

厚生労働科学研究委託費（医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・  
治験推進研究事業））  
委託業務成果報告（業務項目）

**PCSK9 をターゲットとした核酸医薬の薬事申請を目指した治験に  
橋渡しするための非臨床試験  
-臨床試験を開始するための非臨床安全性試験-**

担当責任者

小林直之 大阪大学大学院薬学研究科附属創薬センター・特任准教授

研究要旨

家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体（FH）の薬物療法に用いられているスタチンでは、プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシニン9型（PCSK9）によるフィードバック機構が働くことにより、血中のLDLコレステロール値を十分に低下させることが出来ない。そこで我々はこのPCSK9を創薬ターゲットとして、新規人工核酸「AmNA」を搭載した抗PCSK9アンチセンスを見出した。本研究では、この抗PCSK9アンチセンスの臨床試験に橋渡しするための非臨床安全性試験及びそれに伴う原薬の品質管理の実施を目的として、本年度は、それら試験の実施戦略を作成するとともに、各試験の試験計画を立案した。この試験戦略に沿って非臨床安全性試験を遂行していくことで、本研究の被験物質である抗PCSK9アンチセンスの臨床試験実施への道筋が示され、核酸医薬の臨床開発の実施例となることが示された。

なお、試験戦略を作成するにあたっては、独立行政法人医薬品医療機器総合機構がおこなう薬事戦略相談を受けてきている。

研究協力者

国立循環器病研究センター研究所

病態代謝部

和田 郁人

吉田 晶子

大阪大学大学院薬学研究科

小比賀 聡

橘 敬祐

山本 剛

#### A. 研究目的

現在家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体 (FH) においては、スタチンの投薬による治療が主流であるが、血中の LDL-コレステロール (LDL-C) を十分に下げることが出来ないケースが多い。このことは、スタチンの薬効が、コレステロールの生合成経路にあるメバロン酸経路に関与しているヒドロキシメチルグルタリル CoA (HMGCoA) 還元酵素を阻害することでコレステロール量を低下させる。しかしながら、肝臓内のコレステロール量の低下に伴い、LDL 受容体の分解に関与しているプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン 9 型 (PCSK9) が増加することで、コレステロール量が上昇するというフィードバック経路が同時に働くことがその要因の一つであると考えられている。

そこで我々は、この PCSK9 をターゲットとした核酸医薬による FH 治療薬の創薬研究を推進してきており、これまでに臨床開発候補化合物の絞り込みに成功している。

本研究では、絞り込まれた候補化合物によるヒト初回投与試験 (FIH) を可能とするための非臨床安全性試験の実施と評価を目的として、本年度は、品質管理戦略及び非臨床動態試験を含む非臨床安全性試験の実施戦略及び試験計画を立案するとともに、これまでに我々が開発した血中薬物濃度測定法を優良試験所規範 (GLP) に適合したトキシコキネティクス (TK) 測定法として利用するべく、バリデーション実施のための技術移転を目指した。

#### B. 研究方法

##### 1. 非臨床安全性試験全体の実施戦略

目標とする臨床の前期第 相試験 (P a) の試験デザインの概要を基に、FIH となる臨床第 相試験 (P ) の試験デザインを作成した。次いで、日米 EU 医薬品規制調和国際会議で合意されたガイドライン (ICH ガイドライン) 等を参照して、治験薬の品質管理、薬効確認試験、非臨床動態試験 (ADME) 並びに GLP 適合を必要とする安全性薬理試験、遺伝毒性試験及び一般毒性試験について、それぞれの試験デザインと実施スケジュールを策定した。なお、実施戦略の立案にあたっては、独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) が行っている薬事戦略相談を受けることとした。

##### 2. 品質管理戦略

開発の初期段階であることから、原薬や製剤の製造法の改良が行われることを念頭に、非臨床試験に供する原薬から治験薬、

ひいては臨床応用に至までの品質の一貫性担保を特に意識した管理方法を作成した。また、非臨床試験に用いられる原薬の特性試験における試験項目を設定した。さらに、これから蓄積していく特性試験の結果や原薬の暫定製造法等で得られるサンプルの分析データに非臨床試験の結果を加えることで治験薬の暫定規格を設定する計画を作成した。

### 3. 薬効確認試験

試験動物には、本被験物質のターゲット遺伝子がヒトと同じ配列を有するカニクイザルを選択し、2～6歳の雌雄計28匹(馴化開始時：2.0～6.0kg)を用意し、馴化終了日(馴化期間：7日)に、トリグリセリド(TG)あるいはLDL-Cの高い動物を選別し、試験に供給した。試験期間中の観察は、一般状態、体重、摂餌量、血液生化学的検査[アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、総コレステロール、TG、及びLDL-C]を設定した。投与は1週間に1回とし、初回の投与後のTG又はLDL-Cの変化を指標として、2回目以降の投与量を決定する漸増法として実施することとした。なお、投与方法は予定している臨床投与経路にあわせて皮下投与とした。

### 4. 遺伝毒性試験

ICHガイドラインS2に従って、FIHまでにバクテリアを用いた復帰突然変異試験(Ames試験)及びほ乳類培養細胞を用いた

染色体異常試験の二つの*in vitro*試験をおこなうことを計画し、いずれかの試験において、陽性の結果または陽性が疑われる結果が得られた場合、FIHの開始までに、*in vivo*遺伝毒性試験であるげっ歯類を用いた小核試験を実施することとした。

