

核酸医薬品の非臨床安全性試験の現状

上野 圭仁^{*1}, 真木 一茂^{*2}, 荒戸 照世^{*3}

Current Situation of Non-clinical Safety Assessment for Oligonucleotide-based Therapeutics

Keito UENO^{*1}, Kazushige MAKI^{*2} and Teruyo ARATO^{*1, *3, #}

1. はじめに

核酸医薬品は天然型又は化学修飾されたヌクレオチドから構成され、遺伝子発現を介さずに作用する薬物であり、遺伝性疾患等の現在治療法の確立していない疾患への適応などが期待されている。核酸医薬品は主に標的とする塩基配列にハイブリダイズすることにより薬理作用を発揮するため、バイオテクノロジー応用医薬品(バイオ医薬品)同様に過剰な薬理作用に起因するオンターゲット毒性を生じる可能性がある。加えて、標的以外の塩基配列にハイブリダイズすることによって生じるオフターゲット毒性やハイブリダーゼーションに起因せず核酸分子特有の構造や物理化学的特性による毒性が考えられる。そのため、核酸医薬品を開発する上では、これらの特徴を踏まえた安全性評価が必要である。

こうした背景を踏まえ、日本医療研究開発機構研究費(医薬品等規制調和・評価研究事業)「医薬品の安全性及び

品質確保のための医薬品規制に係る国際調和の推進に関する研究」の分担研究「S6: バイオ/核酸医薬品の安全性に関する研究」研究班(ICH(医薬品規制調和国際会議)S6 対応研究班)¹⁻⁹⁾、大阪大学大学院薬学研究科¹⁰⁾、European Medicines Evaluation Agency (EMA) (当時)¹¹⁾、Oligonucleotide Safety Working Group (OSWG) (2013年にDrug Information Association (DIA)に統合)¹²⁻²⁰⁾が、核酸医薬品の非臨床安全性評価に関する考えを示している(Table 1)。

2018年10月1日時点で、国内外で7品目の核酸医薬品(アンチセンス5品目、アプタマー1品目、siRNA 1品目)^{註1}が製造販売承認されており(Table 2)、核酸医薬品に関するガイドラインが発出されていない現状では、これらの承認申請データが非臨床安全性評価における指標の一つになると考えられる。

本稿では、既承認核酸医薬品の審査報告書を基に、非臨床安全性試験データを抽出・整理し、ICH S6 対応研究

^{*1} 北海道大学大学院医学院 レギュラトリーサイエンス教室 北海道札幌市北区北15条西7丁目(〒060-8638)
Hokkaido University, Graduate School of Medicine, Department of Regulatory Science, Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8638, Japan

^{*2} 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞が関3-3-2 新霞が関ビル(〒100-0013)
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), Shin-Kasumigaseki Building, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

^{*3} 北海道大学病院 臨床開発研究センター 札幌市北区北14条西5丁目(〒060-8648)
Hokkaido University Hospital, Clinical Research and Medical Innovation Center, Kita 14, Nishi 5, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8648, Japan

責任著者 Corresponding author

註1: 本稿では、日本で承認を取得している核酸医薬品は日本での一般名及び販売名を用い、日本で承認されていないものは欧米での一般名及び販売名を用いた。

班, OSWG, EMEA (当時) 等の考え方との比較検討を試みた^{注2}。

与毒性試験の内容は Table 3 のとおりである。反復投与毒性試験には、少なくとも1種のげっ歯類と1種の非げっ歯類が用いられており、げっ歯類ではマウス又はラット、非げっ歯類ではサルが共通して選択されていた。核酸医薬品の非臨床安全性試験における動物種選択に関して、ICH S6 対応研究班は、「げっ歯類と非げっ歯類の2種の動物種を用いることが適切」と述べており、その理由として、多くの核酸医薬品に用いられている化学修飾されたヌクレオ

2. 非臨床安全性試験

2.1 一般毒性試験

2.1.1 動物種

現在までに製造販売承認に至った核酸医薬品の反復投

Table 1 核酸医薬品の非臨床安全性試験の考え方

	ICH S6 対応研究班	OSWG
考え方	<ul style="list-style-type: none"> オンターゲット毒性：薬理作用を発現する動物種を用いる薬理作用を示す動物種が1種のみ/存在しない場合、サロゲートの利用も検討 狭義のオフターゲット毒性：<i>in silico</i>解析や<i>in vitro</i>マイクロアレイ解析 広義のオフターゲット毒性：従来型の毒性試験で評価可能(動物種2種) 	<ul style="list-style-type: none"> オンターゲット毒性：薬理作用を発現する動物種を用いる(NHPを例示)薬理作用を示す動物種が1種のみ/存在しない場合、サロゲートや病態モデル動物の利用も検討 狭義のオフターゲット毒性：<i>in vivo</i>試験にも言及
一般毒性	<ul style="list-style-type: none"> 動物種：げっ歯類と非げっ歯類の2種 サロゲートを利用する場合、(ハザードを検出のために行うことから)複数の用量群を設ける必要はない 投与量：化学修飾を施した核酸医薬品についてはICH M3ガイドラインを準用 	<ul style="list-style-type: none"> 動物種：げっ歯類と非げっ歯類の2種 サロゲートの使用：複数用量の臨床候補品に加えて、中～高用量1用量のサロゲート群を設ける
遺伝毒性	<p>EMEA (当時) の二つの懸念を紹介</p> <ul style="list-style-type: none"> 分解物であるホスホロチオエート・モノヌクレオチドがDNAに取り込まれて突然変異を誘発する可能性 オリゴヌクレオチドがDNAとTriplexを形成し、突然変異を誘発する <p>ほ乳類培養細胞を用いる<i>in vitro</i>遺伝毒性試験において、ヒト細胞を用いることによって、遺伝毒性の評価ができる可能性がある</p>	<p>【EMEA (当時)】以下の二つの懸念について紹介</p> <ul style="list-style-type: none"> 分解物であるホスホロチオエート・モノヌクレオチドがDNAに取り込まれて突然変異を誘発する可能性 オリゴヌクレオチドがDNAとTriplexを形成し、突然変異を誘発する <p>【OSWG】</p> <ul style="list-style-type: none"> 新規の核酸医薬品や新規の修飾が施された場合には、<i>in vivo/in vitro</i>の染色体異常試験と復帰変異試験を実施 Triplexを含む核酸医薬品の遺伝毒性試験は、特別な場合を除き、推奨されない
がん原性	<ul style="list-style-type: none"> 化学修飾部分のオフターゲット毒性に起因するがん原性の評価が必要(げっ歯類2種) 試験実施の要否はICH S1Aガイドライン参考サロゲートを用いたがん原性試験の実施意義は限定的 	
生殖発生毒性	<ul style="list-style-type: none"> 妊娠可能な女性、妊婦及び授乳婦に適用される場合は、原則実施が必要(3段階の用量) 受胎能試験：げっ歯類>NHPを用いた反復投与毒性試験>サロゲート EFD試験：ラット、ウサギ>薬理作用を示す他の動物種>サロゲート PPND試験：ラット>NHP 	<ul style="list-style-type: none"> ラット、ウサギ>うち薬理作用を示す1種 NHPの使用は限定的 サロゲートの使用：複数用量の臨床候補品に加えて、1用量のげっ歯類サロゲート群を設ける+2種目の動物を用いたEFD試験は臨床候補品のみで実施
安全性薬理	<ul style="list-style-type: none"> 安全性コアバッテリー評価は臨床試験開始前に実施必ずしも独立した試験を実施する必要はない hERGテストについて、OSWGの考えを紹介する一方、化学修飾されたオリゴヌクレオチドが分解された際のhERGチャネルに対する情報は蓄積されていないと言及 	<ul style="list-style-type: none"> 安全性コアバッテリー評価を実施 心血管系はNHPで実施するのが理想 中枢神経系、呼吸器系については独立した試験を実施する必要はない hERGテストから有益な情報は得られないことから、実施する必要はない

