2.4 非臨床試験の概括評価

目　次

目　次 2
表 一 覧 3
図 一 覧 3
略号一覧 4
1 緒言 5
2 薬理試験 6
2.1 効力を裏付ける試験 6
2.2 副次的薬理試験 8
2.3 安全性薬理試験 9
2.4 薬力学的薬物相互作用 9
3 薬物動態試験 9
3.1 分析法 10
3.2 吸収及びバイオアベイラビリティ 10
3.3 分布 11
3.3.1 ウサギにおける BRO の眼内分布 11
3.3.2 カニクイザルにおける BRO の眼内分布 12
3.4 妊娠動物及び授乳 15
3.5 代謝 15
3.6 排泄 15
3.7 薬物動態学的薬物相互作用 15
3.8 トキシコキネティクス 15
4 毒性試験 15
4.1 単回投与毒性試験 16
4.2 反復投与毒性試験 16
4.3 遺伝毒性試験 17
4.4 がん原性試験 17
4.5 生殖発生毒性試験 17
4.6 全身曝露量の比較 18
4.7 局所刺激性試験 19
4.8 不純物及び分解産物 19
4.9 新添加物の安全性評価 19
5 総括及び結論 19
6 参考文献一覧 21

表 一 覧

Table 3-1 カニクイザルに 2 mg/kg の BRO を静脈内投与後の平均血清中 BRO の PK パラメータ 11
Table 4-1 毒性試験一覧 16
Table 4-2 ヒトにおける 6 mg 用量での動物との曝露量比 19

図 一 覧

Figure 3-1 カニクイザルに BRO を静脈内投与後の平均（+/- SD）血清中 BRO 濃度 11
Figure 3-2 ウサギに 0.5 mg の BRO を硝子体内投与後の，血清中及び眼内組織中における平均（+/- SD）BRO 濃度 12
Figure 3-3 カニクイザルに 1 mg の BRO を硝子体内投与後の，血清中及び眼内組織中における平均（+/- SD）BRO 濃度 13
Figure 3-4 カニクイザルに 6 mg の BRO を硝子体内投与後の，平均（+/- SD）眼内組織中及び血清中 BRO 濃度 14

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
AUC	The area under the serum concentration-time curve	血清中濃度-時間曲線下面積
BREC	Bovine retinal endothelial cell	ウシ網膜血管内皮細胞
BRO	brolucizumab	ブロルシズマブ
Cmax	The observed maximum serum concentration following drug administration	薬物投与後の最高血清中濃度
CNV	Choroidal neovascularization	脈絡膜血管新生
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着分析法
HREC	Human retinal endothelial cell	ヒト網膜血管内皮細胞
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC50	Half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
Kd	Dissociation constant	解離定数
kDa	Kilodalton	キロダルトン
MHC	major histocompatibility complex,	主要組織適合遺伝子複合体
nAMD	Neovascular age related macular degeneration	滲出型加齢黄斑変性
OIR	Oxygen induced retinopathy	酸素誘発網膜症
PBMC	peripheral blood mononuclear cells,	末梢血単核細胞
rhVEGF	Recombinant human vascular endothelial growth factor	組換えヒト血管内皮増殖因子
scFv	Single chain variable fragment	一本鎖抗体フラグメント
SPR	Surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
stAv-HRP	Streptavidin horseradish peroxidase	ストレプトアビジン ホースラディシュペルオキダーゼ
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor	血管内皮増殖因子受容体

1 緒言

ブロルシズマブ（以下 BRO，開発コード：RTH258，ESBA1008，AL86810）は，分子量が約 26 kDa のヒト化一本鎖抗体フラグメント（single chain variable fragment, scFv）で，血管内皮増殖因子 A（vascular endothelial growth factor A, VEGF-A）に対する阻害作用を示す。本薬は，VEGF-A に結合することにより，血管内皮細胞表面に発現する血管内皮増殖因子受容体（Vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR）である VEGFR1 及び VEGFR2 に対する VEGF-A の結合を阻害する。VEGF 経路のシグナル亢進は眼の病的血管新生や血管透過性亢進を介して網膜浮腫の発症と関連している。滲出型加齢黄斑変性（neovascular age related macular degeneration, nAMD）患者では，VEGF 経路を阻害することで，血管新生病変の進行が抑制され網膜浮腫が改善することが示されている（Rosenfeld et al. 2006，Brown et al. 2006）。

効力を裏付ける試験では，BRO の VEGF に対する結合親和性，動物種選択性及び細胞活性，血管透過性亢進抑制作用及び血管新生抑制作用を調べる目的で，*in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。

薬物動態試験として，ウサギとカニクイザルに BRO を硝子体内投与したときの，眼内薬物動態（PK）と全身曝露を評価した。BRO の全身循環での PK プロファイルは，カニクイザルへの BRO 静脈内投与により評価した。BRO はウサギ VEGF と結合しないが，ウサギは眼局所投与する薬物の PK 評価に一般的に使用されることから，眼内 PK 試験を実施した。カニクイザルは主要な毒性試験において使用された動物種であることから，眼内及び全身循環における PK 評価を行った。

BRO の非臨床安全性試験は，医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH）S6(R1)ガイドライン（バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価）に従って計画し，主要な毒性試験は，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice, GLP）を遵守して実施した。数試験の探索的硝子体内投与毒性試験を実施した後，主要な試験として，カニクイザルを用いて GLP 適合の 3 週間隔 3 回反復硝子体内投与及び 4 週間隔 6 回反復硝子体内投与毒性試験を実施した。また，拡充型出生前及び出生後の発生（enhanced pre- and postnatal development, ePPND）に関する試験を実施し，BRO の妊娠，分娩，乳汁移行，胚胎児発生，出生児の生存児数，成長，出生後の発達に与える影響について評価した。主要な毒性試験では，BRO に対して薬理作用を示し（2.6.2 項），眼の解剖がヒトに近似していて，かつ適切な硝子体内投与が可能であるカニクイザルを使用した。これらの試験では，臨床適応を想定した間隔で片眼（反対眼は無処置対照）に投与可能な最大量である 6 mg/50 µL までの用量を投与した。最高用量 6 mg/眼の BRO 硝子体内投与における全身曝露量は極めて低く，3～4 週間隔の反復硝子体内投与によっても全身並びに出生前及び出生後の発生に毒性所見は認められなかった。VEGF 阻害薬の全身作用はよく知られていることから，全身投与の毒性試験は実施しなかった。

2 薬理試験

VEGF-A は，VEGF ファミリータンパク質のひとつで，選択的スプライシングによって数種類のアイソフォームが生成され，$VEGF_{xxx}$ のようにアミノ酸残基数を表記することで分類されている。VEGF-A は，血管内皮細胞を含むさまざまな種類の細胞に発現する。血管内皮細胞は，VEGFR1 及び VEGFR2 を発現し，VEGF-A によるその活性化が細胞の増殖及び遊走を誘発し結果的に血管新生を引き起こす（Peach et al. 2018）。

