KRN23

第 2 部（モジュール 2）：
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

協和キリン株式会社

略号及び用語の定義一覧

略号

略号	略していない用語
$1,25(OH)_2D$	1,25-dihydroxy vitamin D（1,25-ジヒドロキシビタミン D）
ADHR	Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets/Osteomalacia（常染色体優性低リン血症性くる病／骨軟化症）
cDNA	Complementary deoxyribo nucleic acid（相補的 DNA）
ENS	Epidermal nevus syndrome（表皮母斑症候群）
FGF23	Fibroblast growth factor 23（線維芽細胞増殖因子 23）
HC	Heavy chain（重鎖）
Hyp	Hypophosphatemic（低リン血症）
kDa	Kilodalton（キロダルトン）
LC	Light chain（軽鎖）
TIO	Tumor induced osteomalacia（腫瘍性骨軟化症）
XLH	X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia（X 染色体連鎖性低リン血症性くる病・骨軟化症）

目次

略号及び用語の定義一覧 2
目次 3
2.6.1 緒言 4
1 KRN23 の特徴 4
2 臨床適応 5
2.1 申請治療適応症 7
3 参考文献 7

2.6.1 緒言

1 KRN23 の特徴

KRN23 は、遺伝子組換えヒト型免疫グロブリン G1 モノクローナル抗体であり、線維芽細胞増殖因子 23（FGF23）関連低リン血症性くる病・骨軟化症の原因となる FGF23 の N 末端領域に結合し、FGF23 の過剰な生物学的活性を抑制する。KRN23 は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損チャイニーズハムスターの卵巣細胞で発現され、分泌された KRN23 を培養液から回収のうえ、一連のクロマトグラフィー及び濾過工程によって精製される。アミノ酸配列に基づいて予測された非グリコシル化型 KRN23 の分子量は 147 キロダルトン（kDa）である。

相補的 DNA（cDNA）の配列から推定される KRN23 の重鎖（HC）及び軽鎖（LC）のアミノ酸配列を図 1-1 に示す。

図 1-1 cDNA の配列に基づく KRN23 のアミノ酸配列

HC：

```
1   QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NHYMHWVRQA PGQGLEWMGI
51  INPISGSTSN AQKFQGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARDI
101 VDAFDFWGQG TMVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
151 PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC
201 NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
251 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
351 LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
401 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
```

LC：

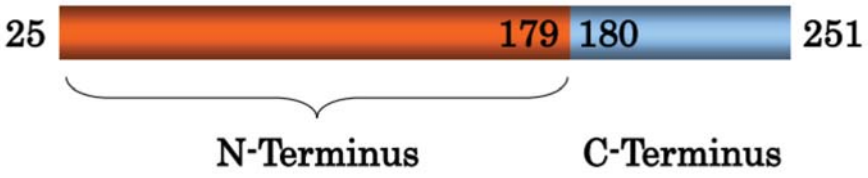
```
1   AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALVWYQQKP GKAPKLLIYD
51  ASSLESGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNDYFTFGPG
101 TKVDIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD
151 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL
201 SSPVTKSFNR GEC
```

黒線は鎖間ジスルフィド結合部位を示す。
HC の N297：グリコシル化部位

KRN23 の標的である FGF23 は、X 染色体連鎖性低リン血症性くる病・骨軟化症（XLH）の原因因子であることが確認されており（Razzaque and Lanske, 2007）、常染色体優性低リン血症性くる病／骨軟化症（ADHR）及び腫瘍性骨軟化症（TIO）を含む、腎臓でのリン再吸収低下及び低リン血症を特徴とするその他の疾患の原因因子であることも示されている（ADHR Consortium, 2000; Shimada et al, 2001）。FGF23 は、リン恒常性維持において、特異的かつ中心的な調節因子であると考えられている。FGF23 は、251 個のアミノ酸から構成されるペプチドであり、主に骨細胞で産生される。N 末端の 24 個のアミノ酸が分泌時に切断されるため、生

物学的に活性を有するインタクト FGF23 は 227 個のアミノ酸から構成される（図 1-2）。インタクト FGF23 は、スブチリシン様プロプロテイン変換酵素によって Arg179 と Ser180 の間で容易に切断され（Lorenz-Depiereux et al, 2006）、16 kDa の N 末端フラグメント及び 10 kDa の C 末端フラグメントとなるが、インタクト FGF23 のみが *in vivo* において生物学的活性を有する（Shimada et al, 2002）。

図 1-2　　インタクト FGF23



オートクライン又はパラクラインの分泌様式で作用する他の大半の FGF ファミリーとは異なり、FGF23 は主に内分泌ホルモンとして作用する。FGF23 は骨で産生され、遠位にある細胞表面上の受容体に作用する。FGF23 の主な作用部位は腎臓である。トランスジェニックマウスを用いた研究又は遺伝子組換えタンパク質を投与した研究において、FGF23 の過度な作用が、低リン血症性くる病／骨軟化症の原因として報告されている（Bai et al, 2003; Bai et al, 2004; Larsson et al, 2004; Shimada et al, 2002; Shimada et al, 2004a）。一方、FGF23 ノックアウトマウスのように FGF23 の機能が欠損した場合や、腫瘍性石灰沈着症患者においては、高リン血症、1,25-ジヒドロキシビタミン D（1,25$(OH)_2$D）値上昇、及び異常な骨化の発現が認められる（Araya et al, 2005; Shimada et al, 2004b; Sitara et al, 2004）。これらの報告は、FGF23 がリン及びビタミン D 代謝の生理的調節に重要な役割をもつことを示す。更に、XLH 患者（Bonewald and Wacker, 2013; Jonsson et al, 2003; Yamazaki et al, 2002）及び低リン血症（Hyp）マウス（Liu et al, 2006）において FGF23 の循環血中濃度が高値であることは明らかである。KRN23 は FGF23 に直接的に結合することで、Klotho と線維芽細胞増殖因子受容体からなる共受容体に FGF23 が結合した複合体の形成並びにそのシグナル伝達を阻害し、FGF23 の機能を中和する。

2　臨床適応

KRN23 の申請適応症は、FGF23 関連低リン血症性くる病・骨軟化症である。本適応症の対象となる疾患として、XLH、TIO 及び表皮母斑症候群（ENS）が含まれる。

XLH は、リン制御システムの遺伝的欠陥によって、FGF23 が過剰に産生され、それによる低リン血症が原因となって、骨石灰化及び筋骨格機能に対し広範かつ重大な影響を及ぼす重篤かつ慢性的な希少疾患である。XLH 患者には、リン制御システムに変化を及ぼす Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome 遺伝子（X 染色体上のエンドペプチダーゼと相同性を有するリン制御遺伝子）の不活性型変異が認められ、骨細胞又はその他の細胞から過剰に FGF23 が産生される（HYP Consortium, 1995; Jonsson et al, 2003; Yamazaki et al, 2002）。

XLH 患者は、血清中 FGF23 濃度が著しく高いことにより低リン血症となる。FGF23 は、血清リンの特異的調節因子として重要な役割を担っており、その主な機能は、腎近位尿細管のリン再吸収の抑制による血清リン濃度を低下させることである（Fukumoto, 2008; Razzaque and Lanske, 2007）。また、FGF23 は腎臓において 1-α-ヒドロキシラーゼ活性を阻害することによ

り、1,25(OH)$_2$D の血清中濃度を低下させ、リン及びカルシウムの腸管吸収が抑制される。FGF23 の尿細管再吸収に対する作用及びビタミン D 代謝を介した腸管吸収に対する作用によって、血清リン濃度が低下する。FGF23 を介した低リン血症は、骨石灰化不全、更にはくる病及び骨軟化症を誘発する。くる病は、小児及び思春期の XLH 患者において骨端線閉鎖前の成長板の石灰化及び骨化不全を特徴とする疾患であるのに対し、骨軟化症は骨石灰化不全を特徴とする。

活性型ビタミン D 及び経口リン補充等の現在行われている XLH の治療法は、血清リン値を上昇させ、骨におけるくる病の病態を改善し、すべてではないものの一部の患者の成長を改善する可能性がある（Carpenter et al, 2011; Makitie et al, 2003; Petersen et al, 1992; Verge et al, 1991）。これらの治療では、体内へのリン取込みの増加による限定的な効果が得られるものの、根本的なリンの枯渇状態は改善されない（Costa et al, 1981）。また、慎重なモニタリングが必要なこと、腎石灰沈着、高カルシウム尿症、副甲状腺機能亢進症等の潜在的リスクと治療ベネフィットとのバランスをとる必要があること、このレジメンを用いた治療法は複雑で用量のコントロールも容易ではないことから、より効果的で利便性の高い治療法が求められている（Carpenter et al, 2011）。

TIO は、oncogenic osteomalacia とも呼ばれる後天性疾患で、腫瘍から過剰に産生される異所性 FGF23 が腎臓からのリン喪失及び 1,25(OH)$_2$D 合成阻害を誘発する。FGF23 濃度の上昇により、XLH と同様の血液生化学検査値のプロファイルを示し、血清リン低値、高リン酸尿症、腎近位尿細管リン再吸収閾値の異常低下、ALP 上昇、カルシウム値正常、1,25(OH)$_2$D 低値から正常、及び副甲状腺ホルモンの正常又は高値（後者は 1,25(OH)$_2$D 低値により生じた二次性副甲状腺機能亢進症が反映されたもの）といった特徴が認められる（Dadoniene et al, 2016）。しかし、TIO 患者の血清 FGF23 濃度は、XLH の場合に比べてはるかに高いために、腎臓からのリン喪失によって生じる臨床症状は、より重症となることが多く、骨石灰化不良、骨折、筋肉痛及び骨痛を伴う。

TIO は通常、中年期に認められるが、どの年代であっても起こりうる疾患である（Jiang et al, 2012）。小児での臨床症状は、成人の場合と同様であるが、XLH 患者と比べてより重度であり、全身性骨減少症、くる病、偽骨折、四肢彎曲、歩行異常、成長遅延、並びに骨、関節及び筋肉の疼痛を伴う。成人では、重度の骨軟化症に起因する進行性疲労、筋力低下及び骨痛が生じ、最終的には長骨、椎骨及び肋骨の骨折に至ることが多い（Kumar, 2000.）。また、組織形態学的分析の結果、石灰化遅延の増長及び過量の類骨の未石灰化を特徴とする、著しい石灰化障害が明らかとなっている（Shane et al, 1997）。

ENS は、表皮母斑を特徴とするまれな先天性症候群であり、その他の臓器系（神経系、骨格系、心血管系、視覚系等）で、一つ以上の発達異常を伴う（Stavrianeas et al, 2004）。表皮母斑は皮膚細胞の種々の構成要素（脂腺細胞-線状脂腺母斑等）の非腫瘍性増殖であり、通常は胚形成時の皮膚細胞の移動に伴い Blaschko 線に沿って線状に分布する（Vidaurri-de la Cruz et al, 2004）。ENS の病変が骨に認められた場合、低リン血症が認められることがあり、小児においては主にくる病、成人においては骨軟化症として現れる。血清 FGF23 濃度を評価したすべての ENS 関連骨軟化症患者で、血清 FGF23 濃度の高値が認められた（Lim et al, 2014）。ENS 関連骨軟化症で認められる過剰な FGF23 の産生源は不明である。初期の研究においては皮膚病変自体に由来する可能性が示唆されたが、より最近の研究では骨に由来する可能性が示唆されている（Aschinberg et al, 1977; Heike et al, 2005; Ivker et al, 1997; Lim et al, 2014）。

原因となる腫瘍／病変の外科的切除が TIO の根治的治療法であるが、完全切除が困難な場合内科的治療も必要となる。ENS 関連骨軟化症に関して、これまでの研究から過剰な FGF23 の産生源は皮膚病変に由来することが示唆されてきたが、より最近の研究では皮膚病変のサンプルから FGF23 タンパクも FGF23 mRNA も検出されていない（Aschinberg et al, 1977; Heike et al, 2005; Ivker et al, 1997; Lim et al, 2014）。したがって、皮膚から産生された未知の物質が FGF23 過剰を引き起こす可能性があること、異型性骨又はその他の骨病変は、ENS 関連骨軟化症の基礎をなす体細胞モザイク変異に関連した一連の先天的形成不全の一部であることが多く、これらが本疾患で認められる FGF23 の過剰産生の原因となっている可能性も推測される（Lim et al, 2014）。TIO と比べると、完全切除又は外科的治療により過剰な FGF23 の産生源が除去される可能性は低い。

現在、切除不能の腫瘍・病変を有する場合の TIO 及び ENS の治療に対しては、経口リン製剤及び活性型ビタミン D（カルシトリオール等）を一日に複数回投与するという治療が行われている。既存療法では、XLH の場合と同様、二次性副甲状腺機能亢進症、高カルシウム血症又は高カルシウム尿症を誘発することなく、血清リン濃度を基準範囲内に抑えるために、厳重なモニタリングと経口リン製剤及びビタミン D 投与を患者ごとに管理する必要がある。しかし、効果は限定的であり、骨疾患に対する根本的な治療法ではない。

KRN23 は、XLH、TIO 及び ENS 患者における著しく高い FGF23 濃度によってもたらされる臨床症状に効果を示す可能性がある。

2.1 申請治療適応症

KRN23 の適応症は、FGF23 関連低リン血症性くる病・骨軟化症の治療である。

3 参考文献

ADHR Consortium, 2000

The ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in *FGF23*. Nat Genet. 2000;26(3):345-8.

Araya et al, 2005

Araya K, Fukumoto S, Backenroth R, Takeuchi Y, Nakayama K, Ito N, et al. A Novel Mutation in Fibroblast Growth Factor 23 Gene as a Cause of Tumoral Calcinosis. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(10):5523-7.

Aschinberg et al, 1977

Aschinberg LC, Solomon LM, Zeis PM, Justice P, Rosenthal IM. Vitamin D-resistant rickets associated with epidermal nevus syndrome: Demonstration of a phosphaturic substance in the dermal lesions. J Pediatr. 1977;91(1):56-60.

Bai et al, 2003
Bai XY, Miao D, Goltzman D, Karaplis AC. The Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets R176Q Mutation in Fibroblast Growth Factor 23 Resists Proteolytic Cleavage and Enhances *in Vivo* Biological Potency. J Biol Chem. 2003;278(11):9843-9.

Bai et al, 2004
Bai X, Miao D, Li J, Goltzman D, Karaplis AC. Transgenic Mice Overexpressing Human Fibroblast Growth Factor 23 (R176Q) Delineate a Putative Role for Parathyroid Hormone in Renal Phosphate Wasting Disorders. Endocrinology. 2004;145(11):5269-79.

Bonewald and Wacker, 2013
Bonewald LF, Wacker MJ. FGF23 Production by Osteocytes. Pediatr Nephrol. 2013;28(4):563-8.

Carpenter et al, 2011
Carpenter TO, Imel EA, Holm IA, Jan de Beur SM, Insogna KL. A Clinician's Guide to X-Linked Hypophosphatemia. J Bone Miner Res. 2011;26(7):1381-8.

Costa et al, 1981
Costa T, Marie PJ, Scriver CR, Cole DEC, Reade TM, Nogrady B, et al. X-Linked Hypophosphatemia: Effect of Calcitriol on Renal Handling of Phosphate, Serum Phosphate, and Bone Mineralization. J Clin Endocrinol Metab. 1981;52(3):463-72.

Dadoniene et al, 2016
Dadoniene J, Miglinas M, Miltiniene D, Vajauskas D, Seinin D, Butenas P, et al. Tumour-induced osteomalacia: a literature review and a case report. World J Surg Oncol. 2016;14(1):4.

Fukumoto, 2008
Fukumoto S. Physiological Regulation and Disorders of Phosphate Metabolism -Pivotal Role of Fibroblast Growth Factor 23-. Intern Med. 2008;47(5):337-43.

Heike et al, 2005
Heike CL, Cunningham ML, Steiner RD, Wenkert D, Hornung RL, Gruss JS, et al. Skeletal Changes in Epidermal Nevus Syndrome: Does Focal Bone Disease Harbor Clues Concerning Pathogenesis? Am J Med Genet A. 2005;139A(2):67-77.

HYP Consortium, 1995
The HYP Consortium. A gene (*PEX*) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. Nat Genet. 1995;11(2):130-6.

Ivker et al, 1997
Ivker R, Resnick SD, Skidmore RA. Hypophosphatemic Vitamin D-Resistant Rickets, Precocious Puberty, and the Epidermal Nevus Syndrome. Arch Dermatol. 1997;133(12):1557-61.

Jiang et al, 2012
Jiang Y, Xia WB, Xing XP, Silva BC, Li M, Wang O, et al. Tumor-Induced Osteomalacia: An Important Cause of Adult-Onset Hypophosphatemic Osteomalacia in China: Report of 39 Cases and Review of the Literature. J Bone Miner Res. 2012;27(9):1967-75.

Jonsson et al, 2003
Jonsson KB, Zahradnik R, Larsson T, White KE, Sugimoto T, Imanishi Y, et al. Fibroblast Growth Factor 23 in Oncogenic Osteomalacia and X-Linked Hypophosphatemia. N Engl J Med. 2003;348(17):1656-63.

Kumar, 2000.
Kumar R. Tumor-induced Osteomalacia and the Regulation of Phosphate Homeostasis. Bone. 2000;27(3):333-8.

Larsson et al, 2004
Larsson T, Marsell R, Schipani E, Ohlsson C, Ljunggren O, Tenenhouse HS, et al. Transgenic Mice Expressing Fibroblast Growth Factor 23 under the Control of the α1(I) Collagen Promoter Exhibit Growth Retardation, Osteomalacia, and Disturbed Phosphate Homeostasis. Endocrinology. 2004;145(7):3087-94.

Lim et al, 2014
Lim YH, Ovejero D, Sugarman JS, Deklotz CMC, Maruri A, Eichenfield LF, et al. Multilineage somatic activating mutations in *HRAS* and *NRAS* cause mosaic cutaneous and skeletal lesions, elevated FGF23 and hypophosphatemia. Hum Mol Genet. 2014;23(2):397-407.

Liu et al, 2006
Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in *Hyp* mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;291(1):E38-49.

Lorenz-Depiereux et al, 2006
Lorenz-Depiereux B, Bastepe M, Benet-Pages A, Amyere M, Wagenstaller J, Muller- Barth U, et al. *DMP1* mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis. Nat Genet. 2006;38(11):1248-50.