注2：大阪大学大学院薬学研究科が作成した革新的医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業「核酸医薬の臨床有効性、安全性の評価方法」報告書中の品質部分は厚生労働省によるパブリックコメントの対象であったが、非臨床安全性部分については対象とされなかったため、今回の比較検討には用いなかった。

Table 2 承認された核酸医薬品

一般名	販売名	種類	投与経路	効能・効果	承認年		
					米国	EU	日本
fomivirsen sodium*	Vitravene	アンチセンス	硝子体内	HIV 感染による CMV 性網膜症	1998	1999	—
ペガブタニブ ナトリウム	マクジェン	アプタマー	硝子体内	加齢黄斑変性症	2004	2006	2008
mipomersen sodium	Kynamro	アンチセンス	SC	家族性高コレステロール血症	2013	不承認	—
eteplirsen	Exondys 51	アンチセンス	IV	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	2016	不承認	—
ヌシセルセン ナトリウム	スピンラザ	アンチセンス	髄腔内	乳児型脊髄性筋萎縮症	2016	2017	2017
inotersen	Tegsedi	アンチセンス	SC	トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチー	2018	2018	—
patisiran	Onpattro	siRNA	IV	トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチー	2018	2018	—

*：現在、販売されていない

チドには、低分子化学合成医薬品と同様に化学構造に起因する毒性が想定され、動物種によってその毒性に対する感受性の差が考えられること、化学修飾を施した核酸医薬品の薬物動態は動物種によって異なる可能性があることなどが挙げられている⁷⁾。また、OSWG は薬理作用を示す動物を選択することが重要であるとの考えを示し (2.1.2 参照)、その事例としてヒト以外の霊長類 (Non-human Primate (NHP)) を挙げている¹⁵⁾。

2.1.2 オンターゲット毒性の評価

前述のとおり、核酸医薬品にはオンターゲット毒性とオフターゲット毒性が存在する。このうち、オンターゲット毒性を評価するためには、被験物質に対して薬理作用を示す動物種を選択する必要があると考えられる。既承認核酸医薬品において、薬理作用を示す動物種が存在しない場合のオンターゲット毒性評価の方法は以下のとおりであった。

サロゲートの利用：Mipomersen の標的であるヒトアポリポタンパク質 B100 遺伝子は、動物によって塩基配列が異なるため、mipomersen はサルでは薬理作用が弱く、マウス、ラット、イヌ及びウサギでは薬理作用が認められない。そのため、mipomersen のマウスを用いた反復投与毒性試験では、臨床候補品の複数用量に加えて、高用量 1 用量のサロゲート (試験動物種で薬理作用を示す臨床候補品と相同な代替核酸) が用いられていた (Table 4)。また、inotersen はヒトトランスサイレチン遺伝子を標的とするアンチセンスであり、臨床候補品はヒトとサルでのみで薬理作用を示すため、マウス及びラットを用いた反復投与毒性試験では、それぞれマウス及びラットのサロゲートが用いられていた。

サロゲートを用いた毒性試験について、ICH S6 対応研究班や OSWG は、量的なリスク評価のためには有用ではなく、サロゲート群を複数用量設ける必要性はないと結論づけているが^{2,15)}、既承認核酸医薬品におけるサロゲート群の設定はこの考えと一致していると言える。

疾患モデル動物の利用：Eteplirsen はヒトジストロフィン遺伝子のエクソン 51 スキッピング誘導治療薬であり、エクソン 51 周辺の遺伝子に変異のあるデュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)) 患者のみに薬理作用を示す。一方、DMD の病態モデルとしてはエクソン 23 に変異を有する mdx マウスが代表的であり、げっ歯類の毒性試験では野生型のマウスに加えて mdx マウスを用いることにより、薬理作用に基づくオンターゲット毒性の評価を行っていた。その際、eteplirsen 群に加えてサロゲート群が設定されており、いずれの組み合わせ間でも毒性プロファイルに大きな違いは認められていない。毒性試験に病態モデルを用いる試験デザインは、OSWG が「疾患モデル動物にサロゲートを投与する方が、通常反復毒性試験においてサロゲートを用いるよりも、適切な場合がある」と言及している¹⁵⁾とおりと言える。

サロゲートも疾患モデル動物も利用しなかった例：ヌシセルセンでは、標的遺伝子であるサバイバルモーターニューロン 2 (SMN2) は主要な実験動物には存在しないことから、サロゲートを用いた試験は実施されていなかった。また、ヒト SMN2 遺伝子を発現させた脊髄性筋萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy (SMA)) モデルマウスは作製されているものの、当該モデルを用いた毒性試験は実施されていなかった。日本の審査報告書には、申請者が「オンターゲット毒性は通常非臨床試験に用いられる動物種で

