与後 2h], 腰髄・脳・肝臓 17~18%[3'N-1(17 塩基長), 7day], 2.2~3.0%[3'N-2(16 塩基長), 7day], 0~2.0%[3'N-3(15 塩基長), 7day], 腎皮質 14%[3'N-1(17 塩基長), 7day], 2.5%[3'N-2(16 塩基長), 7day], 0.77%[3'N-3(15 塩基長), 7day], 0.82%[3'N-4(14 塩基長), 7day], 1.9%[5'N-1(17 塩基長), 7day], 0.66%[5'N-2(16 塩基長), 7day], 0.82%[5'N-3(15 塩基長), 7day]
	臨床	非標識体	血漿, 尿, CSF	IT	未変化体: 血漿約 98%(単回・反復投与後 4h), 尿 63%(単回・反復投与後 0-24h) 代謝物: 血漿 2%[3'N-1(17 塩基長), 単回・反復投与後 4h], 尿 約 28%[3'N-1(17 塩基長), 単回・反復投与後 0-24h], 約 8%[3'N-2(16 塩基長), 単回・反復投与後 0-24h], CSF 0%(56day)
Inotersen	<i>in vivo</i>	非標識体	マウス血漿, 尿, 肝臓, 腎臓	SC	未変化体: 血漿 97%(0.5h), 尿 69%(0-24h), 46%(24-48h), 肝臓・腎臓 80~92%(48h) 代謝物: 血漿 各<1%[N-1(19 塩基長)及び 6~12 塩基長, 0.5h], 尿 各 0.2~8.4%[N-1(19 塩基長), N-2(18 塩基長)及び 5~14 塩基長, 0-24h], 各 2.5~11%[N-1(19 塩基長)及び 5~13 塩基長, 24-48h], 肝臓・腎臓 各 <5%[N-1(19 塩基長)及び 7~14 塩基長, 48h]
			サル血漿, 肝臓, 腎臓	SC	未変化体: 血漿 95%(2h), 肝臓・腎臓 82~95%(48h) 代謝物: 血漿 各<2%(8~12 塩基長, 2h), 肝臓・腎臓 各<5%[N-1(19 塩基長)及び 8~15 塩基長, 48h]
		標識体 (3H)	ラット血漿, 尿, 糞, 肝臓, 腎臓	SC	未変化体: 血漿 73%(2h), 尿・糞 非常に少量, 肝臓・腎臓 >69%(24h) 代謝物: 血漿 検討なし, 尿・糞 3'末端欠落代謝物(5~8 塩基長)が主, 肝臓・腎臓 <10%(3'末端欠落代謝物(24h)), 腎臓 5'末端欠落体(標識部位欠落)を検出
	臨床	非標識体	血漿, 尿	SC	未変化体: 血漿 74%(4h), 尿 7.8%(0-24h) 代謝物: 血漿 各<7%(6~12 塩基長, 4h), 尿 各 0.7~17%(5~12 塩基長, 0-24h)
Volanesorsen	<i>in vivo</i>	非標識体	マウス血漿, 尿, 肝臓, 腎臓	SC	未変化体: 血漿 96%(1h), 63%(7day), 尿 約 85%*(0-24h), 約 35%*(24-48h), 肝臓・腎臓 >70%(48h), <50%(13week) 代謝物: 血漿 <5%*[3'N-1(19 塩基長)が最多, 1h], 12%[3'N-1(19 塩基長), 7day], 24%(5 塩基長, 7day), <1%(その他, 7day), 尿 5 塩基長~N-1(19 塩基長)を検出: 5 塩基長(約 5%*)が最多(0-24h), 7 塩基長(約 20%*)が最多(24-48h), 肝臓・腎臓 N-3(17 塩基長)~N-1(19 塩基長)及び 6~15 塩基長を検出: N-1(19 塩基長)[約 10%*(48h), 約 20%*(13week)]が最多
		標識体 (3H)	ラット血漿, 尿, 糞, 肝臓, 腎臓	SC	未変化体: 血漿 64~71%(単回投与後 2h), 検出不可(単回投与後 24h), 尿 2.5~11%(単回投与後 0-24h), 肝臓・腎臓 56~79%(単回投与後 24h) 代謝物: 血漿 微量(単回投与後 2h), 検出不可(単回投与後 24h), 尿 26~40%(3'末端欠落 6 塩基長), 16~29%(3'末端欠落 7 塩基長)(単回投与後 0-24h), 糞 <0.3%[3'末端欠落 6 塩基長及び 7 塩基長が主(単回投与後 0-24h)], 肝臓 検出不可, 腎臓 微量[3'末端欠落 7 塩基長及び 8 塩基長, 5'末端欠落 6 塩基長(単回投与後 24h)]
		非標識体	サル血漿, 尿, 肝臓, 腎臓	SC	未変化体: 血漿 98%(2h 及び 7day の両時点), 尿 約 20%*(0-24h), 約 30%*(24-48h), 肝臓・腎臓 >82%(48h), 48~52%(13week) 代謝物: 血漿 微量*(2h 及び 7day の両時点), 尿 5~19 塩基長を検出: 7 塩基長[約 30%*(0-24h), 約 25%*(24-48h)]が最多, 肝臓・腎臓 マウスと同様の代謝物プロファイル
	臨床	非標識体	血漿, 尿	SC	未変化体: 血漿 99%(4h 及び 7day の両時点), 尿 <5%*(単回投与後 0-24h), 25%*(反復投与後 0-24h) 代謝物: 血漿 微量*(4h 及び 7day の両時点), 尿 5~19 塩基長を検出: 7 塩基長[約 45%*(単回投与後 0-24h), 約 30%*(反復投与後 0-24h)]が最多, ヒト特異的代謝物 <0.1%(5'末端欠落 18 塩基長及び 16 塩基長)
Golodirsen	臨床	非標識体	血漿, 尿	IV	代謝物は認められなかった.
Viltolarsen	<i>in vivo</i>	標識体 (14C)	ラット腎臓	IV	未変化体: 76%(単回投与後 2h), 58%(単回投与後 24h)
	<i>in vivo</i>	標識体 (14C)	サル血漿, 尿	IV	未変化体: 血漿 >90%(単回投与後 5, 15, 30, 60 min), 尿 >85%(単回投与後 0-6h 及び 6-24h)