VEGF 経路のシグナル亢進は眼の病的血管新生や血管透過性亢進を介して網膜浮腫の発症と関連しており， nAMD 患者では，ラニビズマブやアフリベルセプトのような VEGF 阻害薬投与によって血管新生病変の進行が抑制され網膜浮腫が改善することが示されている（Rosenfeld et al. 2006，Brown et al. 2006）。BRO は，VEGFR1 及び VEGFR2 に対する VEGF-A の結合を阻害することでその作用を抑制する。本薬では，VEGF に対する阻害活性と親和性の向上を期待して，新たに開発したヒト scFV 骨格に抗ヒト VEGF 抗体の相補性決定領域を導入した。BRO は，既存の VEGF 阻害薬と比較して分子量が小さいという新規性を有し，より高いモル用量の投与と効果的な組織分布が可能となるため，投与間隔を延長した場合においても効果の持続が期待でき，第 III 相臨床試験においても 12 週間隔の維持期投与でも効果の持続が認められた。

効力を裏付ける試験では，BRO の VEGF に対する結合親和性，動物種選択性及び細胞活性，並びに血管透過性亢進抑制作用及び血管新生抑制作用を調べる目的で，*in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。

2.1 効力を裏付ける試験

In vitro 結合親和性及び動物種選択性（*in vitro* 試験）

BRO は，VEGF の受容体結合部位に競合的に結合することで VEGF-A のリガンド-受容体の相互作用を阻害する。蛍光分光分析の結果，BRO 2 分子は VEGF-A のホモ二量体 1 分子に結合し，VEGF-A 単量体のそれぞれを阻害することが明らかになった[Table 2.6.3.1-RD-2018-00360]。表面プラズモン共鳴（Surface plasmon resonance, SPR）を利用した分子間相互作用解析装置により，3 種類の VEGF-A のアイソフォーム，並びに VEGF-A 以外のサブタイプ（VEGF-B～D）及び PIGF に対する BRO の結合親和性を分析した結果，$VEGF_{165}$ に対して 2.84×10^{-11} M，$VEGF_{110}$ に対して 2.52×10^{-11} M 及び $VEGF_{121}$ に対して 3.41×10^{-11} M の K_D 値で結合した[Table 2.6.3.1-RDR_ASSMo_0016.01]。一方で BRO は，VEGF-A 以外のいずれの分子についても結合親和性を示さなかった[Table 2.6.3.1- RD-2019-00381]。また， $VEGF_{165}$ に対する親和性を BRO と他の VRGF 阻害薬について比較した結果，25℃ の条件下での親和性（K_D 値）は，BRO で 21 pM，アフリベルセプトで 45 pM，ラニビズマブで<250 pM，ベバシズバムで 1660 pM であった。37℃ の条件下では，BRO，アフリベルセプト，ベバシズマブの K_D 値は上昇し，温度が親和性に影響することが示された。25℃ 及び 37℃ のいずれの条件下においても，BRO とアフリベルセプトの速度定数

（k_{on} 値）は同等で，ラニビズマブ及びベバシズマブのいずれよりも高値を示した[Table 2.6.3.1-RD-2018-00365]。

BRO の VEGF に対する結合親和性の動物種選択性を検討した。ヒト及びカニクイザルの $VEGF_{165}$ はアミノ酸配列が同一であることから，BRO の結合親和性も同一と考えられる。BRO は，ヒト／サル $VEGF_{165}$ 及びマウス・ラット $VEGF_{164}$ に対して同等の親和性で結合した一方，ウサギ $VEGF_{110}$ とは結合しなかった[Table 2.6.3.1-RDR_ASSMo_0007.01]。

VEGFR1 及び VEGFR2 に対する VEGF 結合阻害作用（*in vitro* 試験）

VEGFR1 及び VEGFR2 に対する VEGF 結合阻害作用について，ビオチン化 $rhVEGF_{165}$ を用いた酵素結合免疫吸着分析法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）で検討した。その結果，受容体に対する VEGF 結合阻害作用の IC_{50} 値は，VEGFR1 に対して 4.03 nM（106.0 ng/mL），また VEGFR2 に対して 0.86 nM（22.6 ng/mL）であった[Table 2.6.3.1-RDR_AssMo_0017.01 V2]。VEGFR2 に対する VEGF 結合阻害作用を他の VEGF 阻害薬と比較した。その結果，VEGFR2 と $rhVEGF_{165}$ の結合に対する BRO とアフリベルセプトの阻害活性は同等であった。1 時間インキュベーションの場合には，BRO とアフリベルセプトは，ラニビズマブとベバシズマブの約 1/25～1/50 の濃度で rhVEGF165 と VEGFR2 の結合を阻害した。24 及び 48 時間インキュベーションの場合には，作用の強さの違いは約 1/3～1/5 であった。この作用の強さの違いは，ラニビズマブとベバシズマブの結合が緩徐であることによるものと考えられた [Table 2.6.3.2-RD-2018-00365] 。

血管内皮細胞増殖及び遊走抑制作用（*in vitro* 試験）

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC），ウシ網膜血管内皮細胞（BREC）又はヒト網膜血管内皮細胞（HREC）を用いて，培養細胞中における VEGF に誘発された細胞増殖及び細胞遊走に対する BRO の抑制作用を検討した。これらの細胞は VEGFR1 と VEGFR2 の両者を発現し，VEGF-A 刺激により増殖と遊走が誘発される。BRO は，ラニビズマブと同様，非グリコシル化 $VEGF_{165}$ とグリコシル化 $VEGF_{165}$ のいずれの VEGF で誘発された HUVEC と BREC の増殖を濃度依存的に抑制した。HUVEC 増殖抑制作用に対する BRO の IC_{50} 値は 0.19 nM（5.0 ng/mL），ラニビズマブは 0.20 nM（9.6 ng/mL）を示した。一方，BREC 増殖作用に対する BRO とラニビズマブの IC_{50} 値は，HUVEC よりわずかに高値を示した。なお，HREC に対する BRO の遊走抑制作用は，増殖抑制作用と同様にラニビズマブとほぼ同等であった[Table 2.6.3.1-0013037]，[Table 2.6.3.1-RDR_AssMo_0017.01 V2]。VEGF 誘発の HREC 増殖に対する抑制作用を他の VEGF 阻害薬と比較する目的で追加試験を実施した。BRO，アフリベルセプト，ラニビズマブ及びベバシズマブは，$VEGF_{165}$ 誘発の HREC 増殖作用を抑制した[Table 2.6.3.1-RD-2018-00365]。

