

既承認核酸医薬品の組織分布及び血漿/血清タンパク結合評価に関する調査と考察

今井 峻司^{*1,*2,#}, 深野 泰史^{*1,*3}, 庭山 裕孝^{*1,*4}, 田村 直美^{*1,*5}, 三好 美佳^{*1,*6}, 福原 慶^{*1,*7}, 小平 浩史^{*1,*8}, 岩崎 紀彦^{*1,*9}, 山中 陽介^{*1,*10}, 宮澤 憲浩^{*1,*11}, 高草 英生^{*1,*12}, 角辻 賢太^{*1,*13}, 後藤 昭彦^{*1,*14}, 島田 俊介^{*1,*15}, 吉田 徳幸^{*16,*17}, 小比賀 聡^{*17}, 西川 元也^{*18}, 井上 貴雄^{*16,*17,#}

(受付：令和5年12月22日, 受理：令和6年3月27日)

Survey and Consideration for Evaluation of Tissue Distribution and Plasma/Serum Protein Binding Properties of Approved Oligonucleotide Therapeutics

Shunji IMAI^{*1,*2,#}, Yasufumi FUKANO^{*1,*3}, Yutaka NIWAYAMA^{*1,*4}, Naomi TAMURA^{*1,*5}, Mika MIYOSHI^{*1,*6}, Kei FUKUHARA^{*1,*7}, Hiroshi KODAIRA^{*1,*8}, Norihiko IWAZAKI^{*1,*9}, Yosuke YAMANAKA^{*1,*10}, Norihiro MIYAZAWA^{*1,*11}, Hideo TAKAKUSA^{*1,*12}, Kenta KADOTSUJI^{*1,*13}, Akihiko GOTO^{*1,*14}, Shunsuke SHIMADA^{*1,*15}, Tokuyuki YOSHIDA^{*16,*17}, Satoshi OBIKA^{*17}, Makiya NISHIKAWA^{*18} and Takao INOUE^{*16,*17,#}

- *1 日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会 核酸医薬動態評価タスクフォース 東京都中央区日本橋本町2-3-11 (〒103-0023) Task Force for DMPK Evaluation of Oligonucleotide Therapeutics, Non-Clinical Evaluation Expert Committee, Drug Evaluation Committee, Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, 2-3-11 Nihonbashi-Honcho, Chiyoda-Ku, Tokyo 103-0023, Japan
- *2 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
- *3 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
- *4 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
- *5 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
- *6 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 Kenkyusyo Co., Ltd., 363 Shiosaki, Hokusei-cho, Inabe, Mie 511-0406, Japan
- *7 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
- *8 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
- *9 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
- *10 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
- *11 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
- *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 住友ファーマ株式会社 大阪府大阪市此花区春日出中3-1-98 (〒554-0022) Sumitomo Pharma Co., Ltd., 3-1-98 Kasugade-naka, Konohana-ku, Osaka, Osaka 554-0022, Japan
- *14 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 Co., Ltd., 26-1 Muraoka-Higashi 2-chome, Fujisawa, Kanagawa 251-8555, Japan

Summary

In recent years, the clinical development of oligonucleotide therapeutics, such as antisense oligonucleotide (ASO) and small interfering RNA (siRNA), has been active. Applications for regulatory approval require a series of assessments of the absorption, distribution, metabolism, excretion, and drug-drug interaction characteristics of these oligonucleotide therapeutics using appropriate methods. It is particularly important to understand the tissue distribution and plasma/serum protein binding properties of oligonucleotide therapeutics in assessing their efficacy and safety. However, no comprehensive studies have been conducted to investigate how tissue distribution and protein binding are evaluated and what properties are determined as a result.

In this study, we examined the review reports for approved oligonucleotide therapeutics released by the regulatory authorities, as well as related papers to investigate the evaluation methods and the tissue distribution and plasma/serum protein binding properties of the currently approved ASO and siRNA therapeutics.

First, quantitative whole-body autoradiography (QWBA) studies using radiolabeled compounds were in principle conducted for the evaluation of tissue distribution throughout the whole body, as is the case with small-molecule drugs. In many cases, distribution to tissues of particular interest, such as organs with a high distribution rate, was evaluated by a combination of methods, including liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), capillary electrophoresis (CE), high-performance liquid chromatography (HPLC), hybridization enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and hybridization electrochemiluminescence (ECL) after administration of unlabeled compounds. The results of these tissue distribution evaluations showed that systemically administered ASO therapeutics consisting solely of oligonucleotides were rapidly distributed throughout the body and were highly concentrated in the kidneys in all cases, regardless of animal species. In contrast, all the siRNA therapeutics were highly directed to the liver, and GalNAc-siRNA, in particular, tended to accumulate predominantly in the liver, the therapeutic target tissue.

The plasma/serum protein binding of ASO therapeutics was evaluated by methods commonly used for small-molecule drugs such as ultrafiltration and ultracentrifugation, while gel-shift assay was also used for siRNA therapeutics as a new evaluation method. As regards the protein binding properties of the ASO therapeutics, the plasma/serum protein binding rate of morpholino ASOs was generally low (40% or less), whereas the plasma protein binding rate of phosphorothioate ASOs was 85% or more. In contrast, for siRNA therapeutics, LNP-siRNA showed a low serum protein binding rate of approximately 2% or less, whereas the plasma protein binding rate in GalNAc-siRNAs at concentrations around the clinical exposure level was 76% or higher in human.

The tissue distribution and protein binding of oligonucleotide therapeutics are particularly sensitive to the molecular structure of oligonucleotides and the drug delivery system (DDS) technology employed, so an accurate understanding of these properties is important for the development of oligonucleotide therapeutics. This survey revealed that new evaluation methods for tissue distribution and protein binding were employed in addition to conventional evaluation methods, and indicated that these methods provided an improved understanding of the tissue distribution and protein binding properties.

Key words

Antisense oligonucleotide, Small interfering RNA, Tissue distribution, Protein binding

-
- * 15 持田製薬株式会社 静岡県御殿場市神場字上ノ原722 (〒412-8524)
Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., 722 Uenohara, Jimba, Gotemba, Shizuoka 412-8524, Japan
 - * 16 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, 3-5-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan
 - * 17 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
 - * 18 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
- # 責任著者 Corresponding author

1. 緒言

1.1 背景

近年、RNAを標的とする核酸医薬品であるアンチセンス及びsmall interfering RNA (siRNA) の臨床開発が活発化しており、2023年11月までに18品目が日米欧のいずれかで承認されている。核酸医薬品は「オリゴヌクレオチド (オリゴ核酸)」という特有の分子構造を有することから、品質及び安全性評価に加え、薬物動態評価 (吸収、分布、代謝、排泄

及び薬物相互作用) の観点からも低分子医薬や抗体医薬とは異なる性質を有する。これを踏まえ、核酸医薬動態評価タスクフォース^{注1)}では、核酸医薬レギュラトリーサイエンス研究班^{注2)}と連携し、核酸医薬品の薬物動態に関する調査研究を継続的に実施しており、その成果としてこれまでに「核酸医薬品の薬物動態特性とその評価¹⁾」及び「アンチセンス医薬品の薬物動態評価の現状²⁾」と題した二つの総説を発表してきた。これらの総説では、核酸医薬品の中で最も承認品目数が多いアンチセンス医薬品に

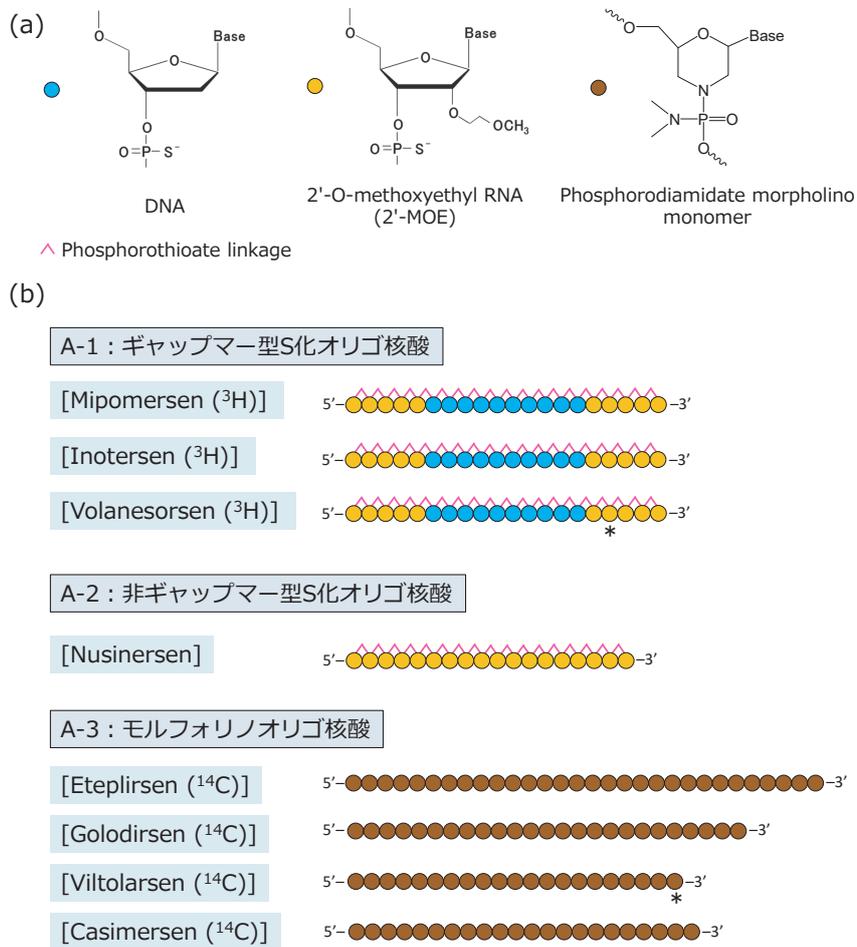


Fig. 1-1 Structural Properties of the Approved Antisense Oligonucleotides (ASOs)

- (a) Chemical modifications of the approved ASOs. Light blue circle, DNA; yellow circle, 2'-MOE; brown circle, phosphorodiamidate morpholino monomer.
- (b) Sequence (length), modification, and the position of the radiolabel of the approved ASOs. An asterisk indicates the position of the radiolabel (¹⁴C or ³H). For radiolabeled ASOs without an asterisk, the position of the radiolabel is not disclosed.

注1) 日本製薬工業協会 (製薬協) 医薬品評価委員会 基礎研究部部に設置された核酸医薬品の薬物動態評価に関する調査、課題抽出、提言等を行うタスクフォース。2019年に設置され、2023年4月現在、製薬企業14社が参画している。これまでに核酸医薬品の薬物動態評価に関する考慮事項や調査研究について総説2報を発表したほか、日本核酸医薬学会や日本薬物動態学会等の関連学会で活動成果を報告している。

注2) 日本医療研究開発機構 (AMED) 医薬品等規制調和・評価研究事業における「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 (2018~2020年度)」及び「RNA製品の品質・安全性評価法の確立 (2020~2023年度)」研究班 (研究代表: 井上貴雄)。

Table 1-1 既承認アンチ

分類	A-1	A-3	A-2
化合物名	Mipomersen	Eteplirsen	Nusinersen
製品名	Kynamro	Exondys 51	Spinraza
開発企業	Ionis Pharmaceuticals	Sarepta Therapeutics	Ionis Pharmaceuticals
適用疾患	Homozygous familial hypercholesterolemia	Duchenne muscular dystrophy	Spinal muscular atrophy
ターゲットRNA	ApoB-100 mRNA	Dystrophin pre-mRNA	SMN2 pre-mRNA
承認年/国	2013/USA	2016/USA	2016/USA 2017/EU 2017/Japan
分子量 (Da)	7595	10306	7501
モノマー数 (mer)	20	30	18
核酸修飾	S-oligo 2'-MOE	Morpholino-oligo	S-oligo 2'-MOE
Drug delivery system	—	—	—
臨床投与量	200 mg	30 mg/kg	12 mg
臨床投与頻度	Q1W	Q1W	*
臨床投与ルート	Subcutaneous injection	Intravenous infusion	Intrathecal injection
薬効標的組織	Liver	Muscle	Central nervous system
毒性試験における主要標的組織	Liver	Kidney	Central nervous system

A-1：ギャップマー型S化オリゴ核酸，A-2：非ギャップマー型S化オリゴ核酸，A-3：モルフォリノオリゴ核酸

Q1W：週1回，Q2W：2週に1回

* 1～3回目は14日おきに投与，4回目は3回目投与後30日に投与，それ以降は4か月に1回投与

結合の評価に関する企業及び当局の双方の考え方について、可能な限り考察した。本稿では、開発企業や規制当局の考えにはそれぞれ主語を付与し、それ以外の主語がない文章は本タスクフォースの考察とした。

1.2 既承認核酸医薬品の構造上の特徴

1.2.1 既承認アンチセンス医薬品の構造上の特徴

本調査研究では、初の全身投与型の核酸医薬品である mipomersen 以降、2023年3月までに承認されたアンチセンス医薬品8品目及びsiRNA医薬品5品目を調査対象とした（Table 1-1及び1-2：承認順）。調査対象となる既承認アンチセンス医薬品は、構造上の特徴から以下の三つに分類される（Fig. 1-1）。

A-1 ギャップマー型S化オリゴ核酸：全てのリン酸ジエステル結合部分がホスホロチオアート修飾（S化）され、オリゴ核酸の5'末端側及び3'末端側

（ウイング領域）の核酸の糖部に2'-O-methoxyethyl（2'-MOE）修飾が施されたアンチセンス医薬品。Mipomersen, inotersen, volanesorsenの3品目が該当する。

A-2 非ギャップマー型S化オリゴ核酸：全てのリン酸ジエステル結合部分がS化され、全ての核酸の糖部に2'-MOE修飾が施されたアンチセンス医薬品。Nusinersenが該当する。

A-3 モルフォリノオリゴ核酸：モルフォリン環を有する核酸アナログで構成され、ホスホロジアミデート結合を骨格に有するアンチセンス医薬品。Eteplirsen, golodirsen, viltolarsen, casimersenの4品目が該当する。

これらの既承認アンチセンス医薬品はオリゴ核酸のみで構成されており、核酸成分以外に組織分布に影響する構成要素は含まれていない。上記のとおり、2023年3月までに承認されているモルフォリノ