Table 3 核酸医薬品の毒性試験内容

	fomivirsen		ペガブタニブ		mipomersen			
	動物種	投与経路	動物種	投与経路	動物種	投与経路		
急性毒性	ウサギ マウス	硝子体内 IV	ウサギ, サル ラット, サル	硝子体内 IV	マウス	IV		
反復投与毒性	サル マウス	硝子体内 IV	ウサギ, イヌ, サル ラット	硝子体内 IV	マウス*1 ラット, サル	SC SC		
遺伝毒性	細菌を用いた復帰突然変異試験 マウスリンフォーマ TK 試験 染色体異常試験(CHO 細胞) マウス骨髄細胞を用いる小核試験		細菌を用いた復帰突然変異試験 マウスリンフォーマ TK 試験 染色体異常試験(SHE 細胞) マウス骨髄細胞を用いる小核試験		細菌を用いた復帰突然変異試験 マウスリンフォーマ TK 試験 マウス骨髄細胞を用いる小核試験			
がん原性					マウス*1 ラット*1	SC SC		
生殖発生毒性 • 受胎能 • 胚・胎児発生 • 出生前・後の発生, 母胎の機能	マウス(承認後に実施) マウス(承認後に実施)		マウス*2 マウス ウサギ	IV IV 硝子体内	マウス*1,*2 マウス*1,*2 ウサギ*1 ラット*1	SC SC SC SC		
その他の毒性 • 抗原性/免疫原性, 免疫毒性 • 毒性発現機序 • 構成ヌクレオシドの毒性 • 幼若ラット反復投与毒性 • 不純物の毒性			マウス, ラット, ウサギ ラット*3 ラット, ウッドチャック	IV IV IV	マウス 幼若ラット マウス	SC SC SC		
	eteprilsen		ヌシネルセン		inotersen		patisiran	
	動物種	投与経路	動物種	投与経路	動物種	投与経路	動物種	投与経路
急性毒性	ラット(成熟, 幼若) IV		サル	髄腔内				
反復投与毒性	mdxマウス*1, サル 幼若ラット	IV, SC IV	幼若マウス 幼若サル	SC 髄腔内	マウス*1, ラット*1 サル	SC SC	ラット, サル	IV
遺伝毒性	細菌を用いた復帰突然変異試験 染色体異常試験(CHO 細胞) マウス骨髄細胞を用いる小核試験		細菌を用いた復帰突然変異試験 染色体異常試験(CHO 細胞) マウス骨髄細胞を用いる小核試験		細菌を用いた復帰突然変異試験 染色体異常試験(CH 肺細胞) マウス骨髄細胞を用いる小核試験		細菌を用いた復帰突然変異試験 染色体異常試験(ヒト末梢血リンパ球) マウス骨髄細胞を用いる小核試験	
がん原性			マウス承認後に実施(2年間)		Tg マウス*1 ラット実施中	SC	Tg マウス	IV
生殖発生毒性 • 受胎能 • 胚・胎児発生 • 出生前・後の発生, 母体の機能			マウス*2 マウス*2 ウサギ マウス*4	SC SC SC SC	マウス*1,*2 マウス*1,*2 ウサギ マウス*1	SC SC SC SC	ラット*1,*2 ラット*1,*2 ウサギ*1 ラット*1	IV IV IV IV
その他の毒性 • 抗原性/免疫原性, 免疫毒性 • 毒性発現機序 • 構成ヌクレオシドの毒性 • 幼若ラット反復投与毒性 • 不純物の毒性			幼若サル*3 サル マウス	髄腔内 髄腔内 SC	マウス*3, サル*3			

*1: 臨床候補品に加えて, サロゲートが被験物質として用いられている

*2: 組み合わせ試験(受胎脳及び胚・胎児発生に関する試験)で評価

*3: 反復投与毒性試験で評価

*4: 欧米の審査報告書には記載されていない

評価することはできないものの, 安全性薬理試験や臨床試験結果を踏まえ, オンターゲット作用に起因する具体的なリスクは想定できず, ヒトにおいて臨床で大きな問題となる可能性は低い旨の説明をしていると記載されている²¹⁾.

Patisiran は, NHP で薬理作用を示すものの, げっ歯類

では薬理作用が認められていないことから, 生殖発生毒性試験ではサロゲートが用いられていたが(2.4.1 参照), 一般毒性試験ではサロゲートは用いられていなかった(Table 3, Table 4).

Table 4 サロゲートの利用

	mipomersen			eteplirsen		
	動物種	投与経路	投与量 mg/kg/週	動物種	投与経路	投与量 mg/kg/週
反復投与毒性	マウス (6か月)	SC	0, 2, 10, 25, 75* ¹	mdx マウス (12週) non-mdx マウス (12週) mdx, non-mdx マウス (28週+8週 R)	IV SC IV	0* ¹ , 12* ¹ , 120* ¹ , 960* ¹ 960* ¹ 0* ¹ , 960* ¹ 0* ² , 12* ² , 120* ² , 960* ²
がん原性	マウス ラット	SC SC	0, 5, 20, 60* ¹ , 80* ³ ♂: 0, 3, 10* ¹ , <30 ♀: 0, 3, 10* ¹ , <25			
生殖発生毒性 ・ 受胎能 ・ 胚・胎児発生 ・ 出生前・後の発生 母体の機能	マウス マウス ウサギ ラット	SC SC SC SC	0, 10.5, 35, 87.5* ¹ 0, 10.5, 35, 87.5* ¹ 0, 8.75, 17.5, 52.5* ¹ 0, 7, 35* ¹ , 70			
その他の毒性 ・ 幼若ラット反復投与毒性 ・ 免疫毒性	幼若ラット マウス	SC SC	0, 3, 10* ¹ , 50 0, 20, 50, 100* ¹			
	inotersen			patisiran		
	動物種	投与経路	投与量 mg/kg	動物種	投与経路	投与量 mg/kg
反復投与毒性	マウス (13週) ラット (26週)	SC SC	0, 4, 12, 40* ¹ , 100 0, 5, 15* ¹ , 40			
がん原性	Tg マウス	SC	0, 10, 30* ¹ , 80			
生殖発生毒性 ・ 受胎能 ・ 胚・胎児発生 ・ 出生前・後の発生 母体の機能	マウス マウス マウス	SC SC SC	0, 3, 15* ¹ , 25 0, 3, 15* ¹ , 25 0, 2.9, 11.4* ¹ , 22.9	ラット ラット ラット	IV IV IV	♂: 0, 0.03, 0.1* ¹ , 0.3 Q2W ♀: 0, 0.15, 0.5, 1.5* ¹ QW ♀: 0, 0.15, 0.5, 1.5* ¹ QW ♀: 0, 0.15, 0.5, 1.5* ¹ QW
その他の毒性 ・ 幼若ラット反復投与毒性 ・ 免疫毒性						

