

- Yamaoka T. Quick nuclear transportation of sirna and in vivo hepatic apob gene silencing with galactose-bearing polymeric carrier. *J. Biotechnol.* 2014
- 8) Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T: Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells in a mouse model of neonatal stroke, *NeuroScience*, 263C: 148-158, 2014.
- 9) Yamamoto T, Obika S, Nakatani M, Yasuhara H, Wada F, Shibata E, Shibata MA, Harada-Shiba M: Locked nucleic acid antisense inhibitor targeting apolipoprotein C-III efficiently and preferentially removed triglyceride from large VLDL particles from murine plasma, *European Journal of Pharmacology*, 723: 353-359, 2014.
- 10) Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K, Harada-Shiba M, Arai H, Bujo H, Nohara A, Oikawa S, Okada T, Wakatsuki A: Familial hypercholesterolemia, *J Atheroscler Thromb*, 21: 6-10, 2014.
- 11) Nagasaki Y, Yamazaki T, Kikuchi A, Harada-Shiba M: Elevated atherogenic index following oral administration of quaternized polyamine nanogels, *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 113: 237-242, 2014.
- 12) Yuasa Y, Osaki T, Makino H, Iwamoto N, Kishimoto I, Usami M, Harada-Shiba M: Proteomic analysis of proteins eliminated by LDL-apheresis, *Ther Apher Dial*, 18(1): 93-102, 2014.
- 13) Yokoyama S, Ueshima H, Miida T, Nakamura M, Takata K, Fukukawa T, Goto T, Harada-Shiba M, Sano M, Kato K, Matsuda K: High-density lipoprotein levels have markedly increased over the past twenty years in japan, *J Atheroscler Thromb*, 21(2): 151-160, 2014.

#### 総説

- 1) 小倉正恒, 斯波真理子: 動脈硬化症の治療標的ー脂質代謝を中心に, *臨床検査* Vol.59 No.2, 133-141, 2015.2
- 2) 安原秀典, 和田俊輔, 斯波真理子: 第6節 PCSK9, series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用ー脂質代謝異常と関連疾患<上巻> 180-194, 2015.1
- 3) 和田俊輔, 斯波真理子, 小比賀聡: 第5節 ARH, series モデル動物

- 利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用ー脂質代謝異常と関連疾患<上巻> 169-179, 2015.1
- 4) 小倉正恒, 斯波真理子: 重症高コレステロール血症の治療, Annual Review 2015 糖尿病・代謝・内分泌, 133-140, 2015.1
- 5) 斯波真理子: 補助療法 LDL アフェレシス, 高 LDL-C 血症 低 LDL-C 血症 診断と治療の ABC 101, 196-203, 2015.1
- 6) 小倉正恒, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症への対応, 動脈硬化予防 Vol.13 No.4, 36-41, 2015.1
- 7) 槇野久士, 斯波真理子: Low density lipoprotein(LDL)アフェレシス, 人工臓器 43 巻 3 号, 197-201, 2014.
- 8) 和田郁人, 山本剛史, 小比賀聡, 斯波真理子: 新規人工核酸を基盤とした循環器疾患の新たな治療薬の開発, 循環器病の進歩 Vol.XXXV No.1, 60-68, 2014.11
- 9) 斯波真理子: すべては患者さんのためにー脂質代謝異常研究の最前線で, 糖尿病診療マスター Vol.12 No.8, 772-778, 2014.11
- 10) 小倉正恒, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症, Current Therapy Vol.32 No.9, 95 (927), 2014.9
- 11) 槇野久士, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症に対する LDL アフェレシスの治療効果と臨床評価方法, 日本アフェレシス学会雑誌 33 巻 2 号, 129-134, 2014.5
- 12) 小倉正恒, 斯波真理子: 脂質異常症, 内科 Vol.113 No.6, 1558-1561, 2014.6
- 13) 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症 (FH), 診断と治療 第 102 巻 第 5 号, 757-761, 2014.5
- 14) 小倉正恒, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症 (PCSK9, ARH) と黄色腫, 動脈硬化, The Lipid, Vol.25 No.2, 4-10, 2014.4
- 15) 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症, あなたも名医! パターンで把握する脂質異常症治療, jmed31, 134-138, 2014.4
- 16) 小倉正恒, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症を再考する, Vascular Medicine, Vol.10 No.1, 16-23, 2014.4
- 学会発表  
(国際学会)
- 1) Ogura M, Hori M, Harada-Shiba M, Serum Total Bilirubin Levels in Japanese Patients with Familial Hypercholesterolemia, The 2<sup>nd</sup> World Congress of Clinical Lipidology, 2014 年 12 月 5 日~7 日, Vienna, Austria
- 2) Wada S, Saito H, Endo K, Wada F,

- Yamamoto T, Obika S, Harada-Shiba M, Development of archaeal L7Ae-based siRNA delivery vehicle with apoE mimetic-like effect, 10th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, ポスター発表, 2014年10月12日～15日, San Diego, California, USA
- 3) Harada-Shiba M, Management of pregnancy and delivery in 4 homozygous FH with LDL apheresis, 9<sup>th</sup> LIPIDCLUB & Therapeutic Apheresis 2014, 2014年6月6日～7日, Rome
- 4) Harada-Shiba M, Yamamoto T, Yasuhara H, Wada F, Wada S, Shibata M.A, Obika S, Long Term Effect of Bridged Nucleic Acid(BNA)-Based Antisense Targeting PCSK9 on Metabolism and Inflammation, 82<sup>nd</sup> European Atherosclerosis Society, ポスター発表, 2014年5月31日～6月3日, Madrid Spain
- 5) Hori M, Yuasa Y, Makino H, Komai H, Yanagi K, Koezuka R, Tamanaha T, Kishimoto I, Hattori H, Harada-Shiba M, Plasma Mature and Furin-Cleaved PCSK9S are Removed by LDL Apheresis Treatment with Both LDL Adsorption and Double Membrane Filtration, 82<sup>nd</sup> European Atherosclerosis Society, ポスター発表, 2014年5月31日～6月3日, Madrid Spain
- 6) Harada-Shiba M, Efficacy of Evolocumab(AMG145) in Patients with PCSK9 Gain-of-Function Mutations, 82<sup>nd</sup> European Atherosclerosis Society, Clinical and Late Breaking Session 1, 2014年5月31日～6月3日, Madrid Spain  
(国内学会)
- 1) 堀美香, 駒井仁美, 水野敏秀, 斯波真理子, ApoE/NMU 二重欠損マウスにおける血清脂質の上昇と肝臓におけるマクロファージ数の低下, 第37回日本分子生物学会年会, ポスター発表, 2014年11月25日～27日, 横浜
- 2) 和田郁人, 山本剛史, 斯波真理子, 小比賀聡, フィブラート系薬剤との比較によるアンチセンス Apolipoprotein C-III阻害剤の脂質低下効果の評価, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014, ポスター発表, 2014年9月8日～9日, 東京
- 3) 和田俊輔, 石井健, 小比賀聡, 斯波真理子, コレステロール修飾型 siRNA の肝臓における免疫惹起性の増大, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014, ポスター発表, 2014年9月8日～9日, 東京
- 4) 山本剛史, 藤井奈緒子, 安原秀典, 斯波真理子, 小比賀聡, アンチセ