BRO による VEGF 誘発網膜毛細血管透過性の抑制（*in vivo* 試験）

nAMD 患者にみられる網膜下液貯留の増加及び網膜浮腫は，VEGF 発現の増加による血管透過性亢進が原因と考えられている（Kaiser et al. 2007）。$rhVEGF_{165}$ によって網膜毛細血管透過性を

亢進させたラットに BRO を硝子体内投与し，網膜浮腫抑制作用を検討した[Table 2.6.3.1-0013037]。

ラットの両眼に BRO (0.35～10.3 µg: rhVEGF165 の 1～30 倍モル当量）を硝子体内投与し，その 24 時間後に VEGF を投与した結果，網膜血管透過性の亢進が有意かつ用量依存的に抑制された（範囲 49.9～93.8%，全群 $p<0.05$）。6.28 µg（rhVEGF165 の 10 倍モル当量）のラニビズマブ投与も，血管透過性の亢進を有意に抑制した（88.7%，$p<0.001$）。ED_{50} は，BRO で 0.85 µg（32.4 pmol），ラニビズマブで 2.59 µg（53.9 pmol）とほぼ同等であった。

BRO の作用持続時間を評価する目的で，3.45 µg（10 モル当量）の BRO を硝子体内投与し，その後 1，3，7 又は 14 日に VEGF を投与した。BRO 硝子体内投与後 24 時間に VEGF を処置した場合，網膜血管透過性の亢進は 95.9%（$p=0.02$）と有意に抑制されたが，投与後 3～14 日における VEGF 処置の場合には，BRO の作用は減弱した。

ラット酸素誘発網膜症モデルにおける BRO の網膜毛細血管新生抑制作用（*in vivo* 試験）

ラット酸素誘発網膜症（oxygen-induced retinopathy, OIR）モデルは，未熟児網膜症や増殖性糖尿病網膜症等，ヒト虚血性網膜症のモデルで，虚血状態によって病的網膜前血管新生が生じる。このモデルを使用して BRO の網膜血管新生抑制作用を評価した。高濃度酸素環境下から室内大気環境下へ移して網膜血管新生を形成させたラット新生児に 15 µg 又は 46 µg の BRO を 2 回（14 日齢及び 17 日齢）硝子体内投与した結果，溶媒対照に比べて BRO は網膜前血管新生を用量依存的かつ有意に抑制（15 µg 群で 82.3%，46 µg 群で 100%）した。一方，14 日齢あるいは 18 日齢に 15 µg 又は 46 µg の BRO を単回硝子体内投与した場合には明らかな作用は認められなかった。18 日齢では異常新生血管が既に顕著に形成されており，既形成の新生血管に対して BRO は効果を示さなかった[Table 2.6.3.1-0013037]。

マウスレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルにおける BRO の血管新生抑制作用（*in vivo* 試験）

レーザー照射によってブルッフ膜を光凝固することで網膜下又は脈絡膜に病的血管新生を誘発するマウスレーザー誘発脈絡膜血管新生（choroidal neovascularization, CNV）モデルを用いて BRO の血管新生抑制作用を評価した。レーザー照射直後（第 0 日）及び照射後 7 日に BRO を硝子体内投与した結果，用量依存的かつ有意な CNV 形成の減少（15 µg で 21.3%，45 µg で 27.6% 及び 130 µg で 31.3%）が認められた[Table 2.6.3.1-0013037]。

2.2 副次的薬理試験

BRO は，VEGF-A に結合し，その作用を阻害する。全身的な VEGF 阻害によって，創傷治癒の遅延，血圧上昇，血液凝固作用（脳梗塞及び心血管梗塞）及びネフローゼ症候群が生じる可能性がある（Semeraro et al. 2014）。最高用量 6 mg/眼の BRO をカニクイザルに 3～4 週間隔で反復硝子体内投与した結果，血清中にフリーの BRO が検出されたことから，全身の VEGF-A に対する作用の可能性が示された。しかし，全身毒性所見は認められず，BRO の全身曝露量は極めて低

くクリアランスも大きいことから，全身における VEGF 阻害の影響は一時的で毒性学的意義は限定的であると考えられた。ヒト申請用量での Cmax が 49 ng/mL 及び AUC が 5320 ng*h/mL（E003 試験）であるのに対し， カニクイザルにおける NOAEL の Cmax が 577 ng/mL 及び AUC が 30300 ng*h/mL であることから Cmax で 12 倍及び AUC で 6 倍の安全域があると考えられた[Table 2.6.7.7B-0016684]。このため，免疫原性試験以外の副次的薬理試験は実施しなかった。

バイオ医薬品では，T 細胞依存性抗原反応を刺激する T 細胞エピトープによって，生体中に親和性が高く，長期間継続する抗体反応が生じる可能性がある。このような場合，軽微な副作用の発現から薬効の喪失まで，患者に対してさまざまな影響がみられることがある。このため，*ex vivo* の T 細胞増殖分析を実施し，T 細胞依存性抗原反応を刺激する T 細胞エピトープが存在している可能性を検討した結果，ヒトにおいて BRO が免疫原性を示す可能性は低いことが示唆された[Table 2.6.3.1-Antitope study ESB01]，[Table 2.6.3.1- RDR_InvHi_0023.01]。しかし，本分析の予測性が十分であるかは明らかではないため，免疫原性に関しては臨床試験の結果から判断する必要があると考えられる。

2.3 安全性薬理試験

ICH S7A ガイドラインでは，被験物質の薬理学的特性が十分に明らかにされており全身曝露量が極めて低い局所投与薬の場合には，安全性薬理試験の実施は求められていない。また，ICH S6(R1)ガイドラインでは，有害な薬理作用が適切な動物種を用いた毒性試験や臨床試験でモニターできる場合には，独立した安全性薬理試験の実施は必ずしも求められていない。VEGF 阻害薬には広汎な臨床使用経験があること，BRO 硝子体内投与時の全身曝露量は極めて低いこと，また毒性試験で全身毒性所見が認められなかったことから，独立した安全性薬理試験は実施しなかった。なお，最高用量 6 mg/眼の反復硝子体内投与毒性試験で実施した心電図測定で異常は認められなかった。BRO の全身曝露量は極めて低くクリアランスも大きいことから，全身における VEGF に対する阻害の影響は短時間であり毒性学的意義は限定的であると考えられた。

2.4 薬力学的薬物相互作用

BRO では，他の硝子体内投与薬との併用投与を想定していない。BRO 硝子体内投与時の全身曝露量は極めて低いことから，眼外において薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。以上の理由から，本薬の薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

3 薬物動態試験

ウサギとカニクイザルを用いて，静脈内投与及び硝子体内投与による遊離 BRO の PK を評価した。ウサギ VEGF に BRO は結合しないが，眼局所投与する薬物の予備的な PK 評価に一般的に使用されることからウサギでの評価を実施した。カニクイザルは BRO がこの動物種に活性を有し，毒性試験にも用いたことから PK 評価を行った。