センス医薬品のまとめ

A-1	A-1	A-3	A-3	A-3
Inotersen	Volanesorsen	Golodirsen	Viltolarsen	Casimersen
Tegsedi	Waylivra	Vyondys 53	Viltepeso	Amondys 45
Ionis Pharmaceuticals	Ionis Pharmaceuticals	Sarepta Therapeutics	Nippon Shinyaku	Sarepta Therapeutics
Hereditary transthyretin amyloidosis (hATTR)	Familial chylomicronemia syndrome (FCS)	Duchenne muscular dystrophy	Duchenne muscular dystrophy	Duchenne muscular dystrophy
TTR mRNA	ApoCIII mRNA	Dystrophin pre-mRNA	Dystrophin pre-mRNA	Dystrophin pre-mRNA
2018/USA 2018/EU	2019/EU	2019/USA	2020/USA 2020/Japan	2021/USA
7183	7583	8647	6925	7585
20	20	25	21	22
S-oligo 2'-MOE	S-oligo 2'-MOE	Morpholino-oligo	Morpholino-oligo	Morpholino-oligo
—	—	—	—	—
284 mg	285 mg	30 mg/kg	80 mg/kg	30 mg/kg
Q1W	Q2W	Q1W	Q1W	Q1W
Subcutaneous injection	Subcutaneous injection	Intravenous infusion	Intravenous infusion	Intravenous infusion
Liver	Liver	Muscle	Muscle	Muscle
Liver and/or Kidney	Kidney	Kidney	Kidney	Kidney

オリゴ核酸（モルフォリノオリゴ）以外のアンチセンス医薬品は、全てのリン酸ジエステル結合部分がS化されており、このようなS化オリゴ核酸はSオリゴと呼ばれる。ギャップマー型のアンチセンスは、DNA鎖とRNA鎖の2本鎖構造を認識するリボヌクレアーゼ（RNaseH）を介して標的RNAを切断し、対応するタンパク質の発現を抑制する³⁾。一方、非ギャップマー型のSオリゴである nusinersen は、標的RNAを切断せず、スプライシング因子と標的RNAの結合を立体障害により阻害し、スプライシングパターン（コドンの読み枠）を変化させることで機能的なタンパク質を発現させる³⁾。モルフォリノオリゴについても、コドンの読み枠を調整して機能的なタンパク質を発現させるスプライシン

グ制御型のアンチセンスである。

1.2.2 既承認 siRNA 医薬品の構造上の特徴

2023年3月までに承認されたsiRNA医薬品は、構造上の特徴から以下の二つに分類される（Fig. 1-2）。

S-1 LNP-siRNA：siRNA原薬がLNPに搭載されたsiRNA医薬品。LNP-patisiran^{注3)}が該当する。LNP-patisiranのsiRNAを構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖とともにS化されておらず、各鎖の一部の核酸の糖部に2'-O-methyl（2'-OMe）修飾が施されている。

S-2 GalNAc-siRNA：siRNAを構成するセンス鎖の3'末端にN-アセチルガラクトサミン（N-acetyl-galactosamine：GalNAc）が付加されたsiRNA医薬

注3) LNP-patisiranの製品名はOnpattro（オンパットロ）であり、一般名であるpatisiranはsiRNA原薬である核酸成分を指す。本稿では核酸医薬品の名称の表記を一般名で統一しているため、LNP-siRNA製剤である本製品については、LNP-patisiranと表記することとする。

Table 1-2 既承認 siRNA

分類	S-1	S-2
化合物名	Patisiran	Givosiran
製品名	Onpattro	Givlaari
開発企業	Alnylam Pharmaceuticals	Alnylam Pharmaceuticals
適用疾患	Hereditary transthyretin amyloidosis (hATTR)	Acute hepatic porphyria (AHP)
ターゲットRNA	TTR mRNA	ALAS1 mRNA
承認年/国	2018/EU 2018/USA 2019/Japan	2019/USA 2020/EU 2021/Japan
分子量 (Da)	14304	16300
モノマー数 (mer)	Sense : 21 Antisense : 21	Sense : 21 Antisense : 23
核酸修飾	2'-OMe	S-oligo 2'-OMe, 2'-F
Drug delivery system	LNP	GalNAc
臨床投与量	0.3 mg/kg	2.5 mg/kg
臨床投与頻度	Q3W	Q1M
臨床投与ルート	Intravenous injection	Subcutaneous injection
薬効標的組織	Liver	Liver
毒性試験における主要標的組織	Liver	Liver and/or Kidney

S-1 : LNP-siRNA, S-2 : GalNAc-siRNA

Q3W : 3週に1回, Q1M : 1か月に1回, Q3M : 3か月に1回, Q6M : 6か月に1回

品. Givosiran, inclisiran, lumasiran, vutrisiran の4品目が該当する。これら4品目はいずれもセンス鎖の5'末端とアンチセンス鎖の5'末端及び3'末端がそれぞれ2箇所ずつS化されている。また、センス鎖、アンチセンス鎖ともに核酸の糖部が2'-OMeあるいは2'-フルオロ (2'-F) 修飾が施されている。

siRNAはRNA誘導サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex : RISC) に取り込まれ、複合体を構成するリボヌクレアーゼ (argonaute) により標的RNAを切断し、対応するタンパク質の発現を抑制する⁴⁾。2本鎖で構成されるsiRNAは1本鎖のアンチセンスより細胞内に取り込まれにくく、核酸の修飾が限定されるため生体内で分解されやすい。LNP-siRNAは、このような性質を有するsiRNAを脂溶性の高いLNPに封入し、ヌクレアーゼとの接触を遮断することで、細胞内への移行性と生体内での安定性を高めた製剤である。全身投与したLNPは一般的に細網内皮系組織である肝臓に集

積しやすいことが知られており、この性質を利用して肝疾患治療への応用が先行して進められている⁵⁾。一方、GalNAc-siRNAは、化学修飾トリガンド付加により送達キャリアなしでの投与を可能とした製品である⁶⁾。具体例にはsiRNAの各RNA鎖に糖部修飾を導入し、一部のリン酸ジエステル結合部にS化を施すことでヌクレアーゼ耐性が付与されている。また、肝実質細胞に特異的に発現するアジアロ糖タンパク質受容体 (asialoglycoprotein receptor : ASGPR) のリガンドであるGalNAcがセンス鎖の3'末端に付加されることにより、肝臓への移行性と細胞選択性が高められている。ASGPRはエンドサイトーシスとエキソサイトーシスを活発に繰り返す受容体であることから、これらの化学修飾及びGalNAcの付加により、送達キャリアがなくても肝実質細胞への効率的な送達が可能となっている。ASGPRには三つのリガンド結合部位が存在することが知られており、付加するGalNAcの数を1分子

医薬品のまとめ

S-2	S-2	S-2
Lumasiran	Inclisiran	Vutrisiran
Oxlumo	Leqvio	Amvuttra
Alnylam Pharmaceuticals	Alnylam Pharmaceuticals	Alnylam Pharmaceuticals
Primary hyperoxaluria type I (PH1)	Heterozygous familial hypercholesterolemia (HeFH)	Hereditary transthyretin amyloidosis (hATTR)
HAO1 mRNA	PCSK9 mRNA	TTR mRNA
2020/EU 2020/USA	2020/EU 2021/USA	2022/EU 2022/USA 2022/Japan
16341	16340	16345
Sense : 21 Antisense : 23	Sense : 21 Antisense : 23	Sense : 21 Antisense : 23
S-oligo 2'-OMe, 2'-F	S-oligo 2'-OMe, 2'-F	S-oligo 2'-OMe, 2'-F
GalNAc	GalNAc	GalNAc
3-6 mg/kg	284 mg	25 mg
Q1M or Q3M	Q6M	Q3M
Subcutaneous injection	Subcutaneous injection	Subcutaneous injection
Liver	Liver	Liver
Liver and/or Kidney	Liver and/or Kidney	Liver and/or Kidney

から3分子に増やすことにより、受容体への結合親和性及肝臓への送達効率が上昇することが報告されている⁷⁻⁹⁾。既承認のGalNAc-siRNAであるgivosiran, lumasiran, inclisiran, vutrisiranについても、三つのGalNAcが付加されている (Fig. 1-2)。

2. 調査結果及び考察

2.1 既承認核酸医薬品の組織分布評価

上記の13品目の既承認核酸医薬品について、日米欧の各局から公開されている承認審査情報から組織分布評価に関する情報を収集した。この調査に基づき、以下に既承認アンチセンス医薬品及びsiRNA医薬品の組織分布評価の概要を述べる。実施された組織分布試験の概要を、アンチセンス医薬品についてはTable 2-1に、siRNA医薬品についてはTable 2-2にまとめた。

2.1.1 アンチセンス医薬品の組織分布評価

既承認アンチセンス医薬品については、髄腔内に局所投与される nusinersen を除く全ての全身投与（静脈内投与又は皮下投与）型の薬剤で、放射性標識化合物を用いた定量的全身オートラジオグラフィ（quantitative whole body autoradiography : QWBA）試験が実施されていた。QWBA試験は、放射性標識化合物を動物に投与し、全身組織の放射能分布を網羅的に評価する手法であり、化学合成医薬品の組織分布評価に汎用される。放射性標識については、次の2品目については具体的な標識位置と核種が公表されていた。一つは、ギャップマー型Sオリゴである volanesorsen で、3'末端から4番目（ギャップマーのウィング領域）の核酸のリボース5'位の炭素が³Hで標識されていた。もう一つは、モルフォリノオリゴである viltolarsen で、3'末端核酸のピリミジン塩基骨格内の炭素が¹⁴Cに置換されていた (Fig. 1-1)。

Table 2-1 既承認アンチセンス医薬品で

化合物名	試験種類	被験物質	動物種	投与経路	投与期間	投与量 (mg/kg)
Mipomersen	PK	³ H-mipomersen	Mouse (M)	IV	Single	22.3
	PK	³ H-mipomersen	Rat (M & F)	IV	Single	23.1 (M), 24.5 (F)
	Tox	Mipomersen	Mouse (M & F)	SC	Repeat 6M	2-75
	Tox	Mipomersen	Rat (M & F)	SC	Repeat 5M	3-50
	Tox	Mipomersen	Monkey (M & F)	SC	Repeat 13W	2, 20
	DART	Mipomersen	Mouse (F), rat (F), rabbit (F)	SC	Repeat	2-25
Eteplirsen	PK	¹⁴ C-eteplirsen	Mouse	IV	Single	120
	PK	¹⁴ C-eteplirsen	Mouse	IV	Single	120
Nusinersen	PK	Nusinersen	Monkey (M)	IT, IV	Repeat 4W	1 mg
	Tox	Nusinersen	Monkey (M & F)	IT	Single	1-7 mg
	Tox	Nusinersen	Monkey (juvenile)	IT	Repeat 14W, 53W	0.3-4 mg
	DART	Nusinersen	Mouse (F), rabbit (F)	SC	Repeat	3-25
Inotersen	PK	³ H-inotersen	Rat (M)	SC	Single	5
	PK	³ H-inotersen	Rat (M & F)	SC	Single	25
	PK	Inotersen	Mouse (F)	SC	Repeat 6W	10, 40
	Tox	Inotersen	Mouse (M & F)	SC	Single	500-2000
	Tox	Inotersen	Mouse (M & F)	SC	Repeat 13W, 26W	3-100
	Tox	Inotersen	Rat (M & F)	SC	Repeat 26W	5-40
	Tox	Inotersen	Monkey (M & F)	SC	Repeat 13W-39W	3-40
	DART	Inotersen	Mouse (F), rabbit (F)	SC	Repeat	2.5-25
Volanesorsen	PK	³ H-volanesorsen	Rat (M)	SC	Single	5, 25
	Tox	Volanesorsen	Mouse (M & F)	SC	Repeat 6W, 13W, 26W	3-100
	Tox	Volanesorsen	Rat (M & F)	SC	Repeat 13W, 26W	0.2-80
	Tox	Volanesorsen	Monkey	SC	Repeat 13W, 39W	3-40
	DART	Volanesorsen	Mouse (F), rabbit (F)	SC	Repeat	10.5-87.5 mg/kg/W
Golodirsen	PK	¹⁴ C-golodirsen	Mouse (M)	IV	Single	120
Viltolarsen	PK	¹⁴ C-viltolarsen	Mouse (M)	IV	Single	20
	PK	¹⁴ C-viltolarsen	Monkey (M)	IV	Single	20
	PK	¹⁴ C-viltolarsen	Monkey (M)	IV	Repeat 8W	20
Casimersen	PK	¹⁴ C-casimersen	Mouse (M)	IV	Single	120

試験種類 DART : development and reproductive toxicology, PK : pharmacokinetics,
 Tox : toxicology including general toxicology, carcinogenicity and micronucleus test
 動物種 F : female, M : male, No M/F is marked in case of sex used was unknown in documents
 投与期間 M : month, W : week
 投与経路 IT : intrathecal, IV : intravenous, SC : subcutaneous
 分析法 CGE : capillary gel electrophoresis, ECL : electrochemiluminescence, ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay,
 LC : liquid chromatography, LSC : liquid scintillation counting, MS : mass spectrometry, MS/MS : tandem mass spectrometry, QWBA : quantitative whole body autoradiography, UV : ultra violet detection

- a) Mipomersen FDA Pharmacology Review (NDA 203568)
 b) Eteplirsen FDA Pharmacology Review (NDA 206488)