- ンス核酸の mRNA 切断反応における効率的回転に関する検討, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014, シンポジウム 3, 2014 年 9 月 8 日～9 日, 東京
- 5) 斯波真理子, 脂質異常症に対するアンチセンス医薬の開発, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014, シンポジウム 1, 2014 年 9 月 8 日～9 日, 東京
- 6) 和田俊輔, 石井健, 小比賀聡, 斯波真理子, コレステロール修飾型 siRNA の肝臓における免疫惹起促進の機序について, 遺伝子・デリバリー研究会 第 14 回夏期セミナー, 2014 年 8 月 20 日～21 日, 一般発表, 熊本
- 7) 和田郁人, 山本剛史, 小比賀聡, 斯波真理子, コレステロール修飾型アンチセンス核酸の薬理効果及び、体内分布解析, 遺伝子・デリバリー研究会 第 14 回夏期セミナー, 2014 年 8 月 20 日～21 日, 一般発表, 熊本
- 8) 柴田映子, 柴田雅朗, 斯波真理子, 動脈硬化の治療実験モデルとして ApoE-KO マウスを用いるための基礎的解析, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日～11 日, 東京
- 9) Wada F, Yamamoto T, Obika S, Harada-Shiba M, Effects of Selective Down-regulation of Apolipoprotein C-III by Antisense Oligonucleotides, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日～11 日, 東京
- 10) Harada-Shiba M, Sumeray M, Rationale and design of a phase 3 study evaluating the efficacy and safety of lomitapide in Japanese patients with homozygous familial hypercholesterolemia(HoFH), 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日～11 日, 東京
- 11) Ohta N, Hori M, Fujiwara A, Fujiyama H, Sano M, Tamanaha T, Makino H, Kishimoto I, Miyamoto Y, Harada-Shiba M, Characteristics of heterozygous familial hypercholesterolemia with mutations in between LDLR, PCSK9 and LDLRAP1 gene, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日～11 日, 東京
- 12) 小倉正恒, 榎野久士, 玉那覇民子, 肥後諒, 菱田藍, 長谷川夕希子, 岸本一郎, 斯波真理子, 冠動脈三枝病変を合併した家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体高齢初産の 1 例, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日～11 日, 東京
- 13) 石原光昭, 鯨岡健, 岩崎忠雄, 小

- 川一行, 服部浩明, 堀美香, 斯波真理子, Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9(PCSK9)非ヘテロダイマー型 mature segment 分子の LDL 受容体分解活性, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日~11 日, 東京
- 14) 鯨岡健, 石原光昭, 岩崎忠雄, 小川一行, 服部浩明, 堀美香, 斯波真理子, ヒト血中における PCSK9 の分子形態の解析, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日~11 日, 東京
- 15) 長谷川夕希子, 堀美香, 中神朋子, 斯波真理子, 内瀉安子, GLP-1 のコレステロール代謝に及ぼす影響, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日~11 日, 東京
- 16) 道倉雅仁, 小倉正恒, 富家千鶴, 肥後諒, 菱田藍, 椽谷真由, 大畑洋子, 玉那覇民子, 槇野久士, 柴田映子, 堀美香, 岸本一郎, 斯波真理子, 超音波で測定したアキレス腱厚と頸動脈内膜中膜複合体厚の関連, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日~11 日, 東京
- 17) Ogura M, Harada-Shiba M, Renal cysts as an emergent risk factor for arterial stiffness, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日~11 日, 東京
- 18) Hori M, Yuasa Y, Makino H, Komai H, Yanagi K, Koezuka R, Tamanaha T, Kishimoto I, Hattori H, Harada-Shiba M, LDL apheresis treatment by both LDL adsorption and double membrane filtration reduces plasma levels of mature and furin-cleaved PCSK9s, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日~11 日, 東京
- 19) Wada S, Yasuhara H, Wada F, Yamamoto T, Obika S, Harada-Shiba M, Conjugation approach toward anti-PCSK9 antisense oligonucleotide agent for getting further inhibitory effects, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日~11 日, 東京
- 20) 斯波真理子, 荒井秀典, 山下静也, 石橋俊, 我が国における家族性高コレステロール血症ホモ接合体の実体調査, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, シンポジウム 5, 2014 年 7 月 10 日~11 日, 東京
- 21) 長谷川夕希子, 堀美香, 中神朋子, 斯波真理子, 内瀉安子, 肝細胞における GLP-1 のコレステロール代謝に及ぼす影響, 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会, 口演, 2014

年 5 月 22 日～24 日, 大阪

表 1. 候補化合物投与 7 日後の血液生化学値

	ALT (U/L)		AST (U/L)		BUN(mg/dL)	
	10 mg/kg	50 mg/kg	10 mg/kg	50 mg/kg	10 mg/kg	50 mg/kg
Saline	18 ± 3.9		38 ± 3.1		32 ± 4.4	
HsPCSK9-1091-AM(14)	27 ± 6.6	62 ± 26.8	47 ± 13.5	77 ± 13.7	32 ± 2.4	31 ± 4.3
HsPCSK9-1131-AM(14)	19 ± 2.0	22 ± 5.9	40 ± 3.1	49 ± 4.4	32 ± 4.9	28 ± 1.3
HsPCSK9-1771-AM(14)	281 ± 55.1	1325	123 ± 11.5	1595	27 ± 0.6	39

表 2. BLAST による候補化合物と相同的なマウス遺伝子の検索結果

ASO ID	Number of mismatch sequence	Gene name		
HsPCSK9-1091-AM(14)	0	Mus musculus myc-like oncogene, s-myc protein (Mycs), mRNA Mus musculus desmocollin 2 (Dsc2), transcript variant X1, mRNA		
	1	Mus musculus breast carcinoma amplified sequence 1 (Bcas1), mRNA Mus musculus breast carcinoma amplified sequence 1 (Bcas1), mRNA Mus musculus predicted gene 10768 (Gm10768), long non-coding RNA Mus musculus desmocollin 2 (Dsc2), mRNA		
		HsPCSK9-1131-AM(14)	Mus musculus zinc finger and SCAN domain containing protein 4F-like (LOC100862415), mRNA Mus musculus RIKEN cDNA A630007B06 gene (A630007B06Rik), mRNA Mus musculus family with sequence similarity 210, member A (Fam210a), mRNA Mus musculus carboxypeptidase N, polypeptide 2 (Cpn2), mRNA Mus musculus ataxia telangiectasia and Rad3 related (Atr), mRNA Mus musculus dihydropyrimidinase-like 5 (Dpysl5), mRNA Mus musculus spastic paraplegia 11 (Spg11), misc_RNA Mus musculus WD repeat domain 77 (Wdr77), mRNA	
			0	Mus musculus nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 2 (Nfatc2), mRNA Mus musculus ADP-ribosylation factor-like 4C (Arl4c), mRNA
			1	Mus musculus family with sequence similarity 172, member A (Fam172a), transcript variant X8, mRNA Mus musculus vaccinia related kinase 1 (Vrk1), transcript variant X10, mRNA Mus musculus oxysterol binding protein-like 5 (Osbp15), transcript variant X3, mRNA