硝子体内投与後，BRO は検討したすべての眼内組織及び血清中から並行して消失し，終末相半減期はウサギで 59～82 時間，カニクイザルで 50～78 時間であった。カニクイザルに硝子体内投与後の血清中 BRO の消失半減期は，静脈内投与時の約 6 時間よりも長かった。検討したすべての眼内組織と血清中から並行して BRO が消失したことから，BRO は硝子体から近接する眼内組織並びに血清中に分布することが示唆された。BRO は速やかに網膜へ分布し， BRO の網膜濃度を硝子体内濃度と比較したとき，カニクイザルで同程度，ウサギでは約 1/3 であった。硝子体内投与時の BRO の全身曝露量（血清中濃度の AUC）は，ウサギでは硝子体の 1/20000 未満，カニクイザルでは 1/7000 未満であった。カニクイザルにおいて，BRO の硝子体内投与量を 0.5 mg/眼から 6 mg/眼に増加させた場合，BRO の全身曝露量は用量比例的あるいは用量比を上回って増加した。眼内及び血清中 BRO の蓄積性は認められなかった。

3.1 分析法

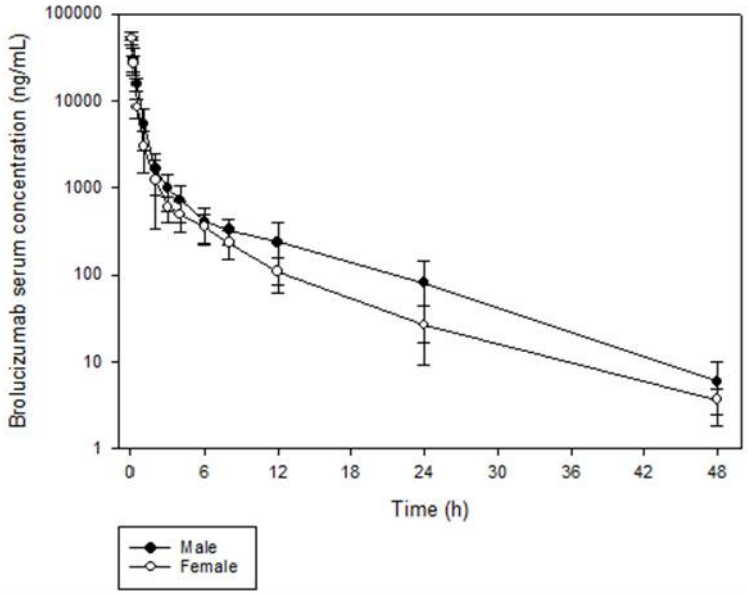
ウサギ及びカニクイザルにおける血清中遊離 BRO 濃度測定及び抗 BRO 抗体検出のため，バリデートした酵素結合免疫吸着分析（ELISA）法をそれぞれ開発した。BRO 濃度測定にはビオチン化 rhVEGF165 をコーティングしたプレート，抗 BRO 抗体検出にはビオチン化 BRO をコーティングしたプレートをそれぞれ用いて，ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）を用いたビオチン検出システムで定量した。

3.2 吸収及びバイオアベイラビリティ

雌雄カニクイザルに 2 mg/kg の BRO を静脈内投与後の，全身循環における PK を評価した。血清中 BRO 濃度は，定量下限（LLOQ）2.00 ng/mL の定量的 ELISA 法で測定した。

血清中 BRO 濃度推移に明らかな性差は認められなかった（Figure 3-1）ことから，雌雄のデータを併合した PK パラメータを算出した。BRO の PK パラメータを Table 3-1 に示す。BRO の初期相半減期は 0.483 ± 0.047 時間，終末相半減期は 5.64 ± 1.50 時間であった。

Figure 3-1　　カニクイザルに BRO を静脈内投与後の平均（+/- SD）血清中 BRO 濃度



Source：[Table 2.6.5.3-TDOC-0012016]
平均値+/- SD，雄 4 例，雌 6 例

Table 3-1　　カニクイザルに 2 mg/kg の BRO を静脈内投与後の平均血清中 BRO の PK パラメータ

パラメータ	雌雄併合	
	平均値	SD
C_0 (µg/mL)	59.7	14.1
初期相 T1/2 (h)	0.483	0.047
終末相 T1/2 (h)	5.64	1.50
AUC0-48h (µg*h/mL)	37.8	21.3
AUCinf (µg*h/mL)	37.9	21.3

Source：[Table 2.6.5.3-TDOC-0012016]

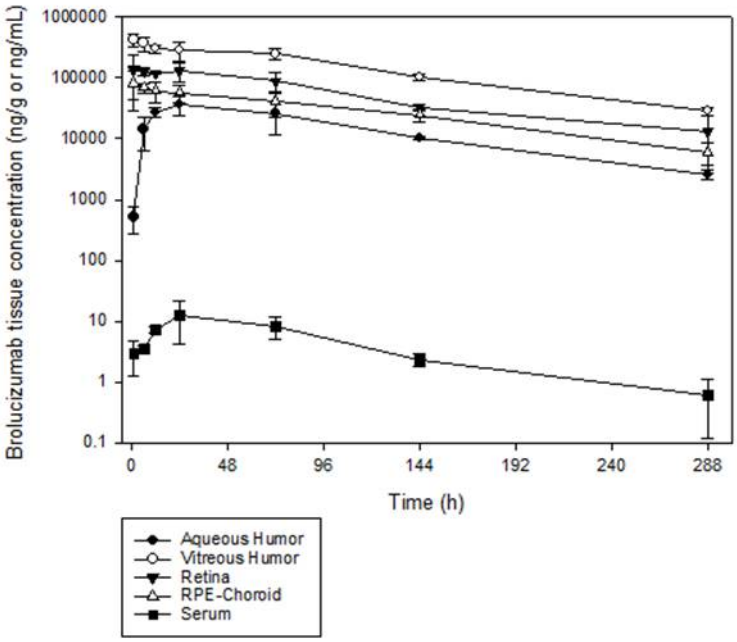
3.3　　分布

3.3.1　　ウサギにおける BRO の眼内分布

ニュージーランドホワイト種のウサギを用いて，BRO を単回硝子体内投与後の眼内分布を評価した。BRO 0.5 mg を 50 µL の投与液としてウサギの右眼に投与し，左眼は非投与とした。血液（血清）及び両眼の組織・組織液試料（房水，硝子体，網膜及び網膜色素上皮・脈絡膜）を各時点 3～5 例の動物から採取し，定量的 ELISA 法で分析した。BRO 濃度の LLOQ は，房水，硝子体及び血清で 0.4 ng/mL，網膜で 1.2～2.4 ng/g，網膜色素上皮・脈絡膜で 1.2～4.8 ng/g であった。