実施された組織分布試験の概要

分析法	測定対象組織（血液，血漿以外）	参考資料
QWBA	All	FDA ^{a)}
QWBA	All	
Unknown	Ileum, kidney, liver, spleen	
Unknown	Kidney, liver	
CGE-UV	Bone marrow, brain, heart, kidney cortex, kidney medulla, liver, lung, mesenteric lymph nodes, ovary, spleen, testis, uterus	
CGE-UV	Maternal liver, maternal kidney, maternal spleen, placenta, fetal kidney, fetal liver	
Unknown	Brain, diaphragm, heart, kidney, biceps, brachii, tibialis anterior, biceps femoris, quadriceps	FDA ^{b)}
QWBA	All	EMA ^{c)} FDA ^{d)} PMDA ^{e)}
Hybridization ECL Hybridization ELISA	Brain stem, cerebellum, cervical spinal cord, frontal cortex, hippocampus, lumbar spinal cord, putamen, temporal cortex, thoracic spinal cord, kidney cortex, liver, skeletal muscle, cerebrospinal fluid	
Hybridization ELISA	Cervical spinal cord, thoracic spinal cord, lumbar spinal cord, cerebellum, cerebral cortex, pons, liver, cerebrospinal fluid	
Hybridization ECL Hybridization ELISA	Cervical spinal cord, thoracic spinal cord, lumbar spinal cord, cerebellum, cerebral cortex, pons, hippocampus, kidney cortex, liver, cerebrospinal fluid	
LC	Maternal liver, placenta, fetal liver	
Unknown	Kidney, liver, mesenteric lymph nodes, bone marrow, thyroid, spleen, bone, pancreas, rain, spinal cord, etc.	
QWBA	All	EMA ^{f)} FDA ^{g)}
LC-UV	Liver, kidney	
LC-UV	Liver	
LC-UV LC-MS/MS	Liver, kidney	
LC-UV	Liver, kidney	
LC-UV	Liver, kidney	
LC-UV	Maternal liver, placenta, fetal liver	
QWBA	All	EMA ^{h)}
Hybridization ELISA LC-UV	Liver, kidney	
Hybridization ELISA LC-UV	Liver, kidney	
Hybridization ELISA LC-UV	Liver, kidney	
Unknown	Maternal liver, placenta, fetal liver	
QWBA	All	FDA ⁱ⁾
QWBA	All	FDA ^{j)} PMDA ^{k)}
QWBA	All	
QWBA	All	FDA ^{l)}

c) Nusinersen EMA Assessment Report (EMA/286159/2018)

d) Nusinersen FDA Pharmacology Review (NDA 209531)

e) Nusinersen PMDA Summary of Application Dossiers

f) Inotersen EMA Assessment Report (EMA/411876/2018)

g) Inotersen FDA Pharmacology Review (NDA 211172)

h) Volanesorfen EMA Assessment Report (EMA/180717/2019)

i) Golodirsén FDA Non-Clinical Review (NDA 211970)

j) Viltolarsén FDA Non-Clinical Review (NDA 212154)

k) Viltolarsén PMDA Summary of Application Dossiers

l) Casimersén FDA Non-Clinical Review (NDA 213026)

Table 2-2 既承認 siRNA 医薬品で

化合物名	試験種類	被験物質	動物種	投与経路	投与期間
Patisiran	PK	¹⁴ C-LNP-patisiran (¹⁴ C-DLin-MC3-DMA)	Rat (M), pigmented rat (M)	IV	Single
	PK	LNP-patisiran	Rat (M & F)	IV	Single
	PK	LNP-patisiran	Monkey (M & F)	IV	Single
	Tox	LNP-patisiran	Rat (M & F)	SC	Repeat 13W, 19W
	DART	LNP-patisiran LNP-AD-18534 (surrogate)	Rat (F), rabbit (F)	IV	Repeat
Givosiran	PK	Givosiran	Rat (M & F)	IV, SC	Single (IV, SC) Repeat 8W (SC)
	PK	Givosiran	Monkey (M & F)	IV, SC	Single (IV, SC) Repeat 8W (SC)
	PK	³ H-givosiran	Rat (M)	SC	Single
	Tox	Givosiran	Mouse	SC	Repeat 4W, 8W
	Tox	Givosiran	Rat	SC	Single Repeat 4W, 13W, 26W
	Tox	Givosiran	Monkey (M), monkey (juvenile, M & F)	SC	Repeat 4W, 39W
	DART	Givosiran	Rat (F), rabbit (F)	SC	Repeat
Lumasiran	PK	Lumasiran	Rat (M & F)	SC	Repeat 8W
	PK	Lumasiran	Monkey (M & F)	IV, SC	Single (IV, SC) Repeat 8W (SC)
	PK	¹⁴ C-lumasiran	Rat (M)	SC	Single
	DART	Lumasiran	Rat (F), rabbit (F)	Unknown	Repeat
Inclisiran	PK	¹⁴ C-inclisiran	Rat	SC	Single
	PK	¹⁴ C-inclisiran	Monkey	SC	Single
	PK	Inclisiran	Mouse	SC	Repeat
	PK	Inclisiran	Rat	SC	Single
	PK	Inclisiran	Monkey	IV, SC	Single (IV, SC) Repeat (SC)
	Tox	Inclisiran	Rat	SC	Repeat 29W
	Tox	Inclisiran	Monkey	SC	Repeat 40W
	DART	Inclisiran	Rat (F), rabbit (F)	SC	Repeat
Vutrisiran	PK	Vutrisiran	Rat (M & F)	SC	Single Repeat 4M
	PK	Vutrisiran	Monkey (M & F)	IV, SC, IM	Single (IV, SC, IM) Repeat 4M (SC)
	PK	³ H-vutrisiran	Rat (M)	SC	Single
	Tox	Vutrisiran	Mouse (M & F)	SC	Repeat 8W, 12W
	Tox	Vutrisiran	Rat (M & F)	SC	Repeat 13W, 6M
	Tox	Vutrisiran	Monkey (M & F)	SC	Repeat 13W, 9M
	DART	Vutrisiran AD-59206 (surrogate)	Rat (F), rabbit (F)	SC	Repeat

試験種類

DART : development and reproductive toxicology, PK : pharmacokinetics,

Tox : toxicology including general toxicology, carcinogenicity and micronucleus test

動物種

F : female, M : male, No M/F is marked in case of sex used was unknown in documents

投与期間

M : month, W : week

投与経路

IM : intramuscular, IV : intravenous, SC : subcutaneous

分析法

FL : fluorescence detection, HRAM : high resolution accurate mass, LC : liquid chromatography,

MARG : micro autoradiography, MS : mass spectrometry, MS/MS : tandem mass spectrometry,

QWBA : quantitative whole body autoradiography, TOF : time of flight, UV : ultra violet detection

m) Patisiran EMA Assessment Report (EMA/554262/2018)

n) Patisiran FDA Multi-discipline Review (NDA 210922)

o) Patisiran PMDA Summary of Application Dossiers

実施された組織分布試験の概要

投与量 (mg/kg)	分析法	測定対象組織 (血液, 血漿以外)	参考資料
0.3	QWBA, MARG	QWBA : all, MARG : adrenal gland, liver, kidney, spleen, testis	EMA ^{m)} FDA ⁿ⁾ PMDA ^{o)}
0.03-1	Patisiran : LC-MS/MS, LC-FL (PNA-Probe) DLin-MC3-DMA : LC-MS/MS PEG ₂₀₀₀ -C-DMG : LC-MS/MS	Liver, spleen	
0.03-1	Patisiran : LC-MS/MS, LC-FL (PNA-Probe) DLin-MC3-DMA : LC-MS/MS PEG ₂₀₀₀ -C-DMG : LC-MS/MS	Liver	
0.3-10	Patisiran : LC-FL (Atto-probe)	Liver	
0.15-2	AD-18534 : LC-FL (Atto-probe) Patisiran : LC-MS/MS, LC-FL (Atto-probe) DLin-MC3-DMA : LC-MS/MS PEG ₂₀₀₀ -C-DMG : LC-MS/MS	Maternal liver, maternal kidney, maternal pancreas, placenta, fetus	
Single : 10 Repeat : 1-5	LC-HRAM-MS, LC-FL (Atto-probe)	Liver, kidney, lung, spleen, heart, brain, jejunum, testis, pancreas, adrenal gland, thyroid, thymus	EMA ^{p)} FDA ^{q)} PMDA ^{r)}
Single : 0.1-10 Repeat : 1-5	LC-HRAM-MS, LC-FL (Atto-probe)	Liver, kidney	
10	QWBA	All	
30-1500	LC-HRAM-MS, LC-FL (Atto-probe)	Liver, kidney	
Single : 3-100 Repeat : 3-300	LC-HRAM-MS, LC-FL (Atto-probe)	Liver, kidney	
10-300	LC-HRAM-MS, LC-FL (Atto-probe)	Liver, kidney	
0.5-100	LC-HRAM-MS, LC-FL (Atto-probe)	Maternal liver, placenta, fetus	
0.1-10	LC-TOF-MS	Liver, kidney	EMA ^{s)} FDA ^{t)}
Single : 10 (IV), 0.1-10 (SC) Repeat : 1, 4	LC-TOF-MS	Liver	
10	QWBA	All	
3-100	Unknown	Fetal liver, fetal tissues	
65	QWBA	All	EMA ^{u)} FDA ^{v)}
20	QWBA	All	
Unknown	LC-TOF-MS	Liver, kidney	
1-25	LC-TOF-MS	Liver, kidney, heart, adrenal gland, thymus, thyroid, pancreas, jejunum, testicle, brain	
Single : 6 (IV), 1-6 (SC) Repeat : 6 → 3	LC-TOF-MS	Liver, kidney, heart	
10-250	LC-TOF-MS	Liver, kidney, heart	
30-300	LC-TOF-MS	Liver, kidney, heart	
50-150	LC-TOF-MS	Maternal liver, placenta, fetal liver	
Single : 0.3-3 Repeat : 1, 40	LC-HRAM-MS	Liver, kidney	EMA ^{w)} FDA ^{x)} PMDA ^{y)}
Single : 10 (IV), 0.3-30 (SC), 1 (IM) Repeat : 0.3, 1	LC-HRAM-MS	Liver	
3	QWBA, LC-MS (plasma), MARG	QWBA : all, MARG : dosing site, liver, kidney	
30-1500	LC-HRAM-MS	Liver, kidney	
12-150	LC-HRAM-MS	Liver, kidney	
30-300	LC-HRAM-MS	Liver, kidney	
Vutrisiran : 3-150 AD-59206 : 6-30	LC-HRAM-MS	Maternal liver, maternal kidney, placenta, fetus, fetal liver	

p) Givosiran EMA Assessment Report (EMA/CHMP/70703/2020)

q) Givosiran FDA Multi-discipline Review (NDA 212194)

r) Givosiran PMDA Summary of Application Dossiers

s) Lumasiran EMA Assessment Report (EMA/568312/2020)

t) Lumasiran FDA Integrated Review (NDA 21410)

u) Inclisiran EMA Assessment Report (EMA/696912/2020)

v) Inclisiran FDA Non-Clinical Review (NDA 214012)

w) Vutrisiran EMA Assessment Report (EMA/589555/2022)

x) Vutrisiran FDA Non-Clinical Review (NDA 215515)

y) Vutrisiran PMDA Summary of Application Dossiers

単回投与後の組織分布は、mipomersen, eteplirsen, inotersen, volanesorsen, golodirsen, viltolarsen, casimersenについて、QWBA試験が実施されていた。動物種としては主にげっ歯類が用いられていたが、viltolarsenではげっ歯類に加えて、サルも用いられていた。局所投与のnusinersenではQWBA試験は実施されず、単回投与毒性試験において、hybridization enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて組織分布評価が実施されていた。

反復投与後の組織分布は、Sオリゴであるmipomersen, nusinersen, inotersen, volanesorsenと、モルフォリノオリゴであるviltolarsenの5品目で実施されていた。このうち、viltolarsenを除く4品目（すなわち、全てのSオリゴ）については、非標識化合物を用いて組織分布が評価されていた。分析法としては、高い信頼性を有する血漿中濃度測定法として多くの既承認核酸医薬品で適用され始めている液体クロマトグラフィー質量分析法 (liquid chromatography-mass spectrometry: LC-MS)¹⁰⁾のほか、キャピラリー電気泳動 (capillary gel electrophoresis: CGE)、高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography: HPLC)、ELISA 及び hybridization electrochemiluminescence (ECL) が用いられていた。反復投与時の組織分布評価は、主に毒性試験に用いられた動物から採取された肝臓及び腎臓を評価対象としていた。肝臓及び腎臓は毛細血管の内皮細胞の特性から全身投与されたオリゴ核酸が分布しやすく、毒性が生じやすいため、より慎重に評価したと考えられる (Table 1-1: 毒性試験における主要標的臓器の項目)¹⁾。後述するsiRNA医薬品についても同様であるが、特に標的臓器が明確な場合、それら臓器における長期投与での薬物分布を毒性試験での採取試料を用いて検討することは、組織分布と毒性発現の関連性を考察する上で有用な手段である。Viltolarsenについては、反復投与時の組織分布についても放射性標識化合物を用いてQWBA試験が実施された。

アンチセンス医薬品の組織分布評価に関する特記事項としては、モルフォリノオリゴであるeteplirsen, golodirsen, viltolarsen, casimersenでは、QWBA試験による組織分布試験のみが実施されて

いた点が挙げられる (全身投与型のSオリゴではQWBA試験以外の組織分布試験も実施されている)。このうちeteplirsen, golodirsen, casimersen (Sarepta社が開発、いずれも米国のみで承認) では単回投与のQWBA試験だけが実施されたことに対し、viltolarsen (日本新薬が開発、米国及び日本で承認) については、上述のとおり、反復投与のQWBA試験も実施されていた。同じモルフォリノオリゴでQWBA試験の適用範囲が異なっている背景としては、開発者や最初の申請国の違いが関係する可能性がある。また、上記の4品目のモルフォリノオリゴはいずれも、X連鎖性遺伝性のデュシェンヌ型筋ジストロフィー (男性患者) を対象とすることから、胎盤通過性は評価されていない。一方、女性患者も対象となるmipomersen, nusinersen, inotersen, volanesorsenでは、生殖発生毒性試験において、母体及び胎児組織への薬物分布から胎盤通過性が評価されていた。

髄腔内に局所投与されるnusinersen以外の7品目のアンチセンス医薬品は、静脈内又は皮下投与後、速やかに全身に分布した。組織中濃度の観点から最も高濃度に薬物が分布した組織は、動物種に関係なく全ての品目で腎臓であり、次いで肝臓であった。脳への移行性は低く、全身投与後のアンチセンス医薬品の全身から脳への移行は血液脳関門により制限されていると考えられた。組織中でのアンチセンス医薬品の消失半減期は一般的な低分子医薬品と比較して長く、例えば、薬物が最も高濃度で分布した腎臓 (腎皮質) ではinotersenで39.5日 (ラット)、volanesorsenで23.0日 (ラット) 及びviltolarsenで367時間 (サル) であった。また、Sオリゴであるinotersen及びvolanesorsenの薬効標的組織である肝臓では、それぞれ12.0及び13.6日 (いずれもラット) であり、腎臓と同様に長い消失半減期が認められた。モルフォリノオリゴであるviltolarsenの薬効標的組織である骨格筋については、マウスでは消失半減期は算出されていないが、168時間後まで組織濃度が検出されており、長い半減期を示すことが想定される。したがって、組織からの消失に関して、全身投与型のSオリゴとモルフォリノオリゴで、特徴が大きく異なることはないと考えられる。髄腔内投与後のnusinersenは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。アンチセンス医薬品は、その分子量の大きさと水溶性の高さから組織から血液への移行が低分子医薬品と比較して遅く、また、修飾核酸の導入により代謝を受けにくい構造を有するため、組織中での消失半減期が長いと考えられる。アンチセンス医薬品の組織分布については先行総説の中でも詳述しているため、そちらも参照して頂きたい²⁾。

