

核酸医薬品のクラスエフェクトの評価

ICH S6 対応研究班^{*1}

Considerations on the Preclinical Safety Assessment of “Class” Effect of Oligonucleotide Therapeutics

Working Group for the ICH S6 & Related Issues^{*1}

1. はじめに

クラスエフェクトとは、あるカテゴリーの薬の物性に依じた共通の作用という意味です。それでは、オリゴヌクレオチド製剤（核酸医薬品）のクラスエフェクトとは何を指すのでしょうか。オリゴヌクレオチド製剤は、標的となる核酸配列にハイブリダイズして作用を発現します。また、作用が予想以上に強いと過剰な薬理作用となって毒性が発現する可能性があります（オンターゲット作用による毒性）。更に、標的と類似した配列にクロスハイブリダイズ

して標的以外の分子を介した意図しない毒性が発現することも考えられます（狭義のオフターゲット作用による毒性）。これらの作用は核酸分子に由来しますが、ハイブリダイゼーションに起因する、すなわち配列に依存しますので製品ごとに作用が異なりクラスエフェクトとはいえません。一方、核酸分子特有の構造や物理的・化学的特性による毒性は核酸成分に由来するもののハイブリダイゼーションに起因するものではないので、核酸医薬品に共通する作用といえます。すなわち、現段階で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作用で、核酸分

^{*1} 平成 27 年度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）「医薬品の安全性およ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」（研究代表者：西川秋佳）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 S6 対応研究班）、研究分担者：平林 容子（Yoko Hirabayashi）^{*2}、協力研究者：真木 一茂（Kazushige Maki）^{*3}、笛木 修（Osamu Fueki）^{*3}、松本 峰男（Mineo Matsumoto）^{*3}、渡部 一人（Kazuto Watanabe）^{*4}、木下 潔（Kiyoshi Kinoshita）^{*5}、中澤 隆弘（Takahiro Nakazawa）^{*6}、小比賀 聡（Satoshi Obika）^{*7}、荒戸 照世（Teruyo Arato）^{*8}、藤坂 朱紀（Aki Fujisaka）^{*3,7}、オブザーバー：小野寺 博志（Hiroshi Onodera）^{*3}、篠田 和俊（Kazutoshi Shinoda）^{*3}

^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyohga, Setagayaku, Tokyo 158-8501, Japan

^{*3} 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 新霞ヶ関ビル (〒100-0013)
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), Shin-Kasumigaseki Building, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyodaku, Tokyo 100-0013, Japan

^{*4} 中外製薬株式会社 静岡県御殿場市駒門 1-135 (〒412-8513)
Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 1-135 Komakado, Gotenbashi, Shizuoka 412-8513, Japan

^{*5} MSD 株式会社 東京都千代田区九段北 1-13-12 北の丸スクエア (〒102-8667)
MSD KK., Kitanomaru Square, 1-13-12, Kudan-Kita, Chiyodaku, Tokyo 102-8667, Japan

^{*6} アンジェス MG 株式会社 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-7-15 彩都バイオインキュベータ 4 階 (〒567-0085)
AnGes MG, Inc., 4F, Saito Bio-Incubator, 7-7-15, Saito-asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

^{*7} 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, Suitashi, Osaka 565-0871, Japan

^{*8} 北海道大学大学院医学研究科 札幌市北区北 15 条西 7 丁目 (〒060-8638)
Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan

子に特有の共通な作用が、核酸医薬品におけるクラスエフェクトということになります (Fig. 1).