Makitie et al, 2003
Makitie O, Doria A, Kooh SW, Cole WG, Daneman A, Sochett E. Early Treatment Improves Growth and Biochemical and Radiographic Outcome in X-Linked Hypophosphatemic Rickets. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(8):3591-7.

Petersen et al, 1992
Petersen DJ, Boniface AM, Schranck FW, Rupich RC, Whyte MP. X-Linked Hypophosphatemic Rickets: A Study (with Literature Review) of Linear Growth Response to Calcitriol and Phosphate Therapy. J Bone Miner Res. 1992;7(6):583-97.

Razzaque and Lanske, 2007
Razzaque MS, Lanske B. The emerging role of the fibroblast growth factor-23- klotho axis in renal regulation of phosphate homeostasis. J Endocrinol. 2007;194(1):1-10.

Shane et al, 1997
Shane E, Parisien M, Henderson JE, Dempster DW, Feldman F, Hardy MA, et al. Tumor-Induced Osteomalacia: Clinical and Basic Studies. J Bone Miner Res. 1997;12(9):1502-11.

Shimada et al, 2001
Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(11):6500-5.

Shimada et al, 2002
Shimada T, Muto T, Urakawa I, Yoneya T, Yamazaki Y, Okawa K, et al. Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. Endocrinology. 2002;143(8):3179-82.

Shimada et al, 2004a
Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. J Bone Miner Res. 2004;19(3):429-35.

Shimada et al, 2004b
Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, et al. Targeted ablation of *Fgf23* demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. J Clin Invest. 2004;113(4):561-8.

Sitara et al, 2004
Sitara D, Razzaque MS, Hesse M, Yoganathan S, Taguchi T, Erben RG, et al. Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in *Phex*- deficient mice. Matrix Biol. 2004;23(7):421-32.

Stavrianeas et al, 2004
Stavrianeas NG, Kakepis ME. Epidermal nevus syndrome [Internet]. GB: Orphanet Encyclopedia; 2004 Apr 9 [cited 2018 May 16]. Available from: https://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-epidermal-nevus.pdf.

Verge et al, 1991
Verge CF, Lam A, Simpson JM, Cowell CT, Howard NJ, Silink M. EFFECTS OF THERAPY IN X-LINKED HYPOPHOSPHATEMIC RICKETS. N Engl J Med. 1991;325(26):1843-8.

Vidaurri-de la Cruz et al, 2004
Vidaurri-de la Cruz H, Tamayo-Sanchez L, Duran-McKinster C, de la Luz Orozco-Covarrubias M, Ruiz-Maldonado R. Epidermal Nevus Syndromes: Clinical Findings in 35 Patients. Pediatr Dermatol. 2004;21(4):432-9.

Yamazaki et al, 2002
Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, Hasegawa Y, Satoh K, Tajima T, et al. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(11):4957-60.

KRN23

第 2 部（モジュール 2）：
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2　薬理試験の概要文

協和キリン株式会社

略号及び用語の定義一覧

略号

略号	略していない用語
$1,25(OH)_2D$	1,25-dihydroxy vitamin D（1,25-ジヒドロキシビタミン D）
Ca	カルシウム
ECG	Electrocardiogram（心電図）
EDV	End-diastolic volume（拡張末期容積）
EF	Ejection fraction（駆出率）
Egr-1	Early growth response factor 1（初期増殖応答因子 1）
ENS	Epidermal nevus syndrome（表皮母斑症候群）
ESV	End-systolic volume（収縮末期容積）
FEPi	Fractional excretion of phosphate（リン分画排泄率）
FGF23	Fibroblast growth factor 23（線維芽細胞増殖因子 23）
FGFR	Fibroblast growth factor receptor（線維芽細胞増殖因子受容体）
Ig	Immunoglobulin（免疫グロブリン）
mAb	Monoclonal antibody（モノクローナル抗体）
NaPiIIa	Type IIa sodium-phosphate co-transporter（IIa 型ナトリウム／リン共輸送担体）
PD	Pharmacodynamics（薬力学）
PHEX	Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome
PK	Pharmacokinetics（薬物動態）
PTH	Parathyroid hormone（副甲状腺ホルモン）
SV	Stroke Volume（一回拍出量）
TIO	Tumor induced osteomalacia（腫瘍性骨軟化症）
TmP/GFR	Ratio of renal tubular maximum reabsorption rate of phosphate to glomerular filtration rate（腎近位尿細管リン再吸収閾値）
XLH	X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia（X 染色体連鎖性低リン血症性くる病・骨軟化症）
WT	Wild type（野生型）

用語の定義

用語	定義
ALP	アルカリホスファターゼ
BUN	尿素窒素
ELISA	固相酵素結合免疫測定法
K_D	解離定数
ST	心電図の S 波の終りから T 波の始まりまでの部分

目次

略号及び用語の定義一覧 2
目次 3
2.6.2 薬理試験の概要文 5
1 まとめ 5
1.1 効力を裏付ける試験 5
1.1.1 *In vitro* 薬理試験 5
1.1.2 *In vivo* 薬理試験 5
1.2 安全性薬理試験 7
2 効力を裏付ける試験 8
2.1 *In vitro* 薬理試験 8
2.1.1 Biacore による KRN23 のヒト、カニクイザル及びウサギ FGF23 への結合親和性の測定（試験番号 r-[redacted]-0326）参考資料 4.2.1.1-1 8
2.1.2 サンドイッチ ELISA によるヒト、サル及びマウス FGF23 反応曲線（試験番号 r-[redacted]-0026）参考資料 4.2.1.1-2 9
2.1.3 サンドイッチ ELISA による各種哺乳動物の血漿中 FGF23 反応曲線（試験番号 r-[redacted]-0027）参考資料 4.2.1.1-3 10
2.1.4 セルベースアッセイによる KRN23 の FGF23 シグナル伝達に対する阻害活性（試験番号 d-[redacted]-816）評価資料 4.2.1.1-4 10
2.1.5 セルベースアッセイによる KRN23 の各種哺乳動物の FGF23 に対する中和活性（試験番号 r-[redacted]-0021）参考資料 4.2.1.1-5 11
2.1.6 Biacore システムを用いた KRN23/FGF23 複合体と遺伝子組換えヒト Klotho の結合解析（報告書番号 r-[redacted]-0106）参考資料 4.2.1.1-6 12
2.1.7 共焦点顕微鏡による培養細胞で発現した KRN23/FGF23 複合体と Klotho の結合解析（報告書番号 r-[redacted]-0107）参考資料 4.2.1.1-7 12
2.1.8 セルベースアッセイによる KRN23/FGF23 複合体の FGF23 シグナル伝達に対する阻害活性（報告書番号 r-[redacted]-0342）参考資料 4.2.1.1-8 13
2.2 *In vivo* 薬理試験 13
2.2.1 ウサギにおける KRN23 の単回静脈内投与試験（試験番号 [redacted]）評価資料 4.2.1.1-9 13
2.2.2 カニクイザルにおける KRN23 の尿中リン排泄量に対する影響（試験番号 [redacted]）評価資料 4.2.1.1-10、評価資料 4.2.1.1-11 14
2.2.3 カニクイザルにおける KRN23 の最小有効量確認試験（試験番号 [redacted]）評価資料 4.2.1.1-12 16
2.2.4 カニクイザルにおける KRN23 単回静脈内／皮下投与の PK/PD 試験（試験番号 [redacted]-022）評価資料 4.2.1.1-13 18
2.2.5 幼若カニクイザルにおける KRN23 の単回静脈内投与薬理試験（試験番号 [redacted]-021）評価資料 4.2.1.1-14 19

2.2.6 成熟及び幼若カニクイザルにおける KRN23 の 13 週間間歇（1 回／2 週）皮下投与の PK/PD 試験並びに 8 週間回復性試験（試験番号 [redacted]-116）評価資料 4.2.1.1-15 21
2.2.7 低リン血症性くる病／骨軟化症における抗 FGF23 抗体の治療効果（Aono et al, 2009）参考資料 4.2.1.1-16 22
2.2.8 抗 FGF23 中和抗体による *Hyp* マウスの筋力低下及び自発運動減少の改善（Aono et al, 2011）参考資料 4.2.1.1-17 25
3 副次的薬理試験 26
4 安全性薬理試験 26
5 薬力学的薬物相互作用 28
6 考察 28
6.1 効力を裏付ける試験 28
6.2 安全性薬理試験 31
7 結論 31
8 参考文献 31

2.6.2 薬理試験の概要文

1 まとめ

KRN23 は、X 染色体連鎖性低リン血症性くる病・骨軟化症（XLH）、腫瘍性骨軟化症（TIO）及び表皮母斑症候群（ENS）等の高濃度の線維芽細胞増殖因子 23（FGF23）に関連した低リン血症性くる病・骨軟化症の治療薬として開発された、FGF23 に対する遺伝子組換えヒト型免疫グロブリン（Ig）G1 モノクローナル抗体（mAb）である。FGF23 は、リンの恒常性における重要な生理学的調節因子であり、カルシウム（Ca）代謝の調節因子としても知られる副甲状腺ホルモン（PTH）及び 1,25-ジヒドロキシビタミン D（1,25(OH)$_2$D）に比べて、特異的かつ主要なリン調節因子とされている（FGF23 に関する詳細は 2.6.1 参照）。KRN23 の薬理作用を評価するため、*in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。独立した安全性薬理試験を実施していないが、複数の反復投与毒性試験で安全性薬理評価を行った。

1.1 効力を裏付ける試験

1.1.1 *In vitro* 薬理試験

KRN23 の結合親和性及び種特異性を検討するための *in vitro* 薬理試験を実施した。Biacore による結合親和性試験（2.1.1 項）では、KRN23 は、ヒト、カニクイザル及びウサギ FGF23 に対して、同程度の高い結合親和性（K_D：約 10^{-11} mol/L）を示した。ELISA による結合試験（2.1.2 項、2.1.3 項）では、KRN23 は、サル遺伝子組換え FGF23 若しくは血漿中サル FGF23 と交差反応を示したが、マウスの遺伝子組換え FGF23 若しくは血漿中イヌ及びラット FGF23 とは交差反応を示さなかった。各哺乳動物の FGF23 による FGF23/Klotho/FGFR 複合体形成に伴う KRN23 の細胞内シグナル伝達阻害を評価したセルベースアッセイ（2.1.4 項及び 2.1.5 項）において、KRN23 は、ヒト、サル及びウサギ FGF23 のシグナル伝達を阻害したが、マウス及びラット FGF23 のシグナル伝達を阻害しなかった。以上の結果から、KRN23 がヒト、サル及びウサギ FGF23 と高い親和性で結合し、FGF23／Klotho／線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）を介したシグナル伝達を阻害することが確認された。

Biacore による結合試験（2.1.6 項）では、KRN23/FGF23 複合体が、遺伝子組換えヒト Klotho に結合することが確認され、K_D は 9.116×10^{-8} mol/L であった。KRN23/FGF23 複合体は、培養細胞に発現したヒト Klotho と結合することも確認され（2.1.7 項）、ヒト Klotho との結合において、非結合型 FGF23 と競合することで FGF23 のシグナル伝達を阻害することが示された（2.1.8 項）。

1.1.2 *In vivo* 薬理試験

KRN23 の薬理作用を評価するために、ウサギ又は成熟及び幼若カニクイザルを対象に、*in vivo* 薬理試験を 6 試験実施した。

ウサギに KRN23（3、10 及び 30 mg/kg）を単回静脈内投与したとき、KRN23 は、血清リン及び 1,25(OH)$_2$D 濃度を上昇させ、尿中リン及び Ca 濃度を低下させた（2.2.1 項）。

成熟カニクイザルに KRN23（1、3 及び 10 mg/kg）を単回静脈内投与したとき、KRN23 は、血清リン及び 1,25(OH)$_2$D 濃度並びに腎近位尿細管リン再吸収閾値（TmP/GFR）を有意に上昇させた（2.2.2 項）。

成熟カニクイザルへの単回静脈内投与における KRN23 の血清リン及び 1,25(OH)$_2$D 濃度に対する最小薬効用量は、それぞれ 0.1 mg/kg 及び 0.03 mg/kg と推定された（2.2.3 項）。

成熟カニクイザルに KRN23（0.03、0.3 及び 3 mg/kg）を単回静脈内又は皮下投与したときの薬物動態（PK）及び薬力学（PD）を検討した（2.2.4 項）。KRN23 による血清リン及び 1,25(OH)$_2$D 濃度の上昇（それぞれ 0.3 mg/kg 及び 0.03 mg/kg 以上）の程度及び持続時間は、静脈内投与と皮下投与で同程度であった。

幼若カニクイザルに KRN23（0.001、0.003、0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg）を単回静脈内投与したとき、KRN23 は、0.003 mg/kg 以上の投与量で 1,25(OH)$_2$D 濃度を上昇させ、0.03 mg/kg 以上の投与量で血清リン濃度を上昇させた（2.2.5 項）。

成熟及び幼若カニクイザルに KRN23（1 mg/kg）を 2 週に 1 回、13 週間間歇皮下投与したときの PK 及び PD を評価した。幼若カニクイザルにおける KRN23 投与前後の血清リン濃度は、成熟カニクイザルと比較してわずかに高かった。幼若及び成熟カニクイザルいずれにおいても、KRN23 投与による血清リン濃度上昇の程度は、反復投与により変化しなかった。最終投与後 28 日目までに、成熟及び幼若カニクイザルの血清リン濃度は投与前の濃度に戻った（2.2.6 項）。

以上の結果から、カニクイザルにおいて、KRN23 は腎臓でのリン再吸収を増加させることにより血清リン濃度を上昇させ、更に血清 1,25(OH)$_2$D 濃度を上昇させることが示された。KRN23 の単回皮下及び静脈内投与後の PD プロファイルは同様であった。2 週に 1 回、13 週間間歇皮下投与した場合では、幼若カニクイザルにおける KRN23 投与前後の血清リン濃度は、成熟カニクイザルと比較してわずかに高かった。

Hyp マウスは、主に骨細胞に発現している Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome（PHEX）遺伝子（エンドペプチダーゼと相同性を有する X 染色体上のリン制御遺伝子）の 3’領域が欠損した、XLH のモデルマウスである。PHEX 遺伝子の変異により、FGF23 が骨細胞から過剰に分泌されることにより低リン血症となる。Hyp マウスは、血清 FGF23 濃度の上昇及び低リン血症に加え、くる病及び関連する骨形成異常を呈する。

FGF23 誘導性低リン血症を有する患者における抗 FGF23 抗体の治療有効性を検討する上で、Hyp マウスは現在使用できる最適な動物モデルである。KRN23 はマウス FGF23 に結合しないため、マウス FGF23 に結合するマウス mAb（マウス抗 FGF23 抗体）を用いて、Hyp マウスにおけるマウス抗 FGF23 抗体の PD 及び作用機序を明らかにすることとした。幼若及び成熟 Hyp マウスを対象とした 2 試験を実施した。

雄性幼若 Hyp マウスに、マウス抗 FGF23 抗体（4 及び 16 mg/kg）を単回又は週 1 回、4 週間（計 5 回）反復皮下投与したとき、マウス抗 FGF23 抗体は、Hyp マウスにコントロール抗体を投与した群（Hyp マウス対照群）と比べて、血清リン及び 1,25(OH)$_2$D 濃度を有意に上昇させた（2.2.7 項）。マウス抗 FGF23 抗体の投与により、FGF23 阻害を介した腎臓における IIa 型ナトリウム／リン共輸送担体（NaPiIIa）の発現増加が認められ、更に腎臓における 25-ヒドロキシビタミン D-1α-水酸化酵素（ビタミン D 活性化酵素）の発現上昇及び 25-ヒドロキシビタミン D-24-水酸化酵素（活性化ビタミン D 分解酵素）の発現抑制が認められた。

Hyp マウスの成長期にマウス抗 FGF23 抗体を反復投与することによって、成長や大腿骨及び脛骨の伸長が著しく改善した。骨長の改善と併せて、マウス抗 FGF23 抗体は、近位骨幹端成長板の柱状構造を著しく改善した。Hyp マウスの成長期におけるマウス抗 FGF23 抗体の投与は、海綿骨及び皮質骨において類骨を大幅に減少させ、石灰化骨を増加させた。

雄性成熟 Hyp マウスに、マウス抗 FGF23 抗体（4 及び 16 mg/kg）を週 1 回、8 週間（計 8 回）反復皮下投与したとき、マウス抗 FGF23 抗体は、Hyp マウス対照群と比べて、血清リン及び $1,25(OH)_2D$ 濃度を上昇させた（2.2.8 項）。幼若 Hyp マウスとは対照的に、骨端癒着後に長骨は成長しないことから、マウス抗 FGF23 抗体投与群の長骨の長さは、Hyp マウス対照群と差が認められなかった。一方、マウス抗 FGF23 抗体を投与した Hyp マウスの類骨量は、野生型（WT）マウスと同程度であり、Hyp マウスにおける XLH の特徴である骨軟化症に対する効果が示された。また、幼若 Hyp マウスで認められたように、マウス抗 FGF23 抗体は、成熟 Hyp マウスにおいても骨石灰化を改善した。

筋力低下及び骨痛は、低リン血症性くる病／骨軟化症を有する患者の日常活動を妨げる。Hyp マウスでは、自発運動、探索行動、立ち上がり等の自発的な行動の抑制が認められる。Hyp マウス対照群では、WT マウスと比較して、前後肢における握力低下及び自発運動量減少が認められた。Hyp マウスへのマウス抗 FGF23 抗体投与により、握力は次第に増加し、自発運動量も増加した。

Hyp マウスを用いた以上の試験結果から、抗 FGF23 抗体が過剰な FGF23 作用を抑制することによって、低リン血症及び骨石灰化不全が軽減されるだけでなく、筋力低下及び自発運動が改善されることが示唆された。

1.2 安全性薬理試験

成熟及び幼若カニクイザルを用いた複数の反復投与毒性試験において、呼吸数、心電図（ECG）、血圧及び心機能について検討した。

成熟カニクイザルを用いた 14 週間反復投与毒性試験（4 項）では、雌雄カニクイザルに KRN23（0.03、0.3、3 及び 30 mg/kg）を 2 週に 1 回、14 週間（計 7 回）静脈内投与した。KRN23 に関連した血圧、呼吸数及び臓器重量の顕著な変化は認められなかった。また、いずれの投与量においても不整脈は認められず、KRN23 に起因する ECG 所見の異常も認められなかった。

