ユプリズナ点滴静注 100 mg
製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.4　非臨床試験の概括評価

田辺三菱製薬株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.4　非臨床試験の概括評価 4
2.4.1　非臨床試験計画概略 4
2.4.2　薬理試験 5
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 5
2.4.2.2　副次的薬理試験 8
2.4.2.3　安全性薬理試験 8
2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験 8
2.4.3　薬物動態試験 8
2.4.3.1　概要 8
2.4.4　毒性試験 10
2.4.4.1　動物種の選定 10
2.4.4.2　単回投与毒性試験 10
2.4.4.3　反復投与毒性試験 10
2.4.4.4　遺伝毒性試験 11
2.4.4.5　がん原性試験 11
2.4.4.6　生殖発生毒性試験 11
2.4.4.7　局所刺激性試験 11
2.4.4.8　その他の毒性試験 12
2.4.4.8.1　組織交差反応性試験 12
2.4.4.8.2　組織分布試験 12
2.4.4.8.3　精巣毒性試験 12
2.4.5　総括及び結論 12
2.4.6　参考文献一覧 16

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ALL	acute lymphoblastic leukemia	急性リンパ性白血病
AQP4	aquaporin 4	アクアポリン 4
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
AUC	area under the concentration-time curve	血清中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}7d}$	area under the concentration-time curve from Time 0 to 7 days postdose	0 時間から投与後 7 日までの血清中濃度-時間曲線下面積
AUC_{inf}	area under the concentration-time curve from dosing extrapolated to infinity	投与から無限大時間まで外挿した血清中濃度-時間曲線下面積
BAFF	B cell activating factor	B 細胞活性化因子
CD	cluster of differentiation	-
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CL	total clearance	全身クリアランス
CL/F	apparent total clearance	見かけの全身クリアランス
CLL	chronic lymphocytic leukemia	慢性リンパ性白血病
C_{max}	maximum observed concentration	最高血清中濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
E : T	effector : target	エフェクター細胞 ： 標的細胞
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
FACS	fluorescence-activated cell sorting	蛍光活性化セルソーティング
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
huCD19 Tg	human CD19 transgenic	ヒト CD19 トランスジェニック
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
Ig	immunoglobulin	イムノグロブリン
IL	interleukin	インターロイキン
IV	intravenous	静脈内
KD	dissociation constant	解離定数
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein	ミエリンオリゴデンドロサイト糖たん白質
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NMOSD	neuromyelitis optica spectrum disorder	視神経脊髄炎関連疾患
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	末梢血由来単核細胞
SC	subcutaneous	皮下
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

Inebilizumab（MEDI-551）は，視神経脊髄炎関連疾患（NMOSD，別名 Devic 症候群）の治療薬として現在開発中である．Inebilizumab（mAb 16C4-aFuc，脱フコシル化 mAb 16C4）は，親和性を最適化し糖鎖部分を改変したヒト化 IgG1κ モノクローナル抗体（mAb）であり，B 細胞特異的抗原である CD19 に結合する．Inebilizumab は，フコシル基転移酵素欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞株を用いて，mAb 16C4 を発現させることで得られる．このフコシル基転移酵素欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞株が産生する抗体は均一に脱フコシル化され，抗体依存性細胞傷害（ADCC）が向上している．更に，Inebilizumab は *in vitro* で抗体依存性細胞貪食活性を示すが，補体依存性細胞傷害（CDC）は示さない．

NMOSD は，中枢神経系（CNS）の自己免疫性慢性炎症性希少疾患であり，脊髄及び視神経が主に障害される．NMOSD の特徴は血清抗アクアポリン 4（AQP4）抗体（すなわち，AQP4 IgG 又は NMO-IgG）の存在である．本抗体は，NMOSD 患者の≧80%で検出され（Jarius and Wildemann, 2010），CD19 陽性 B 細胞系形質芽細胞によって産生される（Chihara et al., 2011）．これらの形質芽細胞の存在と疾患活動性との間に相関性が認められることから（Chihara et al., 2011; Kim et al., 2011; Greenberg et al., 2012; Jarius et al., 2008），形質芽細胞を含む B 細胞系を標的とすることが，NMOSD 患者の治療に有益である可能性がある．