2.1.2 siRNA 医薬品の組織分布評価

既承認のsiRNA 医薬品については、LNP-siRNA 1品目 (LNP-patisiran) 及びGalNAc-siRNA 4品目 (givosiran, lumasiran, inclisiran, vutrisiran) の全てで、単回投与のQWBA 試験が実施されていた。これらのsiRNA 医薬品はいずれも全身投与型の薬剤であることから、上述のアンチセンス医薬品の組織分布評価と考え合わせると、全身投与型の核酸医薬品については全て、単回投与のQWBA 試験が実施されていることになる。反復投与時の組織分布は全てのsiRNA 医薬品で非標識化合物を用いて実施されており、薬物動態試験又は毒性試験の動物から採取された肝臓及び腎臓を主な評価対象としていた。

今回の調査対象の中で唯一、送達キャリアに搭載された製剤であるLNP-patisiranについては、pH感受性脂質（後述）を¹⁴C標識した製剤を用いて、QWBA 試験が実施されていた。核酸医薬の送達キャリアと関連する規制文書として「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」¹⁾が発出されており、「リポソームの構成成分が安全性に影響を与えると予測される場合は、構成成分の分布についても必要に応じて評価する」と記載されている。LNP-patisiranのLNPを構成する四つの脂質成分（pH感受性脂質：DLin-MC3-DMA, PEG修飾脂質：PEG₂₀₀₀-C-DMG, リン脂質：DSPC, コレステロール）のうち、DLin-MC3-DMA及びPEG₂₀₀₀-C-DMGが新規添加剤であるが、この中でDLin-MC3-DMAは特に新規性及び独自性が高く、送達機能発現の観点からも重要性が高い分子であることから、申請用試験において全身分布評価の対象物質に選定されたと推測される。有効成分であるpatisiran（核酸成分）については、放射性標識化合物による網羅的な組織分布試験は実施されなかった。LNPが集積しやすい肝臓及び脾臓について、非標識化合物投与時に採取した組織を用いて、DLin-MC3-DMA及びPEG₂₀₀₀-C-DMGの分布が評価されていた。LNP-

patisiranの組織分布評価の考え方については、別途2.1.2.1項で考察することとする。

送達キャリアを用いないGalNAc-siRNAについては、siRNAを構成する2本のRNA鎖のうち、薬効に直結するアンチセンス鎖の中央付近の核酸を³Hあるいは¹⁴Cで標識した化合物が用いられていることが多かった (Fig. 1-2)。これはエキソヌクレアーゼによるアンチセンス鎖末端からの代謝の影響を可能な限り回避するためと考えられる。すなわち、中央付近の核酸を標識した方が、末端付近の核酸を標識するよりも、検出されるシグナルが代謝されていない本来の塩基長のアンチセンス鎖の挙動を示している確率が相対的に高くなるためと考察される。

放射性標識化合物を用いた組織分布評価に関するトピックスとして、LNP-patisiranとvutrisiranについては、マイクロオートラジオグラフィ（microautoradiography：MARG）を用いて、特定組織における微細分布の半定量的解析が実施されていた。これら二つの品目は、対象疾患（遺伝性ATTRアミロイドーシス）及び標的mRNA（TTR mRNA）が同一であることから、DDS技術の違いが薬効、薬物送達や安全性などにどのような差異を与えるか考察することを意識されたものと考えられる。非標識化合物を用いた評価に関するトピックスとしては、組織中siRNAの定量にLC-MSや蛍光プローブhybridizationを併用する蛍光検出HPLCが用いられていた。また、givosiran以降に承認された品目では、精密質量が取得可能なLC-MSが多用されるようになっていた。LC-MSはアンチセンス鎖とセンス鎖を区別して検出できることから、inclisiran及びvutrisiranではアンチセンス鎖及びセンス鎖それぞれの定量値から2本鎖濃度を算出していた。一方で、givosiran及びlumasiranではアンチセンス鎖の定量値から2本鎖濃度を算出していた。蛍光検出HPLCはpatisiran及びgivosiranで用いられており、patisiranではアンチセンス鎖に相補的なプローブによりアンチセンス鎖を検出対象としていたが、givosiranでは検出対象についての情報は得られなかった。LNP-patisiranでは核酸成分のpatisiranだけでなく、pH感受性脂質及びPEG修飾脂質の組織中濃度もLC-MS/MSで測定されていた。胎盤通過性は全ての品目について、生殖発生毒

Table 2-3 Sprague-Dawleyラットに¹⁴C-LNP-patisiran (¹⁴C-DLin-MC3-DMA)を静脈内投与したときの組織中放射能濃度

	Concentration (μg equivalent/g)											
Tissue	0.25 hr	0.5 hr	1 hr	3.5 hr	4 hr	6 hr	24 hr	48 hr	168 hr	672 hr	1008 hr	1344 hr
Blood	4.80	3.41	1.96	0.692	0.455	0.265	0.284	0.133	0.070	0.008	0.003	0.006
Spleen	1.54	5.74	7.44	7.61	5.56	6.14	3.56	3.59	5.20	2.90	1.49	1.33
Liver	12.7	53.1	60.1	69.5	53.5	66.5	19.0	21.6	10.3	0.730	0.135	0.230

Table 2-4 Sprague-Dawleyラットに¹⁴C-LNP-patisiran (¹⁴C-DLin-MC3-DMA)を静脈内投与したときの肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓、副腎及び脳中放射能分布

	% recovery of administered dose (1 rat/time point)				
Tissue	0.25 hr	4 hr	24 hr	168 hr	1344 hr
Liver	22.3	90.2	34.5	18.4	0.45
Spleen	0.20	0.70	0.48	0.69	0.19
Kidney	0.61	0.40	0.22	0.25	0.04
Lung	0.57	0.16	0.07	0.10	0.01
Heart	0.24	0.08	0.04	0.07	0.01
Adrenal	0.02	0.06	0.14	0.13	0.08
Brain (cerebrum, cerebellum, medulla)	0.04	0.03	0.00	0.03	0.00

注：% Recovery = 単位重量当たりの放射能濃度 (μCi/g) × 組織重量 (g) / 投与放射能 (μCi) × 100
 各組織重量は体重250 gのラットにおける推定重量
 計算に使用した組織重量：肝臓10 g, 脾臓0.75 g, 腎臓2 g, 肺1.5 g, 心臓1 g, 副腎0.05 g, 脳1.8 g

性試験を利用して評価されていた。

2.1.2.1 LNP-siRNAの組織移行性の特徴

次に、LNP-siRNA及びGalNAc-siRNAの組織分布評価の結果に基づき、それぞれの組織移行性の特徴について考察する。

まず、LNP-siRNAについては、承認品目が現状ではLNP-patisiranのみであるため、ここではLNP-patisiranの組織移行性に関する知見及び組織分布評価の結果を述べる。上述のとおり、LNP-patisiranは遺伝性ATTRアミロイドーシスの治療薬であり、3週間に1回の静脈内投与(点滴)で持続的な効果を発揮する。投与されたLNP-patisiranは血液中のアポリポタンパク質E (ApoE)と結合し、ApoEが肝細胞表面に存在する低比重リポタンパク質 (LDL) 受容体などに認識されることによってエンドサイトーシスにより肝細胞内へ取り込まれる。取り込まれたLNP-patisiranは、LNP中のpH感受性脂質がエンドソーム内のpH低下に伴い正に帯電することにより、負電荷を有するエンドソーム膜と

相互作用する。これにより、エンドソーム膜の不安定化とLNPの崩壊が起こり、LNPに内包されているsiRNAが作用部位である細胞質内へと放出される^{12,13)}。LNP-patisiranについては、エンドソーム内に取込まれたLNP-patisiranの一部が、元の脂質組成とは異なる組成の粒子として全身循環に再放出されることを示唆する臨床データが示されており¹⁴⁾、組織分布に影響する現象として注目される。

LNP-patisiranの組織分布は、¹⁴C標識した製剤を用いたラットにおけるQWBA試験、非標識製剤を用いたラット、サル及びウサギにおける組織中濃度測定(定量対象：siRNA, pH感受性脂質及びPEG修飾脂質)で評価されていた。以下では、詳細なデータが示されていたラットの組織分布評価の結果について述べる。

pH感受性脂質を放射性標識したLNP-patisiran (patisiran 0.3 mg/kg, ¹⁴C-DLin-MC3-DMA 2.1 mg/kg)をラットに単回静脈内投与し、投与後0.25, 0.5, 1, 3.5, 4, 6, 24, 48, 168時間(7日)、672時間

Table 2-5 Sprague-Dawley ラットにおける patisiran として 1 mg/kg 単回急速静脈内投与後の patisiran, DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の血漿, 肝臓並びに脾臓における PK パラメータ (平均値)

Analyte	T _{max} (hr)			t _{1/2} (hr)			C _{max} (μg/g)		
	Plasma	Liver	Spleen	Plasma	Liver	Spleen	Plasma	Liver	Spleen
Patisiran	0.083	1.00	1.00	0.440	5.27	128	25.9	5.48	1.01
DLin-MC3-DMA	0.083	4.00	24.0	267	339	474	146	129	22.4
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	0.083	1.00	24.0	21.3	159	76.8	15.8	0.799	2.12

Analyte	C _{max} /mg (μg/g/mg)			AUC _{0-t} (μg·hr/g)			AUC _{0-t} /mg (μg·hr/g/mg)		
	Plasma	Liver	Spleen	Plasma	Liver	Spleen	Plasma	Liver	Spleen
Patisiran	2.59	0.548	0.101	13.2	30.3	14.8	1.32	3.03	1.48
DLin-MC3-DMA	2.25	1.98	0.345	223	36700	12100	3.43	565	186
PEG ₂₀₀₀ -C-DMG	1.98	0.100	0.265	22.0	201	196	2.75	25.1	24.5

製剤の組成：patisiran sodium 10.5 mg (10 mg as patisiran), DLin-MC3-DMA 65.0 mg, PEG₂₀₀₀-C-DMG 8.0 mg

T_{max}：最高血漿/組織中濃度到達時間

t_{1/2}：最終相の消失半減期

C_{max}：最高血漿/組織中濃度

C_{max}/mg：C_{max} の patisiran, DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の含量による標準化した値

AUC_{0-t}：最終測定時点 (t) までの血漿/組織中濃度—時間曲線下面積

AUC_{0-t}/mg：AUC_{0-t} の patisiran, DLin-MC3-DMA 及び PEG₂₀₀₀-C-DMG の含量による標準化した値

(28日), 1008時間 (42日) の組織分布がQWBA試験により評価された (Table 2-3). 放射能は投与後1344時間 (56日) まで全身組織中に広く検出された. 最も高い放射能濃度が認められた組織は肝臓で, 投与後4時間に投与量の約90%が検出された (Table 2-4). 一方, 中枢神経系組織及び心臓の放射能濃度は微量であったことから, 脳や心筋へほとんど移行しないと考えられた. 一般的に, 低分子医薬品を静脈内投与した場合, 組織へ一様に分布することが知られている. 一方, 核酸医薬品についてはDDS技術を用いずに全身投与した場合, 腎臓に最も分布することが知られている²⁾. LNP-patisiranについては, その構成成分であるpH感受性脂質が特に肝臓に選択的に分布したことから, 肝臓に集積しやすいLNPの薬物動態特性を活かして, 薬効標的組織である肝臓への集積性がより高められていると考察される.

次に, ラットに非標識のLNP-patisiran (patisiran 1 mg/kg) を静脈内投与したときの patisiran, DLin-MC3-DMA (pH感受性脂質) 及びPEG₂₀₀₀-C-DMG (PEG修飾脂質) の最高血漿/組織中濃度到達時間 (T_{max}), 最終相の消失半減期 (t_{1/2}), 最高血漿/組織中濃度 (C_{max}) 及び血漿/組織中濃度—時間曲線下面

積 (AUC_{0-t}: tは定量値が得られた最後の時点) を Table 2-5に示す. t_{1/2}は3成分とも各臓器において異なる値を示した. C_{max}及びAUC_{0-t}については, 投与された各製剤成分の量で標準化した値 (C_{max}/mg, AUC_{0-t}/mg) を用いて比較した. C_{max}/mgの値について, 血漿及び脾臓では3成分とも同程度であったものの, 肝臓ではDLin-MC3-DMAのみ高い傾向が認められた. AUC_{0-t}/mgの値について, 血漿では3成分とも同程度であったものの, 肝臓及び脾臓では patisiran と比較して他の2成分は10から200倍程度高い傾向が認められた. これらの薬物動態パラメータが異なる要因は, 3成分の体内挙動を以下のように解釈することにより, 一定程度理解できると考える.

まず, PEG₂₀₀₀-C-DMGは血漿中で大部分がLNPから解離することが知られているため¹⁴⁾, PEG₂₀₀₀-C-DMGの薬物動態パラメータは, LNP複合体としてではなく, 各組織におけるPEG修飾脂質単独の体内挙動を反映していると考えられる.