オリゴヌクレオチド製剤は、Table 1 に挙げたようにアンチセンス、siRNA、miRNA、デコイ核酸、アプタマー等といった構造や作用機序によって分類される他、ヌクレオシドやリン酸ジエステル結合部分への修飾、更に他分子とのコンジュゲート化など、血中動態や組織移行性の改善を目指して様々な化学修飾が施される場合もあります¹⁾。こうした物性に応じて共通の性質がみられることがありますが、オリゴヌクレオチド製剤の開発経験はまだ少なく、全ての製品についてクラスエフェクトが特定されているわけではありません。

本稿では、血漿タンパクの結合に起因する変化、免疫刺激、腎臓・肝臓への影響について、既に報告されているクラスエフェクトによる毒性を紹介するとともに^{2,3)}、こうした毒性は実験動物を用いた従来型の毒性試験で検出可能と考えられていることから、クラスエフェクトによる毒性評

価において参考となるポイントを紹介します。

2. 血漿タンパクの結合に起因する変化

2.1 活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) の延長

オリゴヌクレオチド製剤のクラスエフェクトの一つとして知られているものに、血漿タンパクの結合に起因する急性かつ一過性変化が挙げられます。クローン病の治療薬として開発中であった ICAM-1 に対するホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド (第一世代のアンチセンスオリゴヌクレオチド) である ISIS 2302 において、ヒト以外の霊長類 (NHP) 及びヒトで活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) の延長が報告されました^{4,5)}。ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドはヘパリンと同様の直鎖状のポリアニオン性ポリマーで、ヘパリン結合性タンパク質分子に結合することが示唆され、ヒト血漿を用いた

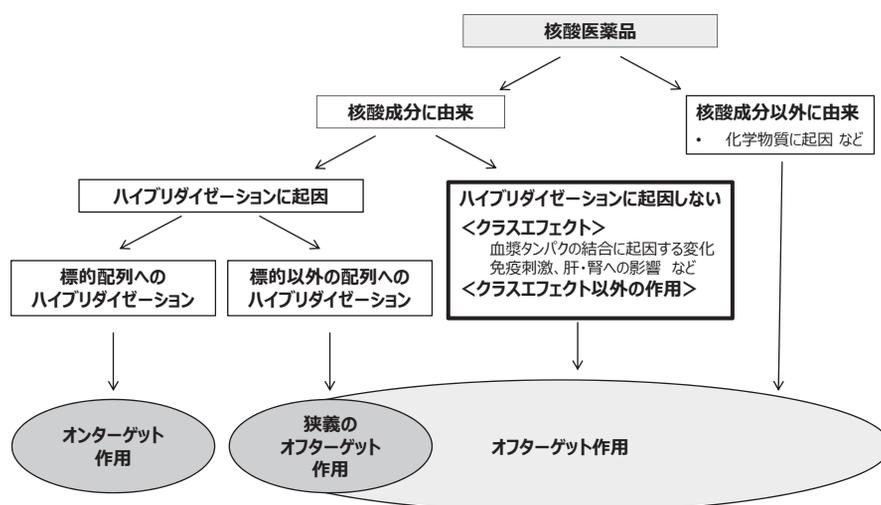


Fig.1 核酸医薬品の作用とクラスエフェクト

Table 1 核酸医薬品の分類

	構造	標的	作用
アンチセンス	一本鎖 DNA (一般に化学修飾核酸を含む) (比較的短鎖)	mRNA, pre-mRNA, miRNA	RNA と配列特異的に結合 翻訳阻害 スプライス制御
siRNA	二本鎖 RNA (化学修飾核酸を含むこともある) (比較的短鎖)	mRNA	RNA と配列特異的に結合 mRNA 切断 翻訳阻害
miRNA	二本鎖 RNA (比較的短鎖)	mRNA	RNA と配列特異的に結合 翻訳制御
デコイ核酸	二本鎖 DNA (比較的短鎖)	転写因子	転写因子と結合 転写阻害
アプタマー	一本鎖 DNA 又は RNA (化学修飾核酸を含むこともある) (比較的長鎖)	タンパク質	標的分子と結合 抗体様作用

(医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 46(5), p.287, Table 2 再掲)