成熟カニクイザルを用いた 40 週間反復投与毒性試験（4 項）では、雌雄カニクイザルに KRN23 を 2 週に 1 回、0.03、0.3、3 及び 30 mg/kg の投与量で静脈内投与、又は 30 mg/kg の投与量で皮下投与した。30 mg/kg の静脈内及び皮下投与群の雄で、13 週から心拍数の高値が認められた。30 mg/kg 静脈内投与群の雄 1 例では、39 週に ST 降下が認められた。30 mg/kg 静脈内及び皮下投与群の雄で、回復期間中に、拡張末期容積（EDV）及び収縮末期容積（ESV）の低値、一回拍出量（SV）の低値が認められた。また、30 mg/kg 静脈内投与群の雄で、回復期間中に駆出率（EF）の低値が認められた。回復期間中に ECG 変化の回復性が認められたが、心機能測定は回復期間中のみの実施であったため、心機能パラメータの回復性については確認できなかった。これらの所見は、生理学的濃度を超えるリン濃度（>8 mg/dL）において認められており、心筋繊維及び心筋血管並びに大動脈中膜における鉱質沈着との関連が示唆され、正常動物における KRN23 に対する過剰な薬理反応に起因するものと考えられた（2.4-6.1 項、2.6.6-9 項及び 4.2.3.7.7.-3）。

幼若カニクイザルを用いた 40 週間反復投与毒性試験（4 項）では、KRN23 を 2 週に 1 回、0.03、0.3 及び 3 mg/kg の投与量で静脈内投与、又は 3 mg/kg の投与量で皮下投与したとき、KRN23 に関連した ECG パラメータ及び血圧の変化は認められなかった。

表 1.2-1　KRN23 の *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験

試験の種類	試験の表題
In vitro	Determination of the binding affinities of KRN23 to human, cynomolgus monkey and rabbit FGF23 by Biacore (Study No. r-[redacted]-0326)
	Response Curve of Human, Monkey and Murine FGF23 by Sandwich ELISA (Study No. r-[redacted]-0026)
	Response Curve of Plasma FGF23 from Various Mammals by Sandwich ELISA (Study No. r-[redacted]-0027)
	Evaluation of the inhibitory activity of KRN23 against FGF23 signaling using a cell-based assay (Study No. d-[redacted]-816)
	Neutralization Activity of KRN23 against FGF23 of Various Mammals with In Vitro Assay (Study No. r-[redacted]-0021)
	Binding analysis of KRN23/FGF23 complex to recombinant human Klotho using Biacore system (Report No. r-[redacted]-0106)
	Binding analysis of KRN23/FGF23 complex to Klotho expressed in cultured cells using confocal microscopy (Report No. r-[redacted]-0107)
	Evaluation of the inhibitory activity of KRN23/FGF23 complex against FGF23 signaling using a cell-based assay (Report No. r-[redacted]-0342)
In vivo	A Single Intravenous Dose Study of KRN23 in Rabbits (Study No. [redacted])
	Effects of KRN23 on Urinary Phosphate Excretion in Cynomolgus Monkeys (Study No. [redacted]), Effects of KRN23 on Urinary Phosphorus Excretion in Cynomolgus Monkeys (Additional Test) (Study No. [redacted])
	Determination of Minimum Effective Dose of KRN23 in Cynomolgus Monkeys (Study No. [redacted])
	A Single Intravenous/Subcutaneous Dose Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Study of KRN23 in Cynomolgus Monkeys (Study No. [redacted]-022)
	A Single Intravenous Dose Pharmacology Study of KRN23 in Juvenile Cynomolgus Monkeys (Study No. [redacted]-021)
	A 13-Week Intermittent (Once Every 2 Weeks) Subcutaneous Dose Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study with KRN23 in Adult and Juvenile Cynomolgus Monkeys with a 8-Week Recovery (Study No. [redacted]116)
	Therapeutic Effects of Anti-FGF23 Antibodies in Hypophosphatemic Rickets/Osteomalacia (Aono et al, 2009)
	Anti-FGF-23 Neutralizing Antibodies Ameliorate Muscle Weakness and Decreased Spontaneous Movement of *Hyp* mice (Aono et al, 2011)

2　効力を裏付ける試験

2.1　*In vitro* 薬理試験

2.1.1　Biacore による KRN23 のヒト、カニクイザル及びウサギ FGF23 への結合親和性の測定（試験番号 r-[redacted]-0326）参考資料 4.2.1.1-1

Biacore™ T100 を用いて、KRN23 のヒト、カニクイザル及びウサギ FGF23 への結合親和性を評価した。KRN23 と各 FGF23 の相互作用に関する K_D を算出したところ、KRN23 は、ヒト、カニクイザル及びウサギ FGF23 に対して同程度の高い結合親和性を示すことが明らかとなった（表 2.1.1-1）。

表 2.1.1-1　ヒト、カニクイザル及びウサギ FGF23 における結合親和性

解析検体	K_D（mol/L）
ヒト FGF23	$3.0 \times 10^{-11} \pm 1.7 \times 10^{-11}$
カニクイザル FGF23	$3.9 \times 10^{-11} \pm 0.97 \times 10^{-11}$
ウサギ FGF23	6.3×10^{-11}

n= 3、平均値±標準偏差（ヒト及びカニクイザル）
n= 1（ウサギ）

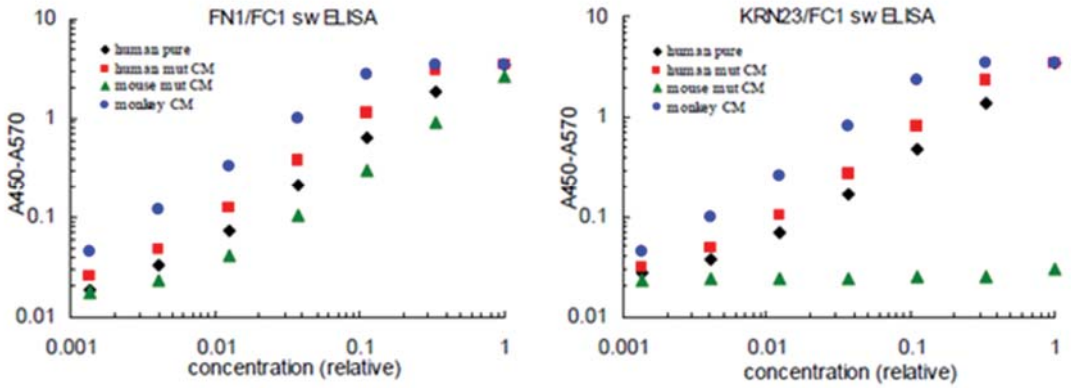
2.1.2　サンドイッチ ELISA によるヒト、サル及びマウス FGF23 反応曲線（試験番号 r-[redacted]-0026）参考資料 4.2.1.1-2

KRN23 の FGF23 に対する結合の種特異性を検討するために、サンドイッチ ELISA を用いて、ヒト、サル及びマウスの遺伝子組換え FGF23 に対する結合性試験を実施した。解析には、2 種類のマウス抗 FGF23 mAb である FN1 及び FC1 並びに KRN23 を用いた 2 種類のサンドイッチ ELISA を用いた（FN1 及び FC1 は、それぞれ FGF23 の N 末端及び C 末端部位を認識する）。FN1/FC1 サンドイッチ ELISA では、FN1 を捕捉抗体として用い、FC1 を検出抗体として使用し、切断されていない全長 FGF23 のみを検出した。KRN23/FC1 サンドイッチ ELISA では、KRN23 を捕捉抗体として用い、FC1 を検出抗体として使用し、KRN23 が各 FGF23 を認識するか確認した。

ヒト及びサル FGF23 では、FN1/FC1 及び KRN23/FC1 サンドイッチ ELISA の両方において、濃度依存的な反応が認められたことから、KRN23 は、ヒト及びサル FGF23 に結合することが示された。サル FGF23 の反応曲線の傾きは、ヒト FGF23 と同様であった。一方で、マウス FGF23 は KRN23/FC1 サンドイッチ ELISA では検出されず、FN1/FC1 サンドイッチ ELISA では検出された（図 2.1.2-1）。

以上の結果から、KRN23 はサル FGF23 とは交差反応を示すが、マウス FGF23 とは交差反応を示さないことが示された。

図 2.1.2-1　　サンドイッチ ELISA によるヒト、サル及びマウス FGF23 反応曲線



human pure：精製された遺伝子組換えヒト全長 FGF23
human mut CM：遺伝子組換えヒト FGF23 R176Q 及び R179Q の培養上清
mouse mut CM：遺伝子組換えマウス FGF23 R176Q 及び R179Q の培養上清
monkey CM：遺伝子組換えサル FGF23 の培養上清
R176Q 及び R179Q：Furin 依存性の消化抵抗性における FGF23 変異体（FGF23 179-180aa）

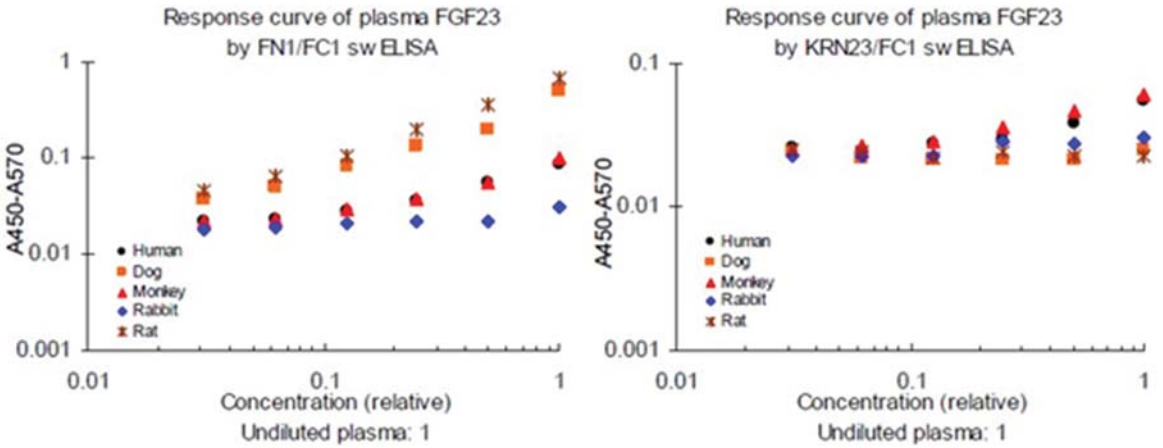
2.1.3 サンドイッチ ELISA による各種哺乳動物の血漿中 FGF23 反応曲線（試験番号 r-[redacted]-0027）参考資料 4.2.1.1-3

KRN23 の FGF23 に対する結合の種特異性を検討するために、サンドイッチ ELISA を用いて、各種哺乳動物（ヒト、サル、イヌ、ウサギ及びラット）の血漿中 FGF23 に対する結合性試験を実施した。解析には、2 種類のマウス抗 FGF23 mAb である FN1 及び FC1 並びに KRN23 を用いた 2 種類のサンドイッチ ELISA を用いた。

ウサギ以外の血漿中 FGF23 は、FN1/FC1 サンドイッチ ELISA で検出された（図 2.1.3-1）。この結果から、FN1 及び FC1 はともに、ヒト、サル、イヌ及びラットの血漿中 FGF23 に対し結合することが示された。一方、KRN23/FC1 サンドイッチ ELISA では、ヒト及びサル血漿中 FGF23 のみ検出された。この結果から、KRN23 がヒト及びサルの FGF23 に結合することが確認され、遺伝子組換え FGF23 を用いて検討した結果と一致していた（2.1.2 項）。ウサギ FGF23 は、2 種類の ELISA ともに陰性を示した。ウサギ FGF23 の FC1 への結合性が確認できなかったことから、KRN23（N 末端）又は FC1（C 末端）、若しくはその両方が、ウサギ FGF23 に結合しないと結論づけることはできなかった。

以上の結果から、KRN23 は、サル FGF23 と交差反応を示すが、ラット及びイヌ FGF23 とは交差反応を示さないことが示された。

図 2.1.3-1 サンドイッチ ELISA を用いた各哺乳動物の血漿中 FGF23 反応曲線



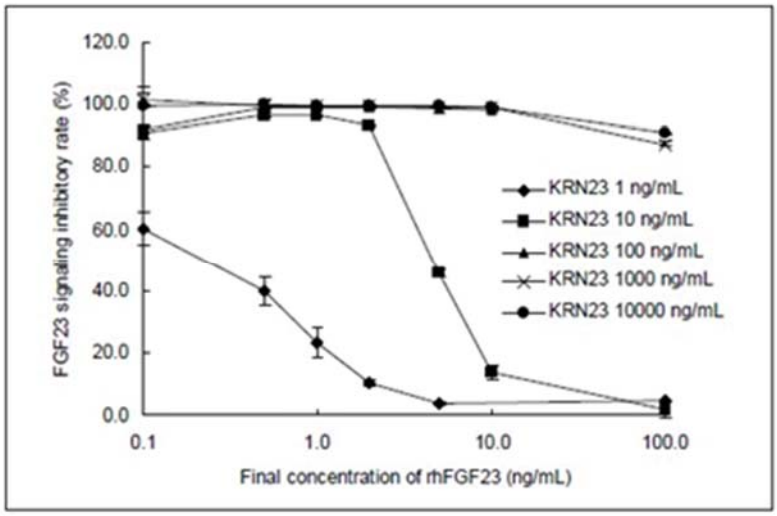
2.1.4 セルベースアッセイによる KRN23 の FGF23 シグナル伝達に対する阻害活性（試験番号 d-[redacted]-816）評価資料 4.2.1.1-4

セルベースアッセイを用いて、遺伝子組換えヒト FGF23 のシグナル伝達に対する KRN23 の阻害活性を評価した。FGF23 依存的細胞内シグナル伝達を評価するために、ヒト Klotho 及び FGFR を共発現させ、初期増殖応答因子 1（Egr-1）プロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞によるレポーターアッセイを用いて、KRN23/FGF23 複合体による FGF23 シグナル伝達の阻害を評価した。FGF23 シグナル伝達に対する KRN23 の阻害活性は、シグナル伝達阻害率を算出することにより評価した。ルシフェラーゼ活性は 0.05～50 ng/mL（最終濃度）の範囲で FGF23 濃度の増加に伴い上昇した。

KRN23 は、濃度の増加に伴い、FGF23 のシグナル伝達を阻害した。特に、FGF23 の濃度範囲 0.1～100 ng/mL（最終濃度）における FGF23 のシグナル伝達は、1000 ng/mL（最終濃度）以上の KRN23 の存在下でほぼ完全に阻害された（図 2.1.4-1）。

以上の結果から、KRN23 は、濃度の増加に伴い、FGF23 のシグナル伝達を阻害することが示された。

図 2.1.4-1　　KRN23 によって誘導された FGF23 シグナル伝達阻害



n= 3、平均値±標準偏差
rhFGF23: Recombinant human FGF23
KRN23 100 ng/mL（rhFGF23 100 ng/mL）及び KRN23 1 ng/mL（rhFGF23 10 ng/mL）の検体は、算出不能のため図から除外した。

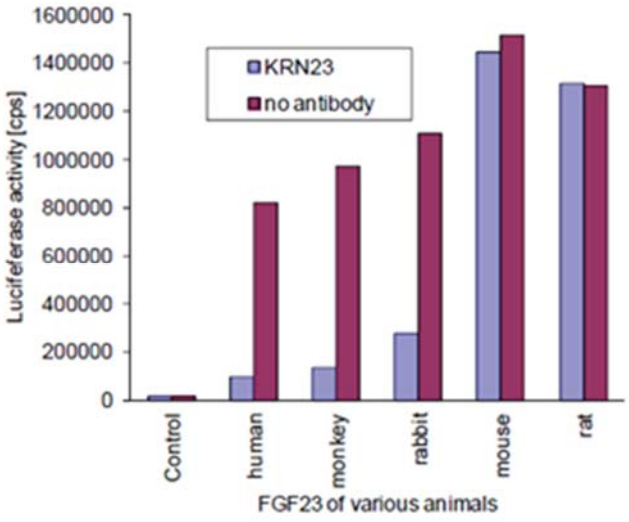
2.1.5　セルベースアッセイによる KRN23 の各種哺乳動物の FGF23 に対する中和活性（試験番号 r-[redacted]-0021）参考資料 4.2.1.1-5

KRN23 による各哺乳動物の FGF23 シグナル伝達の阻害を評価した。FGF23 依存的細胞内シグナル伝達を評価するために、ヒト Klotho 及び FGFR を共発現させ、Egr-1 プロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞によるレポーターアッセイを用いて、ヒト、サル、マウス、ウサギ及びラットの遺伝子組換え FGF23 に対する KRN23（10 µg/mL）のシグナル伝達阻害を検討した。

すべての FGF23 において、ルシフェラーゼ活性の上昇が認められたことから、FGF23 は、種に関わりなく、ヒト Klotho 発現細胞において Egr-1 シグナル伝達を誘導することが示された（図 2.1.5-1）。KRN23 はヒト、サル及びウサギの FGF23 活性を阻害したが、マウス又はラットの FGF23 活性を阻害しなかった。

以上の結果から、KRN23 は、ヒト、サル及びウサギ FGF23 のシグナル伝達を阻害するが、マウス及びラット FGF23 のシグナル伝達を阻害しないことが示された。

図 2.1.5-1　セルベースアッセイによる KRN23 の各種哺乳動物の FGF23 に対する中和活性



2.1.6　Biacore システムを用いた KRN23/FGF23 複合体と遺伝子組換えヒト Klotho の結合解析（報告書番号 r-[redacted]-0106）参考資料 4.2.1.1-6

Biacore™ T100 システムを用いて、KRN23/FGF23 複合体の遺伝子組換えヒト Klotho に対する結合性を評価した。遺伝子組換えヒト Klotho（0.625、1.25、2.5、5 及び 10 µg/mL）は、センサーチップ上に形成させた KRN23/FGF23 複合体に対し濃度依存的な反応を示した。KRN23/FGF23 複合体と遺伝子組換えヒト Klotho の相互作用における K_D は、9.116×10^{-8} mol/L であった。

2.1.7　共焦点顕微鏡による培養細胞で発現した KRN23/FGF23 複合体と Klotho の結合解析（報告書番号 r-[redacted]-0107）参考資料 4.2.1.1-7