*: グラフより読み取った値を示す.

gapmer の mipomersen について、肝ホモジネートを用いた検討が報告されている²²⁾。Mipomersen はまずエンドヌクレアーゼにより Gap 部分(糖部修飾がなされていない中央領域)が切断されて、短鎖のオリゴ核酸が生じる。更に短鎖オリゴがエキソヌクレアーゼによって末端から分解され、より短鎖の代謝物が生成することが示されている。同じ 2'-MOE gapmer である inotersen 及び volanesorsen については、マウス及びサル肝臓・腎臓において、HPLC-UV 吸収により各代謝物の概量が評価されており²³⁾、また、ラットにおいては標識体を用いて定量評価が実施されていた。その結果、これら 2 剤はいずれも各動物の組織において約 70% 以上が未変化体として存在した。代謝物については、Gap 部分で切断された短鎖オリゴ核酸のほか、全長配列の末端の 1~2 塩基が切断された代謝物が認められたが、その存在割合はいずれも小さく、未変化体及び代謝物総和の約 5% 以下であった。

全長にわたり 2'-MOE で修飾された nusinersen は、サルにおいて末梢組織に加えて標的組織である腰髄及び大脳皮質についても検討されており、いずれも 3' 末端から切断されたと考えられる代謝物が最大約 20% 存在した。Nusinersen は Gap 部分を持たないことから、エンドヌクレアーゼによる切断を受けにくく、実際にそのような代謝物は検出されていない。モルフォリノオリゴについては viltolarsen のみ検討が行われており、ラット腎臓において 58% 以上が未変化体として存在していた (¹⁴C 標識体での検討)。

血漿や脳脊髄液などの体液における代謝物の存在量は、組織における代謝物の存在量より相対的に小さく、S オリゴ(nusinersen, inotersen, volanesorsen) 及びモルフォリノオリゴ(viltolarsen) のいずれの薬剤でも動物において検出されないか、あるいは各代謝物の存在比(未変化体及び代謝物総和に対する割合)はほぼ 10% 未満であった。Volanesorsen (20 塩基長) については、マウスにおいて投与 7 日後のみ短鎖の代謝物(5 塩基長) 及び N-1 代謝物(19 塩基長) が 10% を超えたが、サル血漿においてはほぼ未変化体として検出された。代謝物の循環量が少ないことは臨床においても同様であり、nusinersen, inotersen, volanesorsen, golodirsen について、血漿での代謝物の存在比はそれぞれ 10% 未満であった。なお、マウスにおける volanesorsen の検討については、最高血漿中濃度付近の投与 1 時間後ではほとんどが未変化体であったことから(96%)、投与 7 日後に 10% を超えて検出された上記二つの代謝物(5 及び 19 塩基長) は、AUC ベースでの存在比は低いと推察される。

アンチセンスは血漿中での代謝物量が少なく、代謝物プロファイルの種差検討には限界がある。一方で、尿中では

比較的多くの代謝物が検出され、薬剤代謝の最終像を反映すると推察されることから、低分子医薬品と同様に、尿中代謝物プロファイルは種差検討に有用であると考えられる。血漿及び組織中代謝物の結果からもアンチセンスの代謝種差は小さいと推察されるが、実際に臨床での尿中代謝物プロファイルは mipomersen, volanesorsen においてサルとの類似性が認められ、代謝物の存在量が多かった。一方で、動物試験の結果が示されていない golodirsen についても、*in vitro* 代謝安定性評価で各動物種において安定であり、臨床で代謝物が認められなかった。

