サノフィ株式会社

ザルトラップ点滴静注 100mg／同 200mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.4 非臨床試験の概括評価

Total number of pages: 31

目　　次

略号と用語の定義 5

1　非臨床試験計画概略 7

2　薬理試験 10

2.1　効力を裏付ける試験 10
2.1.1　Aflibercept の in vitro 活性評価 10
2.1.2　Aflibercept の in vivo 活性評価 10
2.2　安全性薬理試験 13

3　薬物動態試験 15

3.1　マウス、ラット及びサルにおける静脈内及び皮下投与後の薬物動態 15
3.2　ラットに静脈内投与後の分布 17
3.3　ラットに静脈内投与後の腎排泄 17

4　毒性試験 18

4.1　単回投与毒性試験 20
4.2　反復投与毒性試験 21
4.3　遺伝毒性試験 23
4.4　がん原性試験 23
4.5　生殖発生毒性試験 24
4.6　幼若サルにおける試験 24
4.7　その他の毒性試験 25
4.7.1　局所刺激性試験 25
4.7.2　ヒト組織交差反応性試験 25
4.7.3　溶血性試験 25

4.7.4　免疫毒性 25

5　総括及び結論 26

参 考 文 献 30

表　目　次

表 1 - Aflibercept 単独投与時の in vivo 抗腫瘍効果 12

表 2 - Aflibercept と化学療法剤を併用したときの in vivo 抗腫瘍効果 13

表 3 - マウス及びラットに 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与、又はサルに 5 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの血清中遊離形 aflibercept の PK プロファイル（平均 ± 標準偏差） 15

表 4 - マウスに皮下投与したときの血清中遊離形 aflibercept の薬物動態（平均 ± 標準偏差） 16

表 5 - ラットに皮下投与したときの血清中遊離形 aflibercept の薬物動態（平均 ± 標準偏差） 16

表 6 - サルに皮下投与したときの血清中遊離形 aflibercept の薬物動態（平均 ± 標準偏差） 17

表 7 - 毒性試験プログラムの概要 19

表 8 - サルにおける主要標的器官及び NOAEL 又は LOAEL（標的器官の所見がみられた aflibercept の 最低用量）における遊離形 aflibercept の C_{max} 及び AUC 22

表 9 - 遊離形 aflibercept に基づく動物と癌患者の曝露量比較 23

表 10 - サルで検討した最低用量での曝露量と推奨臨床用量を投与した癌患者における曝露量との比較 .. 28

略号と用語の定義

ADA	抗薬物抗体（Anti-drug antibody）
ADCC	抗体依存性細胞傷害（Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）
adm	投与（Administration）
$AUC_{0-\infty}$	線形台形法により計算した投与後 0 時間から無限大時間まで外挿した血漿中（又は血清中）濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma (or serum) concentration time curve calculated by the linear trapezoidal rule and extrapolated to infinity）
AUC_{0-t}	線形台形法により計算した投与後 0 時間から t 時間までの血漿中（又は血清中）濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma (or serum) concentration time curve calculated by the linear trapezoidal rule from time 0 to time t）
BA	絶対バイオアベイラビリティ（Absolute bioavailability）
C_{max}	最高血漿中（又は血清中）濃度実測値（Maximum plasma (or serum) concentration observed）
CDC	補体依存性細胞傷害（Complement-dependent cytotoxicity）
CHO	チャイニーズハムスター卵巣（Chinese hamster ovary）
CL	血漿（又は血清）クリアランス（Plasma (or serum) clearance）
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）
F	雌（Female）
FSH	卵胞刺激ホルモン（Follicle stimulating hormone）
GD	妊娠後日数（Gestation day）
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good laboratory practice）
HUVEC	ヒト臍帯静脈内皮細胞（Human umbilical vein endothelium cells）
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonisation）
Ig	免疫グロブリン（Immunoglobulin）
K_D	平衡解離定数（Equilibrium dissociation constant）
kDa	キロダルトン（Kilodalton）
LH	黄体形成ホルモン（Luteinizing hormone）
LOAEL	最小毒性量（Lowest observable adverse effect level）
M	雄（Male）
n.c	算出せず（Not calculated）
NE	評価せず（Not evaluated）
NOAEL	無毒性量（No-observable adverse effect level）

NZW	ニュージーランドホワイト（New Zealand White）
PlGF	胎盤増殖因子（Placental growth factor）
PECAM	血小板内皮細胞接着分子（Platelet endothelial cell adhesion molecule）
PK	薬物動態（Pharmacokinetics）
SCID	重症複合免疫不全（Severe combined immunodeficiency）
SD	Sprague Dawley
t_{max}	最高血漿中（又は血清中）濃度到達時間（First time to reach C_{max}）
$t_{1/2}$	終末相半減期（Terminal half life）
VEGF	血管内皮増殖因子（Vascular endothelium growth factor）
VEGFR	血管内皮増殖因子受容体（Vascular endothelium growth factor receptor）
VEGF Trap	aflibercept
V_{ss}	定常状態における分布容積（Volume of distribution at steady-state）
W	週（Week）

1　非臨床試験計画概略

腫瘍を適応症とする臨床試験を実施するために必要なデータを収集し、癌患者の治療薬としての製造販売承認を得ることを目的として、aflibercept（AVE0005、VEGF Trap）の非臨床薬理、薬物動態（PK）及び毒性試験を計画した。毒性試験は、臨床投与法として2週間毎の4 mg/kg投与又は3週間毎の6 mg/kg投与の安全性が裏付けられるように設計した。この非臨床試験計画は、日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）S6 及びICH S9 ガイドライン に準拠している。

血管内皮増殖因子-A（VEGF-A、VEGF としても知られる）は、生理的及び病的の両方の血管新生に重要な役割を果たしている (1)。癌及びその他数種の疾患での病的な血管新生の促進における VEGF の役割については、詳細に検討されている (2)。Aflibercept は VEGF-A に結合し、VEGF-A と細胞表面に存在する VEGF 受容体との相互作用を阻害する。胎盤増殖因子（PlGF）及び VEGF-B を含む他の VEGF ファミリーメンバーにも aflibercept は結合する。その役割については、あまり知られていないが、PlGF は病的血管新生及び炎症細胞の動員に関与していると考えられている。VEGF とは対照的に、PlGF 及び VEGF-B はいずれも、成人の通常の血管形成及び生理的血管新生に不可欠なものではない。しかし、PlGF は、VEGF と同様に、腫瘍血管新生及び病的血管リモデリングに関与している。VEGF-B の役割はあまり知られていない (3) (4)。

Aflibercept は、ヒト VEGF 受容体-1（VEGFR-1）の第 2 Ig ドメインとヒト VEGFR-2 の第 3 Ig ドメインを融合し、さらにそれをヒト IgG1 の定常領域に融合することにより作製される (5)。本薬は分子量 [redacted] キロダルトン（kDa）の蛋白質ドメインを有する二量体糖蛋白質である。総分子量の約 [redacted] %は N-結合型オリゴ糖鎖の存在によるものであり、aflibercept ホモ二量体の総分子量は約 115 kDa である。遺伝子組換え蛋白質である aflibercept は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）K1 細胞に発現させた後、濾過及びクロマトグラフィー法を組み合わせて精製する。本薬の薬理活性について、in vitro 及び in vivo 評価が行なわれている。これらの試験は、P1GF を含む VEGF ファミリーに対する aflibercept の親和性を示した in vitro 結合試験から、動物モデルにおける生物学的活性を示した in vivo 試験まで多岐にわたる。In vitro 試験から、本薬の作用機序に関する情報も得られており、臨床で期待される効果が見られる可能性が裏付けられている。

In vitro 薬理試験として、VEGF-A 及び関連分子に対する aflibercept の結合親和性及び特異性を評価する試験、及びセルベースアッセイを用いて aflibercept の活性を評価する試験を実施した。次に、in vivo 試験として、様々な腫瘍を異種移植及び同種移植したマウスを用いて、aflibercept の腫瘍増殖抑制効果を評価する試験を実施した。In vitro 試験（[Module 2.6.2.2.1 項]）では、aflibercept がピコモル濃度の親和性でマウス、ラット、ウサギ及びヒトの VEGF-A、並びに関連する血管新生促進分子であるヒト VEGF-B、ヒト胎盤増殖因子-1（PlGF-1）、マウス及びヒト PlGF-2 に結合するが、主にリンパ管形成に関与するヒト VEGF-C 及び VEGF-D には結合しないことが示された (6)。また、セルベースアッセイにおいて、aflibercept は VEGF 依存性の受容体リン酸化及びその後のカルシウム動員を阻害したが、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性及び補体依存性細胞傷害（CDC）活性は示さなかった。したがって、aflibercept