Alexa488 標識した KRN23（Alexa488-KRN23）及び共焦点顕微鏡を用いて、KRN23/FGF23 複合体と培養細胞に発現したヒト Klotho の結合性を評価した。ヒト Klotho 発現細胞を、Alexa488-KRN23/FGF23 混合物、Alexa488-KRN23 のみ、又は FGF23 のみの条件で、約 2 時間インキュベート後、共焦点顕微鏡を用いて解析した。特異性を検討するために、ヒト Klotho を発現しない HEK293 細胞を、Alexa488-KRN23/FGF23 混合物とともに、約 2 時間インキュベート後、同様に解析した。

Alexa488-KRN23/FGF23 混合物とともにインキュベートしたヒト Klotho 発現細胞では、Alexa488-KRN23 の蛍光シグナルが、細胞膜及び細胞内区画内で検出された。一方、Alexa488-KRN23 のみ又は FGF23 のみの条件にてインキュベートしたヒト Klotho 発現細胞ではシグナルは認められなかった。また、Alexa488-KRN23/FGF23 混合物とともにインキュベートしたヒト Klotho を発現しない HEK293 細胞では、シグナルは認められなかった。

以上の結果から、KRN23/FGF23 複合体は培養細胞に発現したヒト Klotho に結合することが示された。

2.1.8 セルベースアッセイによる KRN23/FGF23 複合体の FGF23 シグナル伝達に対する阻害活性（報告書番号 r-[redacted]-0342）参考資料 4.2.1.1-8

ヒト Klotho 及び FGFR を共発現させ、Egr-1 プロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞によるレポーターアッセイを用いて、KRN23/FGF23 複合体による FGF23 シグナル伝達の阻害を評価した。KRN23/FGF23 複合体の阻害効果を、FGF23 と KRN23 による直接的な中和とは区別するため、KRN23 が結合又は阻害しないマウス FGF23 を用いてヒト Klotho 介在性シグナル伝達を活性化した。KRN23/FGF23 複合体は、遺伝子組換えヒト FGF23（0、10、100、1000 及び 10000 ng/mL）に対して過剰の KRN23（500 µg/mL）を混合して調製した。FGF23 シグナル伝達を阻害することが知られているヒト FGF23 の C 末端ペプチド（Goetz et al, 2010）を、本試験の阻害作用の陽性対照として評価した。

マウス FGF23（10 及び 100 ng/mL）によるシグナル伝達は、1000～10000 ng/mL の KRN23/FGF23 複合体存在下において、複合体濃度に応じて低下した。KRN23/FGF23 複合体は、陽性対照に用いたヒト FGF23 C 末端ペプチドと同様な阻害プロファイルを示した。

以上の結果から、KRN23/FGF23 複合体は、ヒト Klotho への結合に関して KRN23 非結合の FGF23 と競合することによって、FGF23 シグナル伝達を阻害することが示された。

2.2 *In vivo* 薬理試験

2.2.1 ウサギにおける KRN23 の単回静脈内投与試験（試験番号 [redacted]）評価資料 4.2.1.1-9

雄性ウサギ（Kbl:NZW、19 週齢）に KRN23（3、10 及び 30 mg/kg）又は媒体を単回静脈内投与し、血液生化学及び尿検査を実施した（表 2.2.1-1）。ウサギでは他の哺乳類と比較して通常の血清 Ca 濃度が高いことから（Eckermann-Ross, 2008）、薬理作用である血清リン濃度上昇に対する高い感受性を制御するために、Ca 含量が少ない 2 種類の飼料（実験飼料 I：0.6% Ca 及び 0.6%リン、実験飼料 II：1.2% Ca 及び 0.6%リン）を用いた。Day −8 及び−1 並びに Day 1（投与前）～11 に採血を実施し、血清リン、Ca、1,25(OH)$_2$D、クレアチニン及び BUN 濃度を測定した（Day −8 及び−1 においては、血清リン及び Ca 濃度のみ測定）。Day 2～11 における 24 時間蓄尿を用いて、尿中クレアチニン、リン及び Ca 排泄量（mg／日）を測定した。試験終了時（Day 11）に動物を剖検し、臓器及び組織を採材し固定した。固定した腎臓を薄切し、von Kossa 染色を用いて Ca 沈着を観察した。

表 2.2.1-1 ウサギにおける KRN23 単回静脈内投与試験（試験番号：LB07448）

群	被験及び対照物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数	
					実験飼料 I[a]	実験飼料 II[a]
1	媒体	-	1.51	-	3	3
2	KRN23	3	1.51	1.99	4	4
3	KRN23	10	1.51	6.64	4	4
4	KRN23	30	1.51	19.92	4	4

a: 実験飼料 I：0.6% Ca 及び 0.6%リン、実験飼料 II：1.2% Ca 及び 0.6%リン
受け入れから Day −15 まで、2% Ca を含有する通常飼料を動物に与えた。Day −15 から剖検まで、実験飼料を動物に与えた。

KRN23 投与により、血清リン及び 1,25(OH)$_2$D 濃度が上昇し、尿中リン排泄量が減少した。尿中 Ca 排泄量の減少は、KRN23 を投与したすべての動物に認められた。Ca の沈着が KRN23 を投与したすべての動物の腎臓に認められ、投与量の増加に伴い、石灰化の程度が強くなる傾向があった。30 mg/kg 投与群において、瀕死状態となり試験終了前に安楽死させた動物が実験

飼料 I 群に 1 例、死亡動物が実験飼料 II 群に 2 例認められた。安楽死及び死亡個体では血清クレアチニン及び BUN 濃度の上昇が認められており、瀕死状態や死亡は腎鉱質沈着に起因する急性腎不全によるものと考えられた。正常な動物では XLH で発現するような過剰な FGF23 やリンの調節異常が認められない。この腎臓所見は、血清リン濃度が正常範囲を超えて上昇した動物で認められたことから（範囲：8～39 mg/dL）、正常動物における KRN23 の過剰な薬理反応によるものと考えられた（2.4-6.1 項、2.6.6-9 項及び 4.2.3.7.7-3）。

以上の結果から、ウサギにおいて、KRN23 は腎臓でのリン再吸収を増加させることにより、血清リン濃度を上昇させ、血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度も上昇させることが示された。

2.2.2 カニクイザルにおける KRN23 の尿中リン排泄量に対する影響（試験番号 [redacted]）評価資料 4.2.1.1-10、評価資料 4.2.1.1-11

カニクイザルにおける KRN23 の単回静脈内投与によるリン代謝への影響について検討した。カニクイザル（2～3 歳齢）に KRN23（1、3 及び 10 mg/kg）又は媒体を単回静脈内投与した（表 2.2.2-1）。溶媒投与を 1 週間間隔で 3 回行った後、KRN23 を単回投与した。一般症状観察、体重及び飲水量の測定を実施した。投与直前、投与後 4、8、24、48、72 及び 168 時間に採血を実施し、血清クレアチニン、リン、Ca、PTH 及び $1,25(OH)_2D$ 濃度を測定した。投与後 0～4、4～8、8～24、24～48、48～72 及び 144～168 時間における蓄尿を用いて、尿量、尿中クレアチニン、リン及び Ca 濃度を測定した。更に、TmP/GFR を算出した。

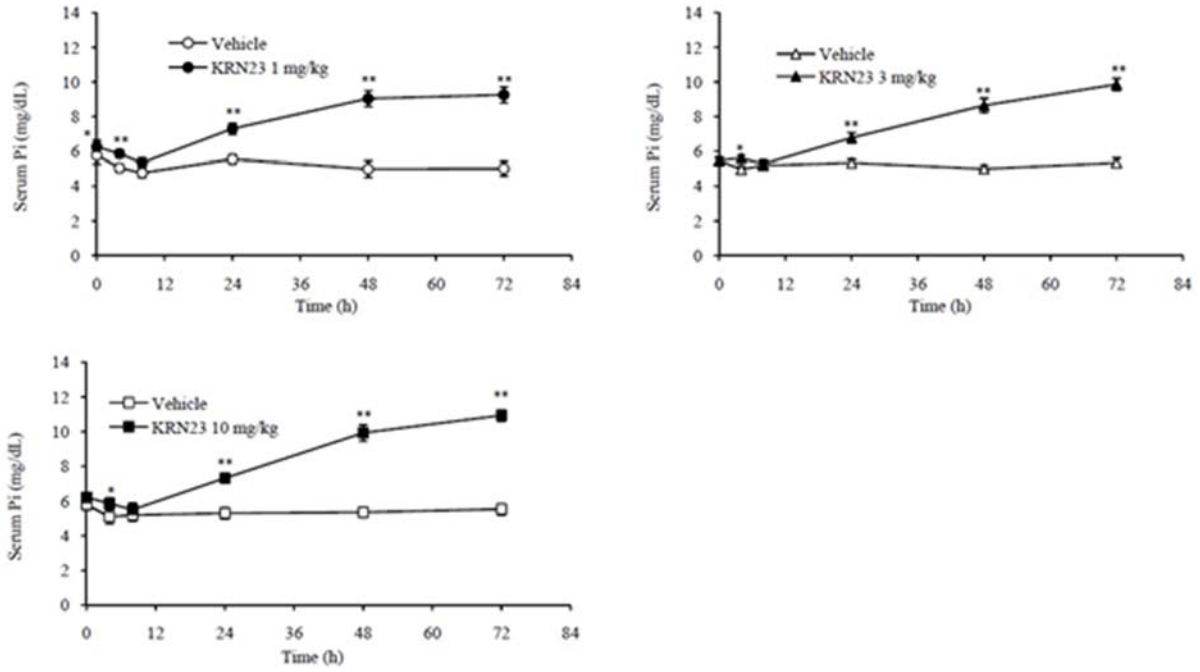
表 2.2.2-1 カニクイザルにおける KRN23 の尿中リン排泄量に対する影響（試験番号：LB07185）

群	被験及び対照物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数	
					雄	雌
-	媒体	-	2	-	-	-
1	KRN23	1	2	0.5	3	3
2	KRN23	3	2	1.5	3	3
3	KRN23	10	2	5	3	3

試験期間中において、いずれの動物においても KRN23 投与に関連する一般症状変化は認められず、体重及び飲水量の大きな変化は観察されなかった。KRN23 による血清リン（図 2.2.2-1）、TmP/GFR（図 2.2.2-2）及び血清 $1,25(OH)_2D$（図 2.2.2-3）値の有意な上昇が、投与後 72 時間まで認められた。TmP/GFR の上昇が認められているため、血清リン濃度の上昇は、主に腎臓でのリン再吸収の増加によって引き起こされると考えられた。更に、血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度の上昇が認められていることから、KRN23 投与によってリンの腸管吸収が亢進することが示唆された。3 及び 10 mg/kg 群において、血清 Ca 及び PTH 濃度の有意な変化が認められたが、これらの変化はわずかであり、薬理学的意義は低いと判断した。KRN23 に関連する血清クレアチニン濃度の明らかな変化は認められなかった。

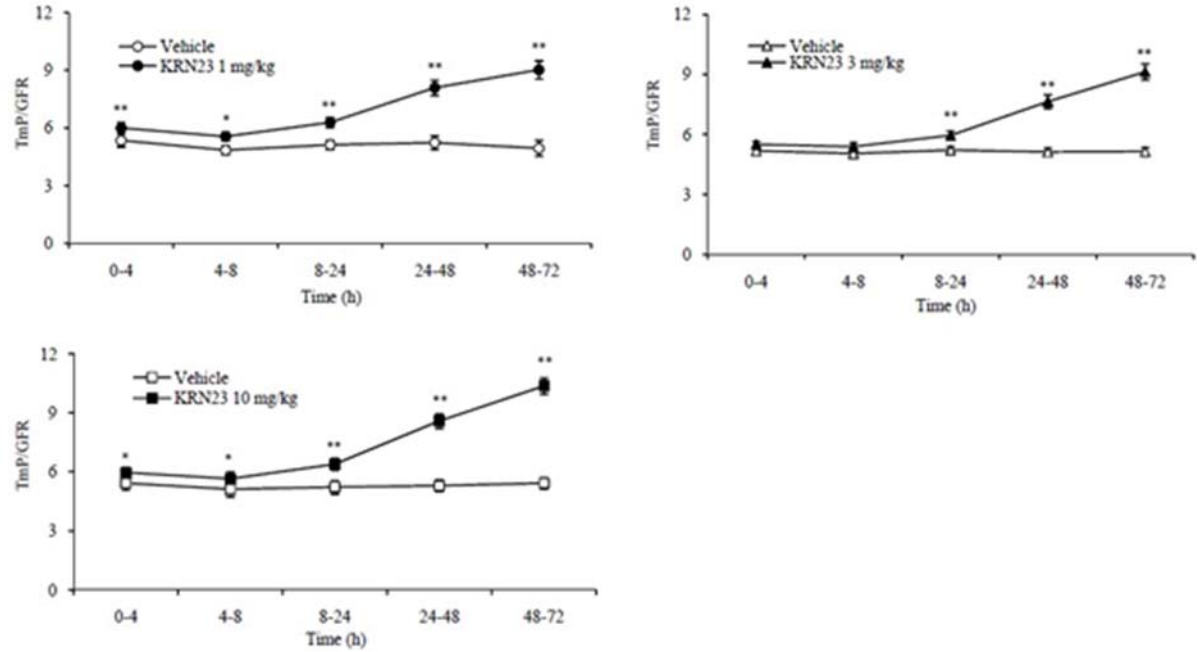
以上の結果から、カニクイザルにおいて、KRN23 は腎臓でのリン再吸収を増加させ、血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度を上昇させることにより、血清リン濃度を上昇させることが示された。

図 2.2.2-1　KRN23 の血清リンに対する影響



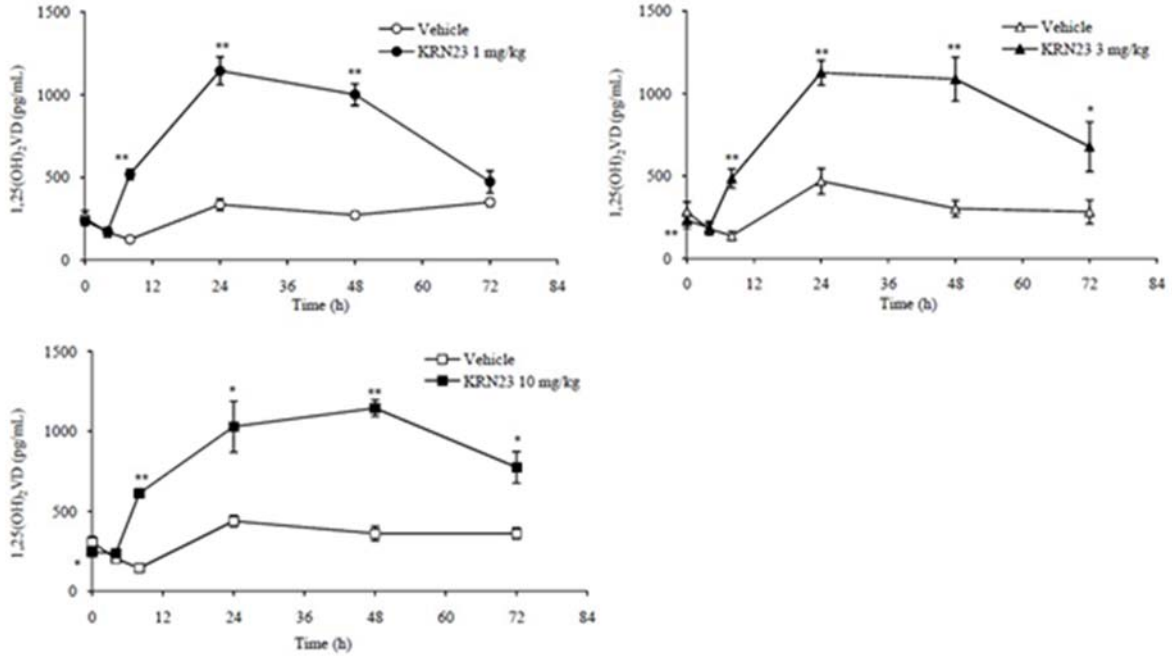
n= 6、平均値±標準誤差
*： p<0.05、**： p<0.01（vs. 媒体投与群、Paired t-test）

図 2.2.2-2　KRN23 の TmP/GFR に対する影響



n= 6、平均値±標準誤差
*： p<0.05、**： p<0.01（vs. 媒体投与群、Paired t-test）

図 2.2.2-3　KRN23 の 1,25(OH)$_2$D 濃度に対する影響



n= 6、平均値±標準誤差
*： p<0.05、**： p<0.01（vs. 媒体投与群、Patred t-test）

2.2.3　カニクイザルにおける KRN23 の最小有効量確認試験（試験番号 [redacted]）
評価資料 4.2.1.1-12

KRN23 による血清リン及び 1,25(OH)$_2$D 濃度上昇の最小有効量を検討した。雌雄カニクイザル（2～3 歳齢）に KRN23（0.001、0.003、0.01、0.03、0.1 及び 0.3 mg/kg）又は媒体を単回静脈内投与した（表 2.2.3-1）。試験期間中に、一般症状観察及び体重の測定を実施した。投与前、投与後 8 時間、投与後 1、2、3、7 及び 10 日目に採血を実施し、血清 BUN、クレアチニン、リン、Ca、インタクト PTH 及び 1,25(OH)$_2$D 濃度を測定した。

表 2.2.3-1　　カニクイザルでの KRN23 の最小有効量確認試験（試験番号：LB07190）

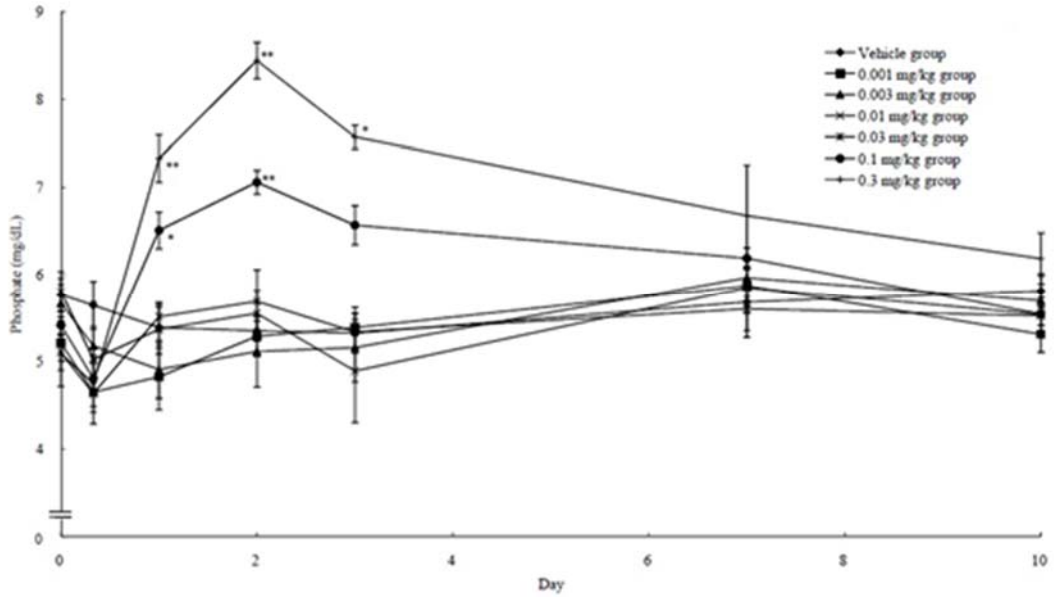
群	被験及び対照物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数	
					雄	雌
1	媒体	-	2	-	2	2
2	KRN23	0.001	2	0.0005	2	2
3	KRN23	0.003	2	0.0015	2	2
4	KRN23	0.01	2	0.005	2	2
5	KRN23	0.03	2	0.015	2	2
6	KRN23	0.1	2	0.05	2	2
7	KRN23	0.3	2	0.15	2	2