以上から、アンチセンスの代謝特性として、S オリゴは全身に存在するエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによる代謝を受け、短鎖代謝物となった後、血漿蛋白や組織との結合力が弱まり速やかに尿中に排泄されると考えられる。また、モルフォリノオリゴは複数の *in vitro* 評価系において極めて安定であること、また、viltolarsen においてサル尿中に主に未変化体として排泄されていることから、概して代謝的に安定であると考えられる。多様な代謝特性を示し、しばしば代謝種差が認められる低分子医薬品と比べて、アンチセンスは配列によらず S オリゴ及びモルフォリノオリゴそれぞれで代謝特性が類似しており、代謝種差は小さいと推察される。また、全身循環する代謝物は微量であると考えられる。

上市済みの三つの siRNA 医薬品のうち、patisiran 及び givosiran の代謝物プロファイルについても簡単に触れる。脂質ナノ粒子に包含される patisiran は siRNA を構成する一部の核酸の糖部に 2'-OME 修飾が施されている。一方、薬物送達キャリアを用いない givosiran については、ヌクレアーゼ耐性を付与するため全ての核酸の糖部に 2'-OME あるいは 2'-F の修飾がなされ、更に両鎖(センス鎖・アンチセンス鎖)の末端が S 化されている。両薬剤の試験成績から、いずれも一本鎖アンチセンスと同様にエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによる代謝を受け、短鎖代謝物となって消失することが示されている²⁴⁻²⁶⁾。

バイオ医薬品(蛋白質、融合蛋白質及び抗体)については、生体内で生成するペプチドやアミノ酸の分解及び異化が既知であり、また、もともと生体に含まれるものであるため、非標識体を用いた動態解析を実施する意義は低いと考察されている²⁷⁾。一方、核酸医薬品は化学修飾された核酸が含まれるため、既承認アンチセンスのように *in vivo* における代謝物プロファイリング情報を取得し、情報を蓄積していくことは意味があると考えられる。

アンチセンスの代謝プロファイリングとして、RI 標識体と非標識体両面からのアプローチがあるが、RI 標識体は入手面や標識位置の設定に課題がある。一方で、非標識体を用いた UV 吸収による概量評価は、短鎖化による大

幅なモル吸光係数の変化等、定量性に課題が残る。以上から、RI 標識体での検討及び非標識体での HPLC あるいは LC-MS(/MS) を用いた概量評価と絶対量評価の利点や課題を整理した上で、より核酸医薬品に即した定量的かつ網羅的な代謝プロファイリング手法について今後の評価研究が望まれる。

2.4 排泄

Table 6 に調査結果を示した。尿糞中排泄は nusinersen (局所投与) を除いた 6 剤について、放射性標識体を用いた解析がなされており、いずれの薬剤も主な排泄経路は尿中排泄であった。S オリゴ (mipomersen, inotersen, volanesorsen) の排泄は緩徐であり、試験期間終了時点 (投与後 14 ~ 56 日間) でラット屍体中に 19 ~ 30% の放射能が残存した。モルフォリノオリゴ (eteplirsen, golodirsen, viltolarsen) は試験期間 (投与後 7 ~ 14 日) 内で投与した放射能の 77% 以上が体外に排泄され、S オリゴと比較して排泄は速やかであった。一般にアンチセンスは糸球体ろ過により尿中排泄される大きさの薬物であるが、血漿蛋白に結合した場合にはその結合体の大きさから糸球体ろ過されにくくなる。S オリゴでは血漿蛋白に強く結合することから未変化体の尿中排泄が抑制され、代謝された後に主に尿中に排泄されたのに対し、モルフォリノオリゴでは血漿蛋白への結合が弱いことから主に未変化体のまま尿中に排泄されたと考察できる (2.3.2 項)。したがって、S オリゴとモルフォリノオリゴの排泄速度の違いは、蛋白結合性の違い (2.2.3 項) によるものと推察される²⁸⁾。

一方、nusinersen では他のアンチセンスと同様に組織中で短鎖のオリゴ核酸に代謝された後に尿中へ排泄されると推定し、実験的評価は行われなかった。

乳汁移行性は S オリゴである mipomersen, volanesorsen,

inotersen, nusinersen で検討され、いずれの薬剤も乳汁への移行が確認された。胆汁排泄を評価した薬剤はなかった。

2.5 DDI

既承認のアンチセンス医薬品 7 剤及び論文報告のあるアンチセンスの *in vitro* DDI 試験情報を Table 7 に記載した。いずれの承認薬においても、平成 30 年 7 月発出の「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」(以下、ガイドライン) に記載されている CYP 阻害、UGT 阻害、CYP 誘導、トランスポーター基質性、トランスポーターの阻害作用について評価されていた。以下に各試験について詳細を記載する。