自己免疫疾患及び CNS 疾患を適応とする Inebilizumab の開発を可能にするため，非臨床試験を以下の目的でデザインし実施した．

- Inebilizumab の結合特性を明らかにする．
- 実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）マウスモデルを用いて Inebilizumab の薬理学的活性を検討する．
- ヒト CD19 トランスジェニック（huCD19 Tg）マウスが，毒性評価試験における薬理学的に適切な動物種であることを確認する．
- huCD19 Tg マウスを用いて Inebilizumab の薬物動態，薬力学，安全性を評価する．
- huCD19 Tg マウスを用いて Inebilizumab の受胎能及び胚・胎児発生への影響を評価する．
- huCD19 Tg マウスを用いて Inebilizumab の出生前及び出生後の発生への影響を評価する．

毒性試験の実施にあたっては，実施国の規制及びガイダンス，並びに医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインを順守した．主な毒性試験は，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（以下，GLP）に準拠して実施した．毒性試験では以下の Inebilizumab 調製物を使用した．1 ヶ月間（試験 [redacted]-2083）及び 3 ヶ月間（試験 [redacted]-2084）反復静脈内（IV）投与毒性試験ではバッチ NDL4517-005 からの調製物を使用した．6 ヶ月間反復 IV 投与毒性試験（試験 [redacted]-2153）ではバッチ [redacted]BM10-A からの調製物を使用した．3 ヶ月間反復皮下（SC）投与毒性試験（試験 [redacted]-2237）では IV 投与及び SC 投与用の製剤バルクであるバッチ NDL4517.088 及び NDL4517.114 をそれぞれ用いた．受胎能及び胚・胎児発生に関する試験（試験 [redacted]00141）で

はバッチ NDL4517-072 からの調製物を使用した．出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験（試験 [redacted]-62509）ではバッチ BF5066 を用いた．組織交差反応性試験（試験 MI-0007）ではバッチ NDL4517.005-R2 からの調製物を使用した．ラットを用いた精巣毒性試験（試験 [redacted]-2087）ではバッチ NDL4517-020 からの調製物を使用した．第 I 相臨床試験（試験 MI-CP200）ではバッチ [redacted]BM09 からの調製物を使用した．品質の同等性/同質性に関するデータのロット比較については，Module 3.2.S に記載している．また，これらの試験に関連するロット系統及びロット廃棄についても記載した．

Inebilizumab の開発プログラムの一環として実施した非臨床試験は，ヒトにおける有効性及び安全性を検討し，臨床開発及び承認を裏付けるのに十分であると考えられた．

2.4.2　薬理試験

Inebilizumab の非臨床薬理については，複数の *in vitro* 評価系と動物モデルを用いて検討した．huCD19 Tg マウスを用いた試験では，10 µg/kg から 12 mg/kg の用量範囲で IV 投与したときの Inebilizumab による B 細胞減少について評価した．また，huCD19 Tg マウスを用いた，組換え型ヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖たん白質（MOG）で能動免疫を獲得させた自己免疫脱髄性疾患の前臨床モデルにおいて，Inebilizumab の有効性を検討した．

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

Inebilizumab は脱フコシル化抗体のみを産生する，フコシル基転移酵素欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞株に mAb 16C4 を安定発現させることにより作製した．

ヒト化抗 CD19 mAb 3649 及びその親和性を最適化した mAb 16C4 の結合特性を，蛍光活性化セルソーティング（FACS）法を用いて検証した（[redacted]551-0002）．その際 Daudi ヒトバーキットリンパ腫細胞（Daudi 細胞）をモデル B リンパ球として用いた．その結果，mAb 16C4 は，親和性を最適化していない mAb 3649 よりも Daudi 細胞に強く結合し，細胞表面からの解離が遅いことが確認された．FACS インターナリゼーション解析により，mAb 16C4 では mAb 3649 と比較して抗原のインターナリゼーションが減少していた．

これらの結果は，mAb 16C4 が ADCC 依存性の作用機序に求められる適切な性質（高い親和性，遅い解離，及び遅いインターナリゼーション）を有することを示している．