### 5. 一般毒性試験及び安全性薬理試験

FIHの開始に必要とされている安全性薬理試験のコアバッテリー(中枢神経系、心血管系および呼吸器系への影響試験)は、動物愛護の観点も考慮し、検査項目に追加することにより、一般毒性試験に組み込んで評価する計画とした。具体的には、中枢神経系への影響は、げっ歯類を用いた毒性試験において、Irwinの変法による観察を、呼吸器系及び心血管系に及ぼす影響は、非げっ歯類を用いた毒性試験において、血液ガスや呼吸数の計測、ホルター心電図を用いた検査を組み込むことで実施する計画とした。

一般毒性試験では2種の動物種を用いるが、げっ歯類では、使用する動物数の削減や検査可能な項目を考慮して、ラットを選択した。また、本被験物質のターゲット遺伝子であるPCSK9の遺伝子配列がヒトと同じである動物を使うことにより、本被験物質によるオンターゲット効果による影響を観察することが可能とすることから、非げっ歯類ではカニクイザルを選択した。

さらに、GLP適合試験の実施に先立ち、予備毒性試験を実施することで、群数及び投与

量、さらには検査項目の最終的な決定を行うこととした。

#### 6. TK測定法の確立

これまでの研究において、我々が開発したELISA法による生体内のアンチセンス分子の濃度測定法をGLPに適合した試験において実施するために、GLP適合施設に対して、移管を行った後、バリデーションを実施するものとした。

#### 7. 非臨床動態試験

ICHガイドラインM3に従って、非臨床動態試験のうち、FIHの開始に必要な動態試験、*in vitro*代謝試験及び*in vitro*タンパク結合試験の実施スケジュールを立案した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、試験委託施設である株式会社新日本科学の動物実験委員会の承認を得た上で、規律に従い、動物愛護の精神を持って施行するものとした。

また、試験戦略および試験計画立案に際しても、代替法の考慮、動物数の削減、動物への負担の軽減を考慮した。

### C. 研究結果

#### 1. 抗PCSK9アンチセンスの品質管理戦略

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、非臨床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

を考慮し、GLP適合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とした。

製造法を改良する場合には、一貫性を損なわない様にするため、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い、特に非臨床安全性試験に用いる原薬では、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原則とした。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場合、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し、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こととした。また、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とした(別添 薬事戦略相談対面助言資料参照)。

#### 2. カニクイザルを用いた薬効確認試験

カニクイザルを用いた*in vivo*薬効確認試験では、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-Cの高い動物を6匹選別する計画にしていたが、馴化期間終了後の検査において、LDL-Cの高い動物が4匹(雄2

匹，雌2匹）であったことから、計画を変更し、初回の投与はこの4匹を用いて実施することにした（現在、試験実施中，3月中旬試験終了予定）。

なお、投与量については、計画通りは初回の1 mg/kgを投与し、現在、検査を実施中である。2回目以降の投与量については、一般状態観察、体重、摂餌量及び投与後6日までの血液生化学検査の結果から薬効或は毒性症状を判断し決定する予定である。

### 3. FIH 試験実施のための非臨床安全性試験実施戦略

本研究の被験物質である AmNA 搭載型抗 PCSK9 アンチセンスによる FIH 試験実施のために必要な非臨床安全性試験として、遺伝毒性試験では、Ames 試験（GLP 適合）及び染色体異常試験（GLP 適合）の2試験を、

一般毒性試験では、1ヶ月間反復投与予備毒性試験（ラット及びカニクイザル、ともに信頼性保証基準に従う）、3ヶ月間反復投与毒性試験（ラット及びカニクイザル、ともに GLP 適合）の計4試験を実施することを計画し、それぞれの試験計画の草案を立案した（別添 薬事戦略相談対面助言資料参照）。

また、一般毒性試験における TK 測定のために、一般毒性試験の実施に先立ち、ラットあるいはカニクイザルの血清を用いた TK 測定法の試験法移管及びバリデーション（信頼性保証基準）試験を実施することとした（別添 薬事戦略相談対面助言資料参照）。現在、試験法を移管し、バリデー

ション実施に向けたバリデーション試験の試験計画を立案している。

### D. 考案

本研究では、優れたFH治療薬の臨床応用を目指し、PCSK9を標的とした安全で特異性の極めて高いAmNA搭載型のアンチセンス分子の医薬品開発を進めている。これまでの研究において、高活性な配列を有する開発の最終候補化合物が決定されており、この最終候補のアンチセンス分子の臨床試験へ橋渡しをするべく、本年度は、本被験物質の非臨床安全性試験の実施に向けた戦略を立案した。

本研究は、我が国ではこれまでに経験の少ない核酸医薬の非臨床安全性試験を実施するものであり、新規人工核酸を搭載した核酸医薬の非臨床試験の先駆けでもある。すなわち、今後の核酸医薬開発におけるバックグラウンドデータの蓄積や核酸医薬の非臨床安全性試験の実施例としての技術蓄積にも繋がることから、今後は、本年度作成した試験実施戦略についての検証を進めるため、GLPに適合した試験を実施し、我々が見いだした抗PCSK9アンチセンスの臨床試験に向けた準備をおこなう所存である。また、核酸医薬の品質管理においても、従来の低分子医薬とは違った課題が考えられている。本研究を進めていくことで、データの蓄積や検証をおこないつつ、我々の抗PCSK9アンチセンスの臨床開発に向けた品質管理法を作成していきたい。

さらには、本研究を進めていくことで、非臨床安全性試験や品質管理を行う上で、核酸医薬に特有の課題の抽出や解決法の提案にも繋げることができると期待している。

#### E. 結論

本年度は、アンチセンス分子の臨床試験に橋渡しをするための非臨床安全性試験の実施戦略を作成するとともに、臨床応用を見据えた品質管理法の戦略を立案し、これらを実施することが、世界的にも数少ない核酸医薬の医薬品開発の一例となり、データの蓄積となることを示した。

#### F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

#### G. 研究発表

知的所有権の出願・取得状況