表 3. BLAST による候補化合物と相同的なマウス遺伝子の検索結果

ASO ID	Number of mismatch sequence	Gene name	
HsPCSK9-1091-AM(14)	0	Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), mRNA Homo sapiens ring finger protein 40, E3 ubiquitin protein ligase (RNF40), mRNA Homo sapiens protein tyrosine kinase 7 (PTK7), mRNA	
	1	Homo sapiens uncharacterized LOC102723370 (LOC102723370), ncRNA Homo sapiens calpain 1, (mu/l) large subunit (CAPN1), transcript variant X1, mRNA Homo sapiens GTF2L repeat domain containing 1 (GTF2IRD1), transcript variant X1, mRNA Homo sapiens sirtuin 3 (SIRT3), transcript variant X1, mRNA	
		HsPCSK9-1131-AM(14)	0
	1		Homo sapiens meiosis 1 associated protein (M1AP), mRNA Homo sapiens zinc finger, AN1-type domain 1 (ZFAND1), non-coding RNA Homo sapiens transmembrane protein 109 (TMEM109), mRNA
HsPCSK9-1771-AM(14)			0
	1	Homo sapiens mab-21-like 3 (C. elegans) (MAB21L3), mRNA Homo sapiens TMEM9 domain family, member B (TMEM9B), mRNA Homo sapiens Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2 (RASGRF2), mRNA Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1, beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA Homo sapiens valyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (VARS2), transcript variant 1, mRNA Homo sapiens CD180 molecule (CD180), mRNA	

表 4. 候補化合物の IC<sub>50</sub> と ALT 値の積

	ALT (U/L)		IC <sub>50</sub> (nM)	ALT (50mg/kg)* IC <sub>50</sub>
	10 mg/kg	50 mg/kg		
Saline	18 ± 3.9			
HsPCSK9-1091-AM(14)	27 ± 6.6	62 ± 26.8	7.7	479.8
HsPCSK9-1131-AM(14)	19 ± 2.0	22 ± 5.9	8.0	176.8
HsPCSK9-1771-AM(14)	281 ± 55.1	1325	6.2	8170.2

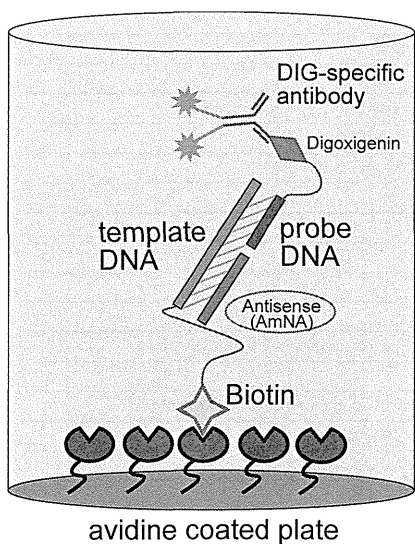


図 2. HELISA 法概要図

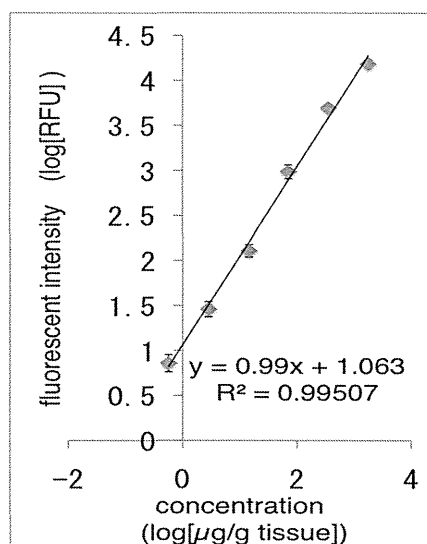


図 1. HELISA 法の検量線

表 5. HELISA 法検討用各種 DNA

Sequence ID	Sequence	Length (mer)
P20B	GggCTCatagcaCaTTaTCc	20
template P20B	Gaatagcgaggataatgtctatgagccc	29
AB20B	TTCAGcattggtattCAGTG	20
AB16B	CAGcattggtatTCAG	16
AB10B	CattggtatT	10
template AB16	Gaatagcgactgaataccaatgctg	25
probe DNA	Tcgctattc	9

Upper case: 2',4'-BNA, Lower case: DNA, P: リン酸化, DIG: ジゴキシゲニン, BIOTIN: ビオチン



表 6. HELISA 法の真度と精度について

	ULQC	HQC	MQC1	MQC2	LQC	LLQC
理論値 ( $\mu\text{g/g}$ protein)	1770	354	70.8	14.2	2.83	0.566
	1410	536	110	12.5	2.44	0.698
	1320	483	118	13.5	2.81	0.408
	1310	484	81.7	11.8	2.47	0.771
実測濃度 ( $\mu\text{g/g}$ protein)	1380	402	104	9.81	2.7	0.801
	1560	483	91.9	8.72	3.4	0.641
	1410	420	82.2	6.87	1.77	0.654
	1350	437	116	12.6	2.34	0.577
	1750	489	68	12.7	3.05	0.413
平均値 ( $\mu\text{g/g}$ protein)	1430	467	96.5	11.1	2.62	0.62
標準偏差 ( $\mu\text{g/g}$ protein)	149	43.9	18.2	2.34	0.492	0.148
真度 (%)	80.2	128	126	82.1	92.5	115
精度 (%)	6.91	8.93	14.1	16.8	14.8	11.1

表 7. 開発候補[ HsPCSK9-1131-AM(14)]検出用 DNA

	Sequence (5'→3')
HsPCSK9-1131-AM(14)	GTgacacaagCAg
Template DNA	gaatagcgactgttctgtcac-BIOTIN
Probe DNA	P-tcgctattc-DIG

Upper case: AmNA, Lower case: DNA, P: リン酸化, DIG; ジゴキシゲン, BIOTIN: ビオチン

## 医薬品戦略相談対面助言資料

家族性高コレステロール血症(FH)ヘテロ接合体を対象疾患とした  
抗 PCSK9 アンチセンス核酸のヒト初回投与試験のためのパッケージについて

受付番号：戦 P162

被験薬の成分記号：HsPCSK9-1131AM(14)

成分名（化学名）：2'-Deoxy-2'-N-methylamino-2'-N,4'-C-oxomethylene-P-thioguanlyl-  
(3'-O→5'-O)-2'-N-methylamino-2'-N,4'-C-oxomethylene-  
P-thiothymidylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioguanlyl-  
(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioadenylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-  
thiocytidylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioadenylyl-(3'-O→5'-O)-  
2'-deoxy-P-thiocytidylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioadenylyl-(3'-  
O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioadenylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioadenylyl-  
(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioguanlyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-  
2'-N-methylamino-2'-N,4'-C-oxomethylene-5-methyl-P-thiocytidylyl-  
(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-2'-N-methylamino-2'-N,4'-C-oxomethylene-  
P-thioadenylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioguanine.