*¹: 臨床候補品に加えて、サロゲートが被験物質として用いられている

*²: サロゲートのみ

*³: mg/kg/月

2.1.3 ハイブリダイゼーションに起因する

オフターゲット毒性の評価

ハイブリダイゼーションに起因したオフターゲット毒性に関して、ICH S6 対応研究班は、*in silico* 解析及びヒト由来試料を用いた *in vitro* マイクロアレイ解析によりある程度予測可能との考えを示しており⁴⁾、OSWG はこれらに加えて適切な動物種を用いた *in vivo* の実施についても触れている¹⁶⁾。

また、ICH S6 対応研究班は、mipomersen ではハイブリダイゼーションに起因したオフターゲット毒性と考えられる明らかな所見は検出されていないことを紹介しており⁴⁾、OSWG も開発中の核酸医薬品においてもこうした所見の報告はないことを述べている¹⁶⁾。一方、その後承認さ

れたヌシネルセンの日本の審査報告書には、12 のオフターゲット候補遺伝子があることが述べられていた²¹⁾。最終的に、対象疾患である SMA が致死性の高い重篤な疾患であること、またヒトにおいて安全性上の大きな問題が認められていないことから、製造販売承認は可能と判断されていたが、製造販売後にヒト由来試料を用いた遺伝子発現解析の実施が要求されていた。

2.1.4 ハイブリダイゼーションに起因しない オフターゲット毒性

核酸医薬品にはオフターゲット作用のうちハイブリダイゼーションに起因しない核酸分子共通の作用(クラスエフェクト)が存在する。核酸医薬品のクラスエフェクトとして、自然免疫系の活性化や血漿蛋白の結合に伴う変化、

腎臓・肝臓への影響、血小板減少などが知られている。

既承認の核酸医薬品で確認されたクラスエフェクトとして、ペガブタニブをサルに静脈内投与した際に、活性化部分トロンボプラスチン時間 (Activated Partial Thromboplastin Time (APTT)) の軽微な延長が観察され、ラットの静脈内投与において腎毒性が観察されている²²⁾。Eteplirsen では、マウス、ラット、サルで腎毒性が観察された²³⁾。Mipomersen では、マウス、ラット、サルで炎症性所見及び炎症性サイトカインの上昇が観察されている²⁴⁾。加えて、サルでは肝臓及び腎臓の空胞化並びに補体の活性化、ラットでは APTT 延長及び慢性腎症、マウスでは肝臓での好塩基球増加が観察されており、マウス、ラット及びサルの間でクラスエフェクトに対する感受性が異なっていた⁵⁾。Inotersen でも、マウス、ラット及びサルにおいて炎症性変化、腎毒性、肝毒性、血小板減少が認められ、腎毒性はマウスやサルよりもラットで重篤であった²⁵⁾。これらは、ICH S6 対応研究班が、核酸医薬品のクラスエフェクトは2種の実験動物を用いた従来型の毒性試験で検討すべきと考えている⁵⁾ことを裏付ける結果であった。なお、inotersen では薬理作用の有無に関わらず、マウス、ラット及びサルにおいて血小板減少が惹起されたが、マウス及びラットのサロゲートを用いた試験では当該影響が認められなかったことから、標的であるトランスサイレチンを阻害したことによる毒性ではないと考察されている²⁵⁾。

siRNA である patisiran では、ラット及びサルで主に肝臓で変異が認められていたが、これは patisiran と同じ脂質ナノ粒子に薬理作用を示さない siRNA を封入した場合でも認められたことから、脂質ナノ粒子を介した毒性と考えられている²⁶⁾。

2.1.5 投与量・投与方法

投与量 (Table 5) に関して、mipomersen (皮下投与)、eteplirsen (静脈内投与)、inotersen (皮下投与) 及び patisiran (静脈内投与) では、毒性試験での最高用量がそれぞれ体重換算で臨床投与用量の約 25 倍、約 32 倍及び約 7 倍であった。しかしながら、曝露量では、ICH S6 対応研究班が核酸分子特有の構造や物理化学的特性によるオフターゲット毒性の評価に必要と考えている「臨床最大曝露量の 50 倍程度の曝露が得られる用量⁹⁾」に満たず、最大耐量、曝露量の飽和が起こる用量又は投与可能な最大用量が用いられた可能性が考えられた。

投与期間は、ICH M3 (R2) ガイドラインでは、臨床適用における使用期間が3か月を超える場合、げっ歯類で6か月、非げっ歯類で9か月が必要とされており、局所投与の3品目を除く、4品目 (mipomersen, eteplirsen, inotersen 及び patisiran) では、げっ歯類、非げっ歯類のいずれにおい

ても当該ガイドラインの基準を満たしていた (Table 5)。一方、局所投与 (髄腔内投与) であるヌシネルセンでは、長期反復投与毒性試験はサルで実施されているのみであった。日本でのヌシネルセンの審査報告書には、申請者が、「げっ歯類では投与経路が静脈内投与、皮下投与等に限定され、ヌシネルセンが標的とする中枢神経系への十分な曝露が得られないことから、幼若サルを用いた反復髄腔内投与試験からヒトでの安全性に関する情報が得られると判断した」旨が記載されている²¹⁾。しかしながら、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) は、ヌシネルセンが化学修飾された核酸医薬品であり、当該修飾のオフターゲット毒性が明らかにされているとは言えないことから、本来であればげっ歯類を用いた長期反復投与毒性試験も実施すべきであったと述べ、製造販売承認申請時において、ヒトに長期投与した場合、安全性に特段の懸念は認められていないものの、製造販売後も引き続き情報を収集する必要があると判断している。