2.5.1 代謝酵素阻害

承認 7 剤のうち 3 剤は肝ミクロソーム、4 剤は肝細胞を用いた試験結果が示されていた。多くの薬剤では CYP 阻害作用を示さなかったが、eteplirsen は CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 に対して (Ki 値: 0.553-7.58 mg/mL), viltolarsen は CYP1A2, CYP3A4, UGT1A1 に対して阻害作用を示した (Ki 値: 642-1090 μ mol/L)。これらの Ki 値は生体内濃度と比較して非常に高く、実質的に *in vivo* で阻害する可能性は低いと考えられる。

弱いながらも阻害活性を示した上記の 2 剤はいずれもモルフォリノオリゴであり、また、いずれも肝ミクロソームを用いた試験系で評価されていた。代謝酵素阻害の試験法については、肝ミクロソームを用いる試験法と肝細胞を用いる試験法があるが、両者を比較した知見を簡単に紹介する。Kazmi らは肝ミクロソームと肝細胞を用いてアンチセンスの CYP 及び UGT 阻害作用を評価した³¹⁾。その結果、肝ミクロソームにおいては、CYP 及び UGT に対する阻害が認められ、1 μ mol/L 以下の IC₅₀ 値を示したのもあつ

Table 6 承認されたアンチセンス医薬品の排泄 (マスバランス試験)

化合物	動物種	投与経路	投与量 (mg/kg)	排泄率・排泄量
Mipomersen	標識体 (3H) ラット	IV	5	尿 26.3%, 糞 4.2%, 屍体 30.1%, ケージ 1.0% (投与後 336 時間まで, 回収率 83%)
Eteplirsen	標識体 (14C) マウス(♂) ⁽¹⁾	IV	120	尿 32.3%, 糞 22.1%, 屍体 1.11%, ケージ 27.6% (投与後 336 時間まで, 回収率 83.2%)
Inotersen	標識体 (3H) ラット(♂)	SC	5	尿 45.2%, 糞 11.5%, 屍体 21%, ケージ 1.41% (投与後 1344 時間まで, 回収率約 80%)
Volanesorsen	標識体 (3H) ラット(♂♀)	SC	5	尿 48%, 糞 7.67%, 屍体 19.1%, ケージ 1.98% (投与後 56 日まで, 回収率約 77%)
Golodirsen	標識体 (14C) マウス(♂) ⁽¹⁾	IV	120	尿 74.9%, 糞 9.64%, 屍体 0.78%, ケージ 7.79% (投与後 336 時間まで, 回収率 93.1%)
Viltolarsen	標識体 (14C) ラット(♂)	IV	20	尿 89.60%, 糞 7.74%, ケージ 0.48%, 呼吸から検出されず(投与後 168 時間まで, 回収率 99.02%)
	標識体 (14C) サル(♂)	IV	20	尿 28.40%, 糞 1.20%, ケージ(尿由来と推定) 47.08%(投与後 168 時間まで, 回収率 76.99%)

(1) C57BL/10ScSn-DMDmdx

Table 7 承認された及び論文報告されたアンチセンスの DDI 評価

化合物	代謝阻害			CYP 誘導		TP 基質性	TP 阻害	
	評価系	評価濃度	評価結果	評価濃度	評価結果	評価結果	評価濃度	評価結果
Mipomersen	CHHs	8-800 μg/mL	阻害無し	1-500 μg/mL	誘導無し	基質でない*	≤100 μmol/L	阻害無し
Eteplirsen	HLMs	≤10.65 mg/mL	K _i : 0.553-7.58 mg/mL	≤6.66 mg/mL	弱い CYP1A2 誘導 (10% of PC 以下)	基質でない	-	弱い OCT1, OATP1B1 阻害
Nusinersen	CHHs	-	阻害無し	-	誘導無し	基質でない	-	阻害無し
Inotersen	CHHs	≤100 μmol/L	阻害無し	≤100 μmol/L	誘導無し	基質でない	≤100 μmol/L	阻害無し
Volanesorsen	CHHs	≤100 μmol/L	阻害無し	≤100 μmol/L	誘導無し	基質でない	1.6 μmol/L	阻害無し
Golodirsen	HLMs	≤6.25 mg/mL	阻害無し	≤6.25 mg/mL	CYP1A2: Control 比 2倍以上 (活性) mRNA 誘導なし	基質でない	≤1 mg/mL	IC ₅₀ : ≥1 mg/mL
Viltolarsen	HLMs	≤3000 μmol/L	K _i : 661, 1090 μmol/L (CYP1A2, 3A4) K _i : 642 μmol/L (UGT1A1)	≤3000 μmol/L	CYP3A4: (Control 比 2.3 倍, 10% of PC 以下) (3000 μmol/L, mRNA)	基質でない	≤3000 μmol/L	IC ₅₀ : 1970 μmol/L (BCRP) IC ₅₀ : 485, 448, 176 μmol/L (OATP1B1, 1B3, OAT3)
Imetelstat ²⁹⁾	HLMs CHHs	≤100 μmol/L ≤100 μmol/L	IC ₅₀ : ≥0.7 μmol/L (CYPs) IC ₅₀ : >100 μmol/L	- -	- -	- -	- -	- -
PS-ASO	HLMs CHHs	≤100 μmol/L ≤100 μmol/L	IC ₅₀ : ≥0.8 μmol/L (CYPs, UGTs) IC ₅₀ : 35, 49 μmol/L (CYP2C8, 3A4/5)	- -	- -	- -	- -	IC ₅₀ : 12-92 μmol/L (OATPs, OATs, OCT2)
PO-ASO	HLMs CHHs	≤100 μmol/L ≤100 μmol/L	IC ₅₀ : >29 μmol/L (CYP2C19) IC ₅₀ : 36, 77 μmol/L (CYP2C19, CYP2B6)	- -	- -	- -	- -	IC ₅₀ : 17-69 μmol/L (OATs, OCT2)
ISIS 304801 ³⁰⁾	CHHs	≤100 μmol/L	阻害無し	≤100 μmol/L	CYP1A2: Control 比 2.01±0.111 倍 (mRNA) CYP3A4: Control 比 2.28±0.200 倍 (活性)	基質でない	≤100 μmol/L	阻害無し
ISIS 420915 ³⁰⁾	CHHs	≤100 μmol/L	阻害無し	≤100 μmol/L	誘導無し	基質でない	≤100 μmol/L	阻害無し
ISIS 681257 ³⁰⁾	CHHs	≤100 μmol/L	阻害無し	≤100 μmol/L	誘導無し	基質でない	≤100 μmol/L	阻害無し