試験期間中において、いずれの動物においても KRN23 投与に関連する一般症状変化は認められなかった。投与前日から投与後 10 日目までの体重は、すべての動物において同程度又は増加しており、異常は認められなかった。KRN23 による血清リン濃度の上昇が、0.1 mg/kg 群では投与後 1 及び 2 日目に認められ、0.3 mg/kg 群では投与後 1～3 日目に認められた（図 2.2.3-1）。KRN23 による血清 1,25(OH)$_2$D 濃度の上昇が、0.03 mg/kg 群では投与後 8 時間に認められ、

0.1 及び 0.3 mg/kg 群では投与後 8 時間及び投与の翌日に認められた（図 2.2.3-2）。いずれの動物においても、血清 BUN、クレアチニン、Ca 及び PTH 濃度に大きな変化は認められなかった。

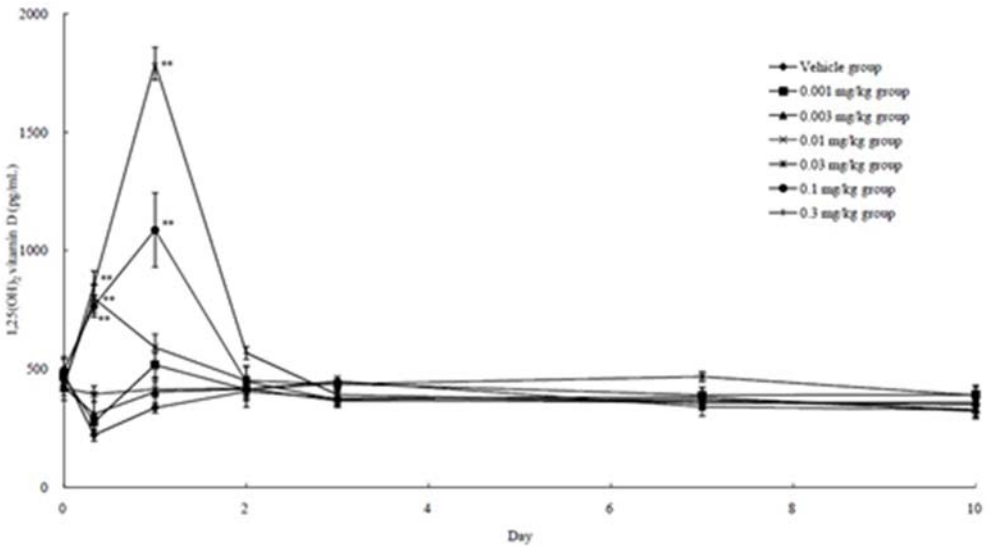
KRN23 による血清リン濃度の上昇が 0.1 mg/kg 以上の投与量で認められ、血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度の上昇が 0.03 mg/kg 以上の投与量で認められた。したがって、この試験条件下における KRN23 の最小有効量は、0.03 mg/kg であると考えられた。

図 2.2.3-1　成熟カニクイザルにおける KRN23 静脈内投与の血清リン濃度に対する影響



n= 4、平均値±標準誤差
*： p<0.05、**： p<0.01（vs. 媒体投与群、Dunnett's test）

図 2.2.3-2　成熟カニクイザルにおける KRN23 静脈内投与の $1,25(OH)_2D$ 濃度に対する影響



n= 4、平均値±標準誤差
**： p<0.01（vs. 媒体投与群、Dunnett's test）

2.2.4 カニクイザルにおける KRN23 単回静脈内／皮下投与の PK/PD 試験（試験番号[redacted]-022）評価資料 4.2.1.1-13

カニクイザルへの単回静脈内及び皮下投与における、KRN23 の PK/PD プロファイルを評価した。表 2.2.4-1 に示したように、雄性成熟カニクイザル（3～5 歳齢）に KRN23（0.03、0.3 及び 3 mg/kg）又は媒体を単回静脈内又は皮下投与した。試験期間中に、一般症状観察及び体重の測定を実施した。Day −4、投与前、投与後 8、24（Day 1）、72（Day 3）時間、Day 7、14、28 及び 42（計 9 時点）に採血を実施し、血清 BUN、クレアチニン、リン及び Ca 濃度を測定した。血清 $1,25(OH)_2D$ 及びインタクト PTH 濃度に関しては、投与前、投与後 8、24（Day 1）、72（Day 3）時間、Day 7、14 及び 28（計 7 回）に採血を実施し測定した。

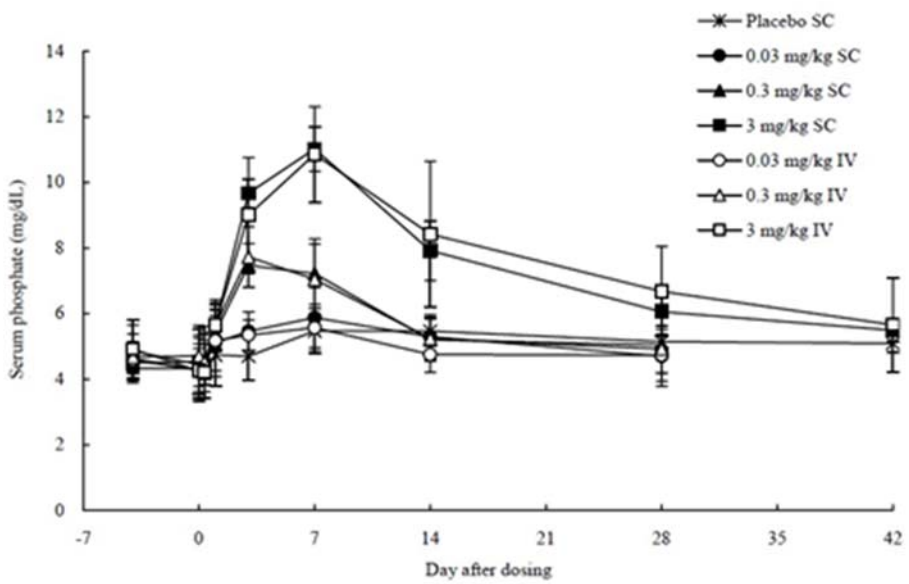
表 2.2.4-1 成熟カニクイザルに対する単回静脈内／皮下投与の PK/PD 試験（試験番号：SBL303-022）

群	被験及び対照物質	投与経路	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数 雄
1	媒体	皮下	-	0.3	-	4
2	KRN23	皮下	0.03	0.3	0.1	4
3	KRN23	皮下	0.3	0.3	1.0	4
4	KRN23	皮下	3	0.3	10	4
5	KRN23	静脈内	0.03	0.3	0.1	4
6	KRN23	静脈内	0.3	0.3	1.0	4
7	KRN23	静脈内	3	0.3	10	4

静脈内及び皮下投与において、KRN23 は、媒体投与群と比較して、0.3 及び 3 mg/kg の投与量で血清リン濃度を上昇させた（図 2.2.4-1）。両投与経路において、投与量の増加に伴って、血清リン濃度上昇の程度及び持続時間が変化した。両投与経路において、KRN23 は、投与前値と比較して、0.03 mg/kg の投与量で血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度の上昇傾向を示した。また、媒体投与群と比較して、0.3 及び 3 mg/kg の投与量で血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度を上昇させた（図 2.2.4-2）。いずれの投与群においても、KRN23 投与に関連する一般症状（投与部位観察含む）、体重、血清 Ca、BUN、クレアチニン及びインタクト PTH 濃度の変化は認められなかった。

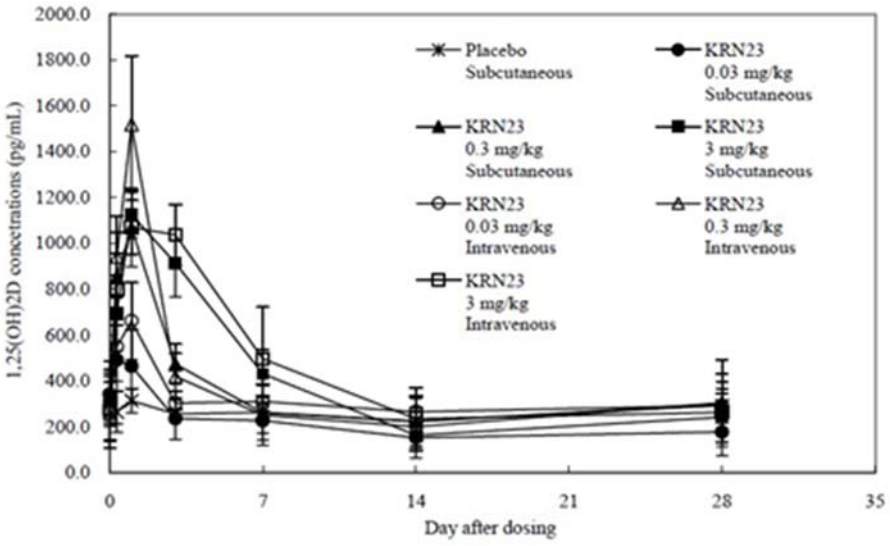
KRN23 は、静脈内及び皮下投与により、投与量の増加に伴って、血清リン及び $1,25(OH)_2D$ 濃度を上昇させた。KRN23 の静脈内及び皮下投与によるこれらの上昇の程度及び持続時間は同程度であったことから、投与経路により薬理作用が変化することはないことが示された。この試験で行われた PK 解析の結果は 2.6.4 に示す。

図 2.2.4-1　雄性カニクイザルにおける KRN23 単回投与（静脈内又は皮下投与）後の血清リン濃度の変化



n= 4、平均値±標準偏差

図 2.2.4-2　雄性カニクイザルにおける KRN23 単回投与（静脈内又は皮下投与）後の血清 1,25(OH)$_2$D 濃度の変化



n= 4、平均値±標準偏差

2.2.5　幼若カニクイザルにおける KRN23 の単回静脈内投与薬理試験（試験番号 [redacted]-021）評価資料 4.2.1.1-14

幼若カニクイザルに単回静脈内投与した場合の、血清リン及び 1,25(OH)$_2$D 濃度の上昇に必要な KRN23 の最小有効量を検討した。

雄性幼若カニクイザル（6 又は 7 ヵ月齢）に KRN23（0.001、0.003、0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg）又は媒体を単回静脈内投与した（表 2.2.5-1）。試験期間中に、一般症状観察及び体重の測定を実施した。Day −2、投与前、投与後 8、24（Day 1）、72（Day 3）時間、Day 7、14

及び 28（計 8 時点）に採血を実施し、血清リン及び Ca 濃度を測定した。血清 $1,25(OH)_2D$ 及びインタクト PTH 濃度に関しては、投与前、投与後 8、24（Day 1）、72（Day 3）時間、Day 7、14 及び 28（計 7 時点）に採血を実施し測定した。

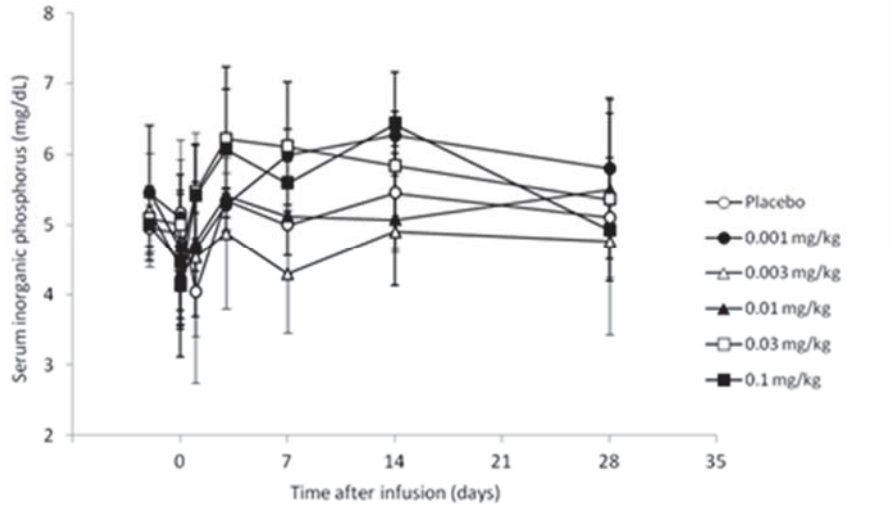
表 2.2.5-1　幼若カニクイザルへの KRN23 の単回静脈内投与薬理試験（試験番号：SBL303-021）

群	被験及び対照物質	投与量(mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数
					雄
1	媒体	-	1	-	3
2	KRN23	0.001	1	0.001	3
3	KRN23	0.003	1	0.003	3
4	KRN23	0.01	1	0.01	3
5	KRN23	0.03	1	0.03	3
6	KRN23	0.1	1	0.1	3

有意差は認められなかったものの、0.03 及び 0.1 mg/kg 群では、投与後 3 日目において、媒体投与群と比較して、血清リン濃度の上昇が認められた（図 2.2.5-1）。また、0.003 mg/kg 以上の投与量で、投与後 8 時間において、媒体投与群と比較して、血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度の有意な上昇が認められた（図 2.2.5-2）。有意差は認められなかったが、0.003～0.03 mg/kg の投与量では、投与後 1 日目においても、血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度は依然として高かった。0.1 mg/kg の投与量では、投与後 1 日目の血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度は有意に高く、投与後 3 日目でもやや高かった。いずれの投与群においても、KRN23 投与に関連する一般症状、体重、血清 Ca 及びインタクト PTH 濃度の変化は認められなかった。

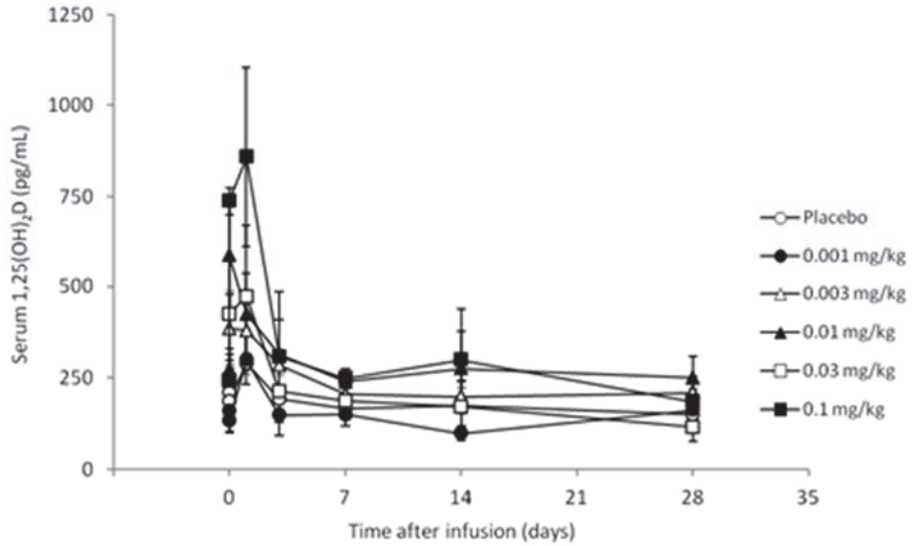
以上の結果から、幼若カニクイザルにおける KRN23 の単回静脈内投与において、0.003 mg/kg 以上の投与量における血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度の上昇及び 0.03 mg/kg 以上の投与量における血清リン濃度の上昇が確認された。この試験における PK の結果は 2.6.4 に要約されている。

図 2.2.5-1　幼若カニクイザルにおける KRN23 単回静脈内投与後の血清リン濃度の変化



n= 3、平均値±標準偏差

図 2.2.5-2　幼若カニクイザルにおける KRN23 単回静脈内投与後の血清 1,25(OH)$_2$D 濃度の変化



n= 3、平均値±標準偏差
p<0.05（投与後 8 時間：0.003 及び 0.03 mg/kg）、p<0.01（投与後 8 時間：0.01 及び 0.1 mg/kg、投与後 24 時間：0.1 mg/kg）（vs. 媒体投与群、Dunnett's test）

2.2.6　成熟及び幼若カニクイザルにおける KRN23 の 13 週間間歇（1 回／2 週）皮下投与の PK/PD 試験並びに 8 週間回復性試験（試験番号 [redacted]-116）評価資料 4.2.1.1-15

成熟及び幼若カニクイザルへの 13 週間（2 週に 1 回）間歇皮下投与における KRN23 の PK/PD プロファイルを評価した。

雌雄の幼若（7～8 ヵ月齢）及び成熟（4～6 歳齢）カニクイザルに KRN23（1 mg/kg）を 2 週間に 1 回、計 7 回皮下投与した（表 2.2.6-1）。試験期間中に、一般症状観察及び体重の測定を実施した。Day −3、初回投与後 8、24、72、120、168 及び 336 時間（計 6 時点）、4 及び 6 回目投与前、最終投与前、最終投与後 8、24、72、120、168 及び 336 時間（計 7 時点）、回復期間の Day 1、8、22 及び 50 に採血を実施し、血清リン濃度を測定した。