Table 2 Mipomersen の反復投与毒性試験

	マウス	ラット	NHP
投与量	0, 2, 10, 25, 75 mg/kg	0, 3, 10, 30, 50 mg/kg	0, 1, 3, 10, 30 mg/kg
投与期間	週 1 回, 6 ヶ月間	週 1 回, 5 ヶ月間	週 1 回, 1 年間
Cmax	75 mg/kg: 47 µg/mL	30 mg/kg: 49 µg/mL	30 mg/kg: 34 µg/mL
AUC	75 mg/kg: 119 µg·hr/mL	30 mg/kg: 455 µg·hr/mL	30 mg/kg: 466 µg·hr/mL
炎症・免疫	リンパ球/組織球性浸潤, 等 (≥10 mg/kg)	リンパ球/組織球性浸潤, 等 (≥10 mg/kg)	リンパ球/組織球性浸潤, 等 (用量依存的)
サイトカイン	MCP-1 (≥25 mg/kg, 用量依存的上昇)	MCP-1, IL1α, IL-10, IFNγ, MIP1α (用量依存的上昇)	IL-6, IFNγ, MIP-1β, IL-1β, MIP-1β (30 mg/kg)
免疫グロブリン	IgM, IgG に変化なし	IgM ↑, IgG ↓	IgM, IgG に変化なし
補体	—	—	活性化 (C3 ↓, Bb ↑)
血球系	赤血球系パラメータ ↓ (≥10 mg/kg) — 血小板数 ↑ (♂, ≥25 mg/kg)	赤血球系パラメータ ↓ (≥30 mg/kg) 白血球への影響 —	— — 血小板数 ↓ (30 mg/kg)
凝固系	—	aPTT の延長 (≥30 mg/kg)	PT, aPTT, フィブリノゲン に変化なし
腎臓	尿細管細胞の好塩基性顆粒蓄積	腎機能障害 (BUN ↑, K ↑, Na ↓) 慢性進行性腎症 (≥30 mg/kg)	尿細管上皮の空胞化・変性 (≥10 mg/kg)
肝臓	クッパー細胞の好塩基性顆粒蓄積 ALT ↑, AST ↑, ALP ↑	肝機能障害 (AST ↑, ビリルビン ↑, 脂質 ↑)	細胞質の空胞の発生増加の 可能性

(文献 8 に基づき作表)

in vitro の検討で ISIS 2302 の濃度が 50 µg/mL に達すると Tenase complex の形成を阻害して aPTT を延長し, 100 µg/mL 以上ではヘパリン補因子 II の結合促進やフィブリノゲンとトロンビンの結合阻害を起こすことがわかりました⁶⁾. こうした変化は, ISIS 2302 のセンス配列や scramble 配列でも起こることがわかり, 配列に依存しない効果であることが示されています. 一方, 塩基配列が ISIS 2302 と同じホスホジエステル型オリゴヌクレオチドでは起こらないことから, ホスホロチオエート修飾に依存することが示唆されています⁹⁾.

なお, こうした作用の軽減を含めた改良型としてデオキシリボースの 2' 位をメトキシエチル (MOE) 修飾した第二世代のアンチセンスオリゴヌクレオチド ISIS 113715 (Protein-tyrosine phosphatase 1B に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド) を NHP に投与しても, 血中濃度が 90 ~ 100 µg/mL で 20 ~ 30% の aPTT の延長が認められています⁷⁾. 第一世代である ISIS 2302 では, NHP に 10 mg/kg 投与したときに aPTT の 25% の延長が認められ⁵⁾, そのときの血漿中濃度は 120 µg/mL と推定されるため¹³⁾, 2'-MOE 修飾の aPTT 延長への影響はあまり大きくないのかもしれない.

米国で家族性高脂血症の治療薬として承認された apoB mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである mi-

pomersen (販売名: Kynamro[®]) は, 2'-MOE 修飾が施されたホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドです. これを, ラットに 30 mg/kg 投与した場合は aPTT の延長が認められ, NHP では同じ投与量でもプロトロンビン時間 (PT), aPTT, フィブリノゲンに変化はありませんでした (Table 2)⁸⁾. このときの最高血漿中濃度はラットで約 50 µg/mL, NHP で約 35 µg/mL であり, NHP で変化が生じなかった原因の一つは種差による反応性の違いのみならず, 血中濃度が低かったことに起因する可能性もあります.

aPTT の延長は, アンチセンスのみならず, 比較的長鎖の一本鎖核酸である aptamer においても認められています. 例えば, 日米欧で加齢黄斑変性症の治療薬として承認を取得しているペガブタニブナトリウム (販売名: マクジェン) は, ホスホロチオエート骨格を持たない aptamer ですが, NHP に 5 mg/kg を 1 時間かけて単回静脈内持続投与したところ, aPTT の軽微な延長が認められています⁹⁾.

このようにホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドや一部のホスホロチオエート骨格を持たないオリゴヌクレオチドは血中である濃度以上になると, 血液凝固の阻害を誘導する可能性があります. したがって, aPTT の延長を起こしやすい修飾を避ける, あるいは aPTT が起こりうる血中濃度を把握し, その情報を臨床試験計画に活かすことが有用と考えられます.

¹³⁾ Crooke, Stanley T. "Antisense Therapeutics". *Biochnology and safety assessment*, 2nd ed. Thomas, John A. ed., Philadelphia, Taylor & Francis, 1998, p.23-60. より推定.

2.2 補体の活性化

補体の活性化もオリゴヌクレオチド製剤のクラスエフェクトの一つとして知られています。抗 HIV に対するホスホロチオエート型アンチセンス¹⁰⁾や、前述の ISIS 2302 を含め、多くのホスホロチオエート型アンチセンスにおいて補体の活性化が起こることが示され、H 因子との相互作用が原因であることがわかっています。配列には依存しないといわれてきましたが^{11,12)}、最近 CpG 配列が多く含まれている場合に補体の活性化を起こすとの報告もみられます¹³⁾。ISIS 2032 では、濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で NHP の血清中の補体を活性化させるものの、マウスやラット等の他の動物及びヒトでは影響が認められず、NHP では強く補体の活性化が起こると考えられています¹⁴⁾。また、2'-MOE 修飾が施されたアンチセンスは影響が少ないことが報告されています¹⁴⁾。しかしながら、mipomersen は 2'-MOE 修飾が施されているにもかかわらず、NHP に 30 mg/kg 投与したときに補体の活性化が認められ (Table 2)⁸⁾、臨床試験では mipomersen 投与群でプラセボ群に比べわずかに活性化 (C3 の減少) の程度が高かったことが示されています¹⁵⁾。

3. 免疫刺激

血漿タンパクの結合に起因する変化以外に、オリゴヌクレオチド製剤のクラスエフェクトとして知られているものに Toll 様受容体 (TLR) を介した免疫系の刺激が挙げられます。核酸医薬品にとって TLR によって認識される事態は回避すべきと考えられています¹⁾。有名な事例として、加齢黄斑変性症の治療薬として開発中であった siRNA (bevasiranib) の例が挙げられます¹⁶⁾。標的配列とは関係なく脈絡膜内皮細胞の TLR3 を介して抗 VEGF 作用を有していたことが報告され、siRNA の TLR3 を介した予期せぬ免疫刺激の可能性が知られるようになりました。

このように siRNA は TLR3 に配列非依存的に認識されますが、一本鎖 RNA の場合、TLR3 ではなく TLR7 及び TLR8 によって認識されることや、その際 UGUGU や GUCCUCAA といった U 及び G の多い配列に依存的であることがわかっています¹⁷⁾。いずれにしても、リボースの 2' の位置を化学修飾することにより、TLR3、TLR7 及び TLR8 による認識が防げること^{18,19)}、特に TLR7 及び TLR8 については、U のリボースの 2' 位の OH を F, H, OMe に置換することで、結果として誘導される TNF- α の産生が抑制されるとの報告があり (Fig. 2)²⁰⁾、こうした修飾を施すことによって免疫系の刺激を回避することも考えられます。また、TLR7 もしくは TLR8 はリガンドを認識すると Type-1 の interferon ($-\alpha$, $-\beta$) の発現を引き起こすことから¹⁸⁾、これを指標に *in vitro* で TLR への影