単回硝子体内投与後，BRO は網膜及び網膜色素上皮・脈絡膜へ速やかに分布した（Figure 3-2）。房水と血清中 BRO の消失半減期は，それぞれ 65 及び 59 時間であり，硝子体からの移行（半減期 71 時間）に依存すると考えられた。片眼への単回硝子体内投与後，極めてわずかな濃度が反対側の眼で検出された。血清中 BRO 濃度は，観察期間を通して硝子体濃度の 1/20000 未満であった。

Figure 3-2　　ウサギに 0.5 mg の BRO を硝子体内投与後の，血清中及び眼内組織中における平均（+/- SD）BRO 濃度



Source：[Table 2.6.5.8A-8217332]

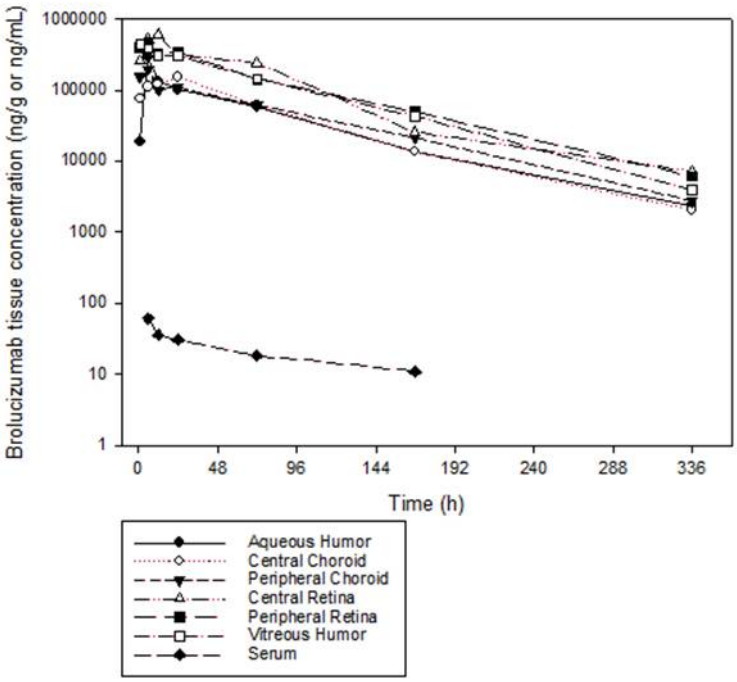
3.3.2　　カニクイザルにおける BRO の眼内分布

カニクイザルに BRO を単回硝子体内投与後の眼内分布を異なる 2 試験で評価した。

最初の試験では，BRO の 20 mg/mL 溶液を 50 µL，単回硝子体内投与（1 mg/眼）した。各時点で雌雄各 1 例，計 2 例の両眼から房水，硝子体，中心部網膜，周辺部網膜，中心部脈絡膜及び周辺部脈絡膜の試料を採取し，定量的 ELISA 法で眼内組織及び血清中の BRO 濃度を測定した。

1 mg/眼の BRO を単回硝子体内投与後，BRO は硝子体から眼内組織へ速やかに（投与後 6～24 時間）分布し，最も高い濃度は中心部網膜で認められた（Figure 3-3）。BRO は検討したいずれの眼内組織からも概ね並行して消失し，見かけの終末相半減期は 50～59 時間であった。投与後 14 日まで硝子体に残存していた BRO の量は，投与量の 1%未満であった。BRO の全身曝露は低く，血清中曝露量は硝子体に比べて 1/7000 未満であった。片眼への単回硝子体内投与による反対側の眼への移行は検出されなかった。

Figure 3-3　カニクイザルに 1 mg の BRO を硝子体内投与後の，血清中及び眼内組織中における平均（+/- SD）BRO 濃度



Source：[Table 2.6.5.8B-TDOC-0012998]

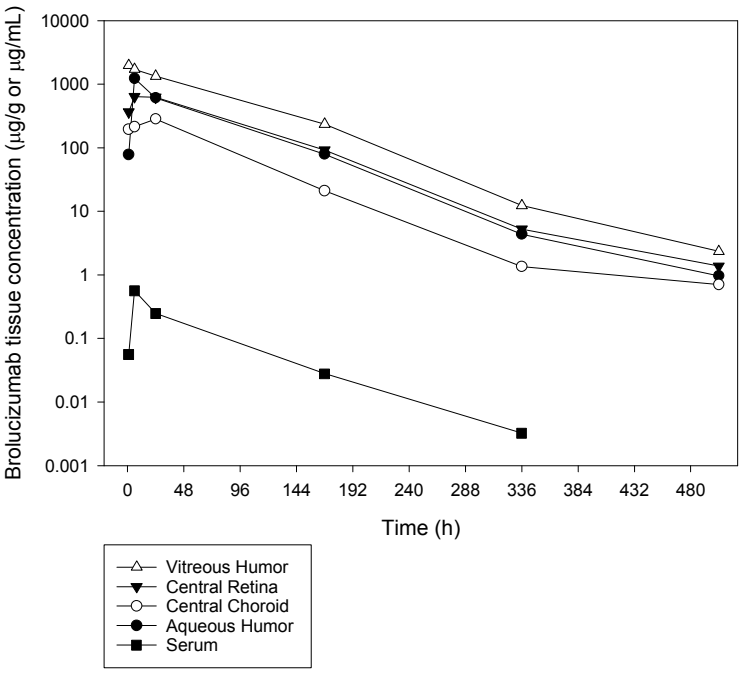
2 番目の試験では，カニクイザルに硝子体内投与後の BRO の眼内及び全身曝露量に対する投与容量と製剤に用いる溶媒の影響を評価した。試験に用いた製剤は，第 1 群に 12%の BRO（6 mg を 50 µL で硝子体内投与，処方識別番号：FID 120852）及び第 2 群に 6%の BRO（6 mg を 100 µL で硝子体内投与，FID 117086）であった。第 1 群の製剤（FID 120852）は， C-12-006 試験で使用し，第 2 群の製剤（FID 117086）は， C-10-083 試験で使用した。各動物には，最初に右眼に投与し，引き続き左眼に投与した。

硝子体内投与後， BRO はさまざまな眼内組織に分布し，血清中にも検出された（Figure 3-4）。最も高い曝露量は，被験物質が投与された硝子体で認められた。硝子体の次に周辺部網膜あるいは房水で高い曝露量が認められた。眼内組織分布，血清中濃度-時間推移あるいは PK パラメータに，製剤及び投与容量の変更による明らかな違いはみられなかった。

