

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 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

2. 研究開発代表者： 国立研究開発法人国立循環器病研究センター研究所病態代謝部 部長 斯波真理子（当該年度3月31日時点の所属）

3. 研究開発の成果

本研究開発は、家族性高コレステロール血症及び動脈硬化症の治療薬として、PCSK9 標的型核酸医薬を治験に橋渡しするための非臨床試験を行うことを目的とする。

今年度は、平成 25 年度までの「保健医療分野における基礎研究推進事業」の研究成果により最適化された PCSK9 をターゲットとする開発候補アンチセンスが、初年度のカニクイザルを用いた薬効確認試験において十分な効果を示さなかったことを受けて、開発候補化合物の再評価を実施した。アンチセンス分子や siRNA 等の核酸医薬の *in vitro* における活性評価には、一般的にカチオン性脂質などの導入試薬を用いるが、得られた結果が *in vivo* 系の実験において反映されないことが多々ある。その原因としては、個々のアンチセンス分子が有する配列特異的な動態の特性を導入試薬で均一化していることに由来すると考えられる。したがって、従来一般的な *in vitro* 評価系をスクリーニングに用いることは適切ではなかったと考え、新たに CEM 法を採用することとした。CEM 法は分担研究者である小比賀らが独自に開発した *in vitro* 評価系であるが、アンチセンス分子の *in vivo* 活性を高精度に反映することが明らかになったため、アンチセンス分子のスクリーニングに適切であると考えられた。実際に本評価系にて再度開発候補分子の選定を行った結果、カニクイザルに対して十分な薬効を示さなかった配列と比較し、約 5 倍の活性を有する配列の取得に成功した。得られたアンチセンス分子についてマウスに対する毒性検討試験による安全性の確認を行った後、再度、カニクイザルに対する薬効評価試験を実施した。1、3、10 mg/kg と用量漸増的に投与を行い、10 mg/kg の用量で血中 LDL-C 値及び血中 PCSK9 タンパク質がそれぞれ最大-60%、-80%と、高い活性を有する HsPCSK9-LNA (14) という化合物を取得することに成功した。この効果は約 3 週間に渡り維持され、その後の 3 mg/kg/2 weeks の投与により最大の効果を維持できることが示唆された。以上の結果から、今後の開発には HsPCSK9-LNA (14) を用いることとした。本化合物について、ラットを用いた 3 用量（10、30、100 mg/kg/week）2 週間の予備毒性試験を完了しており、現在は、血液生化学検査ならびに病理学的解析施行中である。

非臨床試験で実施するトキシコキネティクスには、被験化合物の生体内試料中の濃度を測定することが必須になるが、昨年度、HsPCSK9-1131 の測定用に移管した試験方法を HsPCSK9-LNA (14) 測定にトレースするために新たな DNA プロブを用いて LLOW、直線性及び再現性を確認するための検討を行った。その結果、新たな DNA プロブを用いた際には前被験物質の測定系とは異なり、バックグラウンドが高く、現被験物質についてデータの信頼性を保証するためにはプロブの品質特性の確認や測定手順の最適化が必要となると考えられた。

一方、次年度に計画している GLP 安全試験には被験物質が大量に必要なことを見込んで、これに先立ち GMP グレードのオリゴ核酸を製造可能な株式会社ジーンデザインの協力のもと、製造スケールアップの検討を実施した。項目としては、固相担体、製造スケール、アミダイトの濃度及びアミダイトの当量について検討を行い、さらなるスケールアップに耐えうる製造法の確率を完了した。また、品質管理を精度よく、かつ効率的に行う上で必要となる純度 98.12%の標準物質を 400 mg 取得した。以上の検討より、平成 28 年度以降の研究開発が着実に進行するための、適切な品質の原薬が供給できるものとする。