BCRP: breast cancer resistance protein, CHH: ヒト凍結肝細胞, CYP: シトクロム P450, HLM: ヒト肝ミクロソーム, IC₅₀: half maximal inhibitory concentration, K_i: inhibitory constant, OAT: organic anion transporter, OATP: organic anion transporting polypeptide, OCT: organic cation transporter, PC: 陽性対照, PO: phosphodiester, PS: phosphorothioate, UGT: UDP グルクロン酸転移酵素, TP: transporter.

*: P-gp (P-glycoprotein) のみ評価

た。一方で、肝細胞を用いた際には同じ代謝酵素に対して阻害作用は弱く、 IC_{50} の最小値は $35 \mu\text{mol/L}$ であった。承認薬では、試験系に肝ミクロソームを用いた2剤において阻害作用が認められ、肝細胞を用いた4剤は阻害作用が認められなかった。これらの結果はKazmiらの報告と傾向として類似していた。

二つの評価法間で結果が乖離している理由として、細胞内濃度の不均一性が考えられる。アンチセンスは前述(2.2.1項, Fig. 2)の通りエンドサイトーシスによりエンドソーム内に移行した後、エンドソーム膜を通過して細胞質へと到達するが、膜透過性が低いため、エンドソーム内に滞留する傾向にあることが知られている(すなわち、エンドソーム脱出が細胞内到達の律速と考えられる)³²⁾。そのため代謝酵素近傍濃度は低くなると考えられ、局在過程がない肝ミクロソーム試験系と結果に違いが出ると考えられる。このエンドソーム脱出は薬効発現の観点からも重要であり、PK/PD解析上も細胞内濃度の不均一性が議論となっている^{33,34)}。肝ミクロソーム試験系は代謝阻害ポテンシャルを検出するには有用であるが、*in vivo*への濃度的な外挿を考察する際には過大評価する懸念がある。このことから、細胞内不均一性まで含めた、より*in vivo*に近い評価が可能な肝細胞試験系の方が、核酸医薬品に適した試験系であると考えられる。

2.5.2 CYP誘導

承認7剤中、Sオリゴの4剤では、CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4の誘導作用は認められなかった(Table 7)。モルフォリノオリゴのeteplirsenについては、CYP2B6及びCYP3A4に対して 6.66 mg/mL まで誘導作用が認められなかった。CYP1A2に対してはmRNA誘導作用が認められたものの、その上昇率(0.675-6.39倍)は陽性コントロール(omeprazole: 46.5-90.5倍)の10%以下であり、陰性コントロール(flumazenil: 2.41-6.11倍)と同等であった。また、臨床最高血漿中濃度(C_{max})である $80 \mu\text{g/mL}$ (30 mg/kg 投与後)と比較して十分高い濃度で実験されていた。その他のモルフォリノオリゴ(golodirsen, viltolarsen)もCYP誘導作用が示唆される結果は得られているものの、高濃度条件下で代謝活性のみの上昇であったり、1ロットの肝細胞のみの結果であったりするため、その作用は明確ではなかった。

以上から、概して明確なCYP誘導作用は認められず、現段階ではアンチセンスがCYP誘導作用を持ちうることを積極的に支持する根拠は乏しいと考えられる。

2.5.3 トランスポーター基質性

多くの薬剤で、P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, MATE2K, OCT2, OAT1, OAT3などのガイドラインに記載のトランスポーターの基質性が評価され