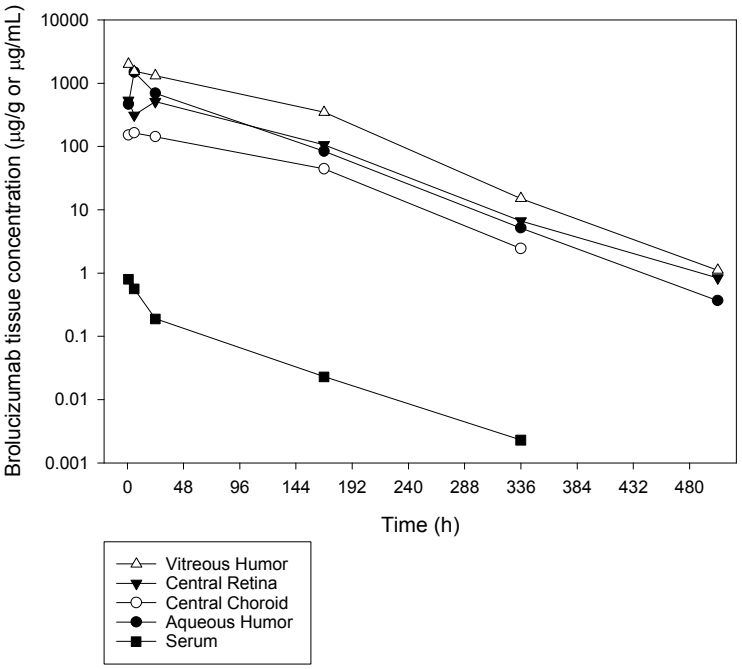
BRO は硝子体内投与後，速やかに眼内組織へ分布し，Tmax は 6～24 時間であった。評価したいずれの眼内組織からも BRO は概ね並行して消失し，見かけの終末相半減期は 41～74 時間であった。BRO の全身曝露は低く，血清中曝露量は，硝子体と比較して Cmax で 1/3500 未満，AUC で 1/5500 未満であり，血清中での見かけの終末相半減期は 48～51 時間であった。

Figure 3-4 カニクイザルに 6 mg の BRO を硝子体内投与後の，平均（+/- SD）眼内組織中及び血清中 BRO 濃度

Formulation A (FID 120852)



Phase I formulation (FID 117086)



Source：[Table 2.6.5.8C-TDOC-0016874]

3.4 妊娠動物及び授乳

妊娠中又は授乳中の動物を用いたBROのPK試験は実施していない。

3.5 代謝

BROは生物学的製剤であり，代謝経路は生体内でのペプチドやアミノ酸への分解であると予想されることから代謝に関する試験は実施していない。

3.6 排泄

BROは，生体内でのペプチドやアミノ酸への分解並びに腎の濾過作用によって排泄されると予想されることから，排泄に関する試験は実施していない。

3.7 薬物動態学的薬物相互作用

肝臓での薬物代謝酵素が，モノクローナル抗体や抗体由来フラグメントの代謝・排泄に影響する可能性は小さく，BROのサイトカインや薬物代謝酵素発現への影響も予想されないことから，低分子薬物と抗体由来の生物学的製剤である本剤の薬物相互作用試験は実施していない。

3.8 トキシコキネティクス

カニクイザルを用いたBROの硝子体内投与毒性評価の一部として，BROを硝子体内投与後の，血清中及び硝子体中BRO濃度を測定した。

全試験のすべての実薬投与群において，BROの血清中濃度が確認された。BROは硝子体内投与後約21日に採取した硝子体試料中で定量可能であり，濃度は用量依存的に増加したが，投与後43日に採取した硝子体試料からはBROは検出されなかった。BROの血清中曝露量に性差は認められなかった（平均体重は雄が約5 kg，雌が約3.7 kgであった）。血清中BRO濃度は投与量の増加に伴って増加した。BROの累積性は認められなかった。

試験動物の33%は投与前に抗BRO抗体を有していたが，抗体価は低く，BRO投与後も抗体価は上昇しなかった。試験動物の約27%では投与後22～64日に抗BRO抗体が検出された。抗体の発現頻度と抗体価は用量に依存しなかった。抗BRO抗体の存在は，0.5 mg投与群の1例で3回目投与後のBROの全身クリアランスの増加と関連していた。このクリアランスの増加は，抗体の存在が原因であった可能性があるが，ELISA測定での相互作用が原因であった可能性も考えられる。この1例での事象のほかに，曝露量に対する抗BRO抗体の影響は認められなかった。

4 毒性試験

最高用量6 mg/眼でカニクイザルを用いたGLP適合の反復硝子体内投与試験（2試験）を実施した。[redacted]社で製造された原薬を用いて毒性試験を実施し，第I相及び第II相臨床試験で使用した。第III相臨床試験では，[redacted]社で製造された原薬を使用することとなったため，[redacted]製造品と[redacted]製造品を比較する目的で，カニクイザルを用いた3ヵ月硝子体内投与毒性試験

（GLP 適合）を実施した。[redacted]製造品と[redacted]製造品のいずれにおいても眼毒性及び全身毒性所見は認められなかった。また，[redacted]製造品を用いて実施した，拡充型出生前及び出生後の発生（ePPND）に関する試験において，出生前及び出生後の発生に影響は認められなかった。

分析試験において第 III 相臨床試験用製剤と市販用製剤の同等性／同質性が示されたため，薬理試験，薬物動態試験及び毒性試験の結果は市販用製剤に外挿可能と判断した（3.2.S.2.6 項）。

すべての反復投与毒性試験及び拡充型出生前及び出生後の発生に関する試験では，BRO に対して薬理作用を示し（2.6.2 項），眼の解剖がヒトに近似し，かつ適切な硝子体内投与毒性試験が実施可能であるカニクイザルを使用した。これらの試験では，臨床適応を想定した間隔で片眼（反対眼は無処置対照）に投与可能な最大量である 6 mg までの用量を投与した。BRO 硝子体内投与における全身曝露量は極めて低く，3～4 週間隔の反復硝子体内投与によっても全身毒性所見が認められておらず，また VEGF 阻害薬の全身作用はよく知られていることから，一般的な静脈内投与毒性試験の必要性は乏しいと考えられた。BRO の毒性試験一覧を Table 4-1 に示す。

Table 4-1　　毒性試験一覧

試験の種類	投与経路	動物種・試験系	GLP 適合
単回投与毒性試験			
ウサギ単回投与毒性試験	硝子体内	ウサギ	非適合
カニクイザル単回投与毒性試験	硝子体内	カニクイザル	非適合
反復投与毒性試験			
カニクイザル 5 週間隔 2 回投与毒性試験	硝子体内	カニクイザル	非適合
カニクイザル 6 週間隔 2 回投与毒性試験	硝子体内	カニクイザル	非適合
カニクイザル 3 週間隔 3 回投与毒性試験	硝子体内	カニクイザル	適合
カニクイザル 4 週間隔 6 回投与毒性試験	硝子体内	カニクイザル	適合
カニクイザル 4 週間隔 3 回投与毒性試験	硝子体内	カニクイザル	適合
生殖発生毒性試験			
カニクイザル拡充型出生前及び出生後の発生試験	硝子体内	カニクイザル	適合