表 2.2.6-1　成熟及び幼若カニクイザルにおける KRN23 の 13 週間間歇皮下投与の PK/PD 試験（試験番号：SBL303-116）

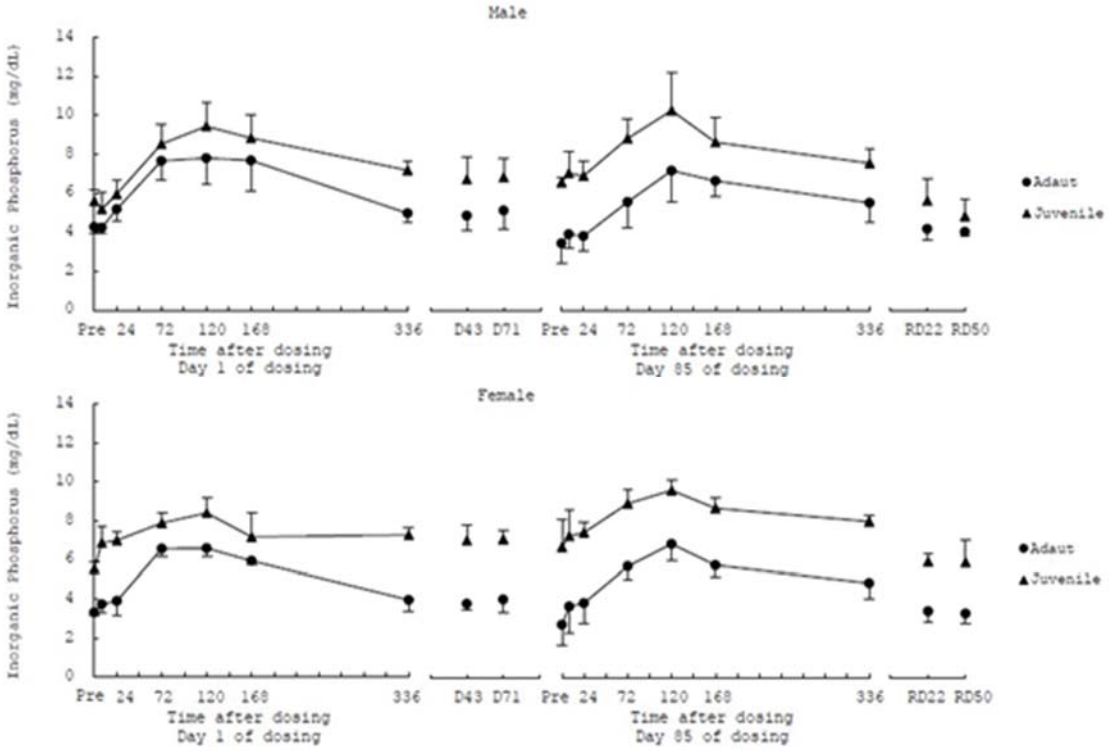
群	被験及び対照物質	動物	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数	
						雄	雌
1	KRN23	成熟	1	2	0.5	4	4
2	KRN23	幼若	1	2	0.5	4	4

いずれの投与群においても、KRN23 投与に関連する一般症状及び体重の変化は認められなかった。血清リン濃度変化の結果を下記に示す（図 2.2.6-1）。幼若カニクイザルにおける KRN23 投与前の血清リン濃度は成熟カニクイザルよりも高かった。幼若雌性カニクイザルにおける血清リン濃度は、初回投与時の投与後 8 時間から上昇し、その他の成熟及び幼若雄性並びに成熟雌性カニクイザルでは、初回投与時の投与後 72 時間から上昇した。最終投与後の幼若及び成熟カニクイザルにおいて、血清リン濃度は初回投与後と同様な推移を示した。幼若及び成熟カニクイザルにおいて、最終投与後 28 日目（回復期の Day 22）までに、血清リン濃度

は投与前の濃度に戻った。幼若カニクイザルにおける血清リン濃度は、投与前を含むすべての時点で成熟カニクイザルと比較してわずかに高かった。雄性と雌性又は初回投与と最終投与の間に明らかな差は認められなかった。

以上の結果から、幼若カニクイザルにおける KRN23 投与前後の血清リン濃度は、成熟カニクイザルと比較してわずかに高いことが示された。幼若及び成熟カニクイザルいずれにおいても、KRN23 反復投与による血清リン濃度上昇は、初回投与時と同様の推移であった。回復期間後には、成熟及び幼若カニクイザルの血清リン濃度は投与前の濃度に戻った。

図 2.2.6-1　成熟及び幼若カニクイザルにおける KRN23 の 13 週間間歇皮下投与後の血清リン濃度の変化



n= 4（各雄及び雌）、平均値±標準偏差

2.2.7　低リン血症性くる病／骨軟化症における抗 FGF23 抗体の治療効果（Aono et al, 2009）参考資料 4.2.1.1-16

幼若 Hyp マウスにおけるマウス抗 FGF23 抗体の低リン血症性くる病／骨軟化症に対する薬理作用を検討した。単回投与試験では、雄性 Hyp マウス（6～8 週齢）に、マウス抗 FGF23 抗体（FN1 と FC1［1:1］の混合物、IgG_1）を 4 及び 16 mg/kg の投与量で皮下投与した。対照群として、雄性 WT 及び Hyp マウスに対照 IgG_1（対照抗体）を 16 mg/kg の投与量で投与した。血清リン及び Ca 濃度推移をモニタリングするため、投与後 0、1、3、5、7、11 及び 14 日目に眼窩から連続的に採血を実施した。リン分画排泄率（FEPi）を評価するため、投与後 48～72 時間に尿を採取した。腎臓における NaPiIIa 及びビタミン D 代謝酵素の発現量を解析するため、投与後 12 時間に一部のマウスを安楽死させ、腎臓を採取した。血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度推移をモニタリングするため、投与後 1、4、7、10 及び 14 日目に安楽死させたマウスの心臓から全採血を実施した。

反復投与試験では、雄性幼若 Hyp マウス（4 週齢）にマウス抗 FGF23 抗体（4 及び 16 mg/kg）を毎週（Day 0、7、14、21 及び 28 に計 5 回）皮下投与した。すべての動物を Day 31 に安楽死させ、血液、脛骨及び大腿骨、並びに腎臓を採取した。腎臓の NaPiIIa タンパク質に対する免疫組織化学的検査を行った。骨の組織学的解析のために、μFX-1000（Fujifilm）を用いて大腿骨及び脛骨の軟 X 線画像を取得した。非脱灰骨切片の Villanueva-Goldner 染色を実施した。骨代謝回転率を解析するために、テトラサイクリン（30 mg/kg、腹腔内投与）及びカルセイン（30 mg/kg、皮下投与）を、それぞれ剖検の 7 日前及び 2 日前に投与した。

Hyp マウスにおいて、マウス抗 FGF23 抗体の単回投与により、投与量の増加に伴って血清リン濃度が上昇した。Hyp マウス+マウス抗 FGF23 抗体 16 mg/kg 投与群（Hyp マウス 16 mg/kg 群）において、Day 7 に血清 Ca 濃度の一時的な上昇が認められたが、全体的に血清 Ca 濃度の顕著な変化は認められなかった。マウス抗 FGF23 抗体の投与により、Hyp マウスにコントロール抗体を投与した群（Hyp マウス対照群）において認められた腎臓からの過剰なリン排泄が完全に正常化した。Hyp マウス対照群では、WT マウスと比較して、腎臓の NaPiIIa タンパク発現量の減少が認められた。一方、マウス抗 FGF23 抗体の投与により、Hyp マウスにおける NaPiIIa タンパク発現量が増加した。

Hyp マウスにおいて、マウス抗 FGF23 抗体の単回投与により、血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度も有意に上昇した。マウス抗 FGF23 抗体の投与により、25-ヒドロキシビタミン D-1α-水酸化酵素の mRNA 発現が顕著に増加した一方で、Hyp マウス対照群において増加していた 25-ヒドロキシビタミン D-24-水酸化酵素の mRNA 発現が WT マウスレベルにまで低下した。

反復投与試験における Day 31 の血清及び尿パラメータを表 2.2.7-1 に要約する。マウス抗 FGF23 抗体を投与した Hyp マウスにおける血清リン濃度は、4 及び 16 mg/kg の投与量において、それぞれ WT マウスと同程度及び WT マウスより高値であった。また、マウス抗 FGF23 抗体を投与した Hyp マウスでは、Hyp マウス対照群と比較して、FEPi が投与量の増加に伴い減少した。更に、Hyp マウス対照群と比較して、血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度が有意に上昇した。マウス抗 FGF23 抗体投与により、血清 Ca 及び尿中 Ca 排泄が投与量の増加に伴い上昇したが、腎鉱質沈着は認められなかった。血清 BUN 及びクレアチニン濃度は、いずれもマウス抗 FGF23 抗体投与による影響は認められなかった。

成長期におけるマウス抗 FGF23 抗体の投与により、Hyp マウスの成長が顕著に改善された。マウス抗 FGF23 抗体が投与された Hyp マウスでは、Hyp マウス対照群と比較して、加速的な体重増加が認められ、試験終了時の最終的な体重値は WT マウスの体重に近くなった。Hyp マウスの典型的な特徴である短尾もマウス抗 FGF23 抗体投与によって改善された一方、Hyp マウス対照群では 5 週齢で尾の伸長が止まった。

マウス抗 FGF23 抗体の投与により、大腿骨及び脛骨の伸長が改善した（大腿骨：WT マウス 14.7±0.1 mm、Hyp マウス対照群 10.4±0.3 mm、Hyp マウス 4 mg/kg 群 12.1±0.2 mm［対 Hyp 対照 $p<0.01$］、Hyp マウス 16 mg/kg 群 12.4±0.1 mm［対 Hyp 対照 $p<0.01$］）。更に、マウス抗 FGF23 抗体の投与により、Hyp マウスの骨で通常認められる肥大かつ変形した骨端及び骨幹が軽減され、骨塩量が是正された。

Hyp マウス対照群では、成長板における軟骨細胞の柱状構造が大きく乱れ、肥大軟骨細胞数が著しく増加し、成長板の構造が異常に肥厚した。一方、マウス抗 FGF23 抗体の投与により、近位骨幹端成長板における柱状構造が大きく改善し、肥大域における実質的な改善が認められた。マウス抗 FGF23 抗体が投与された Hyp マウスの肥大軟骨細胞数は WT マウスとほぼ同じであった。この肥大軟骨細胞数の減少は投与量の増加に伴って認められており、成長板の厚さ

が薄くなった。更に、Hypマウス 16 mg/kg群では一次海綿骨が石灰化骨と置き換わっていた一方で、Hypマウス対照群では、この海綿骨領域は未石灰化の類骨で占有されていた。

脛骨の海綿骨又は皮質骨を組織学的に解析した。Hyp マウスでは、骨の石灰化が乏しく、多量の類骨で占められていた。しかし、成長期におけるマウス抗 FGF23 抗体の反復投与により、海綿骨及び皮質骨の両方で、類骨が大幅に減少し石灰化骨が増加した。

脛骨近位骨幹端において、二次海綿骨における骨形態計測を実施した。マウス抗 FGF23 抗体により骨梁数が増加し、骨梁間隙が減少した。更に、抗 FGF23 抗体の投与により類骨量が大幅に減少し、石灰化骨量が増加した。石灰化の動的パラメータを測定するために、すべての動物の骨を剖検前にテトラサイクリン及びカルセインで二重標識した。Hyp マウス対照群の骨では、いずれのマーカーにおいても標識が認められなかったことから、ミネラルの取り込み活性は極度に低いことが示された。一方、マウス抗 FGF23 抗体を投与した Hyp マウスの骨では、一次標識（分析した骨の 100%）及び二次標識（4 及び 16 mg/kg 投与群においてそれぞれ 40% 及び 85%）によって明らかに標識が認められ、投与後に石灰化のプロセスが回復したことが示された。

Hypマウス 16 mg/kg群における石灰化速度及び骨形成速度は、WTマウスの約 70%であった。マウス抗 FGF23 抗体を投与した Hyp マウスにおける骨芽細胞及び破骨細胞面の値は、WT マウスと比較して高かったことから、骨形成及び骨再構築における急速な回復に影響した可能性が考えられる。

以上の結果から、幼若 Hypマウスにおいて、マウス抗 FGF23 抗体により FGF23 の過剰な活性が阻害されることで低リン血症が改善され、Hyp マウスで通常観察される長軸方向の伸長の低下、石灰化障害及び異常な軟骨形成等のくる病の骨表現型が改善された。

表 2.2.7-1　幼若 Hyp マウスにおけるマウス抗 FGF23 抗体投与後の血清及び尿パラメータ

	WT	Hyp		
	対照抗体	対照抗体	抗 FGF23 抗体 4 mg/kg	抗 FGF23 抗体 16 mg/kg
	n=7	n=7	n=5	n=7
血清リン(mg/dL)	7.6 ± 0.3	5.1 ± 0.2**	7.6 ± 0.4$^{\#\#}$	11.6 ± 0.9$^{**,\#\#}$
血清 Ca(mg/dL)	8.6 ± 0.3	8.0 ± 0.3	8.2 ± 0.2	9.2 ± 0.1$^{\#}$
血清 1,25$(OH)_2$D (pg/mL)[a]	139 ± 14	137± 8	1007 ± 19$^{**,\#\#}$	901 ± 25$^{**,\#\#}$
血清 PTH(pg/mL)	38.8 ± 5.2	72.3 ± 12.0**	NA	30.0 ± 1.4$^{\#\#}$
血清 ALP(IU/L)	106 ± 11	290 ± 16**	145 ± 12$^{*,\#\#}$	102 ± 4$^{\#\#}$
血清 BUN(mg/dL)	25.4 ± 1.5	26.5 ± 1.2	23.8 ± 0.7	24.1 ± 0.9
血清クレアチニン(mg/dL)	0.38 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.03
FEPi (%)	17.7 ± 1.1	38.4 ± 4.8**	33.3 ± 3.8*	21.4 ± 2.1$^{\#\#}$
FECa (%)	0.16 ± 0.02	0.28 ± 0.07	0.43 ± 0.04**	0.90 ± 0.13$^{**,\#\#}$

平均値±標準誤差
a：Day 29 に採取した血清からの結果
*： p<0.05、**： p<0.01（vs. WT、Dunnett's test）
#： p<0.05、##： p<0.01（vs. Hyp 対照抗体群、Dunnett's test）
FECa：Fractional excretion of Ca（Ca 分画排泄率）
NA：血清不足により適応外
剖検前日に尿検体を採取した。リン又は Ca クリアランスをクレアチニンクリアランスで除することにより、FEPi（24 時間）及び FECa（24 時間）を算出した。

2.2.8 抗 FGF23 中和抗体による *Hyp* マウスの筋力低下及び自発運動減少の改善（Aono et al, 2011）参考資料 4.2.1.1-17

成熟 Hyp マウスにおいて、マウス抗 FGF23 抗体により低リン血症性骨軟化症が改善し、筋力及び自発運動量に影響するかを検討した。単回投与試験では、雄性成熟 Hyp マウス（16～18 週齢）に、マウス抗 FGF23 抗体（FN1 と FC1［1:1］の混合物、IgG_1）を 4 及び 16 mg/kg の投与量で皮下投与した。対照群として、雄の WT 又は Hyp マウスに対照 IgG_1（対照抗体）を 16 mg/kg の投与量で投与した。単回投与後、血清リン及び $1,25(OH)_2D$ 濃度推移をモニタリングするため、マウスを投与後 1、4、7 及び 14 日目に安楽死させ、心臓から採血を実施した。反復投与試験では、雄性成熟 Hyp 又は WT マウスにマウス抗 FGF23 抗体を Day 0、7、14、21、28、35、42 及び 49 に皮下投与した。血液、骨及び四頭筋を採取するために、最終投与後 7 日目に動物を安楽死させた。骨の組織学的解析のために、マイクロフォーカス X 線拡大撮像システムを用いて大腿骨の軟 X 線画像を取得した。脛骨は乾燥後に灰化させ、骨塩量を測定した。骨灰分を、乾燥組織重量に対する灰重量の割合として算出した。非脱灰骨部位を Villanueva-Goldner 染色によって可視化した。

筋力低下及び骨痛は、低リン血症性くる病／骨軟化症を有する患者の日常活動を妨げる。そこで、前後肢の握力を Day 0、14、35 及び 54 に握力計を用いて評価した。疼痛は、マウスにおける自発運動、探索行動、立ち上がり等の自発的な行動を抑制することが知られている。そこで、夜間における Hyp 及び WT マウスの自発運動量を測定した。

成熟 Hyp マウスにおいて、マウス抗 FGF23 抗体の単回皮下投与により、血清リン及び $1,25(OH)_2D$ 濃度が投与量の増加に伴い上昇した。反復投与後に得られた体重及び血液パラメータを要約した（表 2.2.8-1）。マウス抗 FGF23 抗体の投与によって、最終投与後 1 日目（Day 50）に、血清リン、Ca 及び $1,25(OH)_2D$ 濃度が上昇した。Hyp マウスにおいて、血清インタクト PTH 濃度に変化は認められなかった（最終投与後 7 日目）。

マウス抗 FGF23 抗体の反復投与によって、成熟 Hyp マウスにおける体重増加が認められた。しかし、試験期間中、マウス抗 FGF23 抗体を投与した成熟 Hyp マウスの体重は、WT マウスと比較して有意に低かった。

軟 X 線画像解析により、成熟 Hyp マウスにおいて、マウス抗 FGF23 抗体による大腿骨の変形の変化は認められなかった。幼若 Hyp マウスとは対照的に、マウス抗 FGF23 抗体を投与した Hyp マウスにおける長骨の長さは、Hyp マウス対照群と変わらなかった。これは、成熟マウスでは、骨端の癒合により骨の再構築及び成長がより困難になることが原因である可能性が考えられる。しかし、マウス抗 FGF23 抗体の反復投与により、WT マウスには達していないが、脛骨の骨灰量が増加した。

大腿骨の組織学的解析では、マウス抗 FGF23 抗体を投与した Hyp マウスにおける類骨量は、WT マウスと同程度であった。短骨はマウス抗 FGF23 抗体を成熟 Hyp マウスに投与しても変化しなかったが、幼若マウスの場合と同様に、石灰化の低下は改善された。

Hyp マウス対照群における握力は WT マウスと比較して明らかに低下した。しかし、マウス抗 FGF23 抗体の投与により、Hyp マウスにおける握力が徐々に改善した。Day 35 におけるマウス抗 FGF23 抗体を投与した Hyp マウスの握力は、WT マウスの握力と変わらなかった。Hyp マウスにおいて、マウス抗 FGF23 抗体による筋重量の増加は認められなかった。Hyp マウス対照群における自発運動量は WT マウスと比較して有意に減少した。しかし、マウス抗 FGF23 抗体の 8 週間の投与により、自発運動量が投与量の増加に伴い増加した。

