2.6.1 緒言

1 緒言

ブロルシズマブ（以下 BRO，開発コード：RTH258，ESBA1008，AL-86810）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）である。BRO 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[Table 2.6.3.1-RDR_AssMo_0017.01 V2]。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，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期待される。

BRO のアミノ酸配列は以下のとおりである：

MEIVMTQSPS	TLSASVGDRV	IITCQASEII	HSWLAWYQQK	PGKAPKLLIY	50
LASTLASGVP	SRFSGSGSGA	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	NVYLASTNGA	100
NFGQGTKLTV	LGGGGGSGGG	GSGGGGSGGG	GSEVQLVESG	GGLVQPGGSL	150
RLSCTASGFS	LTDYYYMTWV	RQAPGKGLEW	VGFIDPDDDP	YYATWAKGRF	200
TISRDNSKNT	LYLQMNSLRA	EDTAVYYCAG	GDHNSGWGLD	IWGQGTLVTV	250
SS					252

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る。BRO は，導入期には 6 mg を 1 ヵ月ごとに連続 3 回，それに引き続く維持期には 6 mg を 3 ヵ月ごとに，硝子体内投与する。

2.6.2 薬理試験の概要文

目　次

目　次 2
表 一 覧 2
図 一 覧 2
略号一覧 4
1 まとめ 5
2 効力を裏付ける試験 5
2.1 *In vitro* 試験 6
2.1.1 VEGF に対する結合親和性及び動物種選択性 6
2.1.2 *In vitro* 細胞活性 10
2.2 *In vivo* 薬効薬理試験 11
3 副次的薬理試験 15
4 安全性薬理試験 16
5 薬力学的薬物相互作用 16
6 考察及び結論 16
7 参考文献 17

表 一 覧

Table 2-1 グリコシル化 $VEGF_{165}$ に対する BRO 及びラニビズマブの結合親和性 6
Table 2-2 BRO，アフリベルセプト，ラニビズマブ及びベバシズマブの $VEGF_{165}$ に対する結合親和性の比較 7
Table 2-3 ヒト VEGF アイソフォームに対する BRO の結合親和性 7
Table 2-4 各種動物由来の VEGF に対する BRO の結合親和性 8
Table 2-5 VEGF 阻害薬の VEGFR2 結合阻害作用の比較 10
Table 2-6 VEGF で誘発される内皮細胞の増殖又は遊走活性に対する BRO 及びラニビズマブの抑制作用 11
Table 2-7 VEGF で誘発される HREC 増殖に対する VEGF 阻害薬の抑制作用 11

図 一 覧

Figure 2-1 SPR による本薬の VEGF-B～D 及び PlGF に対する結合親和性 8
Figure 2-2 VEGFR2 (A)及び VEGFR1 (B)へのヒト $VEGF_{165}$ 結合に対する BRO 及びラニビズマブの阻害作用 9
Figure 2-3 非グリコシル化（A）及びグリコシル化（B）ヒト $VEGF_{165}$ 誘発のヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖に対する BRO 及びラニビズマブの抑制作用 11

Figure 2-4 ラット VEGF 誘発網膜血管透過性亢進モデルにおける BRO 硝子体内投与 1，3，7 及び 14 日後の血管透過性亢進抑制作用 13
Figure 2-5 ラット OIR モデルに BRO（白色カラム）及び溶媒（黒色カラム）を硝子体内投与したときの網膜前血管新生抑制作用..... 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）
BREC	Bovine retinal endothelial cell	ウシ網膜血管内皮細胞
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
K_D	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 まとめ

ブロルシズマブ（以下 BRO，開発コード：RTH258，ESBA1008，AL-86810）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）である。本薬では，血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor, 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。本薬は血管内皮増殖因子 A（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）。硝子体，網膜，脈絡膜に存在する VEGF の活性を抑制することで，BRO は効果を示すと考えられる。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る。

BRO の薬効薬理試験として *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。*In vitro* 試験で BRO は，VEGF 誘発性の血管内皮細胞増殖及び細胞遊走を用量依存的に抑制した。ヒト VEGF に対する結合に加えて，BRO はげっ歯類の VEGF にも結合したことから，*in vivo* 試験ではげっ歯類のモデルを使用した。黄斑浮腫モデルラットに BRO を単回硝子体内投与した結果，VEGF で誘発される網膜血管の透過性亢進を強力かつ用量依存的に抑制した。さらに，ラット酸素誘発網膜症（oxygen-induced retinopathy, OIR）モデルでは，BRO の反復硝子体内投与によって，虚血性の網膜前血管新生の形成を顕著に抑制した。マウスのレーザー誘発脈絡膜血管新生（choroidal neovascularization, CNV）モデルでは，腹腔内投与と硝子体投与のいずれにおいても用量依存的な血管新生阻害作用を示した。以上，BRO の局所（硝子体内）投与による *in vivo* 試験の結果，高濃度酸素あるいはレーザー照射によって誘発された後眼部血管新生及び VEGF によって誘発された血液網膜関門の破綻に対して強力かつ用量依存的な効果が確認された。