BIAcore を用いて，定常状態でのマウス及びヒト FcγR と，脱フコシル化及びフコシル化ヒト IgG1 との間の相互作用の測定により，平衡結合定数（KD）を求めた．その結果，FcγR IIIA（V158）及びそのマウス相同体（FcγR IV）は，フコシル化 IgG1 と比較して脱フコシル化ヒト IgG1 と約 10 倍の親和性で結合することが示唆された．更に，試験した他の FcγR 受容体の結合は，フコシル化 mAb と脱フコシル化 mAb で不変であり，この結合親和性の増加はこれら 2 つの受容体（ヒト FcγRIIIA V158 及びマウス FcγRIV）のみで認められた．

試験 [redacted]551-0002 には，裏付けとなるデータが含まれている．

ヒト，ウサギ，非ヒト霊長類（ヒヒ，アカゲザル，アフリカミドリザル又はカニクイザル）の B 細胞上に発現している CD19 への mAb 16C4（Inebilizumab のフコシル化体）の結合を検討した．標識した mAb 16C4 はヒトの全血から分離した CD20 陽性 B 細胞に結合したが，カニクイザルから分離した B 細胞への結合は認められなかった．間接標識法を用いて，ヒト及び非ヒト霊長類の末梢血中単核細胞（PBMC）から分離した B 細胞を抗 CD20 mAb であるリツキシマブによって特定することは可能であった．mAb 16C4 が PBMC から単離した B 細胞に結合した場合に得られる平均蛍光強度は，ヒヒ，アカゲザル，又はアフリカミドリザルの B 細胞に比べて，ヒトの B 細胞では約 10～20 倍高かった．このことから，mAb 16C4 はヒトの B 細胞には十分結合するが，非ヒト霊長類から分離した CD19 B 細胞にはほとんど結合しないことが示された．同様に，Inebilizumab とウサギ B 細胞との結合は認められなかった．以上より，Inebilizumab のフコシル化体である抗 CD19 mAb 16C4 は，非ヒト霊長類又はウサギの B 細胞に発現した CD19 に対して交差反応性を全く又はほとんど示さないことが，FACS 解析により明らかとなった．試験 [redacted]551-0008 及び [redacted]551-0005 には，裏付けとなるデータが含まれている．

薬理学的に適切な動物種として，huCD19 Tg マウスを評価し特性を明らかにした．ヒト B 細胞上の CD19 への Inebilizumab の結合は，huCD19 Tg マウス由来の B 細胞上のヒト CD19 への結合と同程度であった．huCD19 Tg マウスにおいて，Inebilizumab は血液，脾臓，骨髄，及び腹腔から採取した B 細胞に結合する．一方，野生型マウスから採取した B 細胞への Inebilizumab の結合は認められない．huCD19 Tg マウスにおいて，CD19 は，未熟・成熟 B 細胞，腹腔内の B 細胞，及び B1a B 細胞を含むすべての B 細胞集団に発現する．発現レベルが最も低かったのは早期プロ及びプレ B 細胞であり，成熟 B 細胞では発現レベルが増加した（CD19 の発現は形質細胞への最終分化中にダウンレギュレートされることが知られている）．ヒト初代培養 B 細胞及びトランスジェニックマウス B 細胞への Inebilizumab の結合特性の解析の詳細については，試験 [redacted]551-0009 に記載する．

Inebilizumab の ADCC 活性について，B リンパ腫細胞株を標的とした乳酸脱水素酵素放出試験により評価した．また，健常ドナー由来のヒト血清存在下で B リンパ腫細胞に対する Inebilizumab の CDC 誘発能についても検討した．その結果，*in vitro* において，Inebilizumab は強力な ADCC を有することが示された．しかし，抗 CD20 mAb であるリツキシマブと異なり，抗 CD19 抗体は CDC 活性を示さない．*In vitro* の ADCC データ（B リンパ腫細胞株の Inebilizumab による効果に関するもの）は，試験 [redacted]551-0003 に記載する．