ていた。しかしながら、承認7剤及び論文報告のあるアンチセンス全てにおいて、トランスポーターの基質とはならなかった。一般的にガイドラインに記載のある薬物トランスポーターの基質は分子量1000が上限といわれており³⁵⁾、これまでにこれらの基質となるオリゴ核酸は報告されていない。アンチセンスの細胞内取り込み機構としては前述(2.2.1項, Fig. 2)の通り、エンドサイトーシスが関与していると報告されている³⁶⁾。そのため、アンチセンスが低分子を輸送する薬物トランスポーターの基質となる可能性は低いと考えられる。

2.5.4 トランスポーター阻害

多くの承認薬でガイドラインに記載のトランスポーターの典型基質に対する阻害作用は示さないか、もしくは弱かった(IC_{50} 値 $100 \mu\text{mol/L}$ 以上)。一方で、承認薬ではないがトランスポーターの阻害作用を示すアンチセンスも報告されている。阻害作用として認められた $12\text{-}92 \mu\text{mol/L}$ ($104\text{-}736 \mu\text{g/mL}$, 分子量8000の場合)程度の IC_{50} 値は、静脈内投与後のアンチセンスの C_{max} (例: viltolarsenのヒトへ 80 mg/kg 投与後の C_{max} $329 \mu\text{g/mL}$)と同等のために注意が必要である。一方で、アンチセンスの血漿中濃度は静脈内投与後速やかに低下する推移を示すことが多いため、*in vivo*におけるトランスポーターの阻害作用は限定的である可能性も考えられる。

2.5.5 臨床DDI試験

これまでに、5報の論文で臨床DDI試験結果が報告されているが、アンチセンスが相互作用薬、被相互作用薬の場合のいずれにおいても有意な相互作用は認められなかった³⁷⁻⁴¹⁾。これらの臨床DDI試験はガイドラインに記載の典型基質を使用しての特定の代謝酵素又はトランスポーターを介した薬物動態学的相互作用を評価する試験ではなく、想定される併用薬との相互作用を包括的に評価したと考えられる。承認薬はいずれもCYPやトランスポーターの基質とならず、有意な阻害や誘導能も示されていないことから、代謝酵素及びトランスポーターに関与する臨床DDI試験が必要な状況となっていないことが理由と考えられた。

3. 終わりに

本稿においては、吸収・分布・代謝・排泄・DDIの非臨床薬物動態試験を中心に、既承認核酸医薬品の中で最も承認事例の多いアンチセンスを対象とした調査研究の結果を示した。

調査結果を概略すると、アンチセンスは全身投与後に速やかに吸収され、腎臓や肝臓を主とした組織に分布すること、モルフォリノオリゴと比較してSオリゴの血漿中半減

期は長く、その理由は血漿蛋白結合の差異による排泄速度の違いであること、いずれのアンチセンスも主な排泄経路は尿中であることが示唆された。代謝の特性として、アンチセンスの代謝種差は小さく、Sオリゴはヌクレアーゼによる代謝を受け、主として短鎖代謝物として尿中排泄されること、モルフォリノオリゴは代謝を受けずに主に未変化体として尿中排泄されること、いずれも全身循環する代謝物は微量であることが示唆された。DDIの特性として、トランスポーターの基質性やCYP誘導能を示唆する結果は乏しく、代謝酵素やトランスポーターに対する阻害のポテンシャルは弱いながら散見されること、その作用が試験系により異なることから、細胞内での分布特性を加味したより臨床を反映する評価法が必要と考えられた。

更に、アンチセンス医薬品が低分子医薬品や抗体医薬品と異なった特徴的な性質を示す要因の考察、及びSオリゴとモルフォリノオリゴの共通の特性及び差異についての考察を加えた。多様な動態特性を示す低分子医薬品と比べると、アンチセンスはオリゴ核酸という特性に支配されるため、動態的多様性は低分子よりも小さいと考えられるが、今後承認される薬剤あるいは開発品の情報を蓄積していくことで、核酸医薬品の動態特性はより明確になっていくと考えられる。また、核酸医薬品の動態特性をよりの確に評価する新たな試験系の開発や、臨床DDIの定量的な予測手法の確立など、より核酸医薬品に最適化された試験系や方法論の構築が望まれる。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Roberts, SA.; Drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2003, **6** (1), p.66-80.
- 2) 高草英生, 岩崎紀彦, 西川元也, 吉田徳幸, 小比賀聡, 井上貴雄:「核酸医薬品の薬物動態特性とその評価」: 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2021, **52** (2), p.76-84.
- 3) U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Pharmacology Review (s), Application Number: 203568Orig1s000, 2013.
- 4) U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Pharmacology Review (s), Application Number: 206488Orig1s000, 2016.
- 5) U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review (s), Application Number: 206488Orig1s000, 2016.
- 6) U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Pharmacology Review (s), Application Number: 209531Orig1s000, 2016.
- 7) European Medical Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. Assessment report, Procedure