2 効力を裏付ける試験

BRO はヒト 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。効力を裏付ける試験では，BRO の VEGF に対する結合親和性，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。

2.1 *In vitro* 試験

2.1.1 VEGF に対する結合親和性及び動物種選択性

BRO の VEGF に対する結合親和性

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最も多く存在する VEGF-A のアイソフォームである $VEGF_{165}$ に対する BRO の結合反応速度を分析した。また，nAMD 治療における既存の VEGF 阻害薬であるラニビズマブの結合反応速度と比較した。天然の VEGF-A がグリコシル化物である一方，多くの市販の組換えヒト(rh)$VEGF_{165}$ は非グリコシル化物であるため，BRO の結合能に関しては，$VEGF_{165}$ の非グリコシル化物とグリコシル化物の両者を検討した。

25°C の条件下で実施した結果，非グリコシル化 $rhVEGF_{165}$ に対する BRO 結合の K_D 値は 2.84×10^{-11} M であり，グリコシル化物と同等の親和性であった（Table 2-1）。他のグループからは，BRO の結合親和性については $1\sim2\times10^{-12}$ M との報告もある（Stewart 2018, Szabó et al. 2018）。この結合親和性の違いは，分析方法あるいは試験条件の違いによるものと考えられる。非グリコシル化 $VEGF_{165}$ に対する BRO の結合動態は速度定数 k_{on} 値が 1.68×10^{6} $M^{-1}s^{-1}$，k_{off} 値が 4.78×10^{-5} s^{-1} であった。SPR 法で測定した速度定数から，BRO の結合速度は，ラニビズマブより速く，両者の結合動態は異なることが示された。一方，VEGF との複合体の解離速度は，ラニビズマブに比べて BRO が速かった。

Table 2-1 グリコシル化 $VEGF_{165}$ に対する BRO 及びラニビズマブの結合親和性

VEGF 型	抗体	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
非グリコシル化 $hVEGF_{165}$	BRO	1.68×10^{6}	4.78×10^{-5}	2.84×10^{-11}
グリコシル化 $hVEGF_{165}$	BRO	2.03×10^{6}	4.40×10^{-5}	2.16×10^{-11}
グリコシル化 $hVEGF_{165}$	ラニビズマブ	3.35×10^{4}	$<1.0\times10^{-5}$	$<2.98\times10^{-10}$

K_D 値：解離定数。
ラニビズマブの解離速度は緩やかであるため，k_{off} 値は算出できず，K_D 値は概算値を示した。
Source: [Table 2.6.3.1-RDR_AssMo_0017.01 V2]

引き続き，$VEGF_{165}$ に対する親和性を BRO と他の VRGF 阻害薬について比較する試験を実施した。前述の試験の条件である 25°C に加え，生理学的条件に近い 37°C でも実験を実施した（Table 2-2）。25°C の条件下での親和性（K_D 値）は，BRO が 21 pM，アフリベルセプトが 45 pM と最も高く，ラニビズマブが<250 pM，ベバシズバムは 1660 pM であった。37°C 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°C 及び 37°C 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 2.6.3.2-RD-2018-00365]。

Table 2-2 BRO，アフリベルセプト，ラニビズマブ及びベバシズマブの $VEGF_{165}$ に対する結合親和性の比較

温度条件	VEGF 阻害薬	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)
25°C	BRO	2.0×10^{6}	4.2×10^{-5}	21
	アフリベルセプト	1.3×10^{6}	7.3×10^{-5}	45
	ラニビズマブ	4.0×10^{4}	$<1.0\times10^{-5}$	<250
	ベバシズマブ	3.7×10^{4}	6.1×10^{-5}	1660
37°C	BRO	2.5×10^{6}	2.5×10^{-4}	101
	アフリベルセプト	3.9×10^{6}	1.5×10^{-3}	457
	ラニビズマブ	5.8×10^{4}	$<1\times10^{-5}$	<171
	ベバシズマブ	5.9×10^{4}	1.9×10^{-4}	3300

Kd 値：解離定数。
ラニビズマブの解離速度は緩やかであるため，k_{off}値は算出できず，K_D値は概算値を示した。
Source: [Table 2.6.3.1-RD-2018-00365]