は VEGF-A 及び恐らく VEGF-B や P1GF など他の VEGFR-1 リガンドとの結合及び捕捉を介してのみ機能すると考えられる。

Aflibercept は他の哺乳動物種の VEGF 及び P1GF にも、ヒト VEGF-A と同程度の親和性で結合することが明らかになったため、aflibercept の in vivo 活性を評価することを目的とした試験は担癌マウスを用いて実施した（[Module 2.6.2.2.2 項]）。さらに、薬理活性が得られる aflibercept の投与レジメン及び血中濃度を明らかにするとともに、VEGF が全身性に完全に阻害されたときに起こりうる影響の特定に役立つように、静脈内及び皮下投与経路による副次的薬理試験及び安全性薬理試験を、マウス、ラット及びウサギを用いて実施した。これらの非臨床薬理試験の結果から、aflibercept を全身性に投与することにより、腫瘍増殖及び腫瘍血管新生が効率的に阻害されることが示された。

Aflibercept の PK プロファイルは、マウス、ラット及びサルを用いて、単一の用量で単回静脈内投与、又は複数の用量で皮下投与して評価した。

Aflibercept の投与後、循環血中には 2 つの異なる形で aflibercept が検出された。すなわち、本来の形である遊離形 aflibercept と、遊離形 aflibercept がその標的リガンドである VEGF と結合して形成された VEGF：aflibercept 複合体（以下、結合形 aflibercept）である。結合形 aflibercept の血漿中濃度は、生物学的に利用可能な VEGF の大部分と結合して最高濃度付近に達するまで、aflibercept の用量の増加とともに上昇した。aflibercept の用量をさらに増加すると、血漿中の遊離形 aflibercept 濃度に用量依存的な上昇が認められたが、結合形 aflibercept 濃度の更なる上昇は小さいものにすぎなかった (7)。

Aflibercept の毒性プロファイルを、ラット（一般毒性試験及び安全性薬理試験）、サル（一般毒性試験及び受胎能）及びウサギ（生殖発生毒性試験及び局所刺激性試験）を用いて検討した。また、幼若動物における aflibercept の毒性を評価するため、性的に未成熟のサルを用いた試験を実施した。

Aflibercept の患者への投与は、大部分の臨床試験で静脈内投与により、少数の臨床試験で皮下投与により実施した。このため、サルを用いた 1 ヵ月間及び 3 ヵ月間反復投与毒性試験を、両方の投与経路で実施した。現在の適応症における aflibercept の投与法は点滴静脈内投与である。現在の適応症での予定投与経路（点滴静脈内投与）及び両投与経路による毒性プロファイルの類似性に基づき、サルを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験は静脈内投与経路のみで実施した。ラットを用いた単回投与毒性試験、ラットを用いた呼吸系に対する安全性薬理試験、ウサギを用いた血栓症及び創傷治癒試験、サル及びラットを用いた反復投与毒性試験、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験、ウサギを用いた局所刺激性試験並びにヒト組織交差反応性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従って実施した。別のいくつかの試験（免疫応答性及び免疫不全のマウス及びラットにおける毒性プロファイル、ラットを用いた単回静脈内投与毒性試験、非妊娠ウサギを用いた 14 日間反復投与毒性試験、妊娠ウサギを用いた用量設定試験、溶血に対する影響並びに高血圧及び腎機能に対する影響）は探索的試験であり、GLP に従って実施しなかったが、これらの試験の信頼性に影響を及ぼす可能性のある予期されない事態は認められなかった。In vivo 安全性薬理試験及び毒性試験で使用した aflibercept の製剤は、[redacted]%精製白糖及び[redacted]%ポリソルベート 20 又は [redacted]%精製白糖及び[redacted]%ポリソルベート 20 を含有する生理食塩液であった。臨床試験用製剤にも同じ添加剤が含まれている。患

者における点滴静脈内投与をサポートするため、静脈内投与は多くの場合、30 分間の点滴静脈内投与により実施した。

ここに報告した試験に加えて、aflibercept の別の適応症をサポートするため、硝子体内投与による毒性試験も実施した。また、sanofi-aventis が所有権を持つ抗血管剤（[redacted]）とのラットを用いた 2 つの併用投与試験（1 つは単回投与毒性試験、1 つは単回投与安全性薬理試験）も実施した。

2　薬理試験

2.1　効力を裏付ける試験

薬理試験には、aflibercept の結合特性及び活性を評価することを目的とした in vitro 試験に加えて、腫瘍増殖及び腫瘍血管新生に対する阻害作用を評価することを目的としたマウス腫瘍モデルを用いた in vivo 試験が含まれる（ [Module 2.6.3.2 項] 及び [Module 2.6.2.2 項]）。

2.1.1 Aflibercept の in vitro 活性評価

Aflibercept は in vitro でヒト VEGF-A、VEGF-B 及び PlGF-2 ホモ二量体に対して、それぞれ平衡解離定数（K_D）0.497 pmol/L、1.92 pmol/L 及び 38.8 pmol/L で結合した。Aflibercept は、分子量及び細胞外マトリックスへの結合能が異なる VEGF-A の様々なスプライシングアイソフォーム（VEGF-A_{121} 及び VEGF-A_{165}）に対して、同程度に高い親和性で結合した。Aflibercept はマウス、ラット及びウサギ VEGF、並びにマウス P1GF-2 に対して、対応するヒトサイトカインと同程度の高い親和性で結合した（[Module 2.6.2 表 1]）。単離したサル VEGF-A 及び PlGF に対する aflibercept の結合親和性は測定しなかったが、VEGF-A の配列はサルとヒトで全く同じであり、また、ヒト P1GF-2 のアミノ酸配列は、サル P1GF-2 と高い配列相同性が示されている。したがって、それぞれのサル及びヒトリガンドへの aflibercept の結合親和性は同等であると考えられる。予定されている臨床使用においては、PlGF に対する結合能も aflibercept の薬理活性に寄与する可能性がある。これは、他の VEGF 特異的阻害剤にはない特徴である。PlGF は様々な起源のヒト腫瘍に存在することが明らかになっており、腫瘍血管新生又は VEGF 特異的阻害剤に対する抵抗性に寄与している可能性がある (8)。

初代培養ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）モデルを用いた in vitro 試験において、aflibercept と VEGF-A のモル比が 1：1 以上になると、VEGF によって誘導される VEGFR-2 のリン酸化、カルシウムの動員及び増殖が完全に阻害されることが明らかになった。さらに、ラット大動脈輪モデルを用いた試験において、aflibercept は血管の分岐伸長を阻害した（[Module 2.6.2 表 2] ）。

Aflibercept は VEGF 及び他の VEGF ファミリーリガンドとの結合及び捕捉を介して、血管新生を阻害する。Aflibercept は、HUVEC 及び様々な腫瘍細胞株を用いた ex vivo 試験において CDC 及び ADCC 作用を示さなかった（[Module 2.6.2 表 2]）。

2.1.2 Aflibercept の in vivo 活性評価

マウス腫瘍モデルを用いた aflibercept の抗血管新生作用評価試験

数種の腫瘍（膵癌細胞株 RipTag2、神経膠腫細胞株 C6、膠芽腫細胞株 U87、腎細胞癌由来細胞株 786-0）を異種移植し、生着させたマウスに aflibercept を投与したとき、VEGF 阻害と一致して、腫瘍血管系の密度低下が認められた。これらの試験において、腫瘍血管系に対する aflibercept の作用は、血小板

内皮細胞接着分子（PECAM1 又は CD31）及びエンドグリン（CD105）を含む内皮細胞マーカーの組織学的分析により評価した（[Module 2.6.2 図 2]）。

一部の腫瘍は腹水を伴う。腫瘍関連の血管からの漏出液による腹水産生に VEGF が重要な役割を果たしていることから、腎癌細胞株 RENCA をマウスの腎臓に移植した腹水産生腫瘍モデルにおいて aflibercept を評価した。Aflibercept の 10 mg/kg 以上を投与することにより、腹水の産生が完全に抑制され、RENCA 腫瘍の増殖が阻害された（[Module 2.6.2.2.2.3 項]）。

Aflibercept による腫瘍血管の減少及び腫瘍血管からの漏出液の抑制は、in vivo において aflibercept が VEGF-A 及び他の VEGF ファミリーリガンドの受容体への結合を阻害することによるものと考えられる。