Patisiranは, 単独では生体内で不安定であるがLNP-patisiranの状態では安定であり, ラットへ投与後の血漿中では98.5%の patisiran がLNP封入型で存在している. このことから, 投与直後の

patisiranの血漿中濃度は他の2成分と変わらないと考えられる。血漿からの消失が他の2成分よりも早い要因は、LNPに内包された状態で速やかに肝臓へ移行しているためと考えられる。LNP-patisiranは肝臓においてエンドソーム膜との融合によりLNPが崩壊し、patisiranがエンドソーム外に放出され、細胞質内でRISCに取り込まれて薬効を発揮する。LNPに内包されていないpatisiranは肝臓中では分解により速やかに消失していると考えられる。

DLin-MC3-DMAの血漿中からの消失がpatisiranと比べて緩やかであることは、DLin-MC3-DMAの代謝安定性が高く、体内から消失されにくいと考えられる。審査報告書より、DLin-MC3-DMAの肝ミクロソーム中残存率は約80%であることから代謝安定性は高いことが示されている。また、DLin-MC3-DMAを放射性標識したLNP-patisiranをラットに投与したとき、血漿中総放射能のAUCに占める未変化体AUCの割合が約80%であることが示されている。以上のことから、DLin-MC3-DMAはpatisiranよりも体内から消失されにくいと考えられる。

LNP-patisiranの組織分布評価については、開発企業（Alnylam Japan）と独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）の間で、「LNPの構成成分であるpH感受性脂質（DLin-MC3-DMA）については全身組織分布が評価されているのに対し、有効成分であるsiRNA（patisiran）及びPEG修飾脂質（PEG₂₀₀₀-C-DMG）については、肝臓及び脾臓以外の組織への分布が評価されていない点」について、その適切性が承認審査の過程で議論されている。具体的には開発企業から、「PEG修飾脂質を放射性標識したLNP-siRNAをマウスに投与後24時間の投与放射能あたりの肝臓及び脾臓の割合は、それぞれ約70%及び8%であった」という先行論文の知見¹⁵⁾から、「PEG修飾脂質が肝臓及び脾臓以外の組織に高い割合で分布する可能性が低い」ことが説明された。また、siRNA（patisiran）については、「patisiranを単独（=nakedの状態）で投与したサルの血漿中にはpatisiranは検出されないこと、及び、ラット全身循環血中patisiranの98.5%以上がLNPに封入されていたこと」から、「patisiranは単独の状態では血漿中には存在できず、LNPに封入された状態で存

在するため、patisiranの組織分布はpH感受性脂質を放射性標識したLNP-patisiranの全身分布と同様であると推定され、肝臓及び脾臓以外の組織に高い割合で分布する可能性が低い」との説明がなされた。PMDAは当初、有効成分であるpatisiranの全身組織分布を評価することが望ましいとの立場であったが、開発企業による上記の説明を受け、LNPから遊離したpatisiranの分布や蓄積が安全性面で大きな問題となる可能性は低いと判断し、pH感受性脂質を放射性標識したLNP-patisiranの全身分布の評価のみで受け入れ可能としたことが推察される。

2.1.2.2 GalNAc-siRNAの組織移行性の特徴

GalNAc-siRNAであるgivosiran, lumasiran, inclisiran及びvutrisiranはいずれも皮下注射製剤であり、投与部位から全身循環系へ移行後、肝細胞へ取り込まれ薬効を発現する。これらのGalNAc-siRNAは全て、単回皮下投与後の全身分布がQWBA試験によって評価されており、givosiran, lumasiran, vutrisiranについてはラットで、inclisiran¹⁶⁾についてはラット及びサルでQWBA試験が実施されていた（Table 2-2）。Table 2-6では詳細なデータが示されていたgivosiran（ラット）、inclisiran（サル）及びvutrisiran（ラット）の結果を示した。また、QWBA試験のほかに、非標識化合物を用いた組織分布評価が全てのGalNAc-siRNAで実施されており、ラットやサルにおける肝臓及び腎臓中濃度が測定されていた。この目的として、肝臓は薬効発現の標的組織であること、腎臓については安全性上の懸念があり、主たる排泄臓器でもあることから評価対象としたものと推察される（Table 1-2：毒性試験における主要標的組織の項目）。

まず、各GalNAc-siRNAについて、対象疾患、投与間隔並びにQWBA試験の結果の概要を記載する。Givosiranは急性肝ポルフィリン症の治療薬であり、1か月に1回の投与で持続的な効果を発揮する。Givosiranの組織分布については、³H-givosiran（10 mg/kg）をラットに単回皮下投与し、投与後0.5, 1, 2, 4, 6, 24, 48, 96, 168時間（7日）、336時間（14日）、672時間（28日）、1344時間（56日）の組織分布がQWBA試験により評価されていた（Table 2-2）。最も高いC_{max}及びAUC_{0-t}を示した組織は、標的組織である肝臓であり、次いで、リンパ節、腎

臓であった。肝臓の半減期は137時間であった。骨髄や脳では低い放射能濃度を示し、中枢への移行性は低いと考えられた。評価された組織の T_{max} は0.5から48時間であった。

Lumasiranは原発性高シュウ酸尿症I型の治療薬であり、1か月から3か月に1回の投与で持続的な効果を発揮する。Lumasiranの組織分布については、 ^{14}C -lumasiran (10 mg/kg) をラットに単回皮下投与したときの組織分布がQWBA試験により評価されていた (Table 2-2)。最も高い放射能濃度を示した組織は投与部位であり、次いで肝臓、腎臓であった。それ以外のほとんど全ての組織においては持続的に低い濃度で推移し、中枢神経系組織の放射能濃度はごくわずかであった。

Inclisiranは血漿中のLDLコレステロール濃度を低下させることを目的とした高コレステロール血症混合型脂質異常症の治療薬であり、年2回の投与で持続的な効果を発揮する。Inclisiranの組織分布については、 ^{14}C -inclisiran (20 mg/kg) をカニクイザルに単回皮下投与し、投与後1, 4, 24, 72, 120時間 (5日), 168時間 (7日), 336時間 (14日), 672時間 (28日), 1008時間 (42日) の組織分布がQWBA試験により評価されていた (Table 2-2)。投与後24時間以降の全ての時点において最も高い C_{max} 、 AUC_{0-t} を示したのは、標的組織である肝臓であり、その半減期は1980時間と長く、42日間の試験期間全体を通じて高値を維持した。次に高い C_{max} 、 AUC_{0-t} を示したのは腎臓であったが、これは投与後4時間の初期時点のみで、投与後24時間以降、腎臓中放射能濃度は急激に低下した。その他の組織では、最終ポイントである投与後42日まで放射能は検出されるものの、その濃度は非常に低かった。神経組織 (脊髄及び脳) では非常に低い放射能濃度を示したことから、中枢組織へはほとんど移行しないと考えられた。評価された組織の T_{max} は4から672時間であった¹⁶⁾。

Vutrisiranは遺伝性ATTRアミロイドーシスの治療薬で、3か月に1回の投与で持続的な効果を発揮する。Vutrisiranの組織分布については、 ^3H -vutrisiran (3 mg/kg) をラットに単回皮下投与し、投与後0.5, 1, 4, 24, 48, 96, 168時間 (7日), 336時間 (14日), 672時間 (28日), 1344時間 (56日) の組織分布がQWBA試験により評価されてい

た (Table 2-2)。高い C_{max} 、 AUC_{0-t} を示した組織は肝臓、リンパ節、腎皮質、腎臓、胸管であり、定量可能な放射能が検出された組織のほとんどで、放射能濃度は投与後168時間までに最高濃度に達した。肝臓では投与後672時間まで、腎皮質、リンパ節、投与部位では投与後1344時間 (56日) まで放射能が検出された。Vutrisiranは、脳及び中枢神経系組織には放射能が検出されなかったことから、血液脳関門を通過しないと考えられた。

次に、組織分布評価の結果を考察するため、givosiran, inclisiran, vutrisiranについて、静脈内投与及び皮下投与時の血液又は血漿、肝臓、腎臓中薬物動態パラメータを抽出し、Table 2-7にまとめた。各薬物動態パラメータのうち、投与量で標準化した血液又は血漿、腎臓中の C_{max}/Dose 及び AUC_{0-t}/Dose は、いずれも皮下投与の方が静脈内投与より低かった。一方、投与量で標準化した肝臓中の C_{max}/Dose 及び AUC_{0-t}/Dose については、いずれのGalNAc-siRNAも皮下投与の方が静脈内投与より高かった。このように、皮下投与の方が静脈内投与より肝臓に分布するGalNAc-siRNAの量が高くなる理由として、givosiran及びvutrisiranの承認申請資料では、静脈内投与では血漿中の薬物濃度が急激に上昇し、ASGPRを介する肝細胞への取り込みが飽和した可能性が述べられている。この考察は、開発元の論文報告において詳細が述べられており、急速静脈内投与時の AUC_{0-t} から算出した絶対的バイオアベイラビリティ (最大36.7%) より、投与した化合物は異なるがGalNAc-siRNAを持続注入時の AUC_{0-t} から算出した絶対的バイオアベイラビリティ (ほぼ100%) の方が高い値となることから裏付けられる¹⁷⁾。別の企業からは、GalNAc-siRNAの投与経路による肝臓中曝露の差の原因は、ASGPRを介する取り込み過程の飽和に加え、血漿中からの消失速度と比較して投与部位からの吸収速度が遅いことでflip-flop現象が起きているとする説も提案されている¹⁸⁾。

今回の調査対象のGalNAc-siRNAは、分子構造としてはsiRNAの両鎖に導入された修飾核酸 (2'-OMe及び2'-F) の配置が異なるのみであり (inclisiranにおけるDNA導入の例外を除く: Fig. 2-2)、薬物動態パラメータの傾向はいずれの組織も概ね類似している。しかし、投与量で標準化した肝

Table 2-6 Givosiran, inclisiran及びvutrisiranを単回

化合物名	Givosiran			
動物種	Rat			
投与量	10 mg/kg			
標識核種	³ H			
	C _{max} (μ g equivalent/g)	T _{max} (hr)	AUC _{0-t} (μ g equivalent·hr/g)	t _{1/2} (hr)
Blood	1.16	1	—	—
Bone marrow	2.83	48	577	—
Brain	ND	—	—	—
Dosing site	—	—	—	—
Eye lens	—	—	—	—
Eye uveal tract	—	—	—	—
Eye	—	—	—	—
Fat (brown)	—	—	—	—
Harderian gland	—	—	—	—
Kidney pyramid	—	—	—	—
Kidney cortex	18.6	48	3350	116
Kidney medulla	4.28	4	200	—
Kidney	15.2	4	3340	171
Large intestine	0.782	4	42.8	—
Liver	162	6	14200	137
Lung	—	—	—	—
Lymph node	38.2	2	3690	—
Pancreas	1.84	24	226	—
Salivary gland	2.00	24	459	—
Skin	2.04	0.5	45.7	—
Small intestine	—	—	—	—
Spinal cord	—	—	—	—
Spleen	0.877	48	55.8	—
Stomach	—	—	—	—
Testis	—	—	—	—
Thoracic duct	17.7	2	84.2	—
Thymus	—	—	—	—
Thyroid	3.08	24	655	—

C_{max}：最高血液/組織中濃度T_{max}：最高血液/組織中濃度到達時間AUC_{0-t}：最終測定時点 (t) までの組織中濃度—時間曲線下面積

—：データなし又は算出不可

皮下投与後のQWBA評価による放射能の組織分布

Inclisiran					Vutrisiran		
Monkey					Rat		
20 mg/kg					3 mg/kg		
¹⁴ C					³ H		
C _{max} (μ g equivalent/g)	T _{max} (hr)	AUC _{0-t} (μ g equivalent-hr/g)	t _{1/2} (hr)	t _{last} (hr)	C _{max} (μ g equivalent/g)	T _{max} (hr)	t _{last} (hr)
4.2	4	208	672	1008	0.369	1	4
14.4	120	6650	—	1008	0.293	96	96
0.5	672	415	—	1008	ND	—	—
—	—	—	—	—	438	0.5	1344
0.4	120	204	—	1008	ND	—	—
3.9	168	2980	2350	1008	ND	—	—
0.7	168	403	672	1008	ND	—	—
13.4	336	3160	—	336	0.259	168	168
2.1	168	—	—	1008	BLQ	—	—
351	4	6280	9550	1008	—	—	—
35.2	4	8510	774	1008	2.90	96	1344
20.9	4	2900	3330	1008	0.526	4	336
46.3	4	7360	657	1008	2.11	24	672
17.6	24	7880	672	1008	0.347	96	168
327	72	200000	1980	1008	37.7	4	672
6.6	4	698	1840	1008	0.222	1	96
66.2	120	25100	4860	672	8.91	168	1344
18.2	672	13400	—	1008	0.538	48	336
11.2	168	7870	—	1008	0.288	48	168
3.9	168	2730	322	1008	0.197	48	48
13.1	24	6800	904	1008	0.355	48	48
0.5	336	326	—	1008	ND	—	—
12.2	24	6720	3690	1008	0.271	96	96
6.8	120	5600	4020	1008	0.262	48	96
13.7	336	7440	320	1008	BLQ	—	—
—	—	—	—	—	1.56	0.5	672
11.1	120	5570	1090	1008	ND	—	—
6.3	168	2390	—	672	0.292	168	168

t_{1/2}：最終相の消失半減期t_{last}：投与後定量可能な最終時点BLQ：定量下限未満 (<166 ng ³H-vutrisiran equivalent/g)

ND：検出下限未満

Table 2-7 Givosiran, lumasiran, inclisiran 及び vutrisiran を単回皮下

	化合物名	Givosiran				
		Rat			Monkey	
実験条件	動物種	Rat			Monkey	
	投与量	10 mg/kg			10 mg/kg	
	投与経路	SC	SC	IV	SC	IV
	標識核種	³ H	—	—	—	—
	分析法	QWBA	LC/MS-HRAM			
血液/血漿中 PKパラメータ	C_{max} or C_0^a	1.16	1.07	148	2.14	215
	AUC_{0-t}^b	—	2.79	11.8	11.2	30.5
	T_{max} (hr)	1.0	1.1	0.1	1.7	0.1
	$t_{1/2}$ (hr)	—	2.7	0.2	3.5	0.2
	C_{max} or C_0^a /Dose	0.116	0.107	14.8	0.214	21.5
	AUC_{0-t}^b /Dose	—	0.279	1.18	1.12	3.05
	SC/IV in AUC_{0-t}^b /Dose (%)	—	23.6		36.7	
肝臓中PKパラ メータ	C_{max}^a	162	208	102	204	41.5
	AUC_{0-t}^b	14200	12600	5390	28500	4220
	T_{max} (hr)	6.0	4.0	2.1	8.0	8.0
	$t_{1/2}$ (hr)	137.0	120.0	55.0	146.0	164.0
	C_{max}^a /Dose	16.2	20.8	10.2	20.4	4.15
	AUC_{0-t}^b /Dose	1420	1260	539	2850	422
	SC/IV in AUC_{0-t}^b /Dose (%)	—	234		675	
腎臓中PKパラ メータ	C_{max}^a	15.2	19.0	81.0	—	—
	AUC_{0-t}^b	3340	3190	5440		
	T_{max} (hr)	4.0	6.0	0.3		
	$t_{1/2}$ (hr)	171.0	172.0	119.0		
	C_{max}^a /Dose	1.52	1.9	8.1		
	AUC_{0-t}^b /Dose	334	319	544		
	SC/IV in AUC_{0-t}^b /Dose (%)	—	58.6		—	

a : μg equivalent/g or μg equivalent/mL or $\mu\text{g/g}$ or $\mu\text{g/mL}$

b : μg equivalent \cdot hr/g or μg equivalent \cdot hr/mL or $\mu\text{g} \cdot \text{hr/g}$ or $\mu\text{g} \cdot \text{hr/mL}$