表 2.2.8-1 成熟 Hyp マウスにおけるマウス抗 FGF23 抗体反復投与後の血清パラメータ及び体重

	WT	Hyp		
	対照抗体	対照抗体	抗 FGF23 抗体 4 mg/kg	抗 FGF23 抗体 16 mg/kg
	n= 9	n= 10	n= 10	n= 10
血清リン(mg/dL)[a]	5.4 ± 0.3	2.3 ± 0.1**	5.6 ± 0.2##	7.3 ± 0.2**,##
血清 Ca (mg/dL)[a]	9.4 ± 0.1	8.9 ± 0.1*	9.6 ± 0.1##	9.9 ± 0.2*,##
血清 1,25(OH)$_2$D (pg/mL)[a]	172 ± 6	177 ± 10	660 ± 27**,##	474 ± 29**,##
血清 PTH (pg/mL)[b]	20.4 ± 3.5	37.8 ± 8.8	50.8 ± 7.3	25.8 ± 7.7
体重(g)[a]	35.5 ± 1.3	24.4 ± 0.7**	26.8 ± 0.4**,#	27.9 ± 0.7**,##
Δ 体重(g)[a]	1.0 ± 0.5	0.3 ± 0.3	3.2 ± 0.4**,##	4.1 ± 0.2**,##

n= 9～10、平均値±標準誤差
a: 最終投与（8 回目投与）後、1 日目（Day 50）に採血した。
b: 最終投与（8 回目投与）後、7 日目（Day 56）に採血した。
Δ 体重は、Day 0～Day 56 の体重増加を示している。
* : p<0.05、** : p<0.01（vs. WT マウス、Dunnett's test）
# : p<0.05、## : p<0.01（vs. Hyp マウス対照群、Williams' test）

成熟 Hyp マウスにおけるマウス抗 FGF23 抗体投与の作用は、幼若マウスとは異なる傾向が認められたが、低リン血症性疾患の特徴に対する実質的な改善は認められた。マウス抗 FGF23 抗体を投与した成熟 Hyp マウスにおいて、血清リン濃度が上昇し、脛骨の骨灰量が改善したことは、成人 XLH の特徴である骨軟化症及び過剰な類骨の未石灰化に対して、マウス抗 FGF23 抗体が有用である可能性が示唆された。また、XLH における特徴の一部である筋力低下及び疲労／運動減少等の骨以外の症状においても、実質的に有効である可能性が示唆された。

3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。

4 安全性薬理試験

安全性薬理試験を実施していないが、安全性薬理パラメータ（呼吸数、ECG、血圧及び心機能）を複数の反復投与毒性試験で評価した。これらの試験は、成熟及び幼若カニクイザルを対象とした 14 週試験 1 件及び 40 週試験 2 件であり、0.03～30 mg/kg の投与量で検討した。これらの試験における所見を表 4-1 に要約した。各試験の詳細は 2.6.6 に示す。

表 4-1　安全性薬理所見の概略

試験表題	試験項目	顕著な所見
カニクイザルにおける KRN23 の 14 週間間歇静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 6 週間回復性試験 試験番号 [redacted]185 評価資料 4.2.3.2-3	血圧、呼吸数、ECG	雄又は雌に静脈内投与（0.03、0.3、3、又は 30 mg/kg）したとき、投与期間中及び回復期間中において、KRN23 投与に関連する血圧、呼吸数又は臓器重量の変化は認められなかった。いずれの投与量においても不整脈は認められず、KRN23 投与に起因する ECG 所見の異常も認められなかった。
カニクイザルにおける KRN23 の 40 週間間歇（1 回／2 週）静脈内／皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 13 週間回復性試験 試験番号 [redacted]044 評価資料 4.2.3.2-4	血圧、ECG、心機能（回復期の雄のみ）	静脈内投与（投与期間中）： • 0.03、0.3、又は 3 mg/kg 群において、対照群と比較して、KRN23 に関連する ECG パラメータの変化は認められなかった。 • 30 mg/kg 群の雄において、対照群と比較して、39 週に心拍数の有意な高値が認められた。 • 30 mg/kg 群の雄 1 例において、39 週に ST 降下が認められた。 静脈内投与（回復期間中）： • 心拍数の上昇が投与前のレベルに戻り、ST 降下も回復した。 • 30 mg/kg 群において、対照群と比較して、KRN23 に関連する所見は認められなかった。 • 30 mg/kg 群の雄 2 例において、回復期間中の 1～13 週での左心室の EDV、ESV、SV 又は EF 等の心機能の測定値が、対照群と比較して低かった。 皮下投与（投与期間中）： • 30 mg/kg 群では、いずれのパラメータにおいても、30 mg/kg 静脈内投与群と比較して著しい変化は認められなかった。雄 3 例において、13～39 週に心拍数が投与前値と比較して上昇した。 皮下投与（回復期間中）： • 雄 1 例において、1 及び 13 週における EDV、ESV 及び SV が対照群と比較して低かった。 • 30 mg/kg 静脈内投与群と比較して、心機能パラメータの著しい変化は認められなかった。
幼若カニクイザルにおける KRN23 の 40 週間間歇（1 回／2 週）静脈内／皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 13 週間回復性試験 試験番号 [redacted]020 評価資料 4.2.3.2-5	血圧、ECG	雄又は雌に静脈内投与（0.03、0.3、若しくは 3 mg/kg）又は皮下投与（3 mg/kg）したとき、投与期間中及び回復期間中において、いずれの投与量においても、KRN23 に関連する血圧及び ECG の変化は認められなかった。

5 薬力学的薬物相互作用

薬物相互作用試験は実施しなかった。

6 考察

6.1 効力を裏付ける試験

KRN23 の結合親和性、種特異性、作用機序及び薬力学的作用の評価を目的とした、*in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。

In vitro 薬理試験では、KRN23 が、ヒト、カニクイザル及びウサギ FGF23 に対して、同程度の高親和性（K_D：約 10^{-11} mol/L）で結合することが示された。KRN23 は、マウス、ラット、又はイヌ FGF23 に結合しなかった。KRN23 は、ヒト Klotho 及び FGFR 発現細胞において、遺伝子組換えヒト、サル及びウサギ FGF23 に依存した細胞内シグナル伝達を阻害した。結合データと一致して、KRN23 は、これらの細胞において、マウス又はラットの FGF23 に依存した細胞内シグナル伝達を阻害しなかった。KRN23/FGF23 複合体は、遺伝子組換えヒト Klotho に結合し（K_D：約 10^{-8} mol/L）、培養細胞に発現させたヒト Klotho に結合することが示された。KRN23/FGF23 複合体は、セルベースアッセイにおいて、ヒト Klotho への結合に関して非結合 FGF23 と競合することにより、FGF23 のシグナル伝達を阻害することが示された。これらの *in vitro* 試験により、KRN23 が高親和性に FGF23 に結合し、FGF23/Klotho/FGFR 複合体からのシグナル伝達を阻害する可能性が示された。更に、これらの結果から、ウサギとカニクイザルが、KRN23 の薬力学的及び毒性学的特性を検討できる動物種であることが確認された。

FGF23 以外の FGF ファミリー等への KRN23 の直接的な結合性は検討していない。FGF23 は、FGF19 及び FGF21 とともに FGF19 サブファミリーに属している（Itoh et al, 2004）。FGF19、FGF21 及び FGF23 は、他の FGF ファミリーとは異なり内分泌型 FGF とされ、全身の恒常性を維持するのに不可欠であり、代謝調節を担う血中ホルモンとして重要な役割を担っている（FGF19 は胆汁酸代謝、FGF21 は糖及び脂質代謝、FGF23 はリン代謝）（Kuro-o, 2008、Degirolamo et al, 2016）。KRN23 の非臨床試験において認められている薬理作用（血清リン及び $1,25(OH)_2D$ 濃度上昇）並びに毒性所見（鉱質沈着）は、FGF23 の作用を阻害したことに起因するものであり、FGF19 並びに FGF21 が関連する胆汁酸、糖及び脂質代謝に対する影響は認められていない。

内分泌型 FGF は、FGFR 及び Klotho の複合体を介して細胞内へシグナルを伝達して作用を発揮する（Urakawa et al, 2006、Kurosu et al, 2006）。Klotho には α-Klotho 及び β-Klotho が存在しており、FGF19 は FGFR4 及び β-Klotho の複合体と、FGF21 は FGFR1 又は 2 及び β-Klotho の複合体と、FGF23 は FGFR1 及び α-Klotho の複合体と結合することで機能するものとされている（Kurosu et al, 2009）。すなわち、FGF23 と結合しうるのは α-Klotho であるため、KRN23 及び FGF23 の複合体は FGF19 及び FGF21 の受容体となる β-Klotho には結合せず、FGF19 及び FGF21 の機能に影響を及ぼさないと考えられる。

ウサギ及びカニクイザルにおいて、KRN23 の薬理作用を評価するために、薬力学試験を実施した。3、10 及び 30 mg/kg の投与量で単回静脈内投与したウサギにおいて、KRN23 は、血清リン及び $1,25(OH)_2D$ 濃度を上昇させ、尿中リン及び Ca 排泄量を低下させた。KRN23 が血清リン及び $1,25(OH)_2D$ 濃度を上昇させ、尿中リン排泄を低下させた結果は、作用機序から想定された。一方、すべての動物の腎臓において投与量の増加に伴った Ca 沈着が認められた。また、30 mg/kg 投与群において、瀕死状態となり試験終了前に安楽死させた動物が 3 例認めら

れた。生理学的濃度を超えた血清リン濃度の上昇（8-39 mg/dL）が認められたウサギにおいて、血清クレアチニン及び BUN の上昇が認められたことから、30 mg/kg 群における 3 例の死亡は、腎鉱質沈着に起因する急性腎不全によるものと考えられた。

正常動物は KRN23 の全体的な薬理及び毒性プロファイルを明らかにするために有用であるが、正常動物では XLH 患者と異なり FGF23 が過剰でないため、KRN23 に対する薬理反応が過剰となることが示された。ホルモン及び Ca 調節における種差も考慮する必要がある。ウサギの Ca 代謝及びホルモン調節は独特であることが知られており、他の哺乳動物と比較して血清 Ca 濃度が高いことから（Eckermann-Ross, 2008）、ウサギでは特に血清リン濃度上昇に対する感受性が高く、続いて腎鉱質沈着が発現した可能性が考えられた。正常上限を超えた血清リン濃度の上昇、ホルモン代謝及び Ca 制御におけるウサギとヒトとの違いを考慮すると、正常動物における試験結果の解釈及び患者へのリスクの外挿には注意を要する。

カニクイザルにおける単回静脈内投与において、KRN23 は、1、3 及び 10 mg/kg の投与量で、血清リン及び $1,25(OH)_2D$ 濃度を有意に上昇させた。カニクイザルでは、TmP/GFR も上昇したことから、KRN23 は腎臓でのリン再吸収量を増加させ、血清リン濃度が上昇することが示された。血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度の上昇も認められたことから、腸管でのリン再吸収も KRN23 の投与による影響を受ける可能性のあることが示唆され、血清リン上昇の薬理作用に影響している可能性が考えられる。成熟カニクイザルでは、KRN23 単回静脈内投与の血清リン濃度に対する作用における最小有効量は 0.1 mg/kg と推定され、血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度に対する作用では 0.03 mg/kg と推定された。成熟カニクイザルにおける KRN23 の単回静脈内及び皮下投与比較試験では、血清リン及び $1,25(OH)_2D$ 濃度が、それぞれ 0.3 及び 0.03 mg/kg 以上の投与量で上昇し、両投与経路によるこれらの上昇の程度及び持続時間は同程度であったことから、投与経路によって薬理反応は変化しないことが示唆された。幼若カニクイザルでは、KRN23 の単回静脈内投与において、0.003 mg/kg 以上の投与量における血清 $1,25(OH)_2D$ 濃度の上昇及び 0.03 mg/kg 以上の投与量における血清リン濃度の上昇が確認された。全体として、KRN23 投与後、血清 Ca 又は PTH 濃度における顕著な変化は認められず、正常な Ca フィードバック調節機能は維持された。

KRN23 は、小児及び成人 XLH 患者における長期投与を想定していることから、幼若及び成熟カニクイザルを用いて、13 週間（2 週間に 1 回）の間歇皮下投与における PK/PD について評価した。幼若カニクイザルにおける KRN23 投与前後の血清リン濃度は、成熟カニクイザルと比較してわずかに高かった。幼若及び成熟カニクイザルいずれにおいても、KRN23 投与による血清リン濃度上昇の程度は、反復投与により変化しなかった。回復期間後には、成熟及び幼若カニクイザルの血清リン濃度は投与前の濃度に戻った。KRN23 投与後の血清リン濃度上昇の程度について、雄性と雌性又は初回投与と最終投与の間に明らかな差は認められなかった。

過剰な FGF23 存在下における薬力学的作用を検討するため、幼若及び成熟 Hyp マウスを対象に、マウス抗 FGF23 抗体を用いて試験を実施した（KRN23 はマウス FGF23 に結合しないため）。マウス抗 FGF23 抗体の皮下投与により、血清 BUN 及びクレアチニン濃度に影響することなく、Hyp マウス対照群（コントロール抗体投与群）と比較して、血清リン及び $1,25(OH)_2D$ 濃度が有意に上昇した（2.2.7 項）。マウス抗 FGF23 抗体を投与した Hyp マウスにおいて、FEPi の低下及び腎臓における NaPiIIa タンパク発現量の増加が認められた。したがって、リン排泄の正常化は、NaPiIIa タンパク発現量の増加に伴うものと考えられた。更に、幼若 Hyp マウスへのマウス抗 FGF23 抗体の投与により、腎臓における 25-ヒドロキシビタミン D-1α-水酸化酵素の発現増加及び 25-ヒドロキシビタミン D-24-水酸化酵素の発現抑制が認められた。血

清 1,25(OH)$_2$D 濃度の変化は、これら 2 つの主要なビタミン D 代謝酵素の腎臓における発現が顕著に変化したことによると考えられた。マウス抗 FGF23 抗体を投与した幼若 Hyp マウスでは、血清 Ca 及び尿中 Ca 排泄が投与量の増加に伴い上昇したが、正常動物に KRN23 を投与した場合とは異なり、腎鉱質沈着は認められなかった。以上の結果から、幼若 Hyp マウスにおいて、マウス抗 FGF23 抗体は、腸管でのリン再吸収を増加させ、腎臓でのリン排出を低下させることにより、過剰な FGF23 に伴う病態を改善できることが示された。

幼若 Hyp マウスにおいて、FGF23 誘発低リン血症の改善に加え、成長期におけるマウス抗 FGF23 抗体の投与により、Hyp マウスで認められる成長遅延、大腿骨及び脛骨の伸長が顕著に改善した。マウス抗 FGF23 抗体の投与により、長骨長の改善と一致して、海綿骨及び皮質骨の両方で、近位骨幹端成長板における柱状構造が大幅に改善し、類骨が著しく減少し、石灰化骨が増加した。Hyp マウス 16 mg/kg 群における石灰化速度及び骨形成速度は、WT マウスの約 70%であった。マウス抗 FGF23 抗体を投与した Hyp マウスにおける骨芽細胞及び破骨細胞面の値は、WT マウスと比較して高かったことから、これが骨形成及び骨再構築における急速な回復に影響した可能性が考えられる。以上の結果から、マウス抗 FGF23 抗体により FGF23 の過剰な活性を阻害することにより低リン血症が改善され、幼若 Hyp マウスで通常観察される長軸方向伸長の低下、石灰化障害及び異常な軟骨形成等のくる病の骨表現型が改善された。

過剰な FGF23 を阻害する作用による成人 XLH 患者における有効性について、成熟 Hyp マウスを用いた試験で検討した。幼若マウスで認められた薬力学的作用と一致して、マウス抗 FGF23 抗体を成熟 Hyp マウスに投与することにより、血清リン、Ca 及び 1,25(OH)$_2$D 濃度が上昇した（2.2.8 項）。マウス抗 FGF23 抗体の反復投与において、血清インタクト PTH 濃度の変化は認められなかった。軟 X 線画像解析により、成熟 Hyp マウスにおいて、マウス抗 FGF23 抗体による大腿骨の変形の変化は認められないことが示された。幼若 Hyp マウスとは対照的に、マウス抗 FGF23 抗体を投与した成熟 Hyp マウスの長骨の長さは、Hyp マウス対照群と差が認められなかった。WT マウスのレベルには達しなかったが、マウス抗 FGF23 抗体の投与により、脛骨の骨灰量が増加した。大腿骨の組織学的解析では、マウス抗 FGF23 が投与された Hyp マウスにおける類骨量は、WT マウスと同程度であった。短骨はマウス抗 FGF23 抗体を成熟 Hyp マウスに投与しても変化しなかったが、幼若マウスの場合と同様、石灰化の低下は改善された。成熟 Hyp マウスにおいて、マウス抗 FGF23 抗体による骨成長への作用が認められなかったことは、明らかな成長状態ではないためと想定される。成熟 Hyp マウスへのマウス抗 FGF23 抗体の投与後に認められた骨への作用から、成人 XLH 患者で認められる骨石灰化異常に対する抗 FGF23 抗体の治療有効性の可能性が示された。

筋力低下及び疼痛は、成人 XLH 患者における日常活動に影響する。同様に、成熟 Hyp マウスにおける握力は WT マウスと比較して低かった（2.2.8 項）。マウス抗 FGF23 抗体による過剰な FGF23 の阻害により、Day 35 までに成熟 Hyp マウスにおける握力が WT マウスの握力まで上昇した。マウス抗 FGF23 抗体投与による握力の改善は、筋量増加によるものではなかったことから、機序は不明であるものの、過剰な FGF23 の阻害により、筋肥大を起こさずに収縮力が増加する可能性が示唆された。マウス抗 FGF23 抗体を投与した成熟 Hyp マウスにおける自発運動量は、Hyp マウス対照群と比較して有意に増加しており、疼痛が改善された可能性が示唆された。以上の結果から、マウス抗 FGF23 抗体による FGF23 阻害作用は、低リン血症及び骨石灰化の低下を改善するだけでなく、成熟 Hyp マウスにおける筋力低下及び自発運動も改善することが示唆された。

幼若及び成熟 Hyp マウスにおいて抗 FGF23 抗体の治療の有用性が示されたことから、KRN23 は、過剰な FGF23 によるシグナル伝達を阻害し、低リン血症を改善させ、小児及び成人患者における XLH の特徴的な異常（くる病／骨軟化症、筋力低下及び疼痛）の多くを正常化又は改善する可能性が考えられた。