VEGF アイソフォームに対する BRO の結合親和性

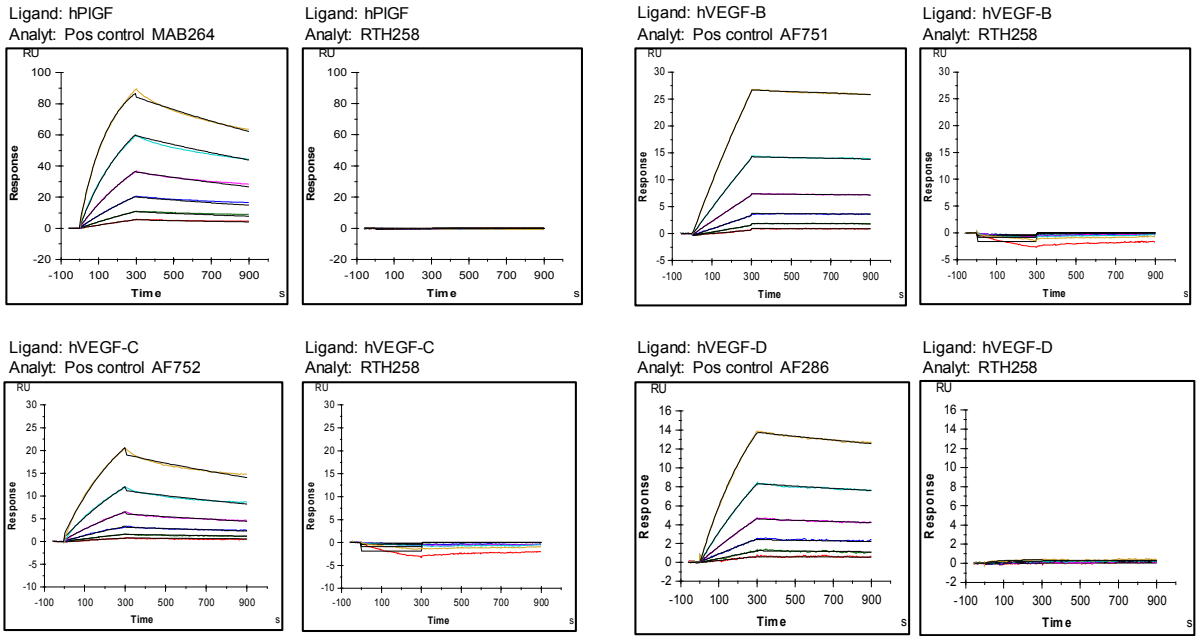
3 種類の VEGF-A のアイソフォーム，並びに VEGF-A 以外のサブタイプ（VEGF-B～D）及び PIGF に対する BRO の結合親和性を SPR 法で分析した。BRO は，$rhVEGF_{165}$ に対して 2.84×10^{-11} M，$VEGF_{110}$ に対して 2.52×10^{-11} M 及び $VEGF_{121}$ に対して 3.41×10^{-11} M の K_D 値で結合した（Table 2-3）。以上，BRO は $VEGF_{165}$，$VEGF_{110}$ 及び $VEGF_{121}$ に対してほぼ同等の親和性を示した。一方で BRO 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（Figure 2-1）。

Table 2-3 ヒト VEGF アイソフォームに対する BRO の結合親和性

VEGF アイソフォーム	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
$hVEGF_{165}$	1.68×10^{6}	4.78×10^{-5}	2.84×10^{-11}
$hVEGF_{110}$	1.45×10^{6}	3.66×10^{-5}	2.52×10^{-11}
$hVEGF_{121}$	1.66×10^{6}	5.67×10^{-5}	3.41×10^{-11}

Source: [Table 2.6.3.1-RDR_ASSMo_0016.01]

Figure 2-1 SPR による本薬の VEGF-B～D 及び PlGF に対する結合親和性



MAB264, AF751, AF752, AF286 は陽性対照として使用
Source: [Table 2.6.3.1- RD-2019-00381]

BRO の動物種選択性

薬効薬理試験及び毒性試験で用いた種を含む動物種由来の VEGF-A を用いて結合親和性を検討した。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。ヒト／サル，マウス，ブタ，ネコ及びウサギの VEGF について，BRO との結合親和性を酵素結合免疫吸着分析法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）で測定した結果，ウサギ以外のすべての動物種で結合親和性が認められた。ELISA 法で結合がみられたすべての動物種の VEGF について，SPR 法で BRO との結合速度及び結合親和性を測定した。BRO は，ヒト／サル $VEGF_{165}$，マウス・ラット $VEGF_{164}$，イヌ $VEGF_{163}$ 及びネコ・ブタ $VEGF_{110}$ に対して同等の親和性で結合した（Table 2-4）。ELISA 法と同様，SPR 法でも，BRO はウサギ $VEGF_{110}$ に結合しないことが確認された。

Table 2-4 各種動物由来の VEGF に対する BRO の結合親和性

VEGF の由来	SPR 測定			ELISA における結合
	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	
ヒト／サル	1.68×10^{6}	4.78×10^{-5}	2.84×10^{-11}	あり
マウス	1.05×10^{6}	4.77×10^{-5}	4.53×10^{-11}	あり
ラット	2.04×10^{6}	7.44×10^{-5}	3.65×10^{-11}	n.d.
ウサギ	結合せず			なし
ブタ	9.53×10^{5}	5.53×10^{-5}	5.81×10^{-11}	あり
イヌ	1.46×10^{6}	5.04×10^{-5}	3.46×10^{-11}	n.d.