QWBA : 定量的全身オートラジオグラフィー, LC/MS-HRAM : 液体クロマトグラフィー/高分解能精密質量分析, LC-TOF-MS : 液体クロマトグラフィー/飛行時間型質量分析

— : データなし又は算出不可

臓中 C_{max} /Doseの投与経路における差の程度が薬剤により異なる点など、各剤で特徴的な薬物動態の特性が一部認められる。

前述のとおり、4剤の中でinclisiranのみセンス鎖の中央付近にDNAが一つ導入されている (Fig. 1-2)。この構造的な違いが薬物動態に及ぼす影響について詳細は不明であるが、inclisiranは、肝臓において①投与量で標準化した AUC_{0-t} /Doseが他剤

より高い、② T_{max} が遅い、③消失半減期が大幅に長いなど、特徴的な値を示しており (Table 2-7)、血中から肝臓への取り込み速度や肝細胞内での安定性などが肝臓の薬物動態パラメータに影響を及ぼしている可能性が考えられる。

以上に示した点は、送達キャリアやリガンド付加といったDDSの要素だけでなく、核酸医薬の有効成分であるオリゴ核酸の化学構造も薬物動態の観点

又は静脈内投与後の血液/血漿/組織中PKパラメータ比較

Lumasiran			Inclisiran	Vutrisiran			
Rat	Monkey		Monkey	Rat		Monkey	
10 mg/kg	10 mg/kg		20 mg/kg	3 mg/kg		3 mg/kg	10 mg/kg
SC	SC	IV	SC	SC	SC	SC	IV
—	—	—	¹⁴ C	³ H	—	—	—
LC-TOF-MS			QWBA	QWBA	LC/MS-HRAM		
—	—	—	4.2	0.369	0.542	0.428	272
			208	—	0.823	2.44	82.1
			4.0	1.0	0.5	2.5	—
			672.0	—	—	4.7	0.5
			0.210	0.123	0.181	0.143	27.2
			10.4	—	0.274	0.813	8.21
—	—		—	—	—	9.9	
120	169	76.1	327	37.7	39.5	46.4	10.5
10700	76700	20300	200000	—	3890	16300	7450
8.0	48.0	88.0	72.0	4.0	7.0	8.0	24.0
138.0	409.0	296.0	1980.0	—	84.5	499.2	655.2
12.0	16.9	7.61	16.4	12.6	13.2	15.5	1.05
1070	7670	2030	10000	—	1300	5430	745
—	378		—	—	—	729	
8.56	—	—	46.3	2.11	1.90	—	—
1540			7360	.	375		
14.0			4.0	24.0	5.0		
236.0			657.0	—	156.3		
0.856			2.32	0.703	0.633		
154			368	—	125		
—	—		—	—	—	—	

C_{max}：最高血液/血漿/組織中濃度
 AUC_{0-t}：最終測定時点 (t) までの血液/血漿/組織中濃度—時間曲線下面積
 T_{max}：最高血液中/血漿中/組織中濃度到達時間
 t_{1/2}：最終相の消失半減期
 C₀：ゼロ時点における血漿中濃度 (計算値)

から重要な意味を持つことを示唆しており、注目に値する。

2.1.3 組織移行性の特徴の比較

ここまで、アンチセンス医薬品及びsiRNA医薬品の組織移行性の特徴について述べてきたが、モデル間の特徴を比較するため、いずれも遺伝性ATTRアミロイドーシス治療薬であるギャップマー型アンチセンスのinotersen, LNP-siRNAの

LNP-patisiran及びGalNAc-siRNAのvutrisiranに加えて、急性肝性ポルフィリン症治療薬でGalNAc-siRNAのgivosiranに関して、ラットの皮下投与又は静脈内投与後の血漿/組織中PKパラメータをTable 2-8にまとめた。

「1.2.2既承認siRNA医薬品の構造上の特徴」の項で述べたように、GalNAc-siRNAは、組織標的化リガンドとしてGalNAcを付加することにより、肝

Table 2-8 Inotersen, patisiran, vutrisiran 及び givosiran のラットにおける単回皮下及び静脈内投与後の血漿/組織中 PK パラメータ比較

化合物名		Inotersen	Patisiran	Vutrisiran	Givosiran
投与量		25 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg
投与経路		SC	IV	SC	IV
血漿中 PK パラメータ	C_{max}^a /Dose	0.362	25.9	0.181	14.8
	AUC_{0-t}^b /Dose	2.68	13.2	0.274	1.18
肝臓中 PK パラメータ	T_{max} (hr)	48	1	7	2.1
	$t_{1/2}$ (hr)	12	5.27	84.5	55
	C_{max}^a /Dose	0.508	5.48	13.2	10.2
	AUC_{0-t}^b /Dose	289	30.3	1300	539
腎臓中 PK パラメータ	T_{max} (hr)	168	—	5	0.3
	$t_{1/2}$ (hr)	39.5	—	156.3	119
	C_{max}^a /Dose	4.88	—	0.633	8.1
	AUC_{0-t}^b /Dose	4000	—	125	544

a : $\mu\text{g equivalent/g}$ or $\mu\text{g equivalent/mL}$ or $\mu\text{g/g}$ or $\mu\text{g/mL}$ b : $\mu\text{g equivalent} \cdot \text{hr/g}$ or $\mu\text{g equivalent} \cdot \text{hr/mL}$ or $\mu\text{g} \cdot \text{hr/g}$ or $\mu\text{g} \cdot \text{hr/mL}$ T_{max} : 最高血漿/組織中濃度到達時間 $t_{1/2}$: 最終相の消失半減期 C_{max} : 最高血漿/組織中濃度 AUC_{0-t} : 最終測定時点 (t) までの血漿/組織中濃度-時間曲線下面積

— : データなし

実質細胞に発現する ASGPR を介して肝臓に選択的に取り込ませることが企図されている。また、siRNA の各 RNA 鎖に糖部修飾を導入し、両鎖の末端を S 化することで生体内安定性の向上が企図されている。

これらの設計の戦略を反映するように、GalNAc-siRNA の組織分布評価の結果は、アンチセンス及び LNP-siRNA と比較して、肝臓では AUC が大きく、長時間滞留する傾向が認められた。例えば、LNP-patisiran と givosiran について、ラット静脈内投与後の siRNA の肝臓中薬物動態パラメータを比較すると、投与量で標準化した肝臓 AUC_{0-t} /Dose は LNP-patisiran (30.3) < givosiran (539)、肝臓 $t_{1/2}$ は LNP-patisiran (5.27 hr) < givosiran (55 hr) であり、givosiran の方がそれぞれ 10 倍以上大きい。LNP-patisiran (pH 感受性脂質を放射性標識) は、「2.1.2.1 LNP-siRNA の組織移行性の特徴」の項で述べた通り、投与後 4 時間で投与量の約 90% が肝臓で検出されていることから肝臓への移行性は高いと考えられた。また、承認申請資料から pH 感受性脂質は、投与後 1 及び 24 時間の肝臓においてそれぞれ投

与量の 67% 及び 78% が分布しているのに対し、patisiran はそれぞれ 26% 及び 1% 以下になっていることから、LNP-patisiran と givosiran の肝臓中薬物動態パラメータの差は、主に siRNA の糖部修飾や S 化による肝臓内での安定化に起因すると考えられる。

アンチセンスの inotersen と GalNAc-siRNA の vutrisiran について、ラット皮下投与後の投与量で標準化した薬物動態パラメータを用いて比較すると、 C_{max} /Dose 及び AUC_{0-t} /Dose は肝臓で inotersen < vutrisiran、腎臓で inotersen > vutrisiran であった。これは、GalNAc による選択的な肝臓への取り込みと、DDS 技術なしのアンチセンスが腎臓に分布しやすい特徴を示している。肝臓及び腎臓の T_{max} 及び $t_{1/2}$ の比較から、inotersen は vutrisiran と比較して組織移行性が遅く、組織中半減期が短いことが示された。「2.1.1 アンチセンス医薬品の組織分布評価」の項で述べた通り、アンチセンス医薬品の組織中半減期は一般的な低分子医薬品と比較して長い、GalNAc-siRNA では企図された通り、アンチセンスと比較して更に生体内安定性が向上しているもの

と考えられる。

2.2 既承認核酸医薬品のタンパク結合評価

以降では、今回の調査対象である13品目のアンチセンス医薬品及びsiRNA医薬品について、タンパク結合評価の*in vitro*試験に関する調査結果を記載する。日米欧各局から公開されている承認審査資料及び審査報告書から得た情報の概要をアンチセンス医薬品及びsiRNA医薬品について、それぞれTable 2-9及びTable 2-10に示す。

2.2.1 アンチセンス医薬品のタンパク結合

アンチセンス医薬品のタンパク結合試験は、8品目中5品目(mipomersen, eteplirsen, nusinersen, inotersen, volanesorsen)が限外ろ過法、1品目(viltolarsen)が超遠心法であり、残り2品目(golodirsen, casimersen)は試験法が記載されていなかった。超遠心法によるタンパク結合試験を実施したviltolarsenだけが試料として血清を使用していたが、他のアンチセンス医薬品は全て血漿を使用していた。髄腔内投与されるnusinersenのタンパク結合試験では、血漿に加えて脳脊髄液も試料として使用していた。Nusinersenの脳脊髄液中のタンパク結合率(ヒト0~24.92%)は血漿中(ヒト94.05~96.13%)に比べて低く、本傾向は血漿中に比べて脳脊髄液中のタンパク質濃度が1%以下と極めて低いという知見と矛盾しないと考えられる¹⁹⁻²¹⁾。

タンパク結合試験に用いられた動物種は、8品目全てのアンチセンス医薬品でげっ歯類であるサル及びヒトが用いられていた。げっ歯類については、マウス及びラットの2種を用いたアンチセンス医薬品は8品目中5品目(mipomersen, eteplirsen, golodirsen, viltolarsen, casimersen)と半数以上であったが、マウスのみを用いた品目(nusinersen, volanesorsen)、あるいは、げっ歯類を用いない品目(inotersen)も存在した。アンチセンス医薬品のタンパク結合率は、それぞれのアンチセンス医薬品内で検討した動物種間では同程度であり、大きな種差は認められなかった。特にSオリゴでは、その高い血漿タンパク結合率に種差が認められないことが知られており^{22, 23)}、動物種の数減らして検討していたアンチセンス医薬品(nusinersen, volanesorsen, inotersen)が全てSオリゴであったことと整合する。

タンパク結合試験で検討した各アンチセンス医薬

品の試験濃度範囲については、情報のあるほとんどの品目で臨床での血漿中濃度をカバーしていたが、viltolarsenのみ臨床での血漿中濃度(329 µg/mL)を大きく下回る濃度範囲(1~10 µg/mL)でタンパク結合試験が実施されていた。しかし、viltolarsenの承認審査を行った米国食品医薬品局(FDA)及びPMDAの審査報告書等において、タンパク結合試験の検討濃度範囲が臨床濃度を大きく下回っていることに対する指摘及び考察はなかった。一般的に、Sオリゴは負電荷を帯びたリン酸部の骨格がタンパク質の親水性部位と相互作用することで高い血漿タンパク結合率を示すのに対し²⁴⁻²⁶⁾、電荷的に中性であるホスホロジアミデート結合を骨格に有するモルフォリノオリゴは概して低い血漿タンパク結合率を示すことが知られている^{27, 28)}ため、高濃度の検討がされなかった可能性がある。

今回調査したアンチセンス医薬品においても、Sオリゴである4品目(mipomersen, nusinersen, inotersen, volanesorsen)の血漿タンパク結合率は全ての動物種で84%以上の高値であったのに対し、モルフォリノオリゴである4品目(eteplirsen, golodirsen, viltolarsen, casimersen)の血漿/血清タンパク結合率は全ての動物種で最大40%であった。Sオリゴとモルフォリノオリゴのタンパク結合率の違いは、両剤の組織移行性、尿中排泄速度及び腎蓄積性の違いを生む要因となる^{22, 24)}。前述のとおり、Sオリゴのタンパク結合は、主に電荷的親和性によって成立しているため、そのタンパク結合力は骨格中で負電荷を示すリン酸基の数に依存することから、より短鎖であるほどタンパク結合力は弱まる^{22, 25, 29)}。しかし、今回の調査対象であるSオリゴの塩基鎖長は18~20であり、4剤間で大きな差はなかったため、そのタンパク結合率にも大きな差が認められなかったと考えられる。なお、8品目全てのアンチセンス医薬品において、検討した試験濃度範囲で濃度依存的なタンパク結合率の変化は認められなかった。

85%以上の高いヒト血漿タンパク結合率を示したmipomersenについては、ヒト血漿タンパク分画である血清アルブミン、 α_2 -マクログロブリン及び α_1 -酸性糖タンパクに対する結合率が、限外ろ過法にて0.1~100 µmol/Lの濃度範囲で別途評価されていた(Table 2-9)。その結果、mipomersenの血清ア

Table 2-9 既承認アンチセンス医薬品で実施

化合物名	Mipomersen	Eteplirsen	Nusinersen
被検物質	³² P-mipomersen	¹⁴ C-eteplirsen	Nusinersen
マトリクス	Plasma	Plasma	Plasma, CSF
試験法/分析法	Ultrafiltration/LSC	Ultrafiltration/unknown	Ultrafiltration/ hybridization ELISA
動物種	Mouse, rat, monkey, human	Mouse, rat, monkey, human	Plasma : Mouse, monkey, human CSF : Monkey, human
試験濃度 (μg/mL)	0.760, 7.60, 15.2, 30.4, 45.6, 60.8, 76.0, 152, 380, 760, 4560	8, 24, 80, 240, 800	Plasma : 0.1, 5 CSF : 5, 150
タンパク結合率 (%)	Mouse 84.47-88.66, rat 90.05-93.15, monkey 90.84- 94.81, human 84.81-95.87	Mouse 17.9-25.4, rat 1.8-18.5, monkey 0.2-8.4, human 6.1-16.5	Plasma : Mouse 95.97-96.55, monkey 96.99-99.44, human 94.05-96.13 CSF : Monkey 0-3.03, human 0-24.92
臨床濃度 ^a (μg/mL)	1-8	77	Plasma : 0.1-5 CSF : 5
備考	Protein binding was also evaluated for albumin, α 2-macroglobulin and α 1-acid glycoprotein		

a : 原資料の非臨床タンパク結合評価に関する記載部分に臨床濃度が与えられている場合は当該濃度を示し、そうでない場合は承認用法・用量で投与されたときのヒトでのC_{max}を示した。

b : 原資料 (FDAの非臨床審査報告書) では、8, 24及び240 μg/mLでのタンパク結合率データが記載されていなかったため、記載のあった80及び800 μg/mLでのタンパク結合率データを示した。