相談の区分： 医薬品戦略相談(別に定める要件を満たす大学・研究機関，ベンチャー  
企業)

対面助言実施日： 2015年3月12日

国立循環器病研究センター研究所

斯波 真理子

1. 背景	3
2. 想定する臨床試験	3
2.1 目標とする Phase II a 試験	4
2.2 Phase I 試験の戦略概要	4
3. HsPCSK9-I131AM(14)について	5
3.1 構造, 分子量, 名称及び物理学的性質	5
3.2 発見の経緯 (スクリーニング)	5
3.3 相同性	5
4. ヒト初回投与に向けた試験計画	5
4.1 品質	5
4.2 薬効試験	7
4.3 毒性試験及び安全性薬理試験	7
4.3.1 遺伝毒性試験 (別添 2, 3 参照)	8
4.3.2 一般毒性試験及び安全性薬理試験 (別添 4, 5 参照)	8
4.4 ADME 試験	9
別表 1 開発スケジュール表	10
別添 1 ホモロジー比較の結果概要	11
別添 2 Ames 試験計画書草案	20
別添 3 染色体異常試験計画書草案	35
別添 4 ラット 3 ヶ月間投与毒性試験計画書草案	53
別添 5 サル 3 ヶ月間投与毒性試験計画書草案	76

# 1. 背景

家族性高コレステロール血症 (FH) は高 LDL-C 血症, 皮膚および腱黄色腫, 若年性動脈硬化症による冠動脈疾患を主徴とする遺伝病であり, ヘテロ接合体は500人に1人以上の高頻度で認める. 現在, FH 患者には, 冠動脈疾患 (CAD) 予防のために, スタチン等の脂質低下薬が処方されているが, 目標 LDL-C 値に達する例は少なく, 薬剤効果が十分ではないが故に, 重度の高コレステロール血症では CAD イベントを何度も引き起こす例が少なくない. この原因として, スタチンがコレステロール合成を阻害する一方で, SREBP2 を活性化することにより, PCSK9 を介したフィードバック経路を活性化し, 血中の LDL-C の上昇を招くと考えられている (図1, 2).

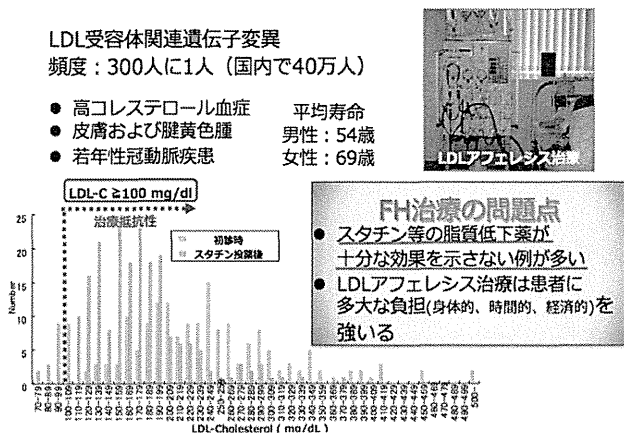


図1 FHとその治療の問題点

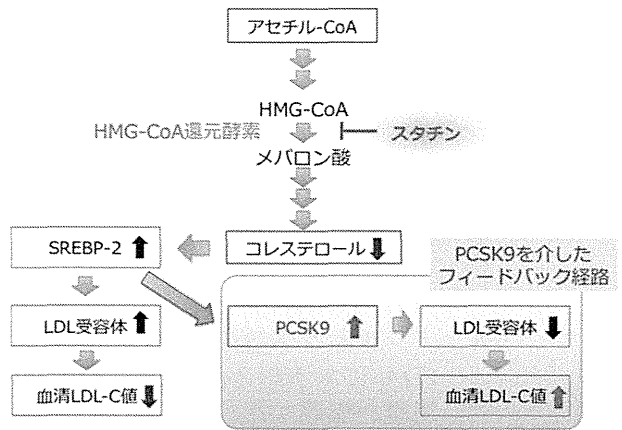


図2 スタチンの作用メカニズム

また PCSK9 は, 高コレステロール血症の家系から連鎖解析により機能が判明したタンパク質であり, LDL 受容体を分解する活性を持っている. この PCSK9 の機能を上昇させる変異では高 LDL-C 血症を示す. 逆に, 機能低下変異では低 LDL-C 血症を示し, CAD のリスクが 88%低いことが知られている. しかしながら, PCSK9 の活性部位が覆われた形で存在するため, 低分子阻害薬で阻害することが困難であり従来型の低分子創薬を困難にしている. そのため, 現在は抗体医薬や核酸医薬による新規な阻害薬の開発が期待されている.

核酸医薬の開発ではしばしば, 細胞内への移行性や生体内の安定性が課題となる. 細胞内移行性では, アンチセンス核酸の場合, DDS 技術の様な細胞内移行性を向上させる様な技術を使うことなく有効性を見出すことが可能である. 一方, 安定性に関しては, これまでに幾つかの化学修飾が施された人工核酸を構成成分に用いる試みがなされており, それぞれに一定の成果を挙げているが, 我々は, 核酸医薬の機能をさらに向上させる人工核酸の開発に成功している (図3).

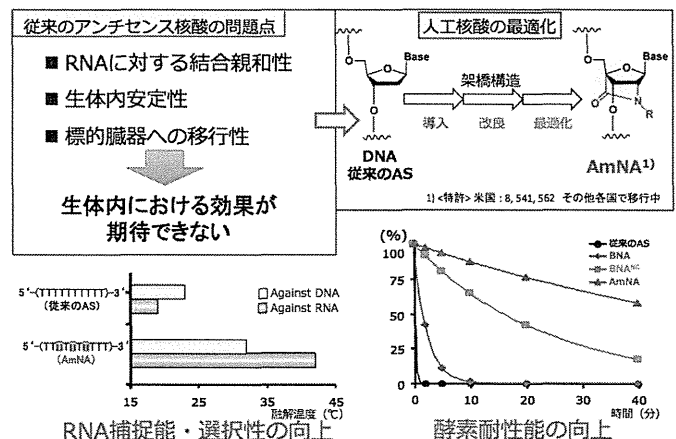


図3 人工核酸AmNAの開発

こういった背景から我々は, FH を対象疾患として, 新規に見いだした人工核酸 AmNA を構成成分に有する核酸医薬の臨床応用を目標に, PCSK9 の mRNA をターゲットとしたアンチセンス核酸の開発をおこなってきた. 現在, 臨床試験の開始に向けて, 非臨床安全性評価, 製造方法及び品質管理方法について検討をおこなっている.

# 2. 想定する臨床試験

現段階で想定している第2相臨床試験前期 (Phase IIa) の概要を 2.1 節に, その試験の実施を目標として計画している第1相臨床試験の実施戦略の概要を 2.2 節にまとめた.