VEGF の由来	SPR 測定			ELISA における結合
ネコ	1.32×10^{6}	4.07×10^{-5}	3.08×10^{-11}	あり

n.d. = 測定せず

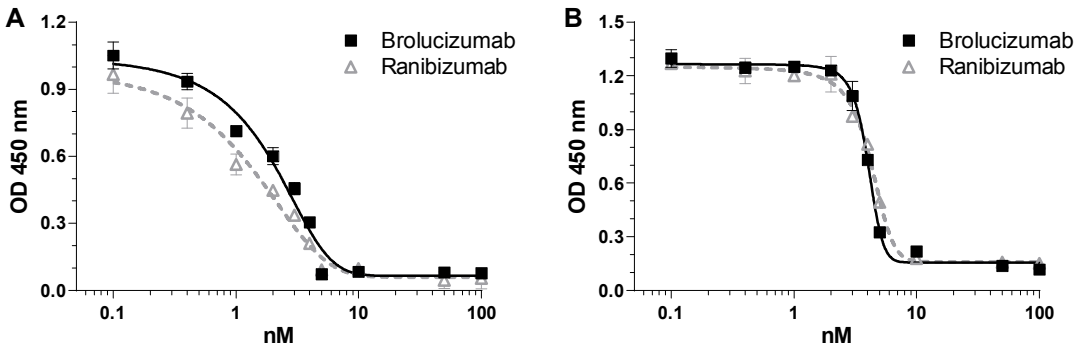
Source: [Table 2.6.3.1-RDR_ASSMo_0007.01]

VEGFR1 及び VEGFR2 に対する VEGF 結合阻害作用

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 ELISA 法で検討した。すなわち，0.1~100 nM の BRO 又はラニビズマブをビオチン化 rhVEGF と 24 時間インキュベーションした後，混合液を VEGFR1 又は VEGFR2 固相プレートに分注し，stAv-HRP（Streptavidin-poly horseradish peroxidase）染色によって受容体に結合した rhVEGF を測定した。ビオチン化 rhVEGF の濃度は，VEGFR1 及び VEGFR2 で，それぞれ 5.2 nM 及び 1.3 nM であった。

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 BRO で 4.03 nM（104.8 ng/mL）及びラニビズマブで 4.29 nM（205.9 ng/mL），また VEGFR2 に対して BRO で 0.86 nM（22.4 ng/mL）及びラニビズマブで 0.75 nM（36 ng/mL）であり，BRO とラニビズマブの阻害活性は同等であることが示された（Figure 2-2）[Table 2.6.3.1-RDR_AssMo_0017.01 V2]。

Figure 2-2　VEGFR2 (A)及び VEGFR1 (B)へのヒト $VEGF_{165}$ 結合に対する BRO 及びラニビズマブの阻害作用



VEGFR2 に対する VEGF 結合阻害作用を他の VEGF 阻害薬と比較した。0.1～10000 pM の VEGF 阻害薬を 13 pM の $rhVEGF_{165}$ と 1，24 及び 48 時間インキュベーションし，ELISA 法で VEGFR2 への VEGF 結合阻害活性について検討した。混合液を VEGFR2 固相プレートに分注し，StAv-HRP 染色によって結合した $rhVEGF_{165}$ を測定した。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（Table 2-5）。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 $rhVEGF_{165}$ 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 2.6.3.1-RD-2018-00365]。

Table 2-5 VEGF 阻害薬の VEGFR2 結合阻害作用の比較

VEGF 阻害薬	IC_{50} (pM)		
	1 時間 インキュベーション	24 時間 インキュベーション	48 時間 インキュベーション
BRO	9.8 pM (0.3 ng/mL)	6.8 pM (0.2 ng/mL)	6.1 pM (0.2 ng/mL)
アフリベルセプト	7.7 pM (0.7 ng/mL)	5.5 pM (0.5 ng/mL)	6.1 pM (0.6 ng/mL)
ラニビズマブ	483 pM (23.2 ng/mL)	47 pM (2.3 ng/mL)	19 pM (0.9 ng/mL)
ベバシズマブ	239 pM (35.6 ng/mL)	32 pM (4.8 ng/mL)	39 pM (5.8 ng/mL)

Source: [Table 2.6.3.1-RD-2018-00365]

2.1.2 *In vitro* 細胞活性

血管内皮細胞増殖及び細胞遊走抑制作用

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，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。本薬をインキュベートさせた時間は， HUVEC で 4 日間， BREC で 30 時間後にブロモデオキシウリジン（bromodeoxyuridine，BrdU）を添加してさらに 16 時間，HREC で 24 時間後に BrdU を添加してさらに 17 時間であった。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（Figure 2-3）。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（Table 2-6）。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。

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 2-7）[Table 2.6.3.1-RD-2018-00365]。