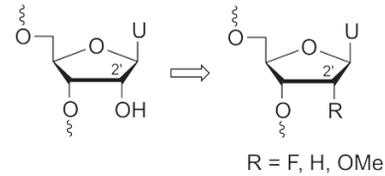


Fig.2 TLR7 及び TLR を介した免疫刺激を回避するための化学修飾の例

響を予測できると考えられます。なお、CpG 配列を含む DNA は TLR9 によって認識されることが知られており、TLR9 の認識を回避するために CpG の多い配列を避けたデザインにすることなども有効とされています¹⁸⁾。

免疫に関する毒性はアンチセンスオリゴヌクレオチドでも認められております。例えば、mipomersen では種々のサイトカインの用量依存的な上昇やリンパ組織球性浸潤、免疫グロブリンの変動等の免疫刺激性・炎症性反応が報告されています (Table 2)⁸⁾。サイトカインやケモカインに関しては、マウスでは MIC-1 のみの上昇しか認められていませんが、ラットと NHP では種々のサイトカイン及びケモカインの上昇が認められています。また、免疫グロブリンの変化はラットでしか認められておらず、動物種によって反応性が違うことが想定されます。また、臨床試験でも免疫に関連する副作用として、炎症性反応及び免疫原性、投与部位での反応及びインフルエンザ様症状が認められています¹⁵⁾。更に ISIS 2302 でも、マウスでは免疫システムに対する影響が認められていますが、NHP ではこうした変化は認められておらず、免疫刺激性・炎症反応を検討する際にも動物の選択に留意する必要があることがわかります⁵⁾。

4. 腎臓・肝臓への影響

オリゴヌクレオチドはそのほとんどが腎臓と肝臓に分布し、代謝・排泄されることから、こうした臓器における毒性変化が共通して起こることが考えられます。

4.1 腎臓への影響

ある一定量以上のアンチセンスを NHP に反復投与すると、近位尿細管上皮細胞中に好塩基性顆粒の蓄積や空胞化が観察されること、観察されるこれらの所見はエンドソームやリソソーム中のアンチセンスの蓄積を反映するものであり、数週間かけて回復すること、が報告されています²⁾。Mipomersen でも、雄ラットに 30 mg/kg 以上、雌ラットに 50 mg/kg 以上を投与したときに腎機能障害及び慢性進行性腎症が、NHP に 10 mg/kg 以上投与したときに尿細

管上皮の空胞化や変性が認められていますが、マウスでは尿細管細胞に塩基性顆粒の蓄積はみられるものの腎臓に関する毒性は認められていません (Table 2)⁸⁾。これは、マウスの腎臓では mipomersen 濃度が低いレベルで飽和していることによるものと考えられ、腎毒性を評価するときの動物種の適切性について考慮すべき事項といえるでしょう。なお、腎毒性は第Ⅲ相比較試験においても認められており、タンパク尿の発生はプラセボ群が3% (4/128例)でしたが、mipomersen 投与群では9% (23/256例)でした¹⁵⁾。ペガプタニブナトリウムでも、ラットの静脈内投与試験で腎毒性が認められています。しかしながら、臨床での投与経路は硝子体内投与であり、静脈内投与で腎毒性が認められた血漿中濃度は臨床推奨用量における最高血漿中濃度の15,000倍であったことから、ヒトに重篤な有害事象が生じる可能性は低いことが説明されています⁹⁾。一方、siRNAは高度に修飾の入ったアンチセンスやアプタマーよりヌクレアーゼ耐性が低いので、あまり問題にならないと考えられています²⁾。