2 種類の腫瘍モデル（ラット神経膠腫細胞株 C6 及びヒト横紋筋肉腫細胞株 A673）を用いた用量反応試験を実施し、循環血中の非結合形（遊離形）aflibercept 濃度、結合形 aflibercept 濃度、及び腫瘍組織量に対する aflibercept の影響を同時に評価した。これらの試験において、aflibercept の用量が 2.5 mg/kg 以上になると、循環血中の結合形 aflibercept 濃度が約 1 µg/mL でプラトーに達することが明らかになった。循環血中の遊離形 aflibercept 濃度が結合形 aflibercept 濃度を上回った時点で、aflibercept は有効量に達した。神経膠腫細胞株 C6 のような一部の腫瘍モデルでは、循環血中の遊離形 aflibercept 濃度が結合形濃度をわずかに上回る程度で aflibercept の最小有効量に達するが（用量 1 mg/kg 以上）、A673 腫瘍のような他の腫瘍モデルでは、循環血中の遊離形 aflibercept 濃度が結合形 aflibercept 濃度の 73～164 倍になる用量 10 mg/kg 以上で活性が認められた（[Module 2.6.2.2.2.2 項]）。

- ***Aflibercept 単独投与時の抗腫瘍効果***

免疫不全マウス及び免疫機能が正常なマウスに様々な腫瘍を異種移植及び同種移植したモデルにおいて、aflibercept は広範な抗腫瘍効果スペクトルを示した。数種の結腸癌細胞株を移植したマウスに aflibercept を投与したとき、特に C51、HCT 116、COLO 205 及び HT-29 移植モデルにおいて腫瘍増殖が抑制された。また、aflibercept は NCI-H460、A549 及び SHP-77 などの肺癌細胞移植モデルでの腫瘍増殖も抑制した。さらに、前立腺癌、膵癌、卵巣癌、胃癌、乳癌、小児癌、黒色腫、神経芽腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫及びリンパ腫移植モデルでの腫瘍増殖に対しても、aflibercept は抑制作用を示した。Aflibercept は検討した 30 種類の腫瘍のうち 25 種類の増殖を遅延させた（log cell kill 値 > 0.7、表 1参照）。2.5～40 mg/kg の範囲で aflibercept の腫瘍増殖抑制効果に用量依存性が認められ、対応する治療係数（最大有効量（多くの場合は最大無毒性用量又は試験最大用量）を最小有効量で割ることにより算出した比）は 16 以上であった。

表 1 - Aflibercept 単独投与時の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍の種類	腫瘍モデル	腫瘍増殖遅延（T-C）*（日）	log cell kill 値*
卵巣癌	進行期 SK-OV-3	46.3	4.2
	進行期 A2780	13.2	2.3
	進行期 OVCAR-3	44.5	2.0
黒色腫	早期 B16	19.8	5.4
	進行期 B16	8.6	2.6
	進行期 A375	6.2	1.2
	進行期 LOX	5.2	0.6
前立腺癌	進行期 DU 145	54.6	4.7
	進行期 PC-3	3.6	0.3
乳癌	進行期 UISO BCA-1	29.9	2.1
	早期 MA13/C	12.7	1.4
膵癌	早期 BxPC3	38.1	1.9
	進行期 BxPC3	25.8	1.3
	進行期 PANC-1	2.9	0.4
胃癌	進行期 MKN-45	38.2	2.8
	進行期 Hs746T	4.1	1.1
	進行期 SNU-5	26.8	2.4
結腸癌	早期 C51	20.7	4.2
	進行期 C51	7.9	2.0
	進行期 HT-29	27.2	2.2
	進行期 COLO 205	27.4	1.6
	早期 HCT 116	25.2	2.5
	進行期 HCT 116	22.1	1.6
肺癌	進行期 NCI-H460	17.0	3.4
	進行期 A549	19.3	1.7
	進行期 SHP-77	41.1	4.3
神経芽細胞腫	進行期 SK-N-MC	36.6	2.5
	進行期 SK-N-AS	26.7	0.6
横紋筋肉腫	進行期 RH-30	23.7	2.0
ユーイング肉腫	進行期 TC-71	19.6	3.7
	進行期 SK-ES-1	25.5	3.2
線維肉腫	進行期 HT-1080	2.4	0.2
リンパ腫	進行期 NAMALWA	12.7	2.3
	進行期 WSU-DLCL2	13.3	2.0

Aflibercept の log cell kill 値が 0.7 未満であった場合、不活性であり、log cell kill 値が 2.8 を超えた場合、活性が高いと判断した。

* 40 mg/kg 投与時の活性（ [Module 2.6.2.2.2.5 項]）。

マウス腫瘍モデルで活性が認められる用量の aflibercept を投与した時、血清中の結合形 aflibercept 濃度は約 2 µg/mL でプラトーに達し、これに対応する遊離形 aflibercept 濃度は結合形 aflibercept 濃度を上回っていた。

- ***Aflibercept と化学療法剤との併用投与時の抗腫瘍効果***

癌患者を治療する際、抗血管新生薬は化学療法剤と併用投与されることから、マウス腫瘍モデルを用いて、様々な化学療法剤と aflibercept の併用投与について検討した。マウス腫瘍モデルにおいて、40 mg/kg 週 2 回投与までの aflibercept とオキサリプラチン、5-フルオロウラシル、イリノテカン、パクリタキセル及びドセタキセルを併用投与したとき、相乗的抗腫瘍効果又は抗腫瘍効果の増強が認められた（表 2）。しかし、aflibercept と化学療法剤を併用投与しても、毒性（体重減少及び他のマウスの健康指標の悪化）の増強は、ドセタキセルとの併用投与を除き、見られなかった。Aflibercept と化学療法剤を併用したときの抗腫瘍効果を要約して表 2に示す。

表 2 - Aflibercept と化学療法剤を併用したときの in vivo 抗腫瘍効果

併用薬（＋aflibercept）	マウスに移植した腫瘍	併用時の結果
オキサリプラチン	マウス結腸腺癌細胞株 C51	相乗効果
5-フルオロウラシル	マウス乳腺癌細胞株 MA13/C	相乗効果
ドセタキセル	マウス黒色腫細胞株 B16	効果の増強あり
イリノテカン	ヒト結腸癌細胞株 HCT 116	相乗効果
パクリタキセル	ヒト卵巣腺癌細胞株 OVCAR-3	効果の増強あり

等毒性用量の単独投与と比較して、併用投与により log cell kill 値が増加し、その差が 1 未満である場合を効果の増強あり、1 以上の場合を相乗効果ありと判断した。

2.2　安全性薬理試験

安全薬理試験のデータは、概要表（[Module 2.6.3.4 項]）及び概要文（[Module 2.6.2.4 項]）に要約して示す。

本薬の安全性薬理プロファイルは、VEGF 経路の阻害に関連する正常組織の血管密度、血圧、創傷修復及び治癒に対する影響など、よく知られたクラス効果に限られる。

マウスに用量 2.5 mg/kg 以上の aflibercept を週 2 回 2～4 週間皮下投与したとき、肝臓、膵島及び甲状腺濾胞内の微小血管密度が低下するとともに、これより程度は小さいが、下垂体及び脂肪組織でも血管密度が低下した。この微小血管密度の低下に伴って、これらの組織の機能に変化が生じるかどうかは不明である。

マウス及びラットに薬理学的モデルにおける有効量に比べて低い用量（ラットで用量 0.5 mg/kg 以上、マウスで用量 2.5 mg/kg 以上）の aflibercept を単回皮下投与したとき、血圧が中等度かつ持続的に上昇したが、可逆的なものであった。この血圧上昇持続時間に用量依存性が認められ、最大の血圧変

化はラットで 10 mg/kg 以上、マウスで 2.5 mg/kg 以上を投与したときのみに認められた。ラットにおいて、アンジオテンシン変換酵素阻害、カルシウムチャネル遮断、αアドレナリン受容体拮抗又は一酸化窒素供与によって効果を発揮する一般的な降圧剤は、aflibercept によって誘発された血圧上昇を効果的に緩和した。

ウサギ切除及び切開モデルに aflibercept を静脈内投与したとき、薬理学的モデルにおける有効量に比べて低用量である 0.3 mg/kg 以上で創傷修復及び治癒が用量依存的に阻害された。しかし、最大創傷治癒阻害が認められたのは、投与間隔全体を通して、遊離形 aflibercept 濃度が結合形濃度を上回る用量 3 及び 30 mg/kg 投与時のみであった。この影響が完全に回復するかどうかについては検討しなかった。

毒性試験で得られた結果から、aflibercept は中枢神経系及び心血管系機能に重大な影響を及ぼさないことが明らかになった。ラットの呼吸機能及びウサギの血栓形成に対して aflibercept は影響を及ぼさなかった。

3　薬物動態試験

予定臨床投与経路（静脈内投与）に加えて、非臨床毒性試験及び薬効薬理試験において使用された投与方法を支持するため、マウス、ラット及びカニクイザルに単回静脈内及び皮下投与したときの遊離形 aflibercept の PK プロファイルを評価した（[Module 2.6.4 1 項] 及び[Module 2.6.5 表 2.6.5.1]）。ピボタルな毒性試験で測定された aflibercept の曝露量については、毒性試験の概要表に記載した（[Module 2.6.7 表 2.6.7.2]）。Aflibercept は ICH S6 ガイダンスに該当する融合蛋白質であることから、代謝試験は実施しなかった。