Figure 2-3　非グリコシル化（A）及びグリコシル化（B）ヒト $VEGF_{165}$ 誘発のヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖に対する BRO 及びラニビズマブの抑制作用

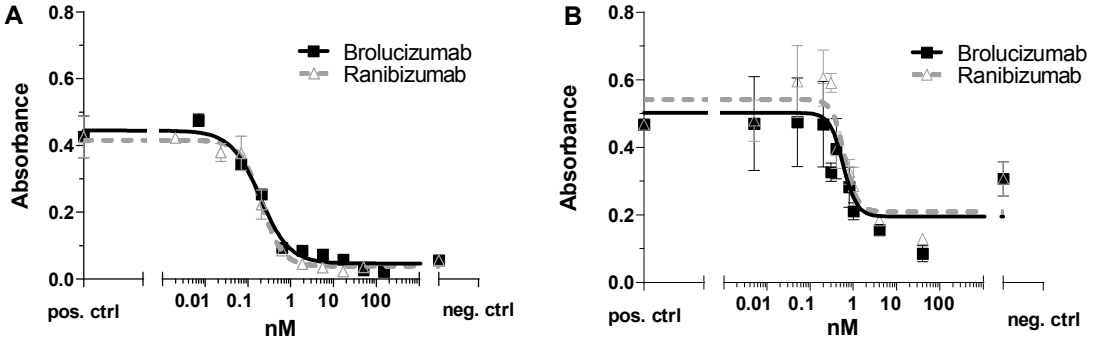


Table 2-6　VEGF で誘発される内皮細胞の増殖又は遊走活性に対する BRO 及びラニビズマブの抑制作用

初代培養細胞	細胞の由来	VEGF の作用	BRO の IC_{50}	ラニビズマブの IC_{50}
HUVEC	ヒト	増殖	0.19 nM (4.9 ng/mL)	0.20 nM (9.6 ng/mL)
BREC	ウシ	増殖	0.77 nM (20.0 ng/mL)	0.64 nM (30.7 ng/mL)
HREC	ヒト	遊走	0.09 nM (2.3 ng/mL)	0.11 nM (5.3 ng/mL)

Source: [Table 2.6.3.1-0013037], [Table 2.6.3.1-RDR_AssMo_0017.01 V2]

Table 2-7　VEGF で誘発される HREC 増殖に対する VEGF 阻害薬の抑制作用

VEGF 阻害薬	HREC 増殖抑制作用の IC_{50}
BRO	54 pM (1.4 ng/mL)
アフリベルセプト	18 pM (1.7 ng/mL)
ラニビズマブ	45 pM (2.2 ng/mL)
ベバシズマブ	116 pM (17.3 ng/mL)

Source: [Table 2.6.3.1-RD-2018-00365]

2.2　*In vivo* 薬効薬理試験

ラット VEGF 誘発網膜血管透過性亢進モデルにおける血管透過性亢進抑制作用

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）。$rhVEGF_{165}$ によって網膜血管透過性を亢進させたラットに BRO を硝子体内投与して，網膜浮腫抑制作用の有効濃度と作用持続時間について検討した [Table 2.6.3.1-0013037]。

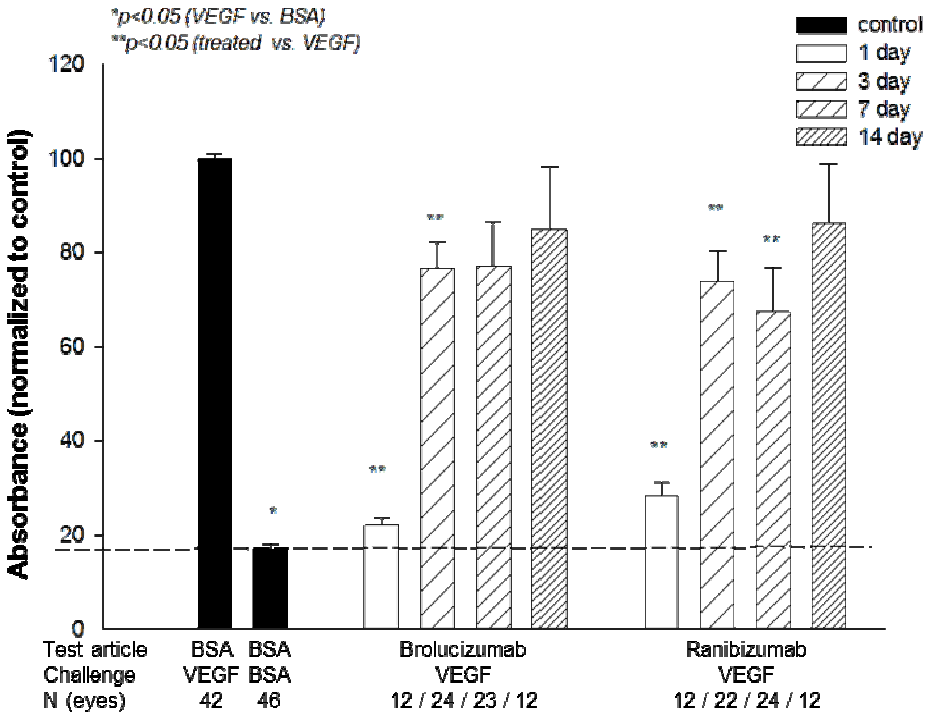
Sprague Dawley 系雄ラットの両眼に BRO（0.35～10.3 µg: rhVEGF165 の 1～30 倍モル当量），ラニビズマブ（6.28 µg: rhVEGF165 の 10 倍モル当量）又は溶媒を硝子体内投与（10 µL）し，その 24 時間後に各ラットの両眼に rhVEGF165（500 ng）を硝子体内投与した。VEGF 投与の 24 時間後にエバンスブルーを静脈内投与し血漿試料を採取した。滅菌生理食塩液を静脈から灌流した