CSF : cerebrospinal fluid, ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay, LSC : liquid scintillation counting

ルブミン、 α 2-マクログロブリン及び α 1-酸性糖タンパクに対するタンパク結合率は、それぞれ95.14~99.25%, 75.93~92.05%及び52.38~95.96%であり、血清アルブミンに対して最も高い結合性を示した。 α 2-マクログロブリン及び α 1-酸性糖タンパクに対しては、mipomersenの濃度上昇に伴ってタンパク結合率は低下する傾向が認められたが、mipomersenのヒト血漿中濃度(1~8 μg/mL)ではいずれのタンパク結合率も90%を超えており、ヒト血漿中では血漿タンパクの種類に依らず高い結合性を示すことが示唆された。血清アルブミンに対する結合の飽和は認められず、 α 2-マクログロブリンに対しては結合の飽和が認められたという所見は、他のSオリゴでも確認されている²⁵⁾。Sオリゴは高い血漿タンパク結合率を示す一方で、その結合力は比較的弱く、解離定数はμmol/Lオーダーである³⁰⁾。また、親水性薬剤であるアンチセンス医薬品のタンパク結合サイトは、血清アルブミンや α 1-酸

性糖タンパクに存在する一般的な薬物結合サイトではない²⁵⁾。したがって、Sオリゴは高い血漿タンパク結合率を示すものの、血漿タンパク結合率の高い低分子医薬品との結合置換による薬物相互作用は生じないと考えられ、これを支持する報告もある^{25, 31)}。

2.2.2 siRNA医薬品のタンパク結合

siRNA医薬品のタンパク結合試験は、今回の調査対象である5品目のsiRNAのうち、LNP製剤であるLNP-patisiranを除く4品目全てのGalNAc-siRNA (givosiran, lumasiran, inclisiran, vutrisiran) について、ゲルシフトアッセイ (electrophoretic mobility shift assay : EMSA) 法が用いられていた。低分子医薬品のタンパク結合試験では、限外ろ過法、超遠心法及び平衡透析法が一般的に用いられているが、核酸医薬品は低分子医薬品とは異なる特徴 (分子量、分子構造及び表面荷電等) を有するため、従来試験法を核酸医薬品に直接当てはめることがで

されたタンパク結合評価の *in vitro* 試験の概要

Inotersen	Volanesorsen	Golodirsen	Viltolarsen	Casimersen
Inotersen	Volanesorsen	Golodirsen	¹⁴ C-viltolarsen	Casimersen
Plasma	Plasma	Plasma	Serum	Plasma
Ultrafiltration/ hybridization ELISA	Ultrafiltration/ hybridization ELISA	Unknown/unknown	Ultracentrifugation/ LSC	Unknown/unknown
Monkey, human	Mouse, monkey, human	Mouse, rat, monkey, human	Mouse, rat, monkey, human	Mouse, rat, monkey, human
5, 150	5, 150	8, 24, 80, 240, 800	1, 10	8-800 (human)
Monkey 97.80-99.35, human 94.41-97.84	Mouse 97.19-98.12, monkey 99.48-99.78, human 98.01-99.24	Mouse 31.3-39.5, rat 11.0-22.2, monkey 33.3- 33.7, human 37.0-37.3 ^b	Mouse 23.0-25.7, rat 29.7-32.2, monkey 36.1- 36.2, human 39.4-40.3	Mouse, rat, monkey < 37, human 8.4-31.6
6	0.133-110	185	329	115

きない³²⁾。特に siRNA 医薬品は、アンチセンス医薬品に比べて分子量が2倍程度大きく約 15 kDa であるが、その“rigid rod”と呼ばれる線形構造の流体力学的半径は、約 48 kDa の球状構造のタンパク質の半径と同等であるため、アンチセンス医薬品で使用する限外ろ過膜（分画分子量 30 kDa）²⁵⁾よりも更に孔の大きい限外ろ過膜（分画分子量 50 kDa）を用いる必要がある³²⁾。しかし、限外ろ過膜の孔が大きくなるほど、siRNA と結合している血漿タンパクが限外ろ過膜を透過する割合が増加することから、限外ろ過法では siRNA のタンパク結合率を適切に評価できない可能性が指摘されている³³⁾。そこで、従来の限外ろ過法、超遠心法及び平衡透析法の代替として、ゲルシフトアッセイ法が核酸医薬品のタンパク結合評価の第4の試験法として採用されている³⁴⁾。ゲルシフトアッセイ法の課題としては、リン酸緩衝液及びゲルローディング緩衝液を試料に添加する必要があるため、これに伴う試料の希釈が

siRNA と血漿タンパクの平衡状態に影響を及ぼす可能性が指摘されている³³⁾。なお、今回の調査対象である GalNAc-siRNA の4品目 (givosiran, lumasiran, inclisiran, vutrisiran) はいずれも siRNA のタンパク結合試験にゲルシフトアッセイ法が応用できることを報告した Alnylam 社の品目である。すなわち、現状では、Alnylam 社が独自に検討・導入した手法とも解釈されるため、上述のゲルシフトアッセイ法における課題を含めて、核酸医薬品のタンパク結合試験法としての能力、限界、正確性、妥当性などについての更なる検討、議論が望まれる。ただし、PMDA, FDA 及び欧州医薬品庁 (EMA) の各規制当局が公開している当該4品目の審査報告書において、本試験法に関する指摘や懸念等の記載は確認されなかったことから、GalNAc-siRNA のタンパク結合試験法としてゲルシフトアッセイ法を用いることは、各規制当局によりその妥当性が認められており、今後の開発でも活用できると考える。

Table 2-10 既承認 siRNA 医薬品で実施されたタンパク結合評価の *in vitro* 試験の概要

化合物名	Patisiran	Givosiran	Lumasiran	Inclisiran	Vutrisiran
被検物質	LNP-Patisiran	Givosiran	Lumasiran	Inclisiran	Vutrisiran
マトリクス	Serum protein	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
試験法/分析法	FPLC/SDS-PAGE	EMSA	EMA EMSA FDA unknown	EMSA	EMSA
動物種	Rat, human	Mouse, rat, monkey, human	Mouse (FDA only), rat, monkey, human	Mouse, rat, monkey, human	Mouse, rat, monkey, human
試験濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.05 $\text{mg}/\text{mL}^{\text{b}}$	0.5, 1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	EMA 0.5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FDA 0.5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.5-1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}^{\text{d}}$	0.5, 1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
タンパク結合率 (%)	Rat serum albumin 0.89, human serum albumin 0.46, human α 1-acid glycoprotein 2.07	Mouse 10.1-91.3, rat 27.5-93.1, monkey 25.9-89.5, human 21.1-91.8 ^c human 91.8 at 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Rat 35.0-95.9, monkey 37.1-85.5, human 19.6-85.0 human 76.6-85.0 at 0.5-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Mouse, rat, monkey, human 86.3-93.1 human 87.4 to rat 93.1 at 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Mouse 11.7-75.6, rat 26.0-87.0, monkey 15.9-86.8, human 19.0-82.0 human 77.9-82.0 at 0.5-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
臨床濃度 ^a ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.57-7.15 ^b	0.321	0.5-1	0.421-1.76	0.0984-0.191
備考	Plasma protein binding of PEG ₂₀₀₀ -C-DMG was also evaluated by ultracentrifuge	Protein binding had inverse relationship with concentrations across all the species	Protein binding had inverse relationship with concentrations across all the species	Protein binding had inverse relationship with concentrations across all the species	Protein binding had inverse relationship with concentrations across all the species

a: 原資料の非臨床タンパク結合評価に関する記載部分に臨床濃度が与えられている場合は当該濃度を示し、そうでない場合は承認用法・用量で投与されたときのヒトでの C_{max} を示した。

b: LNP-Patisiran ではなく、patisiran の濃度を示した。

c: すべての動物種で検出強度が不十分であったため、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でのタンパク結合率は得られなかった。

d: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ より高濃度でのタンパク結合評価が実施されていた可能性があったが、原資料には臨床濃度付近である二つの濃度のみ記載されていた。

EMA: European Medicines Agency, EMSA: electrophoretic mobility shift assay, FDA: Food and Drug Administration, FPLC: fast protein liquid chromatography, LNP: lipid nanoparticle, SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

使用された動物種については、GalNAc-siRNA である4品目全てでマウス、ラット、サル、ヒトが用いられていた。いずれのGalNAc-siRNAにおいても全ての動物種で血漿タンパク結合率は濃度依存的に変動し、GalNAc-siRNA濃度の増加に伴って血漿タンパク結合率は減少する傾向が認められた。しかし、全てのGalNAc-siRNAにおいて、臨床濃度付近の濃度に近い0.5~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒト血漿タンパク結合率は76.6~91.8%と比較的高値であった。GalNAc-siRNAは、ヒト血漿タンパクの60%を占める血清アルブミンには結合せず、ヒト血漿タンパクに数%存在する α 2-マクログロブリン、 α -トロンビン、フィブリノーゲン及びフィブロネクチンに結

合するため^{32,34}、GalNAc-siRNAの高濃度付近では、これらの血漿タンパクに対して結合の飽和が生じたと考えられる。なお、lumasiranのみFDAとEMAに対して、それぞれ異なるタンパク結合試験成績が提出されており、当該試験間で使用した動物種及びlumasiranの検討濃度範囲が異なっていたが、承認申請資料や審査報告書等からその理由を知ることができなかった。

前述のとおり、GalNAc-siRNAは臨床濃度付近で高い血漿タンパク結合率を示すが、この血漿タンパク結合はGalNAc-siRNAのASGPR介在性の肝細胞への取り込みやRNA分解活性にほとんど影響を及ぼさなかったという実験結果が報告されてい

る³⁵⁾。当該報告では、その理由として二つの可能性、すなわち、1) 血漿タンパクはGalNAc-siRNAのsiRNA部分にのみ相互作用して結合している可能性、2) GalNAc-siRNAと血漿タンパクの結合親和性に比べてGalNAcリガンドとASGPRの結合親和性の方が高い可能性、を挙げている。前者については、GalNAc単体に血漿タンパクが結合しなかったという実験結果も併せて報告している。後者については、GalNAc-siRNAの腎クリアランスは糸球体ろ過速度と同程度である点を考慮すると³³⁾、GalNAc-siRNAと血漿タンパクの結合力はその腎排泄を留まらせるほどの強いものではないと考えられることから支持される。

LNP-patisiranはLNP製剤であることから、異なる二つの試験法によってタンパク結合が評価されていた。一つ目の試験法では、siRNAがLNPに封入された状態(LNP-patisiran)でのタンパク結合が評価されており、FPLC(fast protein liquid chromatography)による分離後、SDS-PAGEを利用した定量法を用いて、ラット血清アルブミン、ヒト血清アルブミン及びヒト α 1-酸性糖タンパクに対するpatisiranの結合量を測定していた。その結果、これらの血清タンパクに対するLNP-patisiranの結合率は低く、最大で2%程度であった。二つ目の試験法では、LNPの構成成分の一つであるPEG修飾脂質(PEG₂₀₀₀-C-DMG)について、PEG修飾脂質単体のタンパク結合性が超遠心法を用いて評価されていた。検討された5及び20 μ mol/Lの試験濃度のいずれにおいても、血漿タンパク結合率は97%であり、PEG修飾脂質の高い血漿タンパク結合性が確認された。複数のLNP構成成分の中でタンパク結合評価が実施されたのは、新規脂質添加剤であるPEG修飾脂質のみであり、もう一つの新規脂質添加剤であるpH感受性脂質を含む他のLNP構成成分のタンパク結合評価は実施されなかった。複数のLNP構成成分のうちPEG修飾脂質のみタンパク結合評価が実施された理由は承認申請資料や審査報告書等に記載されていなかったが、LNP-patisiranを静脈内投与すると、血漿中でPEG修飾脂質の大部分はLNPから解離して循環性リポタンパク及び血球に移行することが知られているため¹⁵⁾、LNP構成成分のうち血漿中でLNPから解離して存在するのはPEG修飾脂質のみであったことが当該理由ではな

いかと推察される。しかし、LNPから解離して循環血漿中に存在するLNP構成成分であったとしても、タンパク結合評価がガイドライン上必須というわけではない。したがって、脂質添加剤のタンパク結合評価の必要性に関しては、今後議論が求められる点であると考ええる。

なお、上述した試験法によるLNP-patisiranのタンパク結合試験については、規制当局間で見解が異なっていた。PMDA及びFDAの審査報告書ではその妥当性について特に言及はなかったが、EMAの審査報告書においては、特に一つ目の試験法(すなわち、LNP製剤としてのタンパク結合評価)については、「この評価系では結果の正確性を判断できない」と記載されていた。EMAの審査報告書のように前例のない試験系等に対する規制当局の見解が把握できることは、新しいモダリティの開発をより適切かつ効率的に進める上で非常に有用であると考ええる。一方、核酸医薬のような新しいモダリティの研究開発を進める上で、前例のない新規評価系の開発が必要となる場合は今後更に増えると予想されることから、各規制当局が提供する相談制度(PMDAであれば医薬品安全性相談等)を活用し、開発した/開発予定の新規評価系に対する各規制当局の見解を研究開発の適切な時期に予め確認しておくことは、新しいモダリティの研究開発並びに各規制当局での審査を効率的に進める上で有用であると考ええる。

3. 結論

本研究では既承認のアンチセンス医薬品及びsiRNA医薬品13品目について、日米欧各局から公開されている承認審査情報を中心に組織分布及び血漿/血清タンパク結合の情報を収集し、論文情報も含めて考察を加えた。調査結果の概要及び結論を以下に記載する。

まず、組織分布の評価に関して、全身の組織分布評価については、低分子医薬品と同様に放射性標識化合物を用いたQWBA試験が実施されていた。分布割合が高い臓器など特に注目すべき組織については、非標識化合物を投与して採材した組織をLC-MS、CGE、HPLC、ELISA及びECLなどの手法を組み合わせて評価されているケースが多かった。これらの組織分布評価から明らかになった薬物動態特性