3.1　マウス、ラット及びサルにおける静脈内及び皮下投与後の薬物動態

マウス、ラット及びサルに静脈内投与したとき、遊離形 aflibercept は複数コンパートメントの PK プロファイルを示した。消失は遅く、定常状態における分布容積（V_{ss}）は中央コンパートメントの分布容積よりわずかに大きかった（[Module 2.6.4 3 項]）。

表 3 - マウス及びラットに 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与、又はサルに 5 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの血清中遊離形 aflibercept の PK プロファイル（平均 ± 標準偏差）

種	マウス	ラット	サル
動物数（雄／雌）	9 (5/4)	9 (5/4)	6 (3/3)
用量 (mg/kg)	1	1	5
C_{max} (µg/mL)	19.5 ± 2.6	20.8 ± 2.4	181.7 ± 46.4
$AUC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	306 ± 40	463 ± 65	10235 ± 1532
$t_{1/2}$ (h)	48 ± 7	54 ± 9	98 ± 31
CL (mL/h/kg)	3.31 ± 0.43	2.21 ± 0.34	0.50 ± 0.07
V_{ss} (mL/kg)	77 ± 14	51 ± 7	62 ± 11

Aflibercept の皮下投与時のバイオアベイラビリティはマウス（94%）及びサル（85%）では良好であり、ラット（33%）では中程度であった。マウスに 0.5～25 mg/kg の用量で皮下投与、並びにラット及びサルに 0.75～15 mg/kg の用量で皮下投与したとき、標的分子を介した PK の特徴である、明らかなクリアランスの飽和による非線形の PK プロファイルが認められた。これにより、高用量の aflibercept では $t_{1/2}$ が遅延し、曝露量は用量比例性を上回って増加した（表 4、表 5、表 6）。

非線形の PK プロファイルは、aflibercept の全身クリアランスが飽和することを示唆しており、この要素は、内因性 VEGF に遊離形 aflibercept が結合することにより、遊離形 aflibercept よりも $t_{1/2}$ が長い結合形 aflibercept が形成されるためと考えられる。遊離形 aflibercept と VEGF との結合が飽和に達し

ない低い用量では、比較的早い遊離形 aflibercept のクリアランスに結合形 aflibercept の形成が加わることにより、遊離形 aflibercept の消失が速くなると考えられる。

表 4 - マウスに皮下投与したときの血清中遊離形 aflibercept の薬物動態（平均 ± 標準偏差）

系統	**CD1**	**SCID**	**SCID**	**SCID**	**SCID**	**SCID**
動物数（雄／雌）	**10 (5/5)**	**6 (6/0)**	**6 (6/0)**	**6 (6/0)**	**6 (6/0)**	**6 (6/0)**
用量 (mg/kg)	**1**	**0.5**	**1**	**2.5**	**10**	**25**
C_{max} (µg/mL)	6.2 ± 1.6	3.10 ± 1.61	4.50 ± 0.79	11.7 ± 2.19	81.96± 49.4	169 ± 16
t_{max} (h)	24 ± 0	19± 9	19± 9	19± 9	24± 0	24± 0
$AUC_{0-\infty}$ (µg･h/mL)	288 ± 66	190 ± 108	286 ± 50	989 ± 166	8817 ± 4789	22623 ± 2808
$AUC_{0-\infty}$/用量	288	380	286	396	882	905
$t_{1/2}$ (h)	41 ± 5	33 ± 3	25 ± 3	26 ± 8	61 ± 3	62 ± 4
BA (%)	94	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

略号：n.c.：算出せず

表 5 - ラットに皮下投与したときの血清中遊離形 aflibercept の薬物動態（平均 ± 標準偏差）

動物数（雄／雌）	**10 (5/5)**	**10 (5/5)**	**10 (5/5)**	**9 (4/5)**	**10 (5/5)**
用量 (mg/kg)	**0.75**	**1**	**1.5**	**5**	**15**
C_{max} (µg/mL)	1.9 ± 0.5	2.7 ± 1.0	4.6 ± 1.7	25.8 ± 8.3	46.6 ± 15.2
t_{max} (h)	29 ± 10	24 ± 0	36 ± 17	45 ± 8	38 ± 12
$AUC_{0-\infty}$ (µg･h/mL)	114 ± 31	154 ± 48	345 ± 88	2482 ± 676	6024 ± 1975
$AUC_{0-\infty}$/用量	152	154	230	496	402
$t_{1/2}$ (h)	46 ± 10	45 ± 8	32 ± 5	43 ± 9	50 ± 16
BA (%)	n.c.	33	n.c.	n.c.	n.c.

略号：n.c.：算出せず

表 6 - サルに皮下投与したときの血清中遊離形 aflibercept の薬物動態（平均 ± 標準偏差）

動物数（雄／雌）	**6 (3/3)**	**6 (3/3)**	**6 (3/3)**	**6 (3/3)**
用量 (mg/kg)	**0.75**	**1.5**	**5**	**15**
C_{max} (µg/mL)	3.7 ± 2.0	6.5 ± 2.6	36.2 ± 13.0	101 ± 20.8
t_{max} (h)	39 ± 25	64 ± 29	40 ± 28	32 ± 24
$AUC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	511 ± 217	1089 ± 389	8704 ± 2584	24379 ± 5207
$AUC_{0-\infty}$/用量	681	726	1740	1630
$t_{1/2}$ (h)	55 ± 18	45 ± 10	118 ± 19	101 ± 39
BA (%)	n.c.	n.c.	85	n.c.

略号：n.c.：算出せず

3.2　ラットに静脈内投与後の分布

雌の Sprague Dawley（SD）ラットに ^{125}I 標識-aflibercept を静脈内投与し血清中及び組織中における総放射能を評価した（[Module 2.6.4 4.1 項]）。また、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を用いて、血清中の遊離形 aflibercept 濃度も測定した。このとき、血清中の総放射能の PK プロファイルは遊離形 aflibercept の PK プロファイルと一致しなかった。投与後 5 分では総投与放射能の約 75%が血清中に認められ、投与後 24 時間では、血清中の放射能は投与量の 12.3%まで減少した。投与後 168 時間には、血清中に残存する放射能は総投与放射能の 0.76%のみとなった。組織内放射能はクリアランスに関わる臓器及びその他の血流量の多い組織で最も高く、肝臓（11.4%）、腎臓（1.33%）、脾臓（0.42%）、肺（0.34%）及び心臓（0.19%）の順であった。小腸、大腸、脂肪、筋肉及び甲状腺における放射能は、総投与放射能の 0.05%未満であった。血清中放射能の減少と一致して組織内放射能も減少し、投与後 168 時間には、肝臓で検出される放射能は総投与放射能の 0.16%のみとなった。これらの結果から、^{125}I 標識-aflibercept の分布は大部分が循環血中に限定され、組織内で著しく蓄積する可能性は低いことが示唆される。

3.3　ラットに静脈内投与後の腎排泄

Aflibercept が腎排泄される可能性について評価するため、腎摘出雌ラット及びシャムオペ雌ラットに aflibercept1 mg/kg を単回静脈内投与し、血清中 aflibercept 濃度を投与後 10 時間にわたって連続的に測定した（[Module 2.6.4 6 項]）。Aflibercept の曝露量に関する主な指標（C_{max}、t_{max}、AUC 及び $t_{1/2}$）について比較した結果、腎摘出ラット及びシャムオペ対照動物との間に明白な差はないことが示された。このことから、aflibercept の腎排泄はわずかであることが示唆された。

4　毒性試験

癌患者を対象とした aflibercept の臨床使用をサポートするため、包括的な非臨床毒性試験プログラムを実施した（2.6.7 [TS 2.6.7.1] 及び 2.6.6 [1 項] 参照）。毒性試験の範囲及び程度を表 7に示す。