後，動物を安楽死させ，網膜を採取した。血漿及び網膜試料中におけるエバンスブルーの吸光度を分光光度計で測定し，網膜血管透過性を網膜吸光度／組織湿重量／血漿吸光度から算出して，BRO の血管透過性亢進抑制作用の有効濃度（ED50）を求めた。さらに，BRO（3.45 µg: rhVEGF165 の 10 倍モル当量）及びラニビズマブ（6.28 µg: rhVEGF165 の 10 倍モル当量）を硝子体内投与した 1，3，7 又は 14 日後に VEGF 処置を行い，血管透過性亢進抑制作用の持続時間を検討した。

rhVEGF165 の投与により網膜血管の透過性は約 8 倍に亢進した。BRO は VEGF 誘発の血管透過性の亢進を有意かつ用量依存的に抑制し（範囲 49.9～93.8%，全群 $p<0.05$），ED50 は 0.85 µg（32.4 pmol）であった 。ラニビズマブも血管透過性の亢進を有意に抑制し（88.7%，$p<0.001$），ED50 は 2.59 µg（53.9 pmol）で，BRO 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，BRO（3.45 µg: 10 モル当量）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 又はラニビズマブ投与後 24 時間に VEGF を処置した結果，VEGF 誘発の透過性の亢進は VEGF 誘発対照群に対してそれぞれ 95.9%（$p=0.02$），88.2%（$p=0.05$）抑制され，両薬は同モル用量でほぼ同等の血管透過性亢進抑制作用を示した。しかし，投与後 3～14 日に VEGF を処置した場合には，両薬の作用は共に減弱し，投与後 14 日には作用はほぼ消失した（Figure 2-4）。

Figure 2-4　ラット VEGF 誘発網膜血管透過性亢進モデルにおける BRO 硝子体内投与 1，3，7 及び 14 日後の血管透過性亢進抑制作用



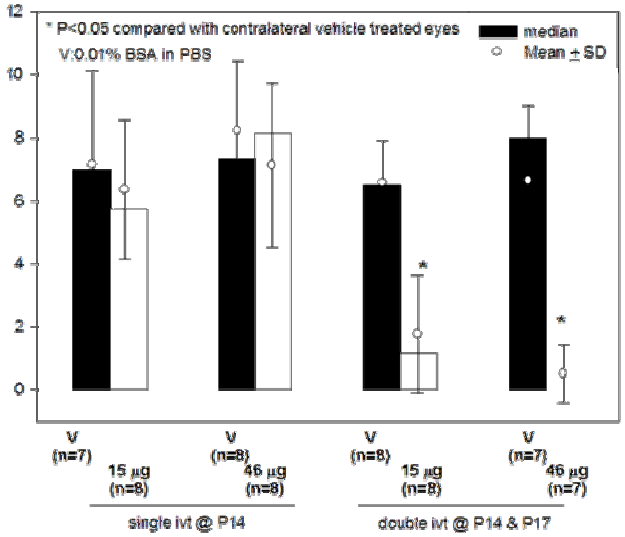
ラット OIR モデルにおける BRO の網膜血管新生抑制作用

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[Table 2.6.3.1-0013037]。

Sprague Dawley 系ラット新生児を生後 0 日から 14 日齢まで 10～50%の高濃度酸素環境下で飼育し，その後 14 日から 20 日齢まで室内大気環境へ移して網膜血管新生を形成させた。片眼に BRO（15 µg 又は 46 µg），反対側の眼に溶媒（各 5 µL）を，単回（14 日齢）又は 2 回（14 日齢及び 17 日齢）硝子体内投与した。また，同様に BRO（5～300 µg）を 18 日齢で単回硝子体内投与した。生後 20 日齢又は 21 日齢にラット新生児から網膜を採取し，アデノシンジホスファターゼ染色した血管内皮細胞のフラットマウント標本を作成し，コンピューターによるデジタル解析で網膜血管新生を定量した。