なお、ICH S6 対応研究班は「核酸医薬品の毒性評価においても原則、臨床での適用状況と同じ投与経路、投与期間、投与頻度により複数の用量を検討する従来の方法が適切である」と述べている⁹⁾。しかしながら、一般毒性試験の投与経路は、臨床投与経路と同じであったが、局所投与である品目では臨床投与経路に加えて、全身曝露される投与経路 (静脈内投与あるいは皮下投与) での試験も実施されていた (Table 3)。

2.2 遺伝毒性試験

既承認の核酸医薬品全てにおいて、*in vitro* 遺伝毒性試験 (細菌を用いた復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験あるいはマウスリンフォーマ TK 試験) 及び *in vivo* 遺伝毒性試験が実施されていた (Table 3)。今回検討した核酸医薬品は全て化学修飾が施されており、OSWG が「新規の核酸医薬品や新規の化学修飾が施されている既知の核酸医薬品では、*in vitro/in vivo* での染色体異常試験と突然変異試験を実施する」ことを提案している¹⁷⁾とおりであった。なお、試験結果はいずれも陰性であり、OSWG も、現在までに核酸医薬品で実施された遺伝毒性試験では、全て結果は陰性であったと述べている¹⁷⁾。また、ヒトの遺伝情報を元にデザインされた核酸医薬品は、その塩基配列が実験動物とは異なることが多いことから、ICH S6 対応研究班では、哺乳類培養細胞を用いる *in vitro* 遺伝毒性試験において、ヒト細胞を用いることによって適切に評価ができる可能性があることを述べている⁷⁾。しかし、patisiran を除き、ヒト細胞を用いた *in vitro* での遺伝毒性試験は実施されていなかった。

また、核酸医薬品によって生じる可能性のある遺伝毒性

Table 5 反復投与毒性試験の投与量と臨床用量の比較

	反復投与毒性試験				承認用法・用量
	動物種	投与経路	投与期間	最大投与量	
fomivirsen	サル	硝子体内	5 週間	33 µg/1~2 週	330 µg/2~4 週 硝子体内
	サル	硝子体内	4 週間	69 µg/1~2 週	
	サル	硝子体内	14 週間	115 µg/2 週	
	マウス	IV	28 日	50 mg/kg	
ペガブタニブ	ウサギ	硝子体内	11 週間	1 mg/眼/2 週	0.3 mg/6 週 硝子体内
			6 か月	2 mg/眼/2 週	
	イヌ	硝子体内	3 週間	2 mg/眼/週	3 mg/眼/2 週
			9 か月	0.5 mg/眼/2 週	
	サル	硝子体内	3 か月	0.5 mg/眼/2 週	
ラット	IV	13 週間	10 mg/kg/日		
mipomersen	マウス*1	SC	6 か月 + 3 か月 R	75 mg/kg/週	200 mg/週 (≒ 3 mg/kg/週)
	ラット	SC	5 か月 + 3 か月 R	50 mg/kg/週	
	サル	SC	1 年	30 mg/kg/週	SC
etepirsen	mdx マウス*1	IV, SC	12 週	960 mg/kg/週	30 mg/kg/週 IV
	non-mdx マウス*1	IV	12 週	960 mg/kg/週	
	mdx/non-mdx マウス*2	IV	26 週 + 8 週 R	960 mg/kg/週	320 mg/kg/週 320 mg/kg/週 900 mg/kg/週
	サル	IV, SC	12 週	320 mg/kg/週	
		IV	39 週 + 8 週 R	320 mg/kg/週	
幼若ラット	IV	10 週	900 mg/kg/週		
ヌシネルセン	幼若マウス	SC	13 週	50 mg/1~2 週	< 12 mg/2 週 ~ 4 か月 < 12 mg/4 週 ~ 6 か月
		髄腔内	14 週	3 mg/1~2 週	
	幼若サル	髄腔内	53 週	4 mg/1~6 週	髄腔内
inotersen	マウス*1	SC	13 週 + 13 週 R	100 mg/kg/週	284 mg/週 (≒ 5 mg/kg/週)
	マウス	SC	26 週 + 13 週 R	80 mg/kg/週	
	ラット*1	SC	26 週	40 mg/kg/週	SC
	サル	SC	13 週 + 13 週 R	40 mg/kg/週	
	サル	SC	39 週 + 26 週 R	20 mg/kg/週	
patisiran	ラット	IV	6 週 + 60 日 R	3 mg/kg/2 週	0.3 mg/kg/3 週 IV
	ラット	IV	4 週	1 mg/kg/4 週	
	ラット	IV	26 週 + 12 週 R	0.3 mg/kg/2 週	3 mg/kg/2 週 3 mg/kg/2 週 → 2 mg/kg/3 週
	サル	IV	6 週 + 60 日 R	3 mg/kg/2 週	
	サル	IV	39 週 + 13 週 R	3 mg/kg/2 週	

*1: 臨床候補品に加えて、サロゲートが被験物質として用いられている

*2: サロゲートのみ

について、EMA(当時)はリフレクションペーパーの中で、「分解物であるホスホロチオエート・モノヌクレオチドがDNAに取り込まれて突然変異を誘発する可能性」及び「オリゴヌクレオチドがDNAとTriplex(三重鎖)を形成し、それに起因する突然変異を誘発する可能性」の二つの懸念について言及している¹¹⁾。前者の分解物による突然変異については、ICH S6 対応研究班でも、「安全性が担保されていない修飾核酸の場合には、分解されたモノヌクレオチドがDNAに取り込まれて突然変異を引き起こす可能性について考慮する必要がある」旨が述べられている⁷⁾。例えば、ペガブタニブでは、ペガブタニブそのものを用いた遺伝毒性試験に加えて、分解されたヌクレオチドを用いた復帰突然変異試験や染色体異常試験が実施されていた²²⁾。一方、後者の生体内のDNAとTriplexを形成する可能性について、EMA(当時)のリフレクションペーパーには標的遺伝子特異的な遺伝子変異の検出法(RFLP

[Restriction Fragment Length Polymorphism, 制限酵素断片長多型]などの適用が考慮されるべきことなどが述べられている¹¹⁾。しかしながら、OSWGは「3重鎖構造を含む核酸医薬品の遺伝毒性試験については、特別な考慮が必要な場合を除いて推奨されない」と述べており¹⁷⁾、既承認の核酸医薬品でも、RFLPなどの検出法を用いた遺伝毒性試験は実施されていなかった。