Aflibercept は、マウス、ラット及びウサギの VEGF 並びにマウスの P1GF-2 に対して、対応するヒトサイトカインと同程度の高い親和性で結合する。さらに、ヒトとサルの VEGF はアミノ酸配列が同じであるため、これらの動物種は毒性試験に適切と考えられた。予定臨床投与経路に基づき、このプログラムでは、aflibercept の全身投与（静脈内又は皮下経路）による一般毒性試験及び生殖発生毒性試験を実施した。反復投与毒性試験では、トキシコキネティクス解析並びに変化の回復性、進行又は遅発性の検討も行った。一般毒性試験プログラムとして、静脈内経路によるラットの単回投与毒性試験、皮下経路によるマウス及び／又はラットの 4～13 週間反復投与毒性試験並びにカニクイザルを用いた週 1 回静脈内投与による 4～27 週間反復投与毒性試験及び週 2～3 回皮下投与による 4～13 週間反復投与毒性試験を実施した。Aflibercept の安全性評価の一環として、性成熟したサルを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験及び幼若サルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験を実施した。また、受胎能に対する aflibercept の影響を評価するため、性成熟したサルを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験において、いくつかの受胎能パラメータ（ホルモン濃度、膣出血、精子分析及び生殖器官の病理組織学的検査）を検討した。Aflibercept の生殖発生毒性を評価するため、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験を実施した。

非臨床毒性試験プログラムを表 7に示す。

表 7 - 毒性試験プログラムの概要

動物種（系統）	投与方法	投与期間	用量 (mg/kg/回)	試験番号 [記載箇所]
単回投与毒性試験				
ラット（SD）	30 分間点滴静脈内投与	単回投与	0、150、500	TXP0166 [TS 2.6.7.5]
ラット（SD）	30 分間点滴静脈内投与	単回投与	0、50、150、500	TXA1004 [TS 2.6.7.5]
反復投与毒性試験				
マウス（CD-1）	週 3 回皮下	4 週間	0、10、15	PK01017 [TS 2.6.7.6]
マウス（SCID）	週 2 回皮下	4 又は 8 週間	0、2.5、25	VGT3 [TS 2.6.7.6]
ラット（SD）	週 3 回皮下	4 週間	0、10、15	PK01027 [TS 2.6.7.6]
ラット（SD）	週 3 回皮下	4 週間	0、2、5	PK01034 [TS 2.6.7.6]
ラット（SD）	週 3 回皮下	4 週間	0、0.5、1	PK01042 [TS 2.6.7.6]
ラット（ヌード）	週 2 回皮下	4 又は 8 週間	0、25	PK01032 [TS 2.6.7.6]
ラット（SD）	週 3 回皮下	4 又は 13 週間	0、0.1、0.5、1、2	0470RR20-001 [TS 2.6.7.7A]
サル（カニクイ）	週 1 回静脈内	4 週間	0、2、10、30	[redacted]223.11 [TS 2.6.7.7B]
サル（カニクイ）	週 1 回静脈内	13 週間	0、3、10、30	[redacted]223.18 [TS 2.6.7.7C]
サル（カニクイ）	静脈内 最初の 15 週間は週 1 回、その後は 2 週に 1 回	27 週間	0、3、10、30	670145 [TS 2.6.7.7D]
サル（カニクイ）	週 3 回皮下	4 週間	0、1.5、5、15	[redacted]223.4 [TS 2.6.7.7E]
サル（カニクイ）	週 2 回皮下	13 週間	0、1.5、5、15、30	[redacted]223.09 [TS 2.6.7.7F]

表 7 – 毒性試験プログラムの概要（続き）

動物種（系統）	投与方法	投与期間	用量 (mg/kg/回)	試験番号 [記載箇所]
受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験				
サル（カニクイ）	静脈内 最初の 15 週間は週 1 回、その後は 2 週に 1 回	27 週間	0、3、10、30	670145 [TS 2.6.7.12A]
胚・胎児発生に関する試験				
ウサギ（NZW）	静脈内	2 週間	0、15、30、45	DSE 20[redacted]-0569 - DIV0953 [TS 2.6.7.11A]
ウサギ（NZW）	静脈内	妊娠 6、9、12、15 及び 18 日	0、3、15、45	TEP0184 [TS 2.6.7.11B]
ウサギ（NZW）	静脈内	妊娠 6、9、12、15 及び 18 日	0、3、15、60	TER0506 [TS 2.6.7.13A]
幼若動物を用いた試験				
サル（カニクイ）	静脈内 週 1 回	13 週間	0、0.5、3、30	670144 [TS 2.6.7.15]
局所刺激性試験				
ウサギ（NZW）	静脈内、筋肉内、皮下	-	24.4、25、100 mg/mL	DSE 20[redacted]-0387 (TOL1079) [TS 2.6.7.16]
ヒト組織交差反応性試験				
ヒト組織	In vitro	-	5.0、25.0 µg/mL	[redacted]01-141 [TS 2.6.7.17A]
溶血性及び凝集性試験				
サル血液	In vitro	-	0.69、2.09、4.17 mg/mL	HEM-No1 [TS 2.6.7.17B]
ヒト血液	In vitro	-	0.5、2.0、4.0 mg/mL	HEM-No3 [TS 2.6.7.17C]
ヒト血液	In vitro	-	8.0 mg/mL	HEM-No5 [TS 2.6.7.17D]

略語： -：該当せず

4.1　単回投与毒性試験

Aflibercept の単回投与毒性試験を、SD ラットを用いて静脈内投与により実施した。500 mg/kg までの用量での単回投与による死亡及び用量制限毒性は認められなかった。したがって、急性過量投与により重度の全身作用が発現する可能性は低いものと考えられる（2.6.6、[2 項] 参照）。

4.2　反復投与毒性試験

Aflibercept の短期及び長期反復投与毒性試験を、最も適切な動物種であるカニクイザルを用いて、臨床で使用される全身投与経路により実施した。包括的な反復静脈内及び皮下投与毒性試験を、マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザルを用いて実施した（2.6.6、[3 項] 参照）。マウス及びラットでは抗 aflibercept 抗体反応に関連した糸球体腎炎がみられたため、長期反復投与毒性試験には適切ではないと考えられた。抗 aflibercept 抗体反応の一部は、げっ歯類のヒトの分子に対する動物種間交差免疫応答に起因するものであった。このため、全身性安全性評価のための主要な動物種として、カニクイザルを使用した。Aflibercept を、4～27 週間の投与期間の範囲で週 1～3 回投与した。これらの試験における静脈内及び皮下投与後の遊離形 aflibercept 曝露量でみられた毒性の多くは、aflibercept の薬理作用に関連したものであり、同じ経路を標的とする他の薬物（VEGF 阻害剤）でも同様に認められている。これらの試験で確認された標的器官は、骨（長骨の成長板成熟障害及び椎骨の骨軟骨性外骨腫）、腎臓（高頻度の糸球体メサンギウム基質増加、散発的な壁側上皮過形成及び糸球体周囲線維化）、副腎（束状帯の好酸性化を伴う空胞形成減少）、卵巣（成熟卵胞数、顆粒膜細胞数及び／又は莢膜細胞数の減少）及び鼻腔（壊死性炎症を伴う中隔及び／又は鼻甲介の萎縮／喪失並びに他の様々な上皮、微小血管、軟骨及び骨の所見）などであった。6 ヵ月間反復投与毒性試験でみられたその他の病理組織学的所見（2.6.6、[3.2.1.3 項] 参照）には、脈絡叢及び消化管の血管変化、心臓を含むいくつかの組織の血管変性及び線維化並びに肝臓の門脈炎症及び門脈周囲壊死が含まれる。上記の標的器官及び毒性所見を表 8に要約する。

実施した反復皮下及び静脈内投与毒性試験において、動脈血圧又は心電活性の明らかな変化は認められなかった。しかし、テレメーターを装着したげっ歯類に aflibercept の薬理活性発現用量を投与したところ、血圧上昇が検出された（2.6.2、[4.2 項] 参照）。さらに、VEGF/VEGFR シグナル伝達は、ヒトにおいて血圧ホメオスタシスを調節する役割を果たすことが知られており、また VEGF 阻害剤は、クラスとして、薬理活性用量での全身投与により血圧を上昇させることが知られている (9)、(10)。

全体として、静脈内又は皮下投与による無毒性量は設定できなかった。動物で所見がみられた最低用量での遊離 aflibercept の平均 C_{max} 及び AUC（異なる投与スケジュールを考慮して補正した）と、癌患者に 4 mg/kg（2 週に 1 回投与）又は 6 mg/kg（3 週に 1 回投与）の用量で初回投与したときの曝露量との曝露量比を表 9に示す。

表 8 - サルにおける主要標的器官及び NOAEL 又は LOAEL（標的器官の所見がみられた aflibercept の最低用量）における遊離形 aflibercept の C_{max} 及び AUC