4.2 肝臓への影響

肝臓もオリゴヌクレオチドが分布しやすい臓器です。主に、Kupffer細胞に貪食され、ある一定以上の投与量でKupffer細胞の肥大化や細胞内に好塩基性顆粒が観察されるようになること、マウスやラットでALT値やAST値の上昇がみられるケースがありますが、NHPではその程度が弱いことが説明されています²⁾。Mipomersenでも、マウスのKupffer細胞で好塩基性顆粒の蓄積が認められ、NHPで細胞質の空胞の増加の可能性が示唆されていますが、ALTやAST、ビリルビン等の上昇が認められたのはげっ歯類だけでした (Table 2)⁸⁾。ヒトでも脂肪肝やALT上昇が認められ、これらについては米国の添付文書上で注意喚起されていますが¹⁵⁾、脂肪肝は動物では認められていません。Mipomersenは肝臓をターゲットとした薬剤であり、臨床におけるこうした変化は薬効であるapoBを阻害したことによるもので、オリゴヌクレオチドの物性によるものではないと開発者は考えているようです。

5. おわりに

核酸医薬品のクラスエフェクトは、オフターゲット作用のうち核酸成分に由来するものの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といえ、血漿タンパクへの結合に起因する変化 (aPTT延長、補体の活性化)、TLRを介した自然免疫系への影響を含む免疫刺激性・炎症性反応、腎臓・肝臓のような高濃度分布臓器での影響などが知られています。こうした作用は、i) 一定の濃度

において発現すること、ii) ホスホロチオエート核酸 (aPTT延長、補体の活性化)、siRNA (TLR3を介した免疫刺激) といった一定の核酸骨格を有する場合や CpG 配列の多い分子 (補体の活性化、TLR9を介した免疫刺激) において認められ、iii) 2'-MOE 等の化学修飾によって低減されることが知られています (免疫刺激の抑制、補体の活性化)。したがって、問題となる骨格や配列を避ける、適切な化学修飾を施す、等が開発上有効と考えられますが、化学修飾等を施しているにもかかわらず毒性が発現している製品もあります。血中濃度等の影響も考えられますが、クラスエフェクトを起こす要因について議論するには、核酸医薬品の開発経験はまだ乏しく、今後開発事例を共有し、薬理作用、血中濃度も含め毒性や副作用に関する情報を蓄積していくことが望まれます。

また、クラスエフェクトは実験動物を用いた従来型の毒性試験で検出可能と考えられていますが、今まで述べてきた毒性変化を、マウス、ラット及びNHPで比較すると、補体の活性化を除いて、NHPよりもげっ歯類で影響を受けやすく、免疫グロブリンへの影響、aPTTの延長、腎機能障害等はげっ歯類の中でもラットで特に感受性が高いように見受けられます。しかしながら、各実験動物種でのオフターゲット効果の特徴、並びに非臨床と臨床のデータとの相関性などについて十分なデータは蓄積されておらず、クラスエフェクトを評価するための適切な動物種については、更なる検討が必要と考えます。

文 献

- 1) (公財) ヒューマンサイエンス振興財団, 平成 25 年度規制動向調査報告書 核酸医薬品の開発と規制の動向 HS レポート No.82. 2013. http://www.jhsf.or.jp/paper/report/report_no82.pdf, (accessed 2015-9-16).
- 2) 宮川伸. 核酸医薬の毒性と安全性. 医学のあゆみ. 2011, 238 (5), p.519-523.
- 3) 荒戸照世. 【核酸医薬の新潮流】核酸医薬をめぐる規制の動向. PHARM TECH JAPAN. 2013, 29 (13), p.2637-2642.
- 4) Yacyshyn, B.; Bowne-Yacyshyn, MB.; Jewell, L.; Tami, JA.; Bennet, CF.; Kisner, DL.; Shanahan, WR. A placebo-controlled trials of I-CAM antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998, 114 (6), p.1133-1142.
- 5) Henry, SP.; Bolte, H.; Auletta, C.; Kornbrust, DJ. Evaluation of the toxicity of ISIS 2302, a phosphorothioate oligonucleotide, in a four-week study in cynomolgus monkeys. *Toxicology*. 1997, 120 (2), p.145-155.
- 6) Sheehan, JP.; Lan, H-C. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex. *Blood*. 1998, 92 (5), p.1617-1625.
- 7) Henry, SP.; Kim, TW.; Karmar-Stickland, K.; Zanardi, TA.; Fey, RA.; Levin, AA. "Toxicologic properties of 2'-O-Methoxyethyl chimeric antisense inhibitors in animals and man". *Antisense drug technology: principle, strate-*