## 2.1 目標とする Phase II a 試験

第2相臨床試験前期（Phase IIa）における適用疾患や用量用法等、想定している内容を表1にまとめた。

表1 Phase II a 試験概要

適用疾患 <sup>※1</sup>	家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体
対象患者 <sup>※2</sup>	従来脂質低下薬にて LDL-C 値が 100 mg/dL に低下していない上記疾患患者
投与方法 <sup>※3</sup>	皮下注射
投与量（目標量） <sup>※4</sup>	カニクイザルを用いた薬効試験より算出する （現在、200mg 投与を予想している）
投与期間及び頻度 <sup>※5</sup>	3ヶ月間、隔週投与（Phase IIa を想定）
剤型 <sup>※6</sup>	用時溶解型注射製剤を予定（リポソーム等の DDS 技術は使用しない）
添加物等 <sup>※7</sup>	一般的に使用される pH 調整剤、浸透圧調整剤等

※1：前述 1. 背景参照

※2：※1に同じ

※3：アンチセンス核酸において一般的に使用されている方法であることから本投与方法を選択している。

※4：アンチセンス核酸を有効成分に家族性高コレステロール血症ホモ接合体を適用疾患として、FDA にて承認されている Kynamoro®（Mipomersen）の場合と比較して、現在想定している用量を記載した。実際には、ヒト初回投与試験の実施までに、カニクイザルを用いた薬効試験を実施し、その結果からヒトにおける用量を算出する。

※5：マウスによるモデル実験及び Kynamoro®を用いた研究の文献情報等を基に、目標として設定している。実際に臨床試験を実施するにあたっては、適切な投与期間や頻度の設定等、柔軟に対応出来る状況にしたい。ただし、初期の臨床試験における投与期間は3ヶ月、投与頻度は多くても1回/週を超えることのない様にしたいと考えている。

※6：現在検討中であるが、臨床試験の初期においては、用時溶解型として試験の実施を想定しており、臨床試験中に剤型の変更もありうる。その際には、一貫性を担保する試験を実施した後、臨床試験へ供給する。

※7：現在検討中

## 2.2 Phase I 試験の戦略概要

ヒト初回投与試験として考えている試験の概要を表2にまとめた。その他、詳細については試験開始前の段階で決定する。

表2 Phase I 試験骨子

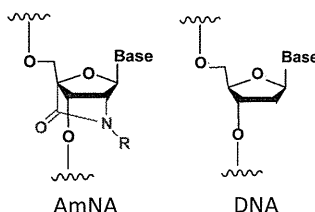
対象	健康成人
投与方法	皮下注射
投与量	非臨床安全性試験や薬効試験の結果に基づき、認められた毒性症状の種類や重篤度等を勘案し、NOAEL 又は LOEL 等のパラメータを用いて、十分な安全域を得られるであろうと考えられる用量を初回の用量と設定する。
コホート	5~6（1用量/cohort）
投与回数	単回投与
期間	2週間/cohort
検査及び頻度	問診：毎日2回程度、血液検査：投与当日、投与後3、7、14日、尿検査（新鮮尿）：投与当日、投与後3、7、14日、尿量（蓄尿）：投与後0-1日、1~3日、3~7日、7~14日
動態的検査	血中濃度：投与前、投与後0.5、1、2、4、8、24、72、168時間 尿中薬物濃度（蓄尿）：投与後0-1日、1~3日、3~7日、7~14日
剤形	用時溶解型注射製剤を予定

また、ヒト初回投与試験を単回投与試験として実施した後、反復投与による Phase I を実施していくことを計画しているが、反復投与試験は、最大投与頻度は 1 回/週、最長期間として 3 ヶ月間を想定しているが、今後の非臨床試験の結果やヒト初回投与試験の結果を反映して、投与量のみならず、投与頻度、投与期間さらには検査項目等の詳細を決定する。

### 3. HsPCSK9-1131AM(14)について

#### 3.1 構造、分子量、名称及び物理学的性質

配列：GTgacacaaagCAG （大文字：AmNA，小文字：DNA，リンケージ：ホスホロチオアート）



化学名：2'-Deoxy-2'-N-methylamino-2'-N,4'-C-oxomethylene-P-thioguanylyl-(3'-O→5'-O)-2'-N-methylamino-2'-N,4'-C-oxomethylene-P-thiothymidylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioguanylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioadenylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thiocytidylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioadenylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thiocytidylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioadenylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioadenylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioadenylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioguanylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-2'-N-methylamino-2'-N,4'-C-oxomethylene-5-methyl-P-thiocytidylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-2'-N-methylamino-2'-N,4'-C-oxomethylene-P-thioadenylyl-(3'-O→5'-O)-2'-deoxy-P-thioguanine.

分子量：

分子式：

#### 3.2 発見の経緯（スクリーニング）

ヒト PCSK9 mRNA を標的とする人工核酸 AmNA を有するアンチセンスを合成し、ヒト肝癌由来由来細胞株 Huh-7 細胞をもちいた *in vitro* スクリーニングにより、活性の高かった数種を選択した。

次いで、マウスを用いて選択したアンチセンスの急性毒性スクリーニング（皮下投与試験）を実施した。これら二つのスクリーニング結果をもちいて、*in vitro* における薬効域と *in vivo* の毒性発現量の差（セーフティマージン）を主たる指標として候補化合物の優先順位付けをおこなった。

#### 3.3 相同性

標的としたヒト PCSK9 と各種動物種との相同性について検索をしている。検索の方法及び結果の概要を別添 1 にまとめた。なお検索は、ヒト、マウス、ラット、カニクイザル他計 12 種を対象におこなった。

### 4. ヒト初回投与に向けた試験計画

ヒト初回投与試験までに実施を計画している試験とその実施スケジュールを別表 1 にまとめた。以下に各項目において得られている情報及び今後実施する試験計画の概要をまとめた。

#### 4.1 品質

試験期間の短縮のため、原薬の製造法検討と非臨床安全性試験の実施を同時並行的に実施するこ

とを計画している。従って、薬効確認試験及び毒性試験や安全性薬理試験の予備試験に用いる被験物質は、分析データを取得した上で製造法の検討中に得られるサンプルを被験物質として用いる可能性がある。このような製造方法の検討データ及び得られる分析データに基づき、GLP 安全性試験に供するための暫定的な製造方法及び暫定規格を設定することを計画している。

ここで注意すべき点として、製造法の検討中においては純度や収量の向上のために反応条件等の改良が行なわれるが、改良前の製造方法で得られたサンプルでは認められなかった新たな不純物等が生じる場合など、品質の一貫性を損なう変更は行わないことである。すなわち、製造法を改良する場合には、目的とする化合物以外の不純物の含量や種類が減少する様に行う（図4）。