FACS を用いた *in vitro* における細胞傷害性試験として，次の 3 種類の PBMC サンプル中の B 細胞，すなわち（1）健常ドナー由来の新鮮 PBMC，（2）慢性リンパ性白血病（CLL）患者由来の凍結 PBMC，及び（3）急性リンパ芽球性白血病（ALL）患者由来の凍結 PBMC，に対する Inebilizumab の細胞傷害作用を検討した．Inebilizumab は健常ドナー由来 PBMC の B 細胞死を効果的に惹起し，全体として，Inebilizumab による CD19 を標的とした B 細胞減少作用は，リツキシマブで得られる減少作用と同程度であった．試験 [redacted]551-0004 には，裏付けとなるデータが含まれている．

CD19 陽性形質細胞に対する Inebilizumab の ADCC 誘導能を，2 種類の由来の異なるヒト形質細胞を用いて *in vitro* で検討した．まず，健常者ドナーの PBMC からナイーブ B 細胞とメモリーB 細胞を単離し，*in vitro* で IL-21，抗 IgM，抗 CD40 で刺激して形質細胞に分化させた．次に，形質細胞に対する Inebilizumab の ADCC 活性を，標準的な ADCC アッセイにより検討した．IL-2 で事前に活性化した KC1333 ナチュラルキラー（NK）細胞をエフェクター細胞とし，エフェクター細胞：標的細胞（E:T）比＝2:1 で添加した．更に，ナイーブ B 細胞，メモリーB 細胞，及び形質細胞をネガティブ細胞マーカー選択によりバルク骨髄細胞から単離し，ADCC を検討した．この検討では，KC1333NK 細胞をエフェクター細胞とし，E：T 比＝1：1 で添加した．Inebilizumab は，PBMC から分化した形質細胞及びヒト骨髄から新鮮単離した形質細胞の両方に対して顕著な減少を引き起こした．データの要約は，試験 [redacted]551-0002 に示す．

huCD19 Tg マウスを用い，正常血液中及び組織中の B 細胞の減少とその回復に及ぼす Inebilizumab の影響を検討した．Inebilizumab は *in vivo* で血液中及び組織中の B 細胞を効果的に減少させた．B 細胞の減少持続期間は用量依存的であり，Inebilizumab 250 µg 単回投与後には 10 週間を超えて B 細胞が減少した．B 細胞が対照 IgG 投与群とほぼ同等の細胞数及び成熟度に回復するまでには更に 4～6 週間が必要であった．Inebilizumab 投与の影響は B 細胞に限定され，循環血中のその他の免疫細胞に対する明らかな影響は認められなかった．対照群のマウスでは加齢と共に血清中免疫グロブリン濃度が上昇したが，Inebilizumab の投与によりこの上昇は抑制された．B 細胞減少後に血清中のサイトカイン及びケモカインを定量した．Inebilizumab を投与した huCD19 Tg マウスにおいて，B 細胞活性化因子（BAFF）濃度は，B 細胞減少後に上昇し，その後，B 細胞の回復に比例して低下し，B 細胞が完全に回復するとベースラインに戻った．以上のように，huCD19 Tg マウスに Inebilizumab を投与することで，血液中の B 細胞は顕著かつ持続的に減少し，その後，正常な細胞数及び分化度にまで回復した．総括報告書（試験 [redacted]551-0010）には，裏付けとなるデータが記載されている．

CD19 を標的とした Inebilizumab による B 細胞減少の効果について，実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルを用いて評価した（Chen et al., 2014）．このモデルでは，疾患を誘起した後，CD19 陽性 B 細胞を減少させることを目的とし，huCD19 Tg マウスに Inebilizumab を単回投与した．Inebilizumab 投与により，脾臓 B 細胞が減少し，発症が抑制された（Chen et al., 2014）．すなわち，Inebilizumab 投与により症状進行が抑制され，これは Day 23 時点の罹病率の低下（対照抗体 100%対 Inebilizumab 66.7%）及び重症度の低下（対照抗体 2.94 ± 0.24 対 Inebilizumab 0.56 ± 0.13，$p < 0.0001$）により確認された．