2.3 がん原性試験

ICH S6 対応研究班は、核酸医薬品では化学修飾部分のオフターゲット毒性に起因するがん原性の評価が必要であり、試験実施の要否についてはICH S1A ガイドラインが参考になると考えている⁹⁾。これまでに承認された核酸医薬品は全て化学修飾が施されているにもかかわらず、がん原性試験が実施されているのはmipomersen, inotersen及びpatisiranのみであった(Table 3)。がん原性試験が省

略されている理由として、fomivirsen とペガプタニブでは、硝子体内投与のため全身曝露がないことが^{22,27)}、eteplirsen では致死性の高い疾患であること、並びに遺伝毒性試験、反復投与毒性試験及び臨床試験の結果が考慮されたことが説明されていた²³⁾。ヌシネルセンでは、申請者は、対象疾患である SMA は致死性が高いこと、ヌシネルセンの標的遺伝子は主要な実験動物に存在しないこと、更にハイブリダイゼーションに起因するオフターゲット毒性の評価では、がん抑制遺伝子を含むいくつかのオフターゲット候補遺伝子への影響が懸念されたものの、各遺伝子の生物学的特性やノックアウトマウスの表現型から、がん原性を示唆する情報が得られていないことなどを踏まえ、がん原性試験の実施は不要と説明していたが、PMDA は「対象疾患(主に I 型の SMA) は致死性の高い重篤な疾患であることから、当該試験結果を承認申請後に提出することは許容可能であるが、CD-1 マウスを用いた 2 年間反復皮下投与がん原性試験を速やかに実施する必要がある」と判断していた²¹⁾。Inotersen 及び patisiran では、トランスジェニックマウスを用いた短期のがん原性試験は実施されていたが、inotersen ではラットを用いた 2 年間のがん原性試験は承認時点で実施中であり²⁵⁾、patisiran では、FDA はラットを用いたがん原性試験は、26 週反復投与毒性試験での血中曝露量が検出感度以下であることから、実施不可能と結論づけていた²⁶⁾。

Mipomersen 及び inotersen では臨床候補品に加えサロゲートが用いられていたが、patisiran ではサロゲートは用いられていなかった (Table 3, Table 4)。なお、mipomersen では、マウスで肝細胞腺腫、繊維肉腫及び血管肉腫が、ラットで皮膚/皮下の悪性線維性組織球種や繊維肉腫などが認められていた²⁴⁾。マウスで認められた肝細胞腺腫は、臨床曝露量に近い用量で発生していること、サロゲート群での発生頻度は薬理活性のない臨床候補品群よりも高かったことから、FDA は、mipomersen 投与による肝細胞腺腫について、ヒトでのリスクとして添付文書で情報提供すべきと考えていた。実際、mipomersen の米国の添付文書では、「禁忌」や「注意」の項においてがん原性について注意喚起されてはいないものの、「毒性試験」の項でがん原性試験の結果が詳述されている²⁸⁾。一方、ICH S6 対応研究班は、サロゲートを用いたがん原性の評価について「バイオ医薬品に比べ、現時点で知識と経験が乏しい核酸医薬品に関しては、がん原性試験をより慎重に行う必要があるものの、核酸医薬品においても、サロゲートを用いたげっ歯類のがん原性試験の実施意義については限定的と考えるのが妥当」との見解を示している²⁾。

2.4 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験は、fomivirsen と eteplirsen を除く 5 品目で実施されていた (Table 3)。Eteplirsen では、適応対象である DMD が通常男児に限られること及び反復投与毒性試験で生殖器への影響が認められなかったことを理由に、生殖発生毒性試験は実施されていなかった²³⁾。

2.4.1 動物種

受胎能への影響は、ペガプタニブ、mipomersen、ヌシネルセン及び inotersen ではマウスを、patisiran では ICH S5 (R2) ガイドラインで推奨されるラットを用いて評価されていた。げっ歯類に対して薬理作用を示さない mipomersen、inotersen 及び patisiran では、臨床候補品に加えてサロゲートが用いられており (Table 3, Table 4)、ICH S6 対応研究班が「臨床候補品に対して薬理作用を示す適切な動物種であれば、げっ歯類を優先して使用することが望ましく、NHP のみが薬理作用を示す場合には、NHP を用いた 3 か月間以上の反復投与毒性試験において病理組織学的検査などにより受胎能を評価することで差し支えないこと、臨床候補品がいずれの動物種に対しても薬理作用を示さない場合、サロゲートを用いた試験も考えられる」と述べている⁸⁾とおりであった。一方、ヌシネルセンではサロゲート群は設定されていなかった。

胚・胎児発生 (Embryo-fetal development (EFD)) への影響は、5 品目 (ペガプタニブ、mipomersen、ヌシネルセン、inotersen、patisiran) 全てにおいて、マウスを用いた組み合わせ試験 (受胎能及び胚・胎児発生に関する試験) とウサギを用いた EFD 試験により評価されていた。加えて、ペガプタニブではマウスを用いた EFD 試験が実施されていた。なお、mipomersen、inotersen 及び patisiran では臨床候補品に加えサロゲートが用いられており (Table 3, Table 4)、ICH S6 対応研究班が「オンターゲット毒性の観点を用いたからも生殖発生毒性を評価する必要があることから、臨床候補品に対してラットやウサギが薬理作用を示さない場合には、薬理作用を示す他の動物種がないかを検討することが必要。臨床候補品に対して薬理作用を示す動物種が得られない場合には、サロゲートを用いた EFD 試験を検討する必要がある」と述べている⁸⁾とおりであった。一方、ヌシネルセンではサロゲート群は設定されておらず、オンターゲット毒性の観点からの評価はできていないことになる。

出生前後の発生、母体の機能 (Pre- and postnatal development (PPND)) への影響は、ペガプタニブでは加齢黄斑変性症患者が高齢であることを理由に PPND 試験は実施されていなかったが²²⁾、mipomersen、ヌシネルセン、inotersen 及び patisiran では実施されており、ラットあるいはマウスが用いられていた。Mipomersen、inotersen