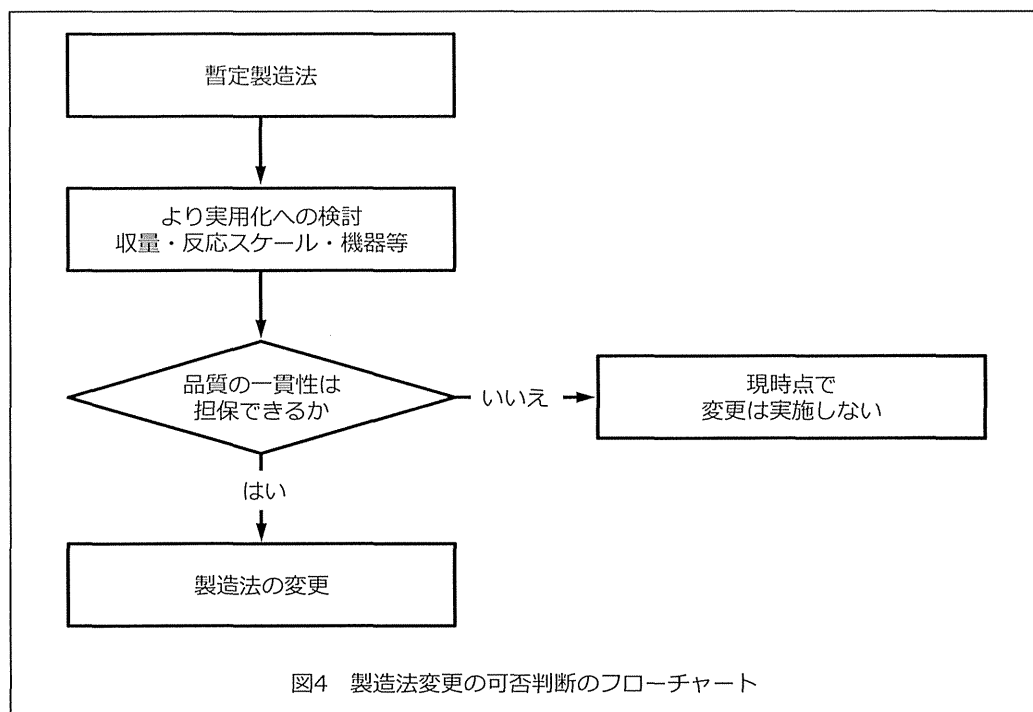
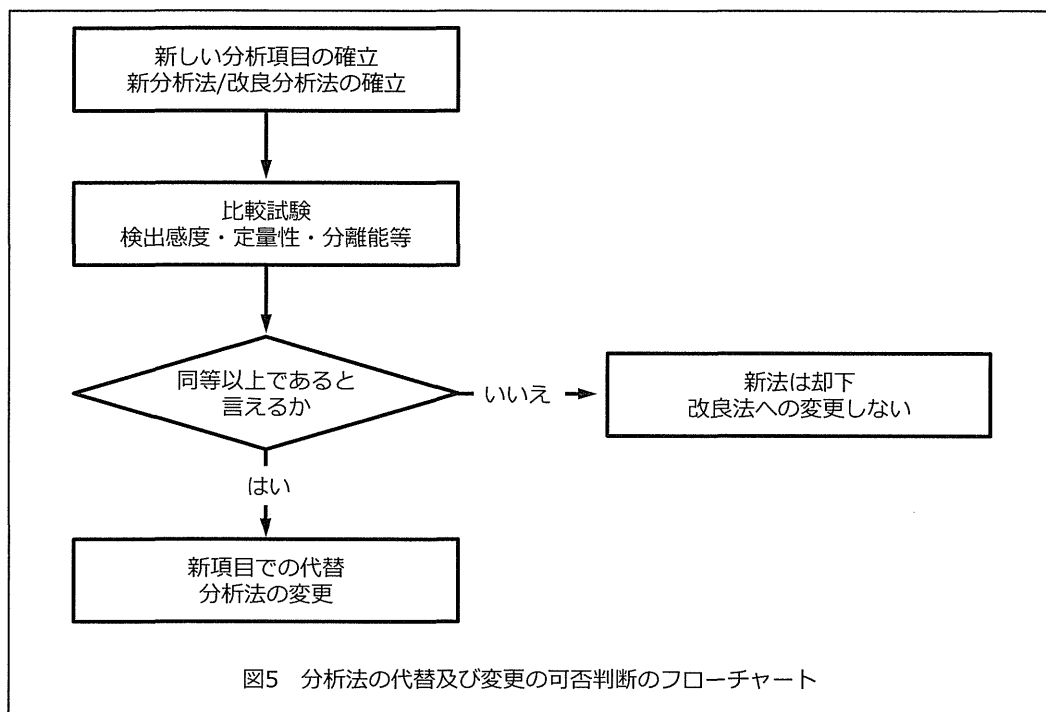


図4 製造法変更の可否判断のフローチャート

非臨床安全性試験に用いる原薬の各ロットについては、品質データの比較が可能となるように可能な限り一貫して同じ分析項目及び分析法にて分析を実施することを計画している。ただし、より良く品質を管理する観点から新たな分析項目を加えたり、分析方法を変更したりする可能性がある。その際には、それまでに設定していた項目は省略しないことを原則とするが、新たな試験方法から得られるデータを用いることにより、それまで設定していた分析項目や試験の代替が可能であると判断できる場合にのみ、従来の分析項目の省略又は分析方法の変更を行う。開発を進めていく上で、分析法を改良する場合に新規の分析法による分析を行うことが可能となるように、非臨床安全性試験に用いる原薬については、GLPに定めるところとは別に、一部を適切な条件で保存することを計画している。（図5）。



非臨床安全性試験に供する原薬について、現時点では少なくとも表3に示した特性試験を実施することを計画している。

表3.試験項目一覧

試験項目	原理
性状	目視
確認試験	LC-MS
純度・不純物プロファイル	LC-MS
純度・不純物プロファイル	イオン交換 HPLC
ナトリウム含量	未定

なお、臨床試験に用いる治験原薬の暫定規格を設定するにあたっては、それまでに得られている全ての分析結果及び非臨床試験成績等を総合的に解析し設定する予定であるが、今後具体的なデータが蓄積された段階で必要に応じて相談したいと考えている。

#### 4.2 薬効試験

カニクイザルを用いて薬効確認試験を実施する。試験計画の概要は以下の通りである。

##### 動物の選別

検疫済みのカニクイザル雌雄計 28 匹を入手し、7 日間の馴化期間終了日にトリグリセリド或は LDL コレステロールの高い動物を 6 匹選別する。

##### 投与量及び試験構成群

投与は、最初に 1mg/kg を投与し、一般状態観察、血液生化学検査の結果等から薬効或は毒性症状を判断し、2 回目の投与量を決定する。

投与	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数 (動物番号)
1 回目	1	2	0.5	6 (1~6)
2 回目	1 回目投与後の検査結果から決定する			
3 回目	1 回目及び 2 回目投与後の検査結果から決定する			



### 投与回数、及び投与の間隔

投与は単回投与として行い、次の用量の投与までの間隔は1週間とする。

### 投与方法

静脈内投与 (Bolus, 約 10mL/min.)