- No. EMEA/H/C/004312/0000, 2017.
- 8) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構, ヌシネルセンナトリウム審査報告書 2017.
- 9) European Medical Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. Assessment report, Procedure No. EMEA/H/C/004782/0000.
- 10) U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Pharmacology Review (s), Application Number: 211172Orig1s000, 2018.
- 11) European Medical Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. Assessment report, Procedure No. EMEA/H/C/004538/0000, 2019.
- 12) U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Non-Clinical Review (s), Application Number: 211970Orig1s000, 2019.
- 13) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. ビルテプソ審査報告書. 令和2年2月19日.
- 14) U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Non-Clinical Review (s), Application Number: 212154Orig1s000, 2020.
- 15) Shen, X.; Corey, DR. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2018, **46** (4), p.1584-1600. doi.org/10.1093/nar/gkx1239.
- 16) Miller, CM.; Donner, AJ.; Blank, EE.; Egger, AW.; Kellar, BM.; Østergaard, ME.; Seth, PP.; Harris, EN. Stabilin-1 and Stabilin-2 are specific receptors for the cellular internalization of phosphorothioate modified antisense oligonucleotides (ASOs) in the liver. *Nucleic Acids Res.* 2016, **44** (6), p.2782-2794. doi.org/10.1093/nar/gkw112.
- 17) Janssen, MJ.; Nieskens, TTG.; Steevens, TAM.; Caetano-Pinto, P.; den Braanker, D.; Mulder, M.; Ponstein, Y.; Jones, S.; Masereeuw, R.; den Besten, C.; Wilmer, MJ. Therapy with 2'-O-Me Phosphorothioate Antisense Oligonucleotides Causes Reversible Proteinuria by Inhibiting Renal Protein Reabsorption. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019, **18**, p.298-307. doi.org/10.1016/j.omtn.2019.08.025.
- 18) 厚生労働省医薬安全局審査管理課長. 非臨床薬物動態試験ガイドラインについて. 医薬審第496号, 平成10年6月26日. <https://www.pmda.go.jp/files/000206161.pdf>.
- 19) Srinivasan, SK.; Iversen, P. Review of in vivo pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate oligonucleotides. *J. Clin. Lab. Anal.* 1995, **9** (2), p.129-137. doi.org/10.1002/jcla.1860090210
- 20) Shen, DD.; Artru, AA.; Adkison, KK.; Danny, D. Principles and applicability of CSF sampling for the assessment of CNS drug delivery and pharmacodynamics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004, **56** (12), p.1825-1857. doi.org/10.1016/j.addr.2004.07.011.
- 21) Prouillac, C.; Lecoeur, S. The Role of the Placenta in Fetal Exposure to Xenobiotics: Importance of Membrane Transporters and Human Models for Transfer Studies. *Drug Metab Dispos.* 2010, **38** (10), p.1623-1635. doi.org/10.1124/dmd.110.033571.
- 22) Baek, MS.; Yu, RZ.; Gaus, H.; Grundy, JS.; Geary, RS. In vitro metabolic stabilities and metabolism of 2'-O-(methoxyethyl) partially modified phosphorothioate antisense oligonucleotides in preincubated rat or human whole liver homogenates. *Oligonucleotides.* 2010, **20** (6), p.309-316. doi: 10.1089/oli.2010.0252.