重要なことに，Inebilizumab 投与により，血清及び CNS 中の自己反応性形質細胞及び MOG 特異的自己抗体が減少した．全体としてこの試験は，Inebilizumab 投与により，持続性 EAE モデルマウスの自己抗体や CNS における自己反応性形質細胞を含む，循環血中及び組織に浸潤している B 細胞が効率的に減少することを示している．このように Inebilizumab は前臨床の神経炎症状態において病因性 B 細胞を標的とすることで高い有効性を示した．

更に，Inebilizumab の活性を別の自己免疫疾患マウスモデルで評価した．Sle1 遺伝子座がホ

モ接合性であるマウスは，自己抗体の高値，特徴的な B 細胞サブセット，高度に活性化された B 細胞及び T 細胞など，多くの古典的な自己免疫疾患症状を呈する．しかし，死亡率の顕著な上昇や腎機能障害といった臨床所見は示さない．ヒト CD19 を発現する Sle1 マウス（B6.Sle1-huCD19 Tg マウス）に，Inebilizumab を 2 週間ごとに 12 週間投与した．Inebilizumab は Sle1-huCD19 Tg マウスの血液中及び組織内の B 細胞を用量依存的かつ効果的に減少させた．Inebilizumab の投与後，脾臓の胚中心 B 細胞と形質細胞を含め，活性化 B 細胞及び分化 B 細胞の数が 90%以上減少し，総血清免疫グロブリン，自己抗体及び循環血液中の炎症マーカーも減少した．以上のように，Sle1-huCD19 Tg マウスモデルにおいて Inebilizumab はマウス B 細胞の大部分を効果的に減少させ，自己免疫疾患症状を軽減させることが示された．試験 [redacted]551-0003 には，裏付けとなるデータが含まれている．

2.4.2.2　副次的薬理試験

Inebilizumab の副次的薬理試験は実施していない．

2.4.2.3　安全性薬理試験

Inebilizumab の独立した安全性薬理試験は実施していない．反復投与毒性試験の中で実施した一般状態観察により，中枢神経系，心血管系，呼吸器系に対する作用の有無を評価した．その結果，これらの器官に対する影響は認められず，また病理組織学的変化も認められなかった．組織交差反応性試験では，心臓，肺，腎臓，脳，消化管を含む重要組織の細胞膜への Inebilizumab の結合は認められなかった．

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない．

2.4.3　薬物動態試験

2.4.3.1　概要

huCD19 Tgマウスを用いてGLP適用下での反復毒性試験を計4試験（試験[redacted]-2083 [redacted]-2084, [redacted]-2153，及び[redacted]-2237）実施したときの，Inebilizumab の単回及び反復投与後のトキシコキネティクス（TK）を評価した．更に，生殖発生毒性試験を計 2 試験（試験[redacted]00141 及び[redacted]-62509）実施したときの曝露も評価した．TK 試験の一覧は Module 2.6.5 に示し，測定・解析方法と TK 成績は Module 2.6.4 に示す．

TK 試験の結果の概要は以下のとおりである．

- 試験 [redacted]-2083 では，huCD19 Tg マウスに Inebilizumab を初回 IV 投与した後，0.675～36.6 mg/kg の用量範囲において，用量比例的な増加を上回る $AUC_{0\text{-}7d}$ の増加が認められ

た．Inebilizumab の最終投与（週 1 回 5 週間反復）後，中間（3.71 mg/kg）及び高（36.6 mg/kg）用量群において終末相の濃度推移の傾きはおおむね同じであり，同程度の全身クリアランス（CL）及び半減期（$t_{1/2}$）が認められた．中間及び高用量群における CL は，抗原シンク現象が起こらないヒト IgG1 を投与した後のヒト IgG1 の典型的な CL とほとんど同じであった．この結果は，中間及び高用量群において認められた CD19 陽性 B リンパ球の激減と一致している．投与期間中の中間及び高用量群において，雌雄間の明らかな曝露の差は認められなかった．一方，回復期間中において雌マウスの血清中 Inebilizumab 濃度は雄マウスより早く低下した．