- gies, and applications, 2nd ed. Crooke, Stanley T, ed., Boca Raton, CRC Press, 2007, p.327-363.
- 8) Food and Drug Administration Center for Drug evaluation and Research. 2013, Kynamro (mipomersen sodium) Injection Pharmacology Review (s). http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/203568Orig1s000PharmR.pdf, (accessed 2015-09-16).
 - 9) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. マクジェン硝子体内注射用キット審査報告書. 2008. http://www.pmda.go.jp/drugs/2008/P200800028/40007900_22000AMX01705000_A100_1.pdf, (accessed 2015-9-16).
 - 10) Galbraith, WM.; Hobson, WC.; Giclas, PC.; Schechter, PJ.; Agarawal, S. Complement activation and hemodynamic changes following intravenous administration of phosphorotioate oligonucleotide in the monkey. *Antisense Res Dev.* 1994, 4 (3), p.201-2066.
 - 11) Henry, SP.; Giclas, PC.; Leed, J.; Pangburn, M.; Auletta, C.; Levin, AA.; Kornbrust, DJ. Activation of the Alternative pathway of complement by a phosphorotioate oligonucleotide :potential mechanism of Action. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997, 281 (2), p.810-816.
 - 12) Henry, SP.; Beatties, G.; Yeh, G.; Chappel, P.; Giclas, P.; Mortari, A.; Jagels, MA.; Kornbrust, DJ.; Levin, AA. Complement activation is responsible for acute toxicities in rhesus monkeys treated with a phosphorotioate oligonucleotide. *Int Immunopharmacol.* 2002, 281 (2), p.1657-1666.
 - 13) Mangsbo, SM.; Sanchez, J.; Anger, K.; Lambris, JD.; Ekdahl, KN.; Loskog, AS.; Nilsson, B.; Totterman, TH. Complement activation by CpG in human whole blood loop system: mechanisms and immunomodulatory effects. *J Immunol.* 2009, 183 (10), p.6724-6732.
 - 14) Henry, SP.; Jagels, MA.; Hugi, TE.; Manalili, S.; Giclas, PC.; Levin, AA. Mechanism of alternative complement pathway dysregulation by a phosphorotioate oligonucleotide in monkey and human serum. *Nucleic Acid Ther.* 2014, 24 (5), p.326-335.
 - 15) Food and Drug Administration Center for Drug evaluation and Research. 2013, Kynamro (mipomersen sodium) Injection Medical Review (s). http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/203568Orig1s000MedR.pdf, (accessed 2015-09-16).
 - 16) Kleinman, MK.; Yamada, K.; Takeda, A.; Chandrasekaran, V.; Nozaki, M.; Baffi, JZ.; Albuquerque, RJ.; Yamazaki, S.; Itaya, M.; Pan, Y.; Appukuttan, B.; Gibbs, D.; Yang, Z.; Kariko, K.; Ambati, BK.; Wilgus, TA.; DiPietro, LA.; Sakurai, E.; Zhang, K.; Smith, JR.; Taylor, EW.; Ambati, J. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature.* 2008, 452 (7187), p.591-597.
 - 17) Marques, JT.; Williams, BRG. Activation of the mammalian immune system by siRNA. *Nat Biotechnol.* 2005, 23 (11), p.1399-1405.
 - 18) Jackson, AL.; Lisley, PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov.* 2010, 9 (1), p.57-67.
 - 19) Kariko, K.; Buckstein, M.; Ni, H.; Weissman, D. Suppression of RNA recognition by toll-like receptors: The impact of Nucleoside Modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity.* 2005, 23 (2), p.165-175.
 - 20) Marques, JT.; Williams, BRG. Single-stranded small interfering RNA and more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: a central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses. *Eur J. Immunol.* 2006, 36 (5), p.1222-1230.