変化がみられた組織		性的に未成熟のサルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験 [a]	性成熟したサルを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験 [b]
骨	NOAEL[c]/LOAEL[d]	0.5 mg/kg/回	3 mg/kg/回
	C_{max} (µg/mL)	8.8	94.2
	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg･day/mL)	16.5	174
鼻腔	LOAEL	0.5 mg/kg/回	3 mg/kg/回
	C_{max} (µg/mL)	8.8	94.2
	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg･day/mL)	16.5	174
腎、副腎	NOAEL[c]/LOAEL[d]	0.5 mg/kg/回	3 mg/kg/回
	C_{max} (µg/mL)	8.8	94.2
	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg･day/mL)	16.5	174
雌の生殖器系	LOAEL	0.5 mg/kg/回	3 mg/kg/回
	C_{max} (µg/mL)	8.8	94.2
	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg･day/mL)	16.5	174
雄の生殖パラメータ	LOAEL	NE	3 mg/kg/回
	C_{max} (µg/mL)		94.2
	$AUC_{0\text{-}168h}$(µg･day/mL)		174
肝酵素増加	NOAEL[c]/LOAEL[d]	3 mg/kg/回	3 mg/kg/回
	C_{max} (µg/mL)	72.2	94.2
	$AUC_{0\text{-}168h}$ µg･day/mL)	174	174
限局性血管増生/変性（種々の組織）	NOAEL	3 mg/kg/回	3 mg/kg/回
	C_{max} (µg/mL)	72.2	94.2
	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg･day/mL)	174	174

略語：NOAEL：無毒性量；LOAEL：最小毒性量；C_{max}：最高血漿中濃度；$AUC_{0\text{-}168h}$：台形法による 0 時間から 168 時間までの血漿中濃度ー時間曲線下面積；NE：評価せず

[a] 3 ヵ月間反復投与毒性試験では、1、5、9 及び 13 回の週 1 回投与後に得られた C_{max} 及び AUC 値を平均した。

[b] 6 ヵ月間反復投与毒性試験では、27 週間の投与期間中に得られたすべての C_{max} 値を平均し、$AUC_{0\text{-}168h}$ 値については、最初の 15 週間における週 1 回投与及び残りの 12 週間における 2 週に 1 回投与を考慮して、27 週間の投与期間全体での平均値を求めた。

[c] 性的に未成熟なサルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験における NOAEL

[d] 性成熟したサルを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験における LOAEL

表 9 - 遊離形 aflibercept に基づく動物と癌患者の曝露量比較

試験の種類/投与レジメン及び試験番号	用量	比率 [a]
ヒト		
癌患者における薬物動態 4 mg/kg での 2 週に 1 回投与 [TCD10794 試験]	**4 mg/kg**	NA
C_{max} (µg/mL) [b]	72.7	NA
AUC_{last} (µg.day/mL) [b]	269	NA
カニクイザル		
6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験 最初の 15 週間は週 1 回投与、残りの 12 週間は 2 週に 1 回投与（670145 試験 [TS 2.6.7.7D]）	**最小毒性量** [e] **3 mg/kg**	NA
C_{max} [c, d] **(µg/mL)**	94.2	1.30
$AUC_{0\text{-}168h}$ [d] **(µg.day/mL)**	348 (174 × 2)	1.29
幼若動物を用いた 3 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験 週 1 回、3 ヵ月間投与（670144 試験 [TS 2.6.7.15]）	**最小毒性量** [e] **0.5 mg/kg**	NA
C_{max} [c, f] **(µg/mL)**	8.8	0.12
$AUC_{0\text{-}168h}$ [f] **(µg.day/mL)**	33 (16.5 × 2)	0.12

略語：AUC：血中濃度ー時間曲線下面積；C_{max}：最高血中濃度； NA：該当せず
T_{max}：最高血中濃度到達時間

[a] 曝露量比 = 非臨床毒性試験の C_{max} 又は AUC 値を、表に示した用量及びレジメンでのヒトにおける C_{max} 又は AUC 推定値で除した値

[b] 表に記載した C_{max} 及び AUC_{last} 値は、患者への初回投与後に算出した。

[c] C_{max} は点滴静脈内投与終了 5 分後の T_{max} で認められた。

[d] 27 週間の投与期間中にサルで得られたすべての C_{max} 値を平均した。最初の 15 週間は週 1 回投与、残りの 12 週間は 2 週に 1 回投与したことを考慮にいれ、27 週間の投与期間中にサルで得られたすべての $AUC_{0\text{-}168h}$ 値を平均した。その後、算出した $AUC_{0\text{-}168h}$ 値を 2 倍し、日本人癌患者を対象に 4 mg/kg で 2 週に 1 回投与したときと比較した曝露量比の算出ができるようにした。

[e] この試験では無毒性量を設定できなかったため、用量を最小毒性量として表示した。

[f] サルに週 1 回投与を 1､5､9 及び 13 回実施したときの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}168h}$ 値を平均した。その後､算出した $AUC_{0\text{-}168h}$ 値を 2 倍し、日本人癌患者を対象に 4 mg/kg で 2 週に 1 回投与したときと比較した曝露量比の算出ができるようにした。

4.3　遺伝毒性試験

ICH ガイドライン S6 及び S9 に従い、遺伝毒性試験は実施しなかった。Aflibercept は高分子であるため、本薬と DNA や他の染色体物質との直接の相互作用はないと予想される。

4.4　がん原性試験

がん原性試験は実施しなかった。

4.5　生殖発生毒性試験

受胎能の評価を、性成熟したカニクイザルを用いた 6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験（2.6.6、[6.1 項] 参照）の一環として実施した。この試験では、aflibercept の 3、10、30 mg/kg/回での点滴静脈内投与（30 分間）を週 1 回 15 週間行った後、残りの 12 週間は 2 週に 1 回行った。雌における生殖ホルモン値の変化（卵巣ホルモン［エストラジオール、プロゲステロン及びインヒビン B］の大幅な減少及び FSH 値の増加）を伴う月経消失又は不規則な月経が、すべての用量で雌サルに認められた。さらに、aflibercept に依存した卵巣重量の変化に伴って、黄体発達障害及び成熟卵胞減少が観察された。本試験では、いずれの用量又は時点においても、被験物質に関連した雄の生殖ホルモン値（FSH、LH 及びテストステロン）の変化はみられなかった。精子運動能低下及び精子異常の増加が投与期間中にすべての用量で観察されたが、5 週間の休薬期間により完全に回復した。受胎能パラメータへの aflibercept の影響に関する無毒性量は設定できなかった。最小毒性量の 3 mg/kg/回での平均 C_{max} 及び AUC（異なる投与スケジュールを考慮して補正した）に基づく曝露量比は、癌患者に 4 mg/kg の用量で初回静脈内投与したときの対応する値（TED6115/TED6116 試験）と比較すると、それぞれ 0.97 及び 1.19 であり、癌患者に 6 mg/kg の用量で初回静脈内投与したときの対応する値（TCD6120 試験）と比較すると、それぞれ 0.80 及び 1.13 であった（表 9）。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験において、交尾確認された雌のニュージーランドホワイトウサギに、aflibercept を 3、15、60 mg/kg/回で、妊娠 6、9、12、15、18 日に 1 日 1 回点滴静脈内投与（30 分間）した。3 mg/kg/回以上で、用量に関連した胎児吸収増加、妊娠中断及び多数の胎児奇形（外表、内臓及び骨格）が観察された。母動物の無毒性量は 3 mg/kg/回、発生に関する無毒性量は 3 mg/kg/回未満と判断された。

Aflibercept を、ヒト用量である 4 mg/kg（2 週に 1 回投与）の約 1～15 倍及び 6 mg/kg（3 週に 1 回投与）の 0.5～10 倍の用量で、妊娠ウサギの器官形成期（妊娠 6～18 日）に 3 日に 1 回静脈内投与すると、胚毒性及び催奇形性が認められた。したがって、妊娠期における aflibercept の投与は、潜在的ベネフィットが胎児への潜在的リスクを上回る場合でない限り推奨されない。妊娠可能な女性は、投与中効果的な避妊法を使用しなければならない。

4.6　幼若サルにおける試験

若齢で骨格が未成熟のカニクイザル（特徴として成長板が開いている）を用いた aflibercept の週 1 回点滴静脈内投与による 13 週間反復静脈内投与毒性試験において、VEGF シグナル伝達阻害剤での既知の所見に基づいて予測される骨格系の変化が観察された（2.6.6、[6.4 項] 参照）。所見が、骨（3 mg/kg/日以上における主に椎弓の骨軟骨性外骨腫、椎弓に沿った被覆する中軸筋肉系の筋線維萎縮又は外骨腫に隣接した微小血管系の増生／変性）、腎臓（糸球体係蹄の好酸性基質増加並びに皮質及び髄質の尿細管の拡張及び蛋白円柱を伴った糸球体症）、卵巣（成熟卵胞、顆粒膜細胞及び莢膜細胞の減少）及び副腎（皮質束状帯の好酸性増加を伴う空胞形成減少）にみられ、全身性の血管増生／変性が種々の組織で観察された。いずれの所見も 5 ヵ月後には完全又は部分的に回復した。部分的に可逆的な変化が、鼻腔（すべての用量で鼻粘膜上皮変性がみられ、鼻甲介の破骨細胞による吸収に進行した）、