- 試験 [redacted]-2084 では，huCD19 Tg マウスに Inebilizumab を初回 IV 投与した後，用量比例的な増加を上回る全身曝露の増加が認められた．この結果は，抗原シンクに起因するものと思われる．一方，週 1 回 3 ヶ月間反復 IV 投与したときの定常状態（Day 71）においては，Inebilizumab の非線形曝露の程度は初回時よりも小さかった．この結果は，B 細胞の消失に伴う抗原シンク効果の減弱によるものと思われる．
- 試験 [redacted]-2153（週 1 回 6 ヶ月間反復 IV 投与）では，Inebilizumab を初回及び 26 回（最終）IV 投与した後，雌雄 huCD19 Tg マウスにおいて 2 用量群（3 及び 30 mg/kg）の間で用量比例的な曝露（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}7d}$）を示した．雌マウスは，雄マウスよりも $t_{1/2}$ が短く，CL が高かった．定常状態には，13 回反復投与した時点までに達した．
- 試験 [redacted]-2237 では，Inebilizumab を初回 SC 投与した後，3 及び 30 mg/kg の用量群の間でほぼ用量比例的な曝露（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}7d}$）を示した．Inebilizumab を 13 回（最終）SC 投与した後，見かけの全身クリアランス（CL/F）と $t_{1/2}$ は両群間（3 及び 30 mg/kg）でおおむね同じであり，それぞれ $t_{1/2}$ は 18.2 及び 20.6 日， CL/F は 3.49 及び 4.63 mL/日/kg であった．Inebilizumab を 30 mg/kg の用量で反復 IV 投与した後の $t_{1/2}$ は，SC 投与時とおおむね同じで 20.9 日であった．CL は，4.83 mL/日/kg であった．30 mg/kg SC 投与時のバイオアベイラビリティは 104%であった．
- 試験 [redacted]00141 では，Inebilizumab を 3 及び 30 mg/kg の用量で，雄 huCD19 Tg マウスに週 1 回 9 週間反復 IV 投与，雌 huCD19 Tg マウスに週 1 回 5 週間反復 IV 投与した．Inebilizumab の初回及び最終 IV 投与後，3～30 mg/kg の用量範囲において，全身曝露はほぼ用量に比例して増加した．母体に対する胎児の Inebilizumab 濃度の比は，3 及び 30 mg/kg の用量でそれぞれ 114%及び 31.1%であった．胎児の血清中 Inebilizumab 濃度が母体の血清中濃度と同程度であったことから，胎児へ Inebilizumab が移行することが明らかとなった．
- 試験 [redacted]-62509 では，妊娠 6 日目，9 日目，12 日目，15 日目，18 日目，授乳 1 日目，4 日目，7 日目，10 日目，14 日目，17 日目，20 日目に Inebilizumab を 3 及び 30 mg/kg の用量で IV 投与した．授乳 21 日目時点で母体の Inebilizumab の血清中濃度はほぼ用量に比例した．出生後 21 日目の出生児血清中の Inebilizumab 濃度は，同じ時点の母体血清中濃度と比較してわずかに低かった．雌雄の出生児間の血清中濃度は同程度であった．

- TK 群に割付けた動物において，免疫原性の評価試料の採取は行わなかった．そのため，TK プロファイル及び TK パラメータに対する免疫原性の影響は解析できなかった．

2.4.4　毒性試験

2.4.4.1　動物種の選定

Inebilizumab は，非臨床安全性評価に汎用される動物種（げっ歯類，ウサギ又はカニクイザル，アフリカミドリザル，ヒヒ等の非ヒト霊長類）の CD19 と結合しない．一方，huCD19 Tg マウスには薬理作用を示し，血液中及び組織内の CD19 陽性 B 細胞の減少と回復が観察できること（Module 2.6.2）に基づき，Inebilizumab の非臨床安全性評価は huCD19 Tg マウスで実施した．