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（Figure 2-5）。一方，14 日齢あるいは 18 日齢に 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。

Figure 2-5　ラット OIR モデルに BRO（白色カラム）及び溶媒（黒色カラム）を硝子体内投与したときの網膜前血管新生抑制作用



マウスレーザー誘発 CNV モデルにおける BRO の血管新生抑制作用

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 CNV モデルを用いて BRO の血管新生抑制作用を評価した[Table 2.6.3.1-0013037]。

C58BL/6J 系雄マウスを用い，網膜動静脈分枝を避け，網膜後極の 3，6，9 又は 12 時の位置をレーザーで 3～4 回焼灼しブルッフ膜を破断した。腹腔内投与試験では，レーザー焼灼を実施した日から 0 mg/kg/日（溶媒），32 mg/kg/日又は 320 mg/kg/日の BRO を 1 日 1 回 14 日間反復腹腔内投与した。全身投与における BRO のクリアランスは速いため，毎日投与とした。14 日間投与後フルオレセイン標識デキストランを全身麻酔下で全身灌流させ後，マウスを安楽死させて眼球を摘出し，脈絡膜のフラットマウント標本を作製した。蛍光顕微鏡で撮影した画像をコンピューター画像解析し，血管新生領域の面積を算出した。硝子体内投与試験では，レーザー焼灼を実施した日（第 0 日）及び 7 日後に 0 µg（溶媒），15 µg，45 µg 又は 130 µg の BRO を片眼に硝子体内投与した。

32 mg/kg/日又は 320 mg/kg/日の BRO を反復腹腔内投与した結果，溶媒投与群に比較して CNV 形成が減少（それぞれ 35.0%；$p<0.05$，47.4%；$p<0.05$）した。以上，BRO の全身投与は，CNV 形成を用量依存的に抑制した。

15 µg，45 µg 又は 130 µg の BRO を第 0 日及び 7 日に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%；$p<0.05$，45 µg で 27.6%；$p<0.05$ 及び 130 µg で 31.3%；$p<0.05$）が認められた。全身投与試験の結果と同様，BRO の硝子体内投与は，CNV 形成を用量依存的に抑制した。

3 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[Table2.6.7.7A-0012707], [Table2.6.7.7B-0016684]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速いことから，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。ヒト予定臨床用量での 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 C_{max} 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。

Ex vivo 免疫原性分析

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，BRO に 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。本分析では，CD8 陽性細胞が少ない主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex, MHC）クラス II アロタイプ（DRB1*01，DRB1*03，DRB1*04，DRB1*07，DRB1*08，DRB1*09，DRB1*10，DRB1*11，DRB1*12，DRB1*13，DRB1*14，DRB1*15，DRB1*16，DRB3，DRB4，DRB5）が優勢な集団の健常人における末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cells, PBMC）を使用し，BRO のアミノ酸配列と重複する複数のペプチドとともに 37C°で 7 日間培養した。ペプチドに免疫原性がある場合には CD4 陽性細胞が増殖する。細胞増殖は，新たに合成される DNA への ^{3}[H]-チミジンあるいはブロモデオキシウリジンの取り込みによって評価した。125 種類のペプチドを用いた最初の試験[Table 2.6.3.1-Antitope study ESB01]では，50 例中 3 例のドナーにおいて免疫原性を示すペプチドと微弱な増殖反応が認められた。引き続き実施した 83 種類のペプチドを用いた確認試験[Table 2.6.3.1-RDR_InvHi_0023.01]では，いずれのドナーにおいても反応を示すペプチドは認められなかった。以上の結果，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。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。

4 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では，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速いことから，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。

5 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。

6 考察及び結論

BRO は，VEGF-A に結合することにより，VEGF と血管内皮細胞表面上に発現する受容体 VEGFR1 及び VEGFR2 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網膜浮腫の発症に関連しており，nAMD 患者の 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を改善することが期待される。培養血管内皮細胞を用いた *in vitro* 試験において，BRO は VEGF による血管内皮細胞増殖及び細胞遊走を抑制した。*In vivo* 試験では，血管透過性亢進モデル及び眼血管新生モデル及びにおいて，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。

7 参考文献

[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.

[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.

[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.

[Stewart MW (2018)] Extended duration vascular endothelial growth factor inhibition in the eye: failures, successes, and future possibilities. Pharmaceutics; 10:1-12.

[Szabó E, Phillips DJ, Droste M, et al. (2018)] Antitumor activity of DLX1008, an anti-VEGF antibody fragment with low picomolar affinity, in human glioma models. J Pharmacol Exp Ther; 365:422-9.