として、オリゴ核酸のみで構成される全身投与型のアンチセンス医薬品は、全身に速やかに分布し、動物種に関係なく全ての品目で腎臓への集積性が高かった。また、組織からの消失に関して、全身投与型のSオリゴ及びモルフォリノオリゴに大きな違いは認められなかった。一方、siRNA医薬品はいずれも薬効標的組織である肝臓への指向性が高く、特にGalNAc-siRNAは、肝臓への集積性が非常に高い傾向が認められた。組織分布の特徴をモダリティ間で比較するため、肝臓に発現する同一の遺伝子(TTR mRNA)を標的とするinotersen(ギャップマー型アンチセンス)、LNP-patisiran(LNP-siRNA)、vutrisiran(GalNAc-siRNA)、並びに、肝臓に発現する別の遺伝子(ALAS1 mRNA)を標的とするgivosiran(GalNAc-siRNA)を比較したところ、GalNAc-siRNAはアンチセンス及びLNP-siRNAと比較して、肝臓におけるAUCが大きく、長時間滞留する傾向が認められた。また、投与量で標準化したinotersenとvutrisiranの比較では、 $C_{max}/Dose$ 及び $AUC_{0-t}/Dose$ は、肝臓でinotersen < vutrisiran、腎臓でinotersen > vutrisiranであり、GalNAcの付加によって肝臓への選択的な取り込みがより増強される傾向があることが示された。

血漿/血清タンパク結合の評価に関しては、アンチセンス医薬品では低分子医薬品等で一般に用いられる限外ろ過法及び超遠心法で評価されていたが、siRNA医薬品については、新しい評価手法としてゲルシフトアッセイ法が用いられていた。血漿/血清タンパク結合の特性として、アンチセンス医薬品については、モルフォリノオリゴの血漿/血清タンパク結合率は40%以下と低い傾向にあるのに対し、Sオリゴの血漿タンパク結合率は85%以上と非常に高かった。一方、siRNA医薬品については、LNP-patisiranは血清タンパクとの結合率が約2%以下と低いのに対し、GalNAc-siRNAでは、全ての医薬品において臨床濃度付近のヒト血漿タンパク結合率が高かった(76%以上)。

核酸医薬品の組織分布と血漿/血清タンパク結合は、オリゴ核酸の分子構造やDDS技術の影響を特に受けやすいため、これらの特性を正確に理解することが核酸医薬開発において重要であると考えられる。今回の調査から、組織分布評価及び血漿/血清タンパク結合評価については、従来の評価法に加え

て新たな評価法が取り入れられていることが明らかとなり、これにより、組織分布及び血漿/血清タンパク結合の特性がより適切に把握されていた。核酸医薬開発においては、修飾核酸技術やDDS技術が更に多様化していくため、今後も適切な評価手法を模索していく必要があると考えられる。また、開発品目に用いられている修飾核酸の種類、構造、物性、投与部位、薬物動態プロファイル等の特徴を踏まえて、薬物動態評価における動物種、投与量/投与濃度、評価手法、分析機器等を適切に選択し、薬物動態評価を実施していく必要があろう。

文献

- 1) 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.
- 2) 岩崎紀彦, 小平浩史, 後藤昭彦, 山中陽介, 佐藤正延, 宮澤憲浩, 庭山裕孝, 設楽悦久, 関口裕太郎, 田村直美, 高草英生, 角辻賢太, 今井峻司, 深野泰史, 福原慶, 蓼原吉輝, 吉田徳幸, 小比賀聡, 西川元也, 井上貴雄. アンチセンス医薬品の薬物動態評価の現状. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2021, 52(3), p.150-163.
- 3) Inoue, Takao; Sasaki, Kiyomi; Yoshida, Tokuyuki. 核酸医薬開発の現状と今後の展望. *Drug Delivery System*. 2019, 34(2), p.86-98.
- 4) 佐々木浩, 泊幸秀. RNAサイレンシング. *MEDCHEM NEWS*. 2012, 22(3), p.24-27.
- 5) Witzigmann, Dominik; Kulkarni, Jayesh A.; Leung, Jerry; Chen, Sam; Cullis, Pieter R.; van der Meel, Roy. Lipid nanoparticle technology for therapeutic gene regulation in the liver. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020, 159, p.344-363.
- 6) Hu, Bo; Zhong, Liping; Weng, Yuhua; Peng, Ling; Huang, Yuanyu; Zhao, Yongxiang; Liang, Xing Jie. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020, 5(1), p.101.
- 7) Nishikawa, Makiya; Yoshioka, Yukitake; Nagaoka, Makoto; Kusamori, Kosuke. 核酸医薬品開発における体内動態とDDS. *Drug Delivery System*. 2021, 36(1), p.40-50.
- 8) Prakash, Thazha P.; Graham, Mark J.; Yu, Jinghua; Carty, Rick; Low, Audrey; Chappell, Alfred; Schmidt, Karsten; Zhao, Chenguang; Aghajan, Mariam; Murray, Heather F.; Riney, Stan; Booten, Sheri L.; Murray, Susan F.; Gaus, Hans; Crosby, Jeff; Lima, Walt F.; Guo,

- Shuling; Monia, Brett P.; Swayze, Eric E.; Seth, Punit P. Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. *Nucleic Acids Research*. 2014, **42**(13), p.8796-8807.
- 9) Prakash, Thazha P.; Brad Wan, W.; Low, Audrey; Yu, Jinghua; Chappell, Alfred E.; Gaus, Hans; Kinberger, Garth A.; Østergaard, Michael E.; Migawa, Michael T.; Swayze, Eric E.; Seth, Punit P. Solid-phase synthesis of 5'-triantennary N-acetylgalactosamine conjugated antisense oligonucleotides using phosphoramidite chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015, **25**(19), p.4127-4130.
- 10) Sun, Yuchen; Saito, Yoshiro. LC-MSを用いた核酸医薬品バイオアナリシス法の開発戦略と分析法検証手法. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*. 2023, **71**(2), p.62-68.
- 11) 厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課長. 「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」について. 薬事審査発0328第19号, 平成28年3月28日.
- 12) Akinc, Akin; Querbes, William; De, Soma; Qin, June; Frank-Kamenetsky, Maria; Jayaprakash, K. Narayanannair; Jayaraman, Muthusamy; Rajeev, Kallanthottathil G.; Cantley, William L.; Dorkin, J. Robert; Butler, James S.; Qin, Liuliang; Racie, Timothy; Sprague, Andrew; Fava, Eugenio; Zeigerer, Anja; Hope, Michael J.; Zerial, Marino; Sah, Dinah Wy; Fitzgerald, Kevin; Tracy, Mark A.; Manoharan, Muthiah; Kotliansky, Victor; Fougerolles, Antonin De; Maier, Martin A. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Molecular Therapy*. 2010, **18**(7), p.1357-1364.
- 13) Jayaraman, Muthusamy; Ansell, Steven M.; Mui, Barbara L.; Tam, Ying K.; Chen, Jianxin; Du, Xinyao; Butler, David; Eltepu, Laxman; Matsuda, Shigeo; Narayanannair, Jayaprakash K.; Rajeev, Kallanthottathil G.; Hafez, Ismail M.; Akinc, Akin; Maier, Martin A.; Tracy, Mark A.; Cullis, Pieter R.; Madden, Thomas D.; Manoharan, Muthiah; Hope, Michael J. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angewandte Chemie* (International ed. in English). 2012, **51**(34), p.8529-8533.
- 14) Zhang, Xiaoping; Goel, Varun; Robbie, Gabriel J. Pharmacokinetics of Patisiran, the First Approved RNA Interference Therapy in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2020, **60**(5), p.573-585.
- 15) BL, Mui; YK, Tam; M, Jayaraman; SM, Ansell; X, Du; YY, Tam; PJ, Lin; S, Chen; JK, Narayanannair; KG, Rajeev; M, Manoharan; A, Akinc; MA, Maier; P, Cullis; TD, Madden; MJ, Hope. Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*. 2013, **2**(12), p. e139.
- 16) Lehoux, Dario; Far, Adel Rafai; Kallend, David; Wijngaard, Peter L. J.; Zerler, Brad. Evaluation of the distribution and excretion of [¹⁴C]-inclisiran following single subcutaneous administration in cynomolgus monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2022, **443**, p.115978.
- 17) McDougall, Robin; Ramsden, Diane; Agarwal, Sagar; Agarwal, Saket; Aluri, Krishna; Arciprete, Michael; Brown, Christopher; Castellanos-Rizaldos, Elena; Charisse, Klaus; Chong, Saeho; Cichocki, Joseph; Fitzgerald, Kevin; Goel, Varun; Gu, Yongli; Guenther, Dale; Habtemariam, Bahru; Jadhav, Vasant; Janas, Maja; Jayaraman, Muthusamy; Kurz, Jeffrey; Li, Jing; Liu, Ju; Liu, Xiumin; Liou, Steven; Maclauchlin, Chris; Maier, Martin; Manoharan, Muthiah; Nair, Jayaprakash K.; Robbie, Gabriel; Schmidt, Karyn; Smith, Peter; Theile, Christopher; Vaishnav, Akshay; Waldron, Scott; Xu, Yuanxin; Zhang, Xuemei; Zlatev, Ivan; Wu, Jing Tao. The Nonclinical Disposition and Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Properties of N-Acetylgalactosamine-Conjugated Small Interfering RNA Are Highly Predictable and Build Confidence in Translation to Human. *Drug Metabolism and Disposition*. 2022, **50**(6), p.781-797.
- 18) Sandra, Louis; T'jollyn, Huybrecht; Goeyvaerts, Nele; Vermeulen, An; Dosne, Anne Gaëlle; Perez-Ruixo, Juan Jose. Plasma and Liver Pharmacokinetics of the N-Acetylgalactosamine Short Interfering RNA JNJ-73763989 in Recombinant Adeno-Associated-Hepatitis B Virus-Infected Mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2022, **383**(1), p.70-79.
- 19) Shen, Danny D.; Artru, Alan A.; Adkison, Kimberly K. Principles and applicability of CSF sampling for the assessment of CNS drug delivery and pharmacodynamics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004, **56**(12), p.1825-1857.
- 20) Artru A: Spinal cerebrospinal fluid chemistry and physiology. *Spinal Drug Delivery*. 1999, p.177-237.
- 21) Biou D, Benoist JF; Nguyen-Thi C, Huong X; Morel P, Marchand M. Cerebrospinal fluid protein concentrations in children: age-related values in

- patients without disorders of the central nervous system. *Clinical Chemistry*. 2000, **46**(3), p.399-403.
- 22) Geary, Richard S.; Norris, Daniel; Yu, Rosie; Bennett, C. Frank. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015, **87**, p.46-51.
- 23) Yu, Rosie Z.; Kim, Tae Won; Hong, An; Watanabe, Tanya A.; Gaus, Hans J.; Geary, Richard S. Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007, **35**(3), p.460-468.
- 24) Geary, Richard S. Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2009, **5**(4), p.381-391.
- 25) Watanabe, Tanya A.; Geary, Richard S.; Levin, Arthur A. Plasma protein binding of an antisense oligonucleotide targeting human ICAM-1 (ISIS 2302). *Oligonucleotides*. 2006, **16**(2), p.169-180.
- 26) Crooke, Stanley T.; Vickers, Timothy A.; Liang, Xue Hai. Phosphorothioate modified oligonucleotide-protein interactions. *Nucleic Acids Research*. 2020, **48**(10), p.5235-5253.
- 27) Amantana, Adams; Iversen, Patrick L. Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005, **5**(5), p.550-555.
- 28) Dirin, Mehrdad; Winkler, Johannes. Influence of diverse chemical modifications on the ADME characteristics and toxicology of antisense oligonucleotides. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2013, **13**(6), p.875-888.
- 29) Guimaraes, Guilherme; Yuan, Long; Li, Pei. Antisense Oligonucleotide In Vitro Protein Binding Determination in Plasma, Brain, and Cerebral Spinal Fluid Using Hybridization LC-MS/MS. *Drug Metabolism and Disposition*. 2022, **50**(3), p.268-276.
- 30) Geary RS; Watanabe TA; Truong L; Freier S; Lesnik EA; Sioufi NB; Sasmor H; Manoharan M; Levin AA. Pharmacokinetic properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified oligonucleotide analogs in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001, **296**(3), p.890-897.
- 31) Geary, Richard S.; Bradley, Jo Ann D.; Watanabe, Tanya; Kwon, Younggil; Wedel, Mark; Van Lier, Jan J.; VanVliet, André 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. *Clinical Pharmacokinetics*. 2006, **45**(8), p.789-801.
- 32) Humphreys, Sara C.; Thayer, Mai B.; Lade, Julie M.; Wu, Bin; Sham, Kelvin; Basiri, Babak; Hao, Yue; Huang, Xin; Smith, Richard; Rock, Brooke M. Plasma and Liver Protein Binding of N-Acetylgalactosamine-Conjugated Small Interfering RNA. *Drug Metabolism and Disposition*. 2019, **47**(10), p.1174-1182.
- 33) Humphreys, Sara C.; Davis, John A.; Iqbal, Sajida; Kamel, Amin; Kulmatycki, Kenneth; Lao, Yanbin; Liu, Xiumin; Rodgers, John; Snoeys, Jan; Vigil, Adam; Weng, Yan; Wiethoff, Christopher M.; Wittwer, Matthias B. Considerations and recommendations for assessment of plasma protein binding and drug-drug interactions for siRNA therapeutics. *Nucleic Acids Research*. 2022, **50**(11), p.6020-6037.
- 34) Rocca, Carrie; Dennin, Sean; Gu, Yongli; Kim, Joohwan; Chigas, Samantha; Najarian, Diana; Chong, Saeho; Gutierrez, Shannon; Butler, James; Charisse, Klaus; Robbie, Gabriel; Xu, Yuanxin; Brown, Kirk. Evaluation of electrophoretic mobility shift assay as a method to determine plasma protein binding of siRNA. *Bioanalysis*. 2019, **11**(21), p.1927-1939.
- 35) Agarwal, Saket; Allard, Ruth; Darcy, Justin; Chigas, Samantha; Gu, Yongli; Nguyen, Tuyen; Bond, Sarah; Chong, Saeho; Wu, Jing Tao; Janas, Maja M. Impact of Serum Proteins on the Uptake and RNAi Activity of GalNAc-Conjugated siRNAs. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2021, **31**(4), p.309-315.