2.4.4.2　単回投与毒性試験

huCD19 Tg マウスを用いて，GLP 非適用下で単回 IV 投与毒性試験を計 2 試験実施した（試験 [redacted]551-0013，[redacted]551-0014）．これらの試験では，評価した最高用量の 50 mg/kg まで投薬に起因した死亡，一般状態変化及び体重への影響は認められなかった．また，評価した最低用量の 0.5 mg/kg から Inebilizumab の薬理作用である B 細胞の減少が認められたが，他の免疫細胞には影響しなかった．病理組織学的検査の結果，リンパ組織で Inebilizumab の薬理作用に関連した B 細胞減少を示唆する変化等が認められたが，他の組織に変化は認められなかった．以上の結果より，huCD19 Tg マウスに Inebilizumab を単回 IV 投与した時の無毒性量は評価した最高用量の 50 mg/kg と結論した．

2.4.4.3　反復投与毒性試験

huCD19 Tg マウスを用いて，1 ヶ月間（試験 [redacted]-2083），3 ヶ月間（試験 [redacted]-2084）及び 6 ヶ月間（試験 [redacted]-2153）反復 IV 投与毒性試験を実施した．いずれの試験でも Inebilizumab の投与による死亡や毒性学的意義のある変化は認められず，Inebilizumab の薬理作用及びそれに起因する変化として，末梢血 B 細胞減少，脾臓中 B 細胞減少，骨髄中 B 細胞減少，リンパ球減少，脾臓重量減少，脾臓における白脾髄領域の縮小及び細胞密度の減少，髄外造血の亢進並びに腸間膜リンパ節及び縦隔リンパ節の皮質の濾胞（B 細胞領域）の縮小及び細胞密度の減少などが認められた．回復期間終了後には，いずれの変化も回復又は回復傾向が認められた．認められた変化が Inebilizumab の薬理作用に起因する変化であること，回復性が期待されることから無毒性量は各試験の最高用量と考え，1 ヶ月間反復 IV 投与毒性試験では 36.6 mg/kg/週，3 ヶ月及び 6 ヶ月間反復 IV 投与毒性試験では 30 mg/kg/週と結論した．

IV 投与時と SC 投与時の毒性を比較するために，huCD19 Tg マウスを用いて 3 ヶ月間反復 SC 投与毒性試験を実施した（試験 [redacted]-2237）．その結果，1 ヶ月間，3 ヶ月間及び 6 ヶ月間反復

IV 投与毒性試験と同様に全身の B 細胞減少と，B 細胞減少に起因する変化が認められた.

2.4.4.4　遺伝毒性試験

ICH S6 に従い，遺伝毒性試験は実施していない．Inebilizumab はモノクローナル抗体であるため，核膜又はミトコンドリア膜を通過し DNA などの染色体成分と直接相互作用するとは予想されない.

2.4.4.5　がん原性試験

Inebilizumab は標準的ながん原性試験に用いられるげっ歯類の CD19 に結合しないため，がん原性試験は実施していない．Inebilizumab による CD19 陽性 B リンパ球の長期減少に関連するがん原性リスクを ICH S6(R1)に概説されている科学的な重要度に基づき評価した．その結果，Inebilizumab の非臨床及び臨床試験結果，並びに公知情報から，Inebilizumab の長期投与が患者の生涯発がんリスクを上昇させるという明らかな懸念は示されなかった. この科学的重要度に基づく評価の結果, がん原性試験が不要であることが米国食品医薬品局の神経疾患治療薬部門により認められた.

2.4.4.6　生殖発生毒性試験

huCD19 Tg マウスを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験（試験[redacted]00141）では，3 mg/kg/週以上の用量で受胎率が低下したが，評価した最高用量の 30 mg/kg/週まで胚・胎児発生に影響は認められなかった．Inebilizumab の薬理作用に起因する変化として，親動物では末梢血 B 細胞減少が，胎児では末梢血及び B 細胞の分化部位である肝臓で huCD19 陽性 B 細胞の減少が認められ，Inebilizumab が胎盤を通過し胎児の B 細胞を減少させることが示唆されたが，胎児においてこの B 細胞の減少に起因する影響は認められなかった．huCD19 Tg マウスを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験（試験[redacted]-62509）では，母動物（F_0），出生児（F_1）の成長，生存率，生殖能及び神経発達並びに胎児（F_2）の発生に影響は認められず, 無毒性量は評価した最高用量である 30 mg/kg/dose と結論した. 一方, 母動物（F_0）に 3 及び 30 mg/kg/dose の Inebilizumab を投与することにより，出生児（F_1）の B 細胞が減少し，その B 細胞減少の回復後においても抗体産生能の低下が認められた．したがって，出生児（F_1）の免疫機能を含めた発達に対する無毒性量は決定できなかった.