6.2 安全性薬理試験

成熟及び幼若カニクイザルを用いた複数の反復投与毒性試験において、安全性薬理パラメータ（呼吸数、ECG、血圧及び心機能）を検討した。成熟カニクイザルにおける 14 週間反復投与毒性試験では、30 mg/kg までの投与量において、KRN23 に起因する不整脈、ECG 所見の異常、血圧又は呼吸数の顕著な変化は認められなかった。一方、40 週間反復投与毒性試験において、KRN23 30 mg/kg の投与量で静脈内及び皮下投与した雄では、心拍数増加、心機能への影響（EDV 及び ESV 低値）、SV 低値が認められた。また、30 mg/kg の投与量で静脈内投与した雄では、ST 降下及び EF 低値が認められた。これらの変化は、生理学的濃度を超える 8 mg/dL 超の血清リン濃度で認められたことから、心筋繊維／心筋血管及び大動脈中膜の鉱質沈着に関連すると示唆され、正常動物における KRN23 に対する過剰な薬理反応に起因するものと考えられた（2.4-6.1 項、2.6.6-9 項及び 4.2.3.7.7-3 参照）。幼若カニクイザルにおける 40 週間反復投与毒性試験では、KRN23 に関連した ECG パラメータ及び血圧の変化は認められなかった。

7 結論

KRN23 はヒト、カニクイザル及びウサギ FGF23 に高親和性に結合し、FGF23/Klotho/FGFR 複合体からのシグナル伝達を阻害することが示された。更に、ウサギ及びカニクイザルが、KRN23 の薬力学的及び毒性学的特性を評価できる動物種であることが確認された。

ウサギ並びに成熟及び幼若カニクイザルを用いた *in vivo* 試験では、血清リン及び $1,25(OH)_2D$ 濃度の上昇が認められ、KRN23 の薬理作用が確認された。血清リン及び $1,25(OH)_2D$ 濃度上昇の程度及び持続時間は、静脈内投与と皮下投与で同程度であったことから、投与経路によって薬理作用は変化しないことが示唆された。幼若及び成熟 Hyp マウスにおいて、抗 FGF23 抗体の投与により、Hyp マウスで観察された XLH に特徴的な異常（低リン血症性くる病／骨軟化症及び関連する筋力低下）の多くが正常化又は改善した。

これらの非臨床薬理試験において、FGF23 を標的とする抗体の投与によって、成熟及び幼若動物における PD が確認され、Hyp マウスにおいて XLH に対する有用性が示されたことから、KRN23 は、XLH、TIO 及び ENS 等の FGF23 関連低リン血症性くる病・骨軟化症に対する治療薬として有用であると考えられた。

8 参考文献

Degirolamo et al, 2016

Degirolamo C, Sabba C, Moschetta A. Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. Nat Rev Drug Discov. 2016;15:51-69.

Eckermann-Ross, 2008

Eckermann-Ross C. Hormonal Regulation and Calcium Metabolism in the Rabbit. Vet Clin North Am Exot Anim Pract. 2008;11(1):139-52.

Goetz et al, 2010
Goetz R, Nakada Y, Hu MC, Kurosu H, Wang L, Nakatani T, et al. Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(1):407-12.

Itoh et al, 2004
Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. Trends Genet. 2004;20:563-9.

Kuro-o, 2008
Kuro-o M. Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. Trends Endocrinol Metab. 2008;19:239-45.

Kurosu et al, 2006
Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. J Biol Chem. 2006;281:6120-3.

Kurosu et al, 2009
Kurosu H, Kuro-o M. Endocrine fibroblast growth factors as regulators of metabolic homeostasis. Biofactors. 2009;35:52-60.

Urakawa et al, 2006
Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. Nature. 2006;444:770-4.

KRN23

第 2 部（モジュール 2）：
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3　薬理試験概要表

協和キリン株式会社

目次

目次 2
2.6.3 薬理試験概要表 3
1 薬理試験：一覧表 3
2 効力を裏付ける試験 6
3 安全性薬理試験 12

2.6.3 薬理試験概要表

1 薬理試験：一覧表

Test Article: KRN23					
Type of Study	Test System	Method of Admin.	Testing Facility	Study Number/ Report Number	資料番号
Primary Pharmacodynamics					
***In Vitro* Pharmacology Studies**					
Determination of the binding affinities of KRN23 to human, cynomolgus monkey and rabbit FGF23 by Biacore	NA	NA	Kirin Pharma Co., Ltd.	r-[redacted]-0326	参考 4.2.1.1-1
Response Curve of Human, Monkey and Murine FGF23 by Sandwich ELISA	NA	NA	Kirin Brewery Co., Ltd.	r[redacted]-0026	参考 4.2.1.1-2
Response Curve of Plasma FGF23 from Various Mammals by Sandwich ELISA	NA	NA	Kirin Brewery Co., Ltd.	r-[redacted]-0027	参考 4.2.1.1-3
Evaluation of the inhibitory activity of KRN23 against FGF23 signaling using a cell-based assay	mEgr-1 promoter / hKl / HEK stable #18	NA	Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.	d-[redacted]-816	4.2.1.1-4
Neutralization Activity of KRN23 against FGF23 of Various Mammals with In Vitro Assay	HEK293 cells stably transfected with human Klotho expressing vector and Egr-1 reporter vector	NA	Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.	r-[redacted]-0021	参考 4.2.1.1-5
Binding analysis of KRN23/FGF23 complex to recombinant human Klotho using Biacore system	NA	NA	Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.	r-[redacted]0106	参考 4.2.1.1-6
Binding analysis of KRN23/FGF23 complex to Klotho expressed in cultured cells using confocal microscopy	mEgr-1 promoter / hKl / HEK stable #18	NA	Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.	r-[redacted]-0107	参考 4.2.1.1-7
Evaluation of the inhibitory activity of KRN23/FGF23 complex against FGF23 signaling using a cell-based assay	mEgr-1 promoter / hKl / HEK stable #18	NA	Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.	r-[redacted]-0342	参考 4.2.1.1-8

NA: Not Applicable

1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: KRN23 or Anti-FGF23 Ab[a]					
Type of Study	Test System	Method of Admin.	Testing Facility	Study Number	資料番号
***In Vivo* Pharmacodynamics Studies**					
A Single Intravenous Dose Study of KRN23 in Rabbits	Rabbits (Kbl:NZW)	IV	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1-9
Effects of KRN23 on Urinary Phosphate Excretion in Cynomolgus Monkeys (Additional Test)	Cynomolgus Monkeys (adult)	IV	[redacted]	[redacted][b]	4.2.1.1-10 4.2.1.1-11
Determination of Minimum Effective Dose of KRN23 in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus Monkeys (adult)	IV	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1-12
A Single Intravenous/Subcutaneous Dose Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Study of KRN23 in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus Monkeys (adult)	IV/SC	[redacted]	[redacted]-022	4.2.1.1-13
A Single Intravenous Dose Pharmacology Study of KRN23 in Juvenile Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus Monkeys (juvenile)	IV	[redacted]	[redacted]-021	4.2.1.1-14
A 13-Week Intermittent (Once Every 2 Weeks) Subcutaneous Dose Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study with KRN23 in Adult and Juvenile Cynomolgus Monkeys with a 8-Week Recovery	Cynomolgus Monkeys (adult and juvenile)	SC	[redacted]	[redacted]-116	4.2.1.1-15
Therapeutic Effects of Anti-FGF23 Antibodies in Hypophosphatemic Rickets/Osteomalacia	Hyp Mice (juvenile)	SC	Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.	Aono et al, 2009	参考 4.2.1.1-16
Anti-FGF-23 Neutralizing Antibodies Ameliorate Muscle Weakness and Decreased Spontaneous Movement of *Hyp* Mice	Hyp Mice (adult)	SC	Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.	Aono et al, 2011	参考 4.2.1.1-17

IV: intravenously, SC: subcutaneously, Ab: antibody
a: Murine anti-FGF23 Ab [a mixture of FN1 and FC1 (1:1)]
b: Additional tests were conducted in Study [redacted] using samples from Study [redacted]

1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: KRN23					
Type of Study	Test System	Method of Admin.	Testing Facility	Study Number	資料番号
Safety Pharmacology Studies [a]					
14-Week Intermittent Intravenous Infusion Toxicity and Toxicokinetic Study with KRN23 in Cynomolgus Monkeys with a 6-Week Recovery	Cynomolgus Monkeys (adult)	IV	[redacted]	[redacted]-185	4.2.3.2-3
A 40-Week Intermittent (Once Every 2 Weeks) Intravenous/Subcutaneous Dose Toxicity and Toxicokinetic Study with KRN23 in Cynomolgus Monkeys with a 13-Week Recovery	Cynomolgus Monkeys (adult)	IV/SC	[redacted]	[redacted]-044	4.2.3.2-4
A 40-Week Intermittent (Once Every 2 Weeks) Intravenous/Subcutaneous Dose Toxicity and Toxicokinetic Study with KRN23 in Juvenile Cynomolgus Monkeys with a 13-Week Recovery	Cynomolgus Monkeys (juvenile)	IV/SC	[redacted]	[redacted]-020	4.2.3.2-5

IV: intravenously, SC: subcutaneously

a: The cardiovascular safety pharmacology assessment was conducted as part of the repeat dose toxicology studies in cynomolgus monkey.

2 効力を裏付ける試験

Test Article: KRN23						
***In vitro* Pharmacology Studies**						
Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Determination of the binding affinities of KRN23 to human, cynomolgus monkey and rabbit FGF23 by Biacore	NA	NA	100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400, 12800 (ng/mL)	NA	KRN23 showed high binding affinities to human, cynomolgus monkey and rabbit FGF23, and the affinity between KRN23 and human FGF23 was similar to that between KRN23 and cynomolgus monkey FGF23 or rabbit FGF23.	r[redacted]-0326
Response Curve of Human, Monkey and Murine FGF23 by Sandwich ELISA	NA	NA	5 (μg/mL)	NA	KRN23 was cross-reactive to monkey and human FGF23 but not mouse FGF23.	r-[redacted]-0026
Response Curve of Plasma FGF23 from Various Mammals by Sandwich ELISA	NA	NA	5 (μg/mL)	NA	KRN23 was cross-reactive to monkey FGF23 as well as human FGF23, but KRN23 not cross-reactive to rat and dog FGF23.	r-[redacted]-0027
Evaluation of the inhibitory activity of KRN23 against FGF23 signaling using a cell-based assay	NA	NA	1, 10, 100, 1000, 10000 (ng/mL)	NA	KRN23 inhibited FGF23 signaling in a concentration-dependent manner.	d[redacted]-816

NA: Not Applicable

2 効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: KRN23						
***In Vitro* Pharmacology Studies**						
Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number/ Report Number
Neutralization Activity of KRN23 against FGF23 of Various Mammals with In Vitro Assay	NA	NA	10 (μg/mL)	NA	KRN23 inhibited signaling of human, monkey and rabbit FGF23.	r-[redacted]-0021
Binding analysis of KRN23/FGF23 complex to recombinant human Klotho using Biacore system	NA	NA	20 (μg/mL)	NA	KRN23/FGF23 complex binds to recombinant human Klotho and may be able to inhibit the intracellular signaling by FGF23 when the complex concentration exceeds K_D value 9.116×10^{-8} mol/L.	r-[redacted]-0106
Binding analysis of KRN23/FGF23 complex to Klotho expressed in cultured cells using confocal microscopy	NA	NA	100 (ng/mL)	NA	KRN23 binds to the FGFR-binding N-terminal domain of FGF23 and not the C-terminal domain of FGF23 which binds Klotho.	r-[redacted]-0107
Evaluation of the inhibitory activity of KRN23/FGF23 complex against FGF23 signaling using a cell-based assay	NA	NA	0, 10, 100, 1000, 10000 ng/mL[a]	NA	KRN23/FGF23 complex inhibits FGF23 signaling by competing with unbound FGF23 for binding to Klotho.	r-[redacted]0342

NA: Not Applicable
a: Concentrations of KRN23/FGF23 complex expressed as concentration of human FGF23.

2 効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: KRN23						
***In Vivo* Preliminary Pharmacodynamics Studies**						
Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
A Single Intravenous Dose Study of KRN23 in Rabbits	Rabbits (Kbl:NZW)	IV	3, 10, 30	3-4M	KRN23 increased serum phosphate levels with increasing the amount of renal phosphate reabsorption and serum 1,25$(OH)_2$D concentrations in rabbits.	[redacted]
Effects of KRN23 on Urinary Phosphate Excretion in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus Monkeys (adult)	IV	1, 3, 10	3M/3F	KRN23 increased serum phosphate levels by increasing the amount of renal phosphate reabsorption and increasing serum 1,25$(OH)_2$D levels in cynomolgus monkeys.	[redacted] [redacted] [a]

M: male, F: female IV: intravenously
a: Additional tests were conducted in Study [redacted] using samples from Study [redacted].

2 効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: KRN23						
***In Vivo* Pharmacodynamics Studies**						
Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Determination of Minimum Effective Dose of KRN23 in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus Monkeys (adult)	IV	0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3	2M/2F	KRN23 increased serum phosphate levels at 0.1 mg/kg or more and $1,25(OH)_2D$ levels at 0.03 mg/kg or more. Therefore, the minimum effective dose of KRN23 was considered to be 0.03 mg/kg under the conditions of this study.	[redacted]
A Single Intravenous/Subcutaneous Dose Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Study of KRN23 in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus Monkeys (adult)	IV/SC	0.03, 0.3, 3	4M	IV and SC administration of KRN23 increased in both serum inorganic phosphorus and $1,25(OH)_2D$. The extent and duration of these increases were considered comparable for IV or SC administration of KRN23 suggesting that route of administration did not alter the pharmacologic response.	[redacted]-022

M: male, F: female
IV: intravenously, SC: subcutaneously

2 効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: KRN23						
***In Vivo* Pharmacodynamics Studies**						
Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
A Single Intravenous Dose Pharmacology Study of KRN23 in Juvenile Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus Monkeys (juvenile)	IV	0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1	3M	Elevation of serum $1,25(OH)_2D$ at 0.003 mg/kg and greater, and of serum inorganic phosphorus at 0.03 mg/kg and greater were confirmed after administration of a single intravenous dose of KRN23 to juvenile monkeys.	[redacted]-021
A 13-Week Intermittent (Once Every 2 Weeks) Subcutaneous Dose Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study with KRN23 in Adult and Juvenile Cynomolgus Monkeys with a 8-Week Recovery	Cynomolgus Monkeys (adult and juvenile)	SC	1	4M/4F	The elevation response of inorganic phosphorus to KRN23 dosing after treatment was slightly higher in juveniles than in adults. There were no clear differences noted between males and females or between the first and final dosing.	[redacted]116

M: male, F: female
IV: intravenously, SC: subcutaneously

2 効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: Anti-FGF23 Ab[a]						
***In Vivo* Pharmacodynamics Studies**						
Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Therapeutic Effects of Anti-FGF23 Antibodies in Hypophosphatemic Rickets/Osteomalacia	Hyp mice (juvenile)	SC	4, 16	3-7M	A single injection of the antibodies corrected the hypophosphatemia and inappropriately normal serum $1,25(OH)_2D$. These effects were accompanied by increased expressions of type IIa sodium- phosphate co-transporter (NaPi2a) and 25-hydroxyvitamin-D-1α- hydroxylase (1αOHase) and a suppressed expression of 25-hydroxyvitamin D-24- hydroxylase (24OHase) in the kidney. Repeated injections during the growth period ameliorated the rachitic bone phenotypes typically observed in Hyp mice, such as impaired longitudinal elongation, defective mineralization, and abnormal cartilage development.	Aono et al, 2009
Anti-FGF-23 Neutralizing Antibodies Ameliorate Muscle Weakness and Decreased Spontaneous Movement of *Hyp* Mice	Hyp mice (adult)	SC	4, 16	6-10M	Repeated injections of anti-FGF23 antibodies increased serum phosphate and $1,25(OH)_2D$ levels and enhanced mineralization of osteoid in adult Hyp mice, whereas bone length did not change. Grip strength was weaker and spontaneous movement was less in adult Hyp mice than in wild-type mice. Treatment with anti-FGF23 antibodies increased grip strength and spontaneous movement in adult Hyp mice.	Aono et al, 2011

M: male
SC: subcutaneously
Ab: antibody
a: Murine anti-FGF23 Ab [a mixture of FN1 and FC1 (1:1)]

3 安全性薬理試験

Test Article: KRN23							
Safety Pharmacology Studies[a]							
Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Electrocardiography Respiratory rate Blood pressure in 14 week toxicology study	Cynomolgus Monkey	IV	0.03, 0.3, 3, 30	6M/6F (30 mg/kg) 4M/4F (0.03, 0.3, and 3 mg/kg)	None	GLP	[redacted]-185
Electrocardiography Blood pressure Cardiac function [b] in 40 week toxicology study	Cynomolgus Monkey	IV/SC	0.03, 0.3, 3, 30 (IV) 30 (SC)	Dosing Period: 8M/8F (30 mg/kg), 4M/4M (0.03, 0.3, and 3 mg/kg) Recovery Period: 4M/4F (30 mg/kg)	None in electrocardiography and blood pressure Increase in heart rate (30 mg/kg, IV and SC) Depress in ST (30 mg/kg, IV) Low left ventricular EDV and ESV, low SV, and/or low EF (30 mg/kg, IV and SC)	GLP	[redacted]-044

M: male, F: female
IV: intravenously, SC: subcutaneously
EDV: End-diastolic volume, ESV: End-systolic volume, SV: Stroke volume, EF: Ejection fraction
a: The cardiovascular safety pharmacology assessment was conducted as part of the repeat dose toxicology studies in cynomolgus monkey.
b: Cardiac function was examined for all males during the recovery period.

3 安全性薬理試験（続き）

Test Article: KRN23							
Safety Pharmacology Studies[a]							
Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Electrocardiography Blood pressure in 40 week Juvenile toxicology study	Cynomolgus Monkey	IV/SC	0.03, 0.3, 3 (IV) 3 (SC)	Dosing Period: 8M/8F (3 mg/kg), 4M/4M (0.03 and 0.3 mg/kg) Recovery Period: 4M/4F (3 mg/kg)	None	GLP	[redacted]020

M: male; F: female
IV: intravenously, SC: subcutaneously
a: The cardiovascular safety pharmacology assessment was conducted as part of the repeat dose toxicology studies in cynomolgus monkey.