4.1　　単回投与毒性試験

添加物組成やエンドトキシン含量が異なる原薬及び製剤を用いてウサギ及びカニクイザルの単回投与毒性試験を GLP 非適合で実施した結果，良好な忍容性が認められた。

4.2　　反復投与毒性試験

単回投与毒性試験に引き続き，反復硝子体内投与時の眼毒性及び全身毒性を検討する目的で，GLP 非適合の反復投与毒性試験を実施した。これらの試験の結果に基づき，眼毒性，全身毒性及び BRO の全身曝露を検討する目的で，カニクイザルを用いた GLP 適合の反復硝子体内投与毒性試験を実施した。

[redacted]社で製造された原薬を用いて，最高用量 6 mg/眼で GLP 適合の 3 週間隔 3 回反復硝子体内投与及び 4 週間隔 6 回反復硝子体内投与毒性試験を実施した。これらの試験では，一般状態観察，体重測定，眼科学的検査（細隙灯顕微鏡検査，倒像検眼鏡検査，眼圧測定及び網膜電図測定），臨床検査（血液学的検査及び血液生化学的検査），病理検査（剖検，器官重量測定及び眼の病理組織学的検査），TK 試験（血清及び硝子体中濃度）及び抗薬物抗体測定（血清及び硝子体中濃度）を実施した。

いずれの試験においても，投与可能な最大量である最高用量 6 mg/眼の BRO を投与した結果，眼毒性及び全身毒性のいずれの兆候も認められなかった。一部の動物では投与前から抗薬物抗体が認められた。BRO の投与と抗薬物抗体産生の間に相関は認められず，抗薬物抗体反応は BRO の曝露あるいは眼毒性及び全身毒性所見のいずれにも影響を与えなかった。

眼毒性及び全身毒性の NOAEL は，6 mg/眼（Cmax は 577 ng/mL 及び AUC0-168h は 30300 ng/mL*h）と判断された[Table2.6.7.7B-0016684]。

引き続き[redacted]製造品と[redacted]製造品を比較する目的で，カニクイザルを用いた最高用量 6 mg/眼の 4 週間隔 3 回硝子体内投与毒性試験を実施した結果，眼毒性及び全身毒性のいずれの兆候も認められなかった。

4.3 遺伝毒性試験

天然に存在するアミノ酸で構成される BRO は，DNA 組換え技術を利用して製造されるが合成後化学修飾を受けない。ICH S6(R1)ガイドラインでは，従来の医薬品について実施されている遺伝毒性試験はバイオ医薬品に対しては適切なものでなく必要とされないこと，また大量のペプチドやタンパク質を投与した場合には解釈不可能な結果が起こる可能性があることが記述されている。さらに，このような成分が DNA や他の染色体成分に直接相互作用するとは考えにくいと述べられていることから，BRO の遺伝毒性試験は実施しなかった。

4.4 がん原性試験

ICH S6(R1)ガイドラインには，バイオ医薬品においては，標準的ながん原性試験は一般的に不適当である旨が記述されている。また，VEGF 阻害薬の硝子体内投与は，がん原性リスクがない治療法として確立されている。以上の理由から，BRO のがん原性試験は実施しなかった。

4.5 生殖発生毒性試験

ICH S6(R1)ガイドラインでは，生殖発生毒性試験実施の必要性について，臨床での適応及び予想される対象疾患患者群により判断すべきことが記述されており，一般的に滲出性加齢黄斑変性患者は高齢で，臨床での適応は硝子体内投与である。BRO の生殖発生毒性試験として，GLP 適合の拡充型出生前及び出生後の発生（ePPND）のみを実施した。

本試験では，雌カニクイザルに最高用量 6 mg/眼までの BRO を妊娠第 20 日から分娩まで，4 週間隔で硝子体内投与した。また，分娩後 28 日に生存児を有する一部の動物に追加投与を行い，

トキシコキネティクス評価のための血液及び乳汁を採取した。母動物について，一般状態観察，超音波検査（妊娠モニタリング），体重測定，分娩観察，眼科学的検査，血液学的検査，血液凝固検査，血液生化学的検査，サル絨毛性ゴナドトロピン測定，剖検，TK（血清及び乳汁）及び抗薬物抗体（ADA）測定を実施した。また，出生児について，一般状態観察，体重測定，外表検査，形態計測，神経行動学的検査，握力測定，骨格検査，血液学的検査，血液凝固検査，血液生化学的検査，剖検，器官重量測定，TK 測定（血清），及び ADA 測定を実施した。

BRO の妊娠，分娩，乳汁移行，胚胎児発生，出生児の生存児数，成長，出生後の発達に与える影響は認められなかった。母動物に 6 mg/眼までを硝子体内投与したとき，乳汁中及び出生児に BRO の曝露は認められなかった。母動物及び出生児に対する NOAEL はともに 6 mg/眼と考えられた。分娩後 132 日の母動物における Cmax は 301 ng/mL，AUC0-24h は 5120 ng/mL*h であった。

カニクイザルを用いた 4 週間隔 6 回反復硝子体内投与毒性試験では，雄性生殖器の病理組織学的検査において BRO 投与の影響は認められなかったことから，BRO 投与による雄性受胎能に対するリスクは極めて低いと考え，雄性授胎能試験は実施しなかった。

一方，卵巣及び黄体の発達には血管新生が関わっていることから，VEGF の阻害が雌性受胎能に影響を与えることはよく知られており，BRO においても雌性受胎能に対して影響する可能性は否定できない。しかし，カニクイザルを用いた 4 週間隔 6 回反復硝子体内投与毒性試験では，雌性生殖器の病理組織学的検査，卵巣重量の測定及び性ホルモンに関与する内分泌系組織の病理組織学的検査において BRO 投与の影響は認められなかった。カニクイザルの月経周期が 29.4 日（吉田 2006）であることから，本試験では月経周期ごとにおよそ各 1 回投与されたことになるが，雌性生殖器及び内分泌系組織に病理組織学的異常が認められなかったことから，性ホルモンレベル及び月経周期に対する BRO 投与の影響があった可能性は低い。以上のとおり，硝子体内投与時の全身曝露量は極めて低いことから，BRO の用法・用量に従った場合のリスクは極めて低いと考えられた。このため，雌性受胎能試験を実施しても新たに得られる情報は限定的であることから，動物福祉（3Rs）の観点からも実施は不適切と考え，BRO の雌性受胎能試験は実施しなかった。