2.6.3 薬理試験概要表

目　次

目　次 2
略号一覧 3
2.6.3.1　薬理試験一覧表 4
2.6.3.2　薬効を裏付ける試験 6
2.6.3.3　副次的薬理試験 6
2.6.3.4　安全性薬理試験 6

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）
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着分析法
hVEGF	Human vascular endothelial growth factor	ヒト血管内皮増殖因子
SPR	Surface Plasmon Resonance	表面プラズモン共鳴
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

2.6.3.1 薬理試験一覧表

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
>*In vitro* 薬理試験					
Binding stoichiometry	Binding stoichiometry of brolucizumab in complex with human VEGF-A was determined by intrinsic fluorescence spectroscopy.	In vitro	Novartis, USA	RD-2018-00360	4.2.1.1-1
Binding parameters and potency	SPR by Biacore was utilized to determine the kinetics and affinity of brolucizumab for VEGF-A.	In vitro	ESBATech, Switzerland	RDR_AssMo_0017.01 V2	4.2.1.1-2
	Brolucizumab was evaluated in a competition ELISA to determine inhibition of VEGF-A binding to VEGFR1 and VEGFR2.	In vitro	ESBATech, Switzerland	RDR_AssMo_0017.01 V2	4.2.1.1-2
	Human umbilical vein endothelial cell proliferation assay assessed neutralization of VEGF-A induced proliferation by brolucizumab or ranibizumab.	In vitro	ESBATech, Switzerland	RDR_AssMo_0017.01 V2	4.2.1.1-2
Affinity and potency comparison with other VEGF inhibitors	SPR by Biacore was utilized to determine the kinetics and affinity of brolucizumab, aflibercept, ranibizumab, and bevacizumab for VEGF-A.	In vitro	Novartis, USA	RD-2018-00365	4.2.1.1-3
	Brolucizumab, aflibercept, ranibizumab, and bevacizumab were evaluated in a competition ELISA to determine inhibition of VEGF-A binding to VEGFR2.	In vitro	Novartis, USA	RD-2018-00365	4.2.1.1-3
	Brolucizumab, aflibercept, ranibizumab, and bevacizumab were evaluated for their ability to inhibit VEGF induced proliferation of human retinal endothelial cells.	In vitro	Novartis, USA	RD-2018-00365	4.2.1.1-3
Binding parameters	SPR analysis to determine the binding affinity of brolucizumab for $hVEGF_{165}$, $hVEGF_{121}$, and $hVEGF_{110}$, three of the soluble forms of hVEGF-A.	In vitro	ESBATech, Switzerland	RDR_ASSMo_0016.01	4.2.1.1-4
	SPR analysis to determine the binding affinity of brolucizumab hVEGF-B, hVEGF-C, hVEGF-D and hPlGF (isoforms 1, 2 and 3).	In vitro	ESBATech, Switzerland	RD-2019-00381	4.2.1.1-7
	Direct binding of brolucizumab for VEGF from mouse, rat, rabbit, dog, cat, and pig was determined by ELISA.	In vitro	ESBATech, Switzerland	RDR_ASSMo_0007.01	4.2.1.1-5

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
	SPR analysis was used to establish the binding kinetics and affinity of brolucizumab for VEGF from mouse, rat, dog, cat, and pig.	In vitro	ESBATech, Switzerland	RDR_ASSMo_0007.01	4.2.1.1-5
Potency and efficacy	Brolucizumab was evaluated in vitro for its ability to inhibit VEGF-A induced proliferation of bovine retinal endothelial cells.	In vitro	Alcon Research Ltd., USA	0013037	4.2.1.1-6
	In vitro human retinal endothelial cell migration assay assessed neutralization of VEGF-A induced migration by brolucizumab.	In vitro	Alcon Research Ltd., USA	0013037	4.2.1.1-6
>*In vivo* 薬理試験					
	The ability of brolucizumab to inhibit VEGF-induced vascular permeability in vivo was assessed in the rat VEGF challenge model.	Intravitreal	Alcon Research Ltd., USA	0013037	4.2.1.1-6
	The oxygen-induced retinopathy model was used to evaluate the ability of brolucizumab to inhibit retinal neovascularization in vivo.	Intravitreal	Alcon Research Ltd., USA	0013037	4.2.1.1-6
	Brolucizumab was evaluated in vivo for inhibition of neovascularization in the mouse laser-induced choroidal neovascularization model.	Intravitreal and intraperitoneal	Alcon Research Ltd., USA	0013037	4.2.1.1-6
副次的薬理試験					
>*In vivo* 薬理試験					
	In vitro T cell proliferation assay to analyze the immunogenic potential of brolucizumab.	In vitro	Antitope Ltd., UK	Antitope study ESB01	4.2.1.2-1
	In vitro T cell proliferation assay to analyze the immunogenic potential of brolucizumab.	In vitro	ESBATech, Switzerland	RDR_InvHi_0023.01	4.2.1.2-2

2.6.3.2 薬効を裏付ける試験

該当資料なし（2.6.3.1 薬理試験一覧表に記載したため）

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当資料なし（2.6.3.1 薬理試験一覧表に記載したため）

2.6.3.4 安全性薬理試験

該当資料なし