### 観察及び検査

一般状態, 体重, 摂餌量, 血液生化学 (AST, ALT, 総コレステロール, トリグリセリド, LDL コレステロール, PCSK9)

## 4.3 毒性試験及び安全性薬理試験

ICH ガイドライン M3(R2)等のガイドラインを参照し、ヒト初回投与試験の実施までに実施する試験として、次の試験を実施することを計画した。

### ① 遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験)

染色体異常試験

(小核試験)

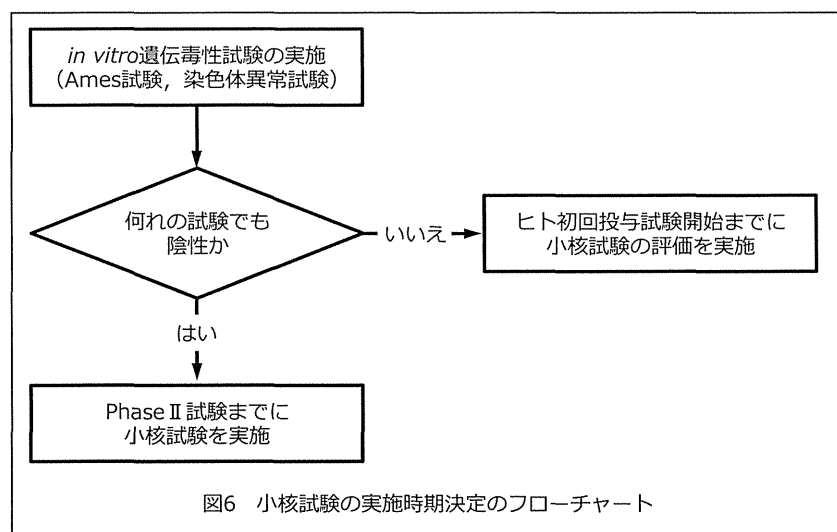
### ② 一般毒性試験

1ヶ月間反復投与予備毒性試験 (用量設定試験)

3ヶ月間反復投与毒性試験

### 4.3.1 遺伝毒性試験 (別添 2, 3 参照)

遺伝毒性試験は、ICH ガイドライン S2 に記載された標準的組み合わせにおけるオプション 1 に従ってヒト初回投与試験の開始までに Ames 試験及び染色体異常試験を実施するものとし、いずれかの試験において、陽性或は陽性が疑われる結果となった場合には、ヒト初回投与試験の開始までに小核試験を実施する。



### 4.3.2 一般毒性試験及び安全性薬理試験 (別添 4, 5 参照)

#### 検査及び観察項目の構成について

1ヶ月間反復投与予備毒性試験 (非 GLP、用量設定試験) と 3ヶ月間反復投与毒性試験の立案に当たり、動物愛護の観点も考慮し、安全性薬理試験のコアバッテリー (中枢系: Irwin, 呼吸器系: 血液ガス及び呼吸数, 心・血管系: ホルター心電図) として実施される項目も組み込んだ計画とした (図 7)。なお、計画している一般毒性試験については、試験計画を添付した (別添 4, 5)。

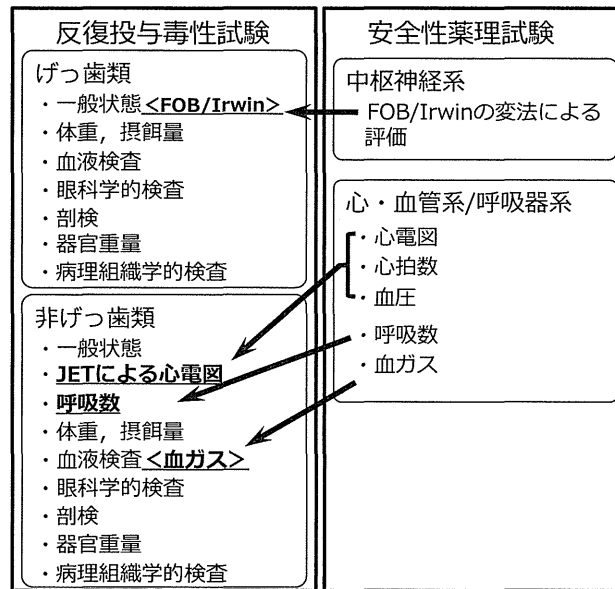


図7 一般毒性試験の計画概要図

### 投与量及び群設定について

これまでの核酸医薬における毒性試験を参考に考えたとき、MTD を含める様に用量設定をおこなった場合、臨床における安全性を予測するために必要な用量以上の高用量になること（限界量以上の投与が必要になること）が予想された。そこで、用量設定試験では、被験物質投与時の症状を観察するとともに、臨床における曝露量の50倍に達する投与量における状態を観察することで、反復投与毒性試験の用量設定を行うことを目的とする計画を立案した。

3ヶ月間反復投与毒性試験では、用量設定試験の高用量群において毒性症状が認められない場合を想定した計画としているため、高用量群に予備毒性試験の結果から臨床における曝露量の50倍に達する用量を高用量群として設定し、動物愛護の観点も加味して2用量群としている。

### 動物種選択について

#### <非げっ歯類>

被験物質の塩基配列はヒト型であるが、カニクイザルの配列と一致しているため、オンターゲット効果による影響については、上述の通りカニクイザルを用いることで評価することが可能であることから、非げっ歯類にはカニクイザルを選択する。

#### <げっ歯類>

げっ歯類においては、マウス及びラット共にヒトの塩基配列とは異なっているため、本被験物質を用いたオンターゲット効果による影響を評価は不可能である。また、投与経路は皮下投与を予定しており、この場合、反復投与試験においてマウスを使用するには動物の大きさによる限界があることから、げっ歯類にはラットを選択する。

なお、ラットのほうがマウスを選択した場合よりも、使用する動物数を削減できることも考慮している。

## 4.4 ADME 試験

ICH ガイドライン M3(R2)に準拠し、ヒト初回投与試験の開始までに次の試験を完了することを計画している。

- ・ *in vitro* タンパク結合
- ・ *in vitro* 代謝試験

また、別表1に示した様に、臨床第II相試験の開始までに、非臨床動態試験を実施することを計画している。なお、試験項目については、臨床第I相試験で実施する動態学的検査（例えば、血中動態、排泄に係る検査、排泄物中の代謝物分解物に関する検査など）の結果を考慮しつつ決定する。

## 開発スケジュール表

			H26	H27	H28	H29	H30	H31
検討	毒性検討試験	マウス						
薬効	薬効試験	サル						
遺伝毒	Ames試験							
	染色体異常試験							
	小核試験※1	ラット						
一般毒	予備毒性試験	ラット						
		サル						
	反復投与毒性試験※2	ラット						
		サル						
その他毒性※3								
TK	TKバリデーション	ラット						
		サル						
ADME	<i>in vitro</i> 血漿タンパク結合							
	<i>in vitro</i> 代謝試験							
	吸収							
	組織分布							
	排泄							
品質	製造法検討							
	治験用製剤検討							
	試験法の開発とバリデーション	原薬						
		製剤						
安定性確認	原薬							
	製剤							
臨床試験申請時期								
ライセンシング（共同開発を含む）※4								