4.6 全身曝露量の比較

申請用量は，6 mg の BRO の反復硝子体内投与である。非臨床安全性試験の結果から，眼局所に対しては 2 倍の安全域が， 全身に対しては Cmax に基づくと 12 倍，AUC に基づくと 6 倍の安全域があると考えられた（Table 4-2）。

Table 4-2 ヒトにおける 6 mg 用量での動物との曝露量比

用量	Cmax[b] (ng/mL)	AUC[b] (ng/mL*hr)	ヒトにおける BRO 曝露量[c]		眼毒性の安全域[d]	Cmax に基づく全身毒性の安全域	AUC に基づく全身毒性の安全域
			C_{max} (ng/mL)	AUC (ng/mL*hr)			
6 mg[a]	577	30300	49	5320	2	12	6

a: GLP 適合のサル 4 週間隔 6 回硝子体内投与毒性試験の NOAEL [Table 2.6.7.7B-0016684]
b: [Table 2.6.7.7B-0016684]
c: E003 試験
d: サルの硝子体容積はヒトの約 1/2（Girach and Pakola 2012, Struble et al. 2014）

4.7 局所刺激性試験

眼刺激性は，硝子体内投与反復投与毒性試験（4.2 項）において眼毒性の一部として評価した。眼局所に BRO 投与の影響は認められず，眼刺激性は認められなかった。

4.8 不純物及び分解産物

標準的な生物製剤の基準に基づき，試験方法，試験項目及びそれらの規格を設定した。規格設定の根拠及びその妥当性は，品質に関する概括資料（2.3 項）に記載する。

4.9 新添加物の安全性評価

BRO 市販製剤に配合される添加物のうち，クエン酸ナトリウム水和物及びポリソルベート 80 は医薬品添加剤としての硝子体内投与による使用前例がなく，精製白糖の一日最大使用量は硝子体内投与による使用前例を超える。全身毒性及び遺伝毒性については，クエン酸ナトリウム水和物，ポリソルベート 80 及び精製白糖のいずれも静脈内投与の使用前例が本薬硝子体内投与時の一日最大使用量をそれぞれ 14000 倍，50000 倍あるいは 14000 倍上回っていることから，安全性が確認されているものと判断した。硝子体内投与による局所の安全性については，市販製剤と同等以上の濃度のクエン酸水和物，クエン酸ナトリウム水和物，ポリソルベート 80 及び精製白糖を含有した製剤を用いた毒性試験の溶媒投与群（対照群）の成績から評価した。いずれの試験においても，溶媒投与による眼局所の影響は認められなかった。カニクイザルの硝子体容量はヒトの約 1/2 であることから（Girach and Pakola 2012, Struble et al. 2014），眼局所毒性に対してこれらの添加物には 2～9 倍を超える安全域があると考えられた。

5 総括及び結論

BRO は，分子量が約 26 kDa の scFv で，既存の VEGF 阻害薬と比較して分子量が小さいという新規性を有し，より高いモル用量の投与と効果的な組織分布が期待できる。BRO は Fc ドメインを持たないため，全身曝露は限定的で，血小板の活性化，補体依存性あるいは抗体依存性の細胞毒性を引き起こす可能性は極めて低い。

BRO の薬効薬理試験として *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。BRO は， VEGF-A と結合し，VEGF 受容体（VEGFR1 及び VEGFR2）に対する VEGF-A の結合を阻害することでその作用を抑

制する。*In vitro* 試験の結果，BRO は血管内皮細胞増殖及び細胞遊走を抑制した。BRO は，既存の VEGF 阻害薬であるアフリベルセプト，ラニビズマブ及びベバシズマブと同等の血管内皮細胞増殖抑制作用を示した。BRO は，ヒト／カニクイザル $VEGF_{165}$ 及びマウス・ラット $VEGF_{164}$ と同等の親和性で結合した一方，ウサギ $VEGF_{110}$ とは結合しなかった。*In vivo* 試験では，網膜血管透過性亢進モデル及び眼血管新生モデルにおいて，BRO は血管透過性亢進と血管新生をいずれも用量依存的に抑制した。

BRO の主要な非臨床安全性試験は，臨床試験用製剤を用いて，ヒトの予定臨床投与経路である硝子体内投与で GLP を遵守して実施された。BRO 硝子体内投与における全身曝露は極めて低く，また VEGF 阻害薬の全身作用はよく知られていることから，一般的な静脈内投与毒性試験の必要性は乏しいと考えられた。6 mg/眼までの用量では，眼毒性及び全身毒性のいずれの兆候も認められなかった。また，同用量下において，妊娠，分娩，乳汁移行，胚胎児発生，出生児の生存児数，成長，及び出生後の発達に影響は認められなかった。乳汁中及び出生児に BRO の曝露は認められなかった。

BRO の申請用量は，6 mg の反復硝子体内投与である。非臨床安全性試験の結果，最高用量 6 mg/眼における 3～4 週間隔反復硝子体内投与時の良好な忍容性が確認され，眼局所に対しては 2 倍の安全域が， 全身に対しては Cmax に基づくと 12 倍，AUC に基づくと 6 倍の安全域があると考えられた。以上の非臨床試験の結果は，nAMD 治療に対する BRO の有用性を示すものと考えられた。

6 参考文献一覧

[Brown DM, Kaiser PK, Michels M, et al. (2006)] Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. N Engl J Med; 355:1432-44.

[Girach A and Pakola S (2012)] Vitreomacular interface diseases: pathophysiology, diagnosis and future treatment options. Expert Rev Ophthalmol; 7(4):311-23.

[Kaiser PK, Blodi BA, Shapiro H, et al. (2007)] Angiographic and optical coherence tomographic results of the MARINA study of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. Ophthalmology; 114:1868-75.

[Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, et al. (2018)] Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signaling at VEGFR2. Int J Mol Sci.; 19:1-27.

[Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. (2006)] Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. N Engl J Med; 355:1419-31.

[Semeraro F, Morescalchi F, Duse S, et al. (2014)] Systemic thromboembolic adverse events in patients treated with intravitreal anti-VEGF drugs for neovascular age-related macular degeneration: an overview. Expert Opin Drug Saf; 13(6):785-802.

[Struble C, Howard S, Relph J (2014)] Comparison of ocular tissue weights (volumes) and tissue collection techniques in commonly used preclinical animal species. Oct 1-4 2014, Nice, France. European Association for Vision and Eye Research annual meeting[abstract]. Acta Ophthalmologica; 92:s253.

吉田高志 (2006) 繁殖. 医科学研究資源としてのカニクイザル. 霊長類医科学研究センター30 年の集積; 東京:シュプリンガー・ジャパン, p. 31-46. (available upon request)