及び patisiran ではサロゲート群も設定されていた (Table 3, Table 4). ヌシネルセンでは、欧米の申請データパッケージに PPND 試験は含まれていなかったが^{29,30)}、日本での申請データパッケージにはマウスを用いた PPND 試験が含まれていた。ICH S6 対応研究班は「臨床候補品に対してラットが薬理作用を示す場合には、ラットを用いた PPND 試験の評価を優先することが適切で、NHP 以外に薬理作用を示す適切な動物種がない場合には、NHP を用いた PPND の評価を検討する」と述べている⁸⁾。

なお、OSWG は、通常、生殖発生毒性試験では動物種としてラット及びウサギを用い、これらが薬理作用を示さない場合には NHP やサロゲートの利用を考えることを提案しており¹⁸⁾、ICH S6 対応研究班とほぼ同様の考え方であると言える。また、OSWG は、臨床候補品が薬理作用を示さない場合、1 種目の動物を用いた EFD 試験では、複数用量の臨床候補品群に加えて 1 用量のサロゲート群を設定し、2 種目の動物を用いた EFD 試験は臨床候補品群のみで実施することを提案している。

2.4.2 投与経路

生殖発生毒性試験の投与経路は、Table 3 のとおりであった。ペガブタニブ (げつ歯類) とヌシネルセンでは臨床投与経路と異なっていたが、これは ICH S6 対応研究班が「臨床適用経路による評価が困難な場合には、他の投与経路による評価も可能」と述べている⁸⁾とおりと言える。

2.5 安全性薬理試験

既承認の核酸医薬品における安全性薬理試験の実施状況は Table 6 のとおりであり、formivirsen を除いた全ての品目で安全性コアバッテリー評価が行われていた。Eteplirsen, inotersen 及び patisiran では独立した安全性薬理試験が実施されていたが、mipomersen やヌシネルセンでは一部の評価がサルでの反復投与毒性試験に組み込んで行われていた。コアバッテリー評価に用いる動物種について、OSWG は「補体の活性化により血行動態の変化がみら

れることから、心血管系は NHP で実施するのが理想」と述べているが¹⁹⁾、既承認の核酸医薬品では、必ずしも NHP で独立した心血管系の安全性薬理試験が実施されているわけではなく、ICH S6 対応研究班が「核酸医薬品の評価においても、必ずしも独立した試験を実施する必要はない」と述べている⁹⁾とおりであった。

hERG 試験は、mipomersen と inotersen のみで実施されていた。OSWG は「hERG 試験からは有用な情報は得られず、mipomersen やいくつかのオリゴヌクレオチド製剤で検討されてきた場合も陰性であったため、試験の必要性は低い」との見解を示しているが¹⁹⁾、ICH S6 対応研究班は OSWG の考えを紹介する一方で、化学修飾されたオリゴヌクレオチドが分解された際の hERG チャネルに対する情報は蓄積されていないと言及している⁹⁾。

3. 終わりに

今回検討した核酸医薬品 7 品目では、動物種の選択、サロゲートの利用、投与経路などについて、ICH S6 対応研究班、OSWG 及び EMEA (当時) が提示している核酸医薬品特有の試験デザインが多く用いられていた。しかしながら、以下のような違いもあった。

- 反復毒性試験に用いる動物種として、疾患モデル動物が用いられている品目があった。OSWG では疾患モデル動物の利用について記載があるが、ICH S6 対応研究班では言及されていない。
- 反復毒性試験での最高用量は、ICH S6 対応研究班が「臨床最大曝露量の 50 倍程度の曝露が得られる用量」を満たしている品目はなく、最大耐量、曝露量の飽和が起こる用量又は投与可能な最大用量により設定された可能性が考えられた。
- 遺伝毒性試験において、EMEA (当時) や ICH S6 対応研究班が提示している標的遺伝子特異的な Triplex

Table 6 安全性薬理試験

	ペガブタニブ		mipomersen		eteplirsen		ヌシネルセン		inotersen		patisiran	
	動物種	投与経路	動物種	投与経路	動物種	投与経路	動物種	投与経路	動物種	投与経路	動物種	投与経路
心血管系	イヌ	IV	hERG アッセイ サル*1	IV, SC	サル	SC	ラット, サル*1	髄腔内	hERG アッセイ サル	SC	サル	IV
呼吸器系	ラット	IV	マウス	SC	サル	SC	ラット, サル*1	髄腔内	サル	SC	サル	IV
中枢神経系	ラット	IV	マウス	SC	サル	SC	ラット, サル*1	髄腔内	マウス	SC	サル	IV
腎機能	イヌ*2	硝子体内	マウス*1	SC	サル	SC	サル*1	髄腔内				
肝機能	サル*2	硝子体内	サル*1	IV, SC	サル	SC						

*1: 反復投与毒性試験で評価

*2: 欧米の審査報告書には記載されていない

の検出法などは実際には用いられておらず、OSWGの考えに近かった。

- がん原性試験について、1品目でサロゲートを用いた評価が実施され、当該評価が必要ないとICHS6対応研究班の考え方とは異なっていた。
- hERG試験は実施されている品目と実施されていない品目があり、実施の必要性について統一された見解はまだないと考えられる。