脳（すべての用量での脈絡叢における泡沫状細胞質変性を伴ったマクロファージ浸潤）及び肝臓（高用量群の 1 例における門脈周囲壊死及び炎症並びにそれに伴って高用量群の数例にみられた肝酵素値増加）で観察された。無毒性量は設定できなかった。上記の主要標的器官及び無毒性量又は LOAEL 及び PK パラメータを表 8に要約する。

最小毒性量の 0.5 mg/kg/回での遊離 aflibercept の平均 C_{max} 及び AUC（異なる投与スケジュールを考慮して補正した）に基づく曝露量比は、癌患者に 4 mg/kg の用量で初回静脈内投与したときの対応する値（TED6115/TED6116 試験）と比較すると、それぞれ 0.09 及び 0.11 であり、癌患者に 6 mg/kg の用量で初回静脈内投与したときの対応する値（TCD6120 試験）と比較すると、それぞれ 0.07 及び 0.11 であった（表 9）。

4.7　その他の毒性試験

4.7.1　局所刺激性試験

Aflibercept をウサギに単回静脈内、筋肉内及び皮下注射したときの局所忍容性は良好であった。

4.7.2　ヒト組織交差反応性試験

Aflibercept は、検討した 33 のヒト組織のいずれに対しても、交差反応を示さなかった。

4.7.3　溶血性試験

サル及びヒトのヘパリン処理した全血、血清及び血漿と、動物の毒性試験及び臨床診療で使用した濃度を含めた aflibercept 溶液と混合したところ、溶血及び蛋白沈殿は認められなかった。

4.7.4　免疫毒性

反復投与毒性試験において抗 aflibercept 抗体の血清中濃度を測定し、aflibercept の消失に及ぼすこれらの抗体の影響を検討した（2.6.6、[3 項] 参照）。Aflibercept をラット及びマウスに反復投与したところ、抗 aflibercept 抗体反応（ADA）がみられ、その結果として aflibercept の消失が加速し、死亡を伴う腎毒性が発現した。このため、これらの動物種は短期及び長期反復投与毒性試験に使用できなかった。サルでは投与期間の延長に伴って ADA 反応の発現頻度が増加し、ADA 陽性動物は、3 ヵ月間反復投与毒性試験では最大で 12%、6 ヵ月間反復投与毒性試験では 36%であった。6 ヵ月間反復投与毒性試験において ADA 陽性であった 14 例中 2 例の動物において、遊離形及び結合形 aflibercept の消失がいずれも加速した。一部の妊娠雌ウサギでは、合計 5 回の静脈内投与により抗 aflibercept 抗体が発現し、それに伴って遊離形 aflibercept 濃度が減少した。ウサギ及びサルのいずれにおいても、抗 aflibercept 抗体の存在に伴う毒性はみられず、これらの動物における全体的安全性プロファイルの変化も認められなかった。

5　総括及び結論

臨床データ及び疫学的データに加えて、非臨床試験データから、aflibercept を抗癌剤として開発することの強力な根拠が得られている。VEGF ファミリーメンバーは腫瘍の成長及び増殖に必要な病的血管新生の促進において重要な役割を果たしている。

Aflibercept はヒト VEGF-A、VEGF-B 及び PlGF-2 に高い親和性で結合し、これらのリガンドが受容体と相互作用することを阻害する遺伝子組換え融合蛋白質である。Aflibercept はマウス、ラット、ウサギ及びヒト由来の VEGF に対して同程度の高い親和性で結合し、これを阻害することが明らかになった。さらに、VEGF のアミノ酸配列はサルとヒトで全く同じであり、aflibercept はサルの VEGF にも結合することから、aflibercept の非臨床安全性評価に使用する動物種としてサルは適切である。セルベースアッセイにおいて、aflibercept は VEGF 受容体の活性化及びカルシウム動員を強力に阻害した。

様々な腫瘍を異種又は同種移植したマウスモデルに aflibercept を単独投与したとき、用量依存的な抗腫瘍効果が認められた。結腸腺癌細胞株 C51 及び HT-29、結腸癌細胞株 COLO 205 及び HCT 116 を移植したマウスに aflibercept を 2.5～40 mg/kg 投与したとき、用量依存的に腫瘍増殖が抑制され、治療係数は 16 以上であった。また、aflibercept は NCI-H460、A549 及び SHP-77 などの肺癌細胞モデルに対しても同程度の用量で活性を示した。Aflibercept の抗腫瘍効果は、腫瘍血管密度の低下及び腫瘍血管新生の抑制と関連し、VEGF シグナル伝達経路の遮断と一致する。さらに、aflibercept は卵巣腫瘍モデルで腹水産生抑制作用も示したが、これも VEGF シグナル伝達経路の遮断と一致する。マウス腫瘍モデルにおいて、aflibercept と化学療法剤（オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、イリノテカン、パクリタキセル及びドセタキセル）を併用投与したとき、抗腫瘍効果が促進された。

異種腫瘍を移植したマウスモデルにおいて、血清中の遊離形 aflibercept 濃度がプラトー時の結合形 aflibercept 濃度約 2 µg/mL を上回る用量で抗腫瘍効果が認められた。したがって、遊離形 aflibercept 濃度と結合形 aflibercept 濃度の比を、以後実施する臨床試験での用量設定の指標として使用できると考えられた。

安全性薬理試験から、aflibercept はマウスの正常組織の血管密度を低下させ、ラット及びマウスの血圧を上昇させ、ウサギの創傷修復及び治癒を遅延させることが明らかになった。これらのパラメータに対する影響は、担癌マウスでの薬効量よりも低い用量で検出された。創傷治癒及び血圧に対する最大の影響は、薬効量と同範囲の用量のみで認められた。げっ歯類で報告された血圧上昇は可逆的なものであり、aflibercept を投与した患者でも報告された（[2.7.4 臨床的安全性の概要] 参照）。創傷修復及び治癒に対する影響の可逆性に関する評価は行わなかった。これらの影響は VEGF 経路の阻害と関連している。

毒性試験で得られた結果に基づいて、aflibercept は中枢神経系及び心血管系機能に重大な影響を及ぼさないことが明らかになった。ラットの呼吸機能及びウサギの血栓形成に対して aflibercept は影響を及ぼさなかった。

マウス、ラット及びサルに単回静脈内投与したとき、遊離形 aflibercept は複数コンパートメントの（血漿中又は血清中）PK プロファイルを示した。Aflibercept は 48 時間（マウス）から 98 時間（サル）の範囲の $t_{1/2}$ で消失し、V_{ss} はいずれの種においても中央コンパートメントの分布容積よりわずかに大きかった。クリアランスの飽和による非線形の PK プロファイルが認められた。この飽和は内因性 VEGF に aflibercept が速やかに結合することに起因すると考えられ、このことにより高用量の aflibercept では $t_{1/2}$ が遅延し、曝露量は用量比例性を上回って増加した。

ラットに ^{125}I-aflibercept を静脈内投与したときの組織分布から、分子量の大きい蛋白質で予測されるように、aflibercept は主に血流量の多い臓器に分布することが示された。組織内放射能の相対濃度は肝臓で最も高く、次いで他の血流量の多い組織で高かった。ラットにおける組織内放射能は、投与後 7 日目でほぼ完全に消失した。しかし、総放射能の PK プロファイルは遊離形 aflibercept の PK プロファイルと一致しなかったことから、これらの結果は注意して解釈する必要がある。

サルを用いて実施した一般毒性試験のデータによると、aflibercept による毒性変化の大部分、すなわち骨成長板成熟の遅延、腎毒性及び卵巣機能抑制は、VEGF 経路阻害に一致するものであり、他の抗 VEGF 薬について実施した非臨床試験でも報告されている (11)(12)(13)。これらの変化がみられた血漿中曝露量は、予定臨床用量での患者における曝露量に近かった（但し、毒性試験の投与レジメンは主に週 1 回静脈内投与であったのに対し、臨床条件下では 2 週に 1 回又は 3 週に 1 回の投与であった）。これらの変化は回復することが示された。蛋白尿は VEGF/VEGFR 経路阻害剤を投与した患者におけるクラス副作用と考えられ (13)、aflibercept を投与した患者で報告されている（[2.7.4] 参照）。

更なる aflibercept 誘発性の骨の変化として、骨軟骨性外骨腫が、推奨治療用量を投与した患者における曝露量に近い血漿中曝露量で観察された。この変化は 5 ヵ月間の休薬期間後に回復が認められなかった。このような骨の変化は、aflibercept を投与した患者では報告されていない（[2.7.4] 参照）。