※1：予備検討的に反復投与試験において評価をおこない、フェーズIIまでに本試験を実施

※2：臨床試験の投与期間及び対象患者層等により追加

※3：フェーズII試験のデザインにより判断

※4：随時実施

: 追加実施の場合  
 : フェーズII開始までに実施  
 : 継続的に実施

(別添 1)

## ホモロジー比較の結果概要

抗ヒト PCSK9 アンチセンスとして開発する 3 つの候補についてホモロジー比較をおこなった。方法、配列及び結果は以下の通り。

方法：

NCBI/BLAST<sup>®</sup>を用いた

([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome))

配列：

- ・ HsPCSK9-1771-AM(14): CTggcctcctGTg 赤で示した領域
  - ・ HsPCSK9-1091-AM(14): GAtgcctcccCTg 緑で示した領域
  - ・ HsPCSK9-1131-AM(14): GTgacacaaagCAg 黄色で示した領域
- 大文字: AmNA, 小文字: DNA, 全 S 化

動物種：

ヒト, カニクイザル, チンパンジー, アカゲザル, マウス, ラット, 赤色野鶏, ゼブラフィッシュ, 出芽酵母, 分裂酵母, アフリカツメガエル, ブタ

検索結果

配列の一致が見られた領域を, それぞれのオリゴ核酸について, HsPCSK9-1771-AM(14)は赤で, HsPCSK9-1091-AM(14)は緑で, HsPCSK9-1131-AM(14)は, 黄色で示した。

ヒト

>gi|299523249|ref|NM\_174936.3| Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), transcript variant 1, mRNA (ヒト)

```
GTCCGATGGGGTCTTGGTGGCGTGATCTGCGCGCCCGAGGCGTCAAGCACCCACACCCTAGAAGGTTTCCGCAGCGAC
GTCGAGGCGCTCATGGTTGCAGGCGGGCGCCCGCTTTCAGTTCAGGGTCTGAGCCTGGAGGAGTGAGCCAGGCAGTGA
GACTGGCTCGGGCGGGCCGGGACGCGTCGTTGCAGCAGCGGCTCCAGCTCCCAGCCAGGATCCCGCGCGCCCTTCA
CGCGCCCTGCTCCTGAACTTCAGCTCCTGCACAGTCTCCCCACCGCAAGGCTCAAGGCGCCCGCGGTGGACCGCG
CACGGCCTCTAGGTCTCCTCGCAGGACAGCAACCTTCCCTGGCCCTCATGGGCACCGTCAGCTCCAGGCGGTCTCT
GGTGGCCGCTGCCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTCCTGGGTCCCGCGGGCGCCCGTGGCAGGAGGACGAGGACG
GGACTACGAGGAGCTGGTGTAGCCTTGGCTTCCGAGGAGGACGGCCTGGCCGAAGCACCCGAGCACGGAACACAG
CCACCTTCCACCGCTGCGCAAGGATCCGTGGAGGTTGCCACCTACGTGGTGGTGTGAAGGAGGAGACCCACC
TCTCGCAGTCAAGGCGACTGCCCGCGCCGCTGCAGGCCAGGCTGCCCGCGGGGATACCTCACCAAGATCCTGCAATG
TCTTCCATGGCCTTCTTCTGGCTTCTGGTGAAGATGAGTGGCGACCTGCTGGAGCTGGCCTTGAAGTTGCCCATG
TCGACTACATCGAGGAGGACTCCTCTGTCTTTGCCAGAGCATCCCCTGGAACCTGGAGCGGATTACCCCTCCACGGT
ACCGGGCGGATGAATACAGCCCCCGACGGAGGCAGCCTGGTGGAGGTTATCTCCTAGACACCAGCATACAGAGTG
ACCACCGGAAATCGAGGGCAGGGTCATGGTCAACGACTTCGAGAATGTGCCCGAGGAGGACGGGACCCGCTTCCACA
GACAGGCCAGCAAGTGTGACAGTCAATGGCACCCACCTGGCAGGGGTGGTACGCGCGGGGATGCCGGCTGGCCAAG
GTGCCAGCATGCGCAGCCTGCGCGTCTCAACTGCCAAGGGAAGGGCACCGTTAGCGGCACCCCTCATAGCCTGGAGT
TTATTCGAAAAGCCAGCTGGTCCAGCCTGTGGGGCCACTGGTGGTGTGCTGCTGCCCTGGCGGGTGGGTACAGCCGG
TCCTCAACGCCGCTGCCAGCGCTGGCGAGGGCTGGGGTCTGTGCTGGTACCCGCTGCCGGCAACTTCCGGGACGATG
CCTGCCTCTACTCCCCAGCCTCAGCTCCCGAGGTCATCACAGTTGGGGCCACCAATGCCCAAGACCAGCCGGTGACCC
TGGGGACTTTGGGGACCAACTTTGGCCGCTGTGTGGACCTCTTTGCCCTAGCGCGAGGACATCATTTGGTGCCTCCAGCG
ACTGCAGCACCTGCTTTGTGTGTCACAGAGTGGGACATCACAGGCTGCTGCCACGTTGGCATTGGCAGCCATGATGC
TGTCTGCCGAGCCGGAGCTCACCTGGCCGAGTTGAGGCAGAGACTGATCCACTTCTCTGCCAAGATGTCATCAATG
AGGCCTGGTTCCTTGAGGACCAGCGGGTACTGACCCCCAACCTGGTGGCCGCCCTGCCCGCCAGCACCCATGGGGCAG
GTTGGCAGCTGTTTTGCAGGACTGTATGGTCAACACTCGGGCCCTACACGGATGGCCACAGCCGTCGCCCGCTGCG
CCCAGATGAGGAGCTGCTGAGCTGCTCCAGTTTCTCCAGGAGTGGGAAGCGGGCGGGGAGCGCATGGAGGCCAAG
GGGGCAAGCTGGTCTGCCGGGGCCACAACGCTTTTGGGGGTGAGGGTGTCTACGCCATTGCCAGGTGCTGCCTGCTAC
CCCAGGCCAATGCAGCGTCCACACAGCTCCACAGCTGAGGCCAGCATGGGGACCCGTGTCCACTGCCACCAACAGG
GCCACTCCTCACAGCTGCAGCTCCACTGGGAGGTTGAGGCAGAGACTTGGCACCCACAAGCCGCTGTGCTGAGCCAC
GAGGTGAGCCCAACAGTGCCTGGGCACAGGCGAGGCCAATCCACGCTTCTGCTGCCATGCCCCAGGTCTGGAAT
GCAAAGTCAAGGAGCATGGAATCCCGGCCCTCAGGAGCAGTTGACCGTGGCCTGCGAGGAGGGCTGGACCCTGACTG
GCTGCAGTGGCTTCCCTGGGACCTCCACGCTTGGGGGCTTACGCCGTAGACAACACGTTGTAGTCAAGGAGCCGGG
ACGTCAGCACTACAGGACGACCAGCGAAGGGGCGGTGACAGCCGTTGCCATCTGCTGCCGGAGCCGGCACCTGGCGC
```