文 献

- 1) ICH S6 対応研究班. 核酸医薬の非臨床安全性を考える (1) 連載の開始にあたって. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2015, 46 (5), p.286-289.
- 2) ICH S6 対応研究班. 核酸医薬の非臨床安全性を考える (2) サロゲートを用いた毒性試験. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2015, 46 (6), p.374-379.
- 3) ICH S6 対応研究班. 核酸医薬の非臨床安全性を考える (3) 核酸医薬品に由来する代謝物の評価. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2015, 46 (8), p.523-527.
- 4) ICH S6 対応研究班. 核酸医薬の非臨床安全性を考える (4) 核酸医薬品のオフターゲット作用の評価. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2015, 46 (10), p.681-686.
- 5) ICH S6 対応研究班. 核酸医薬の非臨床安全性を考える (5) 核酸医薬品のクラスエフェクトの評価. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2015, 46 (12), p.846-851.
- 6) ICH S6 対応研究班. 核酸医薬の非臨床安全性を考える (6) 核酸医薬の非臨床試験における動物種選択. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2016, 47 (2), p.101-104.
- 7) ICH S6 対応研究班. 核酸医薬の非臨床安全性を考える (7) 核酸医薬品の遺伝毒性評価. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2016, 47 (4), p.250-253.
- 8) ICH S6 対応研究班. 核酸医薬の非臨床安全性を考える (8) 核酸医薬の生殖発生毒性試験. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2016, 47 (8), p.568-574.
- 9) ICH S6 対応研究班. 核酸医薬の非臨床安全性を考える (9) 試験デザインやその他の試験. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2016, 47 (10), p.724-729.
- 10) 大阪大学大学院薬学研究科. 核酸医薬品の臨床有効性, 安全性の評価方法報告書. 平成 29 年 3 月 31 日. <https://www.pmda.go.jp/files/000221600.pdf>. (accessed 2018-08-10).
- 11) EMEA. 2005. CHMP SWP Reflection paper on the assessment of the genotoxic potential of antisense oligodeoxynucleotides. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003149.pdf. (accessed 2018-08-10).
- 12) Schubert, D.; Levin, AA.; Kornbrust, D.; Berman, CL.; Cavagnaro, J.; Henry, S.; Seguin, R.; Ferrari, N.; Shrewsbury, SB. The Oligonucleotide Safety Working Group (OSWG). *Nucleic Acid Ther.* 2012, 22 (4), p.211-212.
- 13) Marlowe, JL.; Akopian, V.; Karmali, P.; Kornbrust, D.; Lockridge, J.; Semple, S. Recommendations of the Oligonucleotide Safety Working Group's Formulated Oligonucleotide Subcommittee for the Safety Assessment of Formulated Oligonucleotide-Based Therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 2017, 27 (4), p.183-196.
- 14) Capaldi, D.; Teasdale, A.; Henry, S.; Akhtar, N.; den Besten, C.; Gao-Sheridan, S.; Kretschmer, M.; Sharpe, N.; Andrews, B.; Burm, B.; Foy, J. Impurities in Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products. *Nucleic Acid Ther.* 2017, 27 (6), p.309-322.
- 15) Kornbrust, D.; Cavagnaro, J.; Levin, A.; Foy, J.; Pavco, P.; Gamba-Vitalo, C.; Guimond, A. Oligo Safety Working Group Exaggerated Pharmacology Subcommittee Consensus Document. *Nucleic Acid Ther.* 2013, 23 (1), p.21-28.
- 16) Lindow, M.; Vornlocher, HP.; Riley, D.; Kornbrust, DJ.; Burchard, J.; Whiteley, LO.; Kamens, J.; Thompson, JD.; Nochur, S.; Younis, H.; Bartz, S.; Parry, J.; Ferrari, N.; Henry, SP.; Levin, AA. Assessing unintended hybridization-induced biological effects of oligonucleotides. *Nat Biotechnol.* 2012, 30 (10), p.920-923.
- 17) Berman, CL.; Barros, SA.; Galloway, SM.; Berman, CL.; Kasper, P.; Oleson, FB.; Priestley, CC.; Sweder, KS.; Schlosser, MJ.; Sobol, Z. OSWG Recommendations for Genotoxicity Testing of Novel Oligonucleotide-Based Therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 2016, 26 (2), p.73-85.
- 18) Cavagnaro, J.; Berman, C.; Kornbrust, D.; White, T.; Champion, S.; Henry, S. Considerations for assessment of reproductive and developmental toxicity of oligonucleotide-based therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 2014, 24 (5), p.313-325.
- 19) Berman, CL.; Cannon, K.; Cui, Y.; Kornbrust, DJ.; Lagrutta, A.; Sun, SZ.; Tepper, J.; Waldron G.; Younis, HS. Recommendations for safety pharmacology evaluations of oligonucleotide-based therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 2014, 24 (4), p.291-301.
- 20) Alton, EW.; Boushey, HA.; Garn, H.; Green, FH.; Hodges, M.; Martin, RJ.; Murdoch, RD.; Renz, H.; Shrewsbury, SB.; Seguin, R.; Johnson, G.; Parry, JD.; Tepper, J.; Renzi, P.; Cavagnaro, J.; Ferrari, N. Clinical Expert Panel on Monitoring Potential Lung toxicity of Inhaled Oligonucleotides: Consensus Point and Recommendations. *Nucleic Acid Ther.* 2012, 22 (4), p.246-254.
- 21) 医薬・生活衛生局審査管理課. スピンラザ髄注 12mg 審議結果報告書. 平成 29 年 6 月 13 日. http://www.pmda.go.jp/drugs/2017/P20170731001/630499000_22900AMX00587_A100_2.pdf. (accessed 2018-08-10).
- 22) 医薬食品局審査管理課. マクジェン硝子体内注射用キット 0.3 mg 審議結果報告書. 平成 20 年 5 月 13 日. http://www.pmda.go.jp/drugs/2008/P200800028/40007900_2200AMX01705000_A100_1.pdf. (accessed 2018-08-10).
- 23) Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. 2016. EXONDYS 51 (etelplirsen) Injection. Pharmacology review (s) FDA Briefing Document NDA 206488. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/206488Orig1s000PharmR.pdf. (accessed 2018-08-10).
- 24) Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. 2013. Kynamuro (mipomersen sodium) Injection. Pharmacology review (s) FDA Briefing Document NDA 203568. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/203568Orig1s000PharmR.pdf. (accessed 2018-08-10).
- 25) European Medicines Agency. 2018. Tegsedi (inotersen) Public Assessment report. Procedure No. EMEA/H/C/004782/0000. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/004782/WC500253277.pdf. (accessed 2018-08-10).

- 26) Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. 2018. Onpattro (patisiran) liquid complex injection. Multi-Discipline Review (s) FDA Briefing Document NDA 210992. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210922Orig1s000MultiR.pdf, (accessed 2018-09-26).
- 27) Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. 1998. Vitravene (fomivirsen sodium) Injection. Pharmacology review (s) FDA Briefing Document NDA 20961. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20961_Vitravene_pharmr.pdf, (accessed 2018-08-10).
- 28) Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. 2013. Kynamuro (mipomersen sodium) Injection. Package Insert. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/203568s000lbl.pdf, (accessed 2018-08-10).
- 29) Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. 2016. Spinraza (nusinersen) Injection. Pharmacology review (s) FDA Briefing Document NDA 209531. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/209531Orig1s000PharmR.pdf, (accessed 2018-08-10).
- 30) European Medicines Agency. 2017. Spinraza (nusinersen) Public Assessment Report. Procedure No. EMEA/H/C/004312/0000. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/004312/WC500229706.pdf, (accessed 2018-08-10).