Aflibercept を投与したサルにおける鼻出血及び鼻腔の病理組織学的所見が、推奨治療用量での患者における曝露量に近い血漿中曝露量で観察された。これらの変化は他の抗 VEGF 薬について実施した非臨床試験では報告されていないが、鼻出血はベバシズマブの臨床試験で高頻度にみられた有害事象であり (14)、aflibercept 投与患者で報告されている（[2.7.4] 参照）。鼻中隔穿孔も、少数例のベバシズマブ投与患者で報告されている (15)(16)。

サルにおける aflibercept 関連の肝酵素増加が、推奨治療用量での患者における曝露量に近い血漿中曝露量で観察された。この変化に関連して、肝臓の門脈炎症及び門脈周囲壊死（多くはクッパー細胞のびまん性色素沈着を伴う）が、推奨治療用量での患者における曝露量の約 9 倍の遊離形 aflibercept の血漿中曝露量がみられたサルで観察された。

これらの変化は、これらの試験の休薬期間内には完全には回復しなかった。一方、患者においては、aflibercept の投与に起因すると考えられる肝酵素の大きな変化は報告されていない（[2.7.4] 参照）。

腸の粘膜下、膀胱及び心臓を含むいくつかの組織における全身性の微小血管変化が、少数例のサルにおいて、推奨治療用量での患者における曝露量に近い血漿中曝露量でみられたが、そのサルにおける遊離形 aflibercept 濃度は、結合形 aflibercept 濃度を上回っていた。これらの変化は、これらの試験の休薬期間内には完全には回復しなかった。

Aflibercept を性成熟した雌雄のサルに 6 ヵ月間投与したところ、受胎能パラメータの変化が認められた。これらの変化は、推奨治療用量での患者における曝露量に近い遊離形 aflibercept の血漿中曝露量でみられ、男女の受胎能に影響を及ぼすと考えられた。抗 VEGF 薬による雌性生殖機能の抑制は、卵胞及び黄体の発達における VEGF を介した血管新生の重要な役割に関連するものである (17)。Aflibercept による雌雄の受胎能への影響には回復が認められた。

サル（6 ヵ月間反復投与毒性試験）及び癌患者におけるトキシコキネティクスパラメータの比較を表 10に示す。

表 10 - サルで検討した最低用量での曝露量と推奨臨床用量を投与した癌患者における曝露量との比較

		サル	ヒト	サル/ヒト比
	用量	3 mg/kg/回	4 mg/kg、2 週に 1 回 [d]	
遊離形 aflibercept	C_{max} (µg/mL)	94.2 [a]	72.7	**1.30**
	AUC (µg.day/mL)	348 [b]	269	**1.29**
結合形 aflibercept	C_{max} (µg/mL)	3.91 [c]	3.89	**1.01**

[a] サル 6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験では、27 週間の投与期間全体での遊離形 aflibercept の C_{max} 値を平均した。

[b] サル 6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験では、最初の 15 週間は週 1 回投与を、残りの 12 週間は 2 週に 1 回投与を行ったことを考慮に入れて、27 週間の投与期間全体での遊離形 aflibercept の $AUC_{0\text{-}168h}$ 値を平均した。その後、算出した $AUC_{0\text{-}168h}$ 値を 2 倍して、日本人癌患者に 4 mg/kg の用量でそれぞれ 2 週に 1 回投与したときの曝露量との曝露量比を算出できるようにした。

[c] サル 6 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験では、27 週間の投与期間全体での結合形 aflibercept の C_{max} 値を平均した。

[d] 日本人癌患者における遊離形 aflibercept の血漿中曝露量は初回静脈内投与後に算出し、結合形 aflibercept の濃度は定常状態で算出した（TCD10794 試験では 4 mg/kg の 2 週に 1 回投与）。患者における AUC 値は AUC_{last} として算出した。

Aflibercept の発生への影響を、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験で評価した。Aflibercept による胚毒性が母動物の毒性用量でみられ、催奇形性変化が検討したすべての用量で誘発された。妊娠期における aflibercept の投与は、潜在的ベネフィットが胎児への潜在的リスクを上回らない限り推奨されない。妊娠可能な女性は、投与中効果的な避妊法を使用し、妊娠した場合は投薬の中止をする。

ウサギを用いた単回投与試験又はサルを用いた反復投与毒性試験の一環として局所刺激性を、また、ヒトの血液、血漿、血清との in vitro 適合性を評価したところ、予定臨床用量（4 mg/kg の 2 週に 1 回投与又は[redacted]）及び予定臨床濃度は、静脈内投与において問題ないと考えられる。

Aflibercept の反復投与により、ラット及びマウスでは高度の免疫原性が、妊娠雌ウサギでは中等度の免疫原性がみられ、サルでは 4～13 週間投与により軽微な免疫原性が示された。サルに 6 ヵ月間反復静脈内投与したところ、抗体反応の発現頻度が増加した。大部分のサルにおける ADA 反応は、遊離形 aflibercept 曝露量及び結合形 aflibercept 濃度に対して、明らかな影響を及ぼさないと考えられた。

非臨床データによると、腫瘍により産生されるVEGFを中和するための他の治療薬と同様に、aflibercept は、体内で産生される大量の VEGF と結合することを考慮し、十分な量を投与しなければならないと考えられる。この目的を達成するため、遊離形 aflibercept 及び結合形 aflibercept の両方を測定することによって、腫瘍及び組織由来の VEGF を実際に捕捉及び阻害するのに必要な aflibercept の用量を確認することが可能になった。これによって、最適な血管新生抑制のための有用な指標が提供される。Aflibercept の薬力学的有効用量は、遊離形 aflibercept の血清中濃度が結合形 aflibercept の濃度を上回ったときに得られる。非臨床試験でみられた薬理活性と遊離形及び結合形 aflibercept の循環血中濃度の関係に基づくと、癌患者における臨床推奨用量である 4 mg/kg の 2 週に 1 回投与及び 6 mg/kg の 3 週に 1 回投与は、有効用量の範囲内にあると考えられる。それは、これらの患者における遊離形 aflibercept の血漿中濃度が、投与期間全体を通して結合形を上回って維持されたことにより示される。

参 考 文 献

1. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. Clinical Science 2005;109:227-41.
2. Ferrara N, Mass RD, Campa C, Kim R. Targeting VEGF-A to treat cancer and age-related macular degeneration. Annu Rev Med. 2007;58:491-504.
3. Luttun A, Brusselmans K, Fukao H, Tjwa M, Ueshima S, Herbert JM, et al. Loss of placental growth factor protects mice against vascular permeability in pathological conditions. Biochemical and Biophysical Research Com. 2002; 295:428-34.
4. Cao Y. Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. Science Signaling. 2009 Feb 24;2:1-11.
5. Holash J, Davis, S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, et al. VEGF-Trap: A VEGF blocker with potent antitumor effects. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 2002;99:11393-8.
6. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. Cancer Cell. 2002;1:219-27.
7. Rudge JS, Holash J, Hylton D, Russell M, Jaing S, Leidich R, et al. VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. Proc Natl Acad Sci, USA 2007;104:18363-70.
8. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? Nat Rev Cancer. 2008;8:942-56.
9. Vaklavas C, Lenihan D, Kurzrock R, Tsimberidou AM. Anti-vascular endothelial growth factor therapies and cardiovascular toxicity: what are the important clinical markers to target? Oncologist 2010;15:130-41.
10. Izzedine H, Ederhy S, Goldwasser F, Soria JC, Milano G, Cohen A, et al. Management of hypertension in angiogenesis inhibitor-treated patients. Ann Oncol 2009;20: 807-15.
11. Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, Bruner RH, Thomford PJ, Hall RL, et al. Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. Toxicol Pathol. 1999;27:78-86.
12. Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, Valentine PJ, Barry ST, Brave SR, et al. AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. Cancer Res. 2005;65:4389-400.
13. Roodhart JM, Langenberg MH, Witteveen E, Voest EE. The molecular basis of class side effects due to treatment with inhibitors of the VEGF/VEGFR pathway. Current Clin Pharm. 2008;3:132-43.
14. Avastin BLA STN #125085: Summary basis for approval. CDER - FDA, 2004: 1-501.
15. Fakih MG, Lombardo JC. Bevacizumab-induced nasal septum perforation. Oncologist. 2006;11:85-6.

16. Traina TA, Norton L, Drucker K, Singh B. Nasal septum perforation in a bevacizumab-treated patient with metastatic breast cancer. Oncologist. 2006;11:1070-1.
17. Fraser HM, Wilson H, Rudge JS, Wiegand SJ. Single injections of vascular endothelial growth factor trap block ovulation in the macaque and produce a prolonged, dose-related suppression of ovarian function. J Clin Endocrinol Metabol. 2005;90:1114-22.