- 23) Post, N.; Yu, R.; Greenlee, S.; Gaus, H.; Hurh, E.; Matson, J.; Wang, Y. Metabolism and Disposition of Volanesorsen, a 2'-O-(2-methoxyethyl) Antisense Oligonucleotide, Across Species. *Drug Metab Dispos.* 2019, 47 (10), p.1164-1173. doi: 10.1124/dmd.119.087395.
- 24) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. パチシランナトリウム審査報告書. 令和元年5月16日.
- 25) U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Multi-Discipline Review, Application Number: 212194Orig1s000, 2019.
- 26) Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties of Full Phosphorothioate Small Interfering RNAs for Gene Silencing In Vivo. *Nucleic Acid Ther.* 2020 Apr 20. doi: 10.1089/nat.2020.0852. Online ahead of print.
- 27) ICH Harmonised Tripartite Guideline, Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-derived Pharmaceuticals S6 (R1), 2011.
- 28) Ferrari, N.; Seguin, R. Oligonucleotide-Based Drugs and Therapeutics: Preclinical and Clinical Considerations for Development. Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, 2018.
- 29) Kazmi, F., Sensenhauser, C. & Greway, T. Characterization of the In Vitro Inhibitory Potential of the Oligonucleotide Imetelstat on Human Cytochrome P450 Enzymes with Predictions of In Vivo Drug-Drug Interactions. *Drug Metab Dispos.* 2019, 47 (1), p.9-14. doi:10.1124/dmd.118.084103.
- 30) Shemesh, C. S., Yu, R. Z., Warren, M. S., Liu, M., Jahic, M., Nichols, B., Post, N., Lin, S., Norris, D. A., Hurh, E., Huang, J., Watanabe, T., Henry, S. P. & Wang, Y. Assessment of the Drug Interaction Potential of Unconjugated and GalNAc3-Conjugated 2'-MOE-ASOs. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2017, 9, p.34-47. doi:10.1016/j.omtn.2017.08.012.
- 31) Kazmi, F.; Yerino, P.; McCoy, C.; Parkinson, A.; Buckley, D. B.; Ogilvie, B. W. An Assessment of the In Vitro Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes, UDP-Glucuronosyltransferases, and Transporters by Phosphodiester- or Phosphorothioate-Linked Oligonucleotides. *Drug Metab Dispos.* 2018, 46 (8), p.1066-1074. doi:10.1124/dmd.118.081729.
- 32) Crooke, S. T.; Wang, S.; Vickers, T.A.; Shen, W.; & Liang, X.H. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* 2017, 35 (3), p.230-237. doi:10.1038/nbt.3779.
- 33) Ochaba, J.; Powers, A.F.; Tremble, K.A.; Greenlee, S.; Post, N.M.; Matson, J.E.; MacLeod, A.R.; Guo, S.; Aghajan, M. A novel and translational role for autophagy in antisense oligonucleotide trafficking and activity. *Nucleic Acids Res.* 2019, 47 (21), p.11284-11303. doi:10.1093/nar/gkz901.
- 34) Geary, R.S.; Wancewicz, E.; Matson, J.; Pearce, M.; Siwkowski, A.; Swayze, E.; Bennett, F. Effect of dose and plasma concentration on liver uptake and pharmacologic activity of a 2'-methoxyethyl modified chimeric antisense oligonucleotide targeting PTEN. *Biochem. Pharmacol.* 2009, 78 (3), p.284-291. doi:10.1016/j.bcp.2009.04.013.
- 35) Giacomini, K.M.; Huang, S.M.; Tweedie, D.J.; Benet, L.Z.; Brouwer, K.L.; Chu, X.; Dahlin, A.; Evers, R.; Fischer, V.; Hillgren, K.M.; Hoffmaster, K.A.; Ishikawa, T.; Keppler, D.; Kim, R.B.; Lee, C.A.; Niemi, M.; Polli, J.W.; Sugiyama, Y.; Swaan, P.W.; Ware, J.A.; Wright, S.H.; Yee, S.W.; Zamek-Gliszczynski, M.J.; Zhang, L. Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9 (3), p.215-236. doi: 10.1038/nrd3028.
- 36) Miller, C.M.; Tanowitz, M.; Donner, A.J.; Prakash, T.P.; Swayze, E.E.; Harris, E.N.; Seth, P.P. Receptor-Mediated Uptake of Phosphorothioate Antisense Oligonucleotides in Different Cell Types of the Liver. *Nucleic Acid Ther.* 2018, 28 (3), p.119-127. doi:10.1089/nat.2017.0709.
- 37) Li, Z.; Hard, M.L.; Grundy, J.S.; Singh, T.; von Moltke, L.L.; Boltje, I. Lack of clinical pharmacodynamic and pharmacokinetic drug-drug interactions between warfarin and the antisense oligonucleotide mipomersen. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2014, 64 (2), p.164-171. doi:10.1097/FJC.0000000000000101.
- 38) Yu, R.Z.; Geary, R.S.; Flaim, J.D.; Riley, G.C.; Tribble, D.L.; vanVliet, A.A.; Wedel, M.K. Lack of pharmacokinetic interaction of mipomersen sodium (ISIS 301012), a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting apolipoprotein B-100 messenger RNA, with simvastatin and ezetimibe. *Clin. Pharmacokinet.* 2009, 48 (1), p.39-50. doi:10.2165/0003088-200948010-00003.
- 39) Villalona-Calero, M.A.; Ritch, P.; Figueroa, J.A.; Otterson, G.A.; Belt, R.; Dow, E.; George, S.; Leonardo, J.; McCachren, S.; Miller, G.L.; Modiano, M.; Valdivieso, M.; Geary, R.; Oliver, J.W.; Holmlund, J. A phase I/II study of LY900003, an antisense inhibitor of protein kinase C- α , in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10 (18 Pt 1), p.6086-6093. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0779.
- 40) Geary, R.S.; Bradley, J.D.; Watanabe, T.; Kwon, Y.; Wedel, M.; van Lier, J.J.; VanVliet, A.A. Lack of pharmacokinetic interaction for ISIS 113715, a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting protein tyrosine phosphatase 1B messenger RNA, with oral antidiabetic compounds metformin, glipizide or rosiglitazone. *Clin. Pharmacokinet.* 2006, 45 (8), p.789-801. doi:10.2165/00003088-200645080-00003.
- 41) Adjei, A.A.; Dy, G.K.; Erlichman, C.; Reid, J.M.; Sloan, J.A.; Pitot, H.C.; Alberts, S.R.; Goldberg, R.M.; Hanson, L.J.; Atherton, P.J.; Watanabe, T.; Geary, R.S.; Holmlund, J.; Dorr, F.A. A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* 2003, 9 (1), p.115-123.