2.4.4.7　局所刺激性試験

Inebilizumab の独立した局所刺激性試験は実施しなかったが，huCD19 Tg マウスを用いた反復投与毒性試験の一部として投与部位を評価した．Inebilizumab の臨床適用経路である IV 投与に起因する肉眼的及び病理組織学的変化は認められなかった.

3 ヶ月間反復 SC 投与毒性試験では, SC 投与部位に軽微～軽度の急性／亜急性炎症が認められた．これらの所見は，回復期間後は認められなかった．

2.4.4.8　その他の毒性試験

2.4.4.8.1　組織交差反応性試験

ヒト，Fischer-344 ラット及び huCD19 Tg マウスの正常組織パネルを用いて実施した組織交差反応性試験（試験 MI-0007）では，ヒト及び huCD19 Tg マウスの B 細胞のみに Inebilizumab による細胞膜の染色が認められた．また，ヒト，ラット及び huCD19 Tg マウスの複数の組織及び細胞で Inebilizumab による細胞質の染色が認められたが，細胞内に交差反応性エピトープが存在したとしても *in vivo* では Inebilizumab のような高分子は到達できないと考えられた．ヒト組織で認められた染色パターン, 強度及び頻度はラット組織で認められた染色パターンに類似していた．

2.4.4.8.2　組織分布試験

Fischer-344 ラットを用いて，Inebilizumab を 25 mg/kg の用量で単回 IV 投与したときの組織分布に関する試験を非 GLP 適用下で実施した（試験 [redacted]551-0012）．その結果，精細管内の細胞のみに Inebilizumab による染色が認められた．

2.4.4.8.3　精巣毒性試験

Fischer-344 ラットを用いて Inebilizumab を 1 ヶ月間反復 IV 投与したときの精巣への影響を評価した（試験 [redacted]-2087）．なお，組織交差反応性試験でヒト組織に認められた染色パターン，強度及び頻度はラット組織に認められた染色パターンに類似していたことから, huCD19 Tg マウスでは精巣に対するオフターゲット毒性のリスク評価ができない可能性を考え, ラットを用いた精巣毒性試験を実施した．その結果，評価した最高用量の 25 mg/kg/週まで精巣に肉眼的及び病理組織学的所見は認められなかったことから，無毒性量は 25 mg/kg/週と結論した．

2.4.5　総括及び結論

Inebilizumab は，フコシル基転移酵素欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞によって生成される，親和性を最適化し糖鎖部分を改変したヒト化 IgG1κ モノクローナル抗体であり，ヒト CD19 陽性 B リンパ球に選択的に結合し，これを減少させる．脱フコシル化 mAb である Inebilizumab は，フコシル化体である mAb 16C4 に比べて，ヒト FcγRIIIA 及びマウス FcγRIV に対する親和性が増し，ADCC が増強している．

Inebilizumab は，複数の B リンパ腫細胞株において顕著な細胞傷害性を示した．更に，Inebilizumab は健常ドナー由来 PBMC の B 細胞を減少させ，*in vitro* でヒト CD19 陽性形質細

胞に対する ADCC を効率的に誘導した.

Inebilizumab はヒト CD19 に特異的に結合し，げっ歯類の CD19 に対する交差反応性を示さない．また，ラット，ウサギ，ヒヒ，アカゲザル，アフリカミドリザル，又はカニクイザルの B 細胞表面の CD19 に対して全く又はほとんど交差反応性を示さない. そのため huCD19 Tg マウスを適切な動物種として選択し，Inebilizumab の安全性と活性を評価した．このモデルにおいて，huCD19 発現は，ヒトの場合と同様に B 細胞系に限られており，ヒトでの細胞表面発現の発生パターンに倣う（Zhou et al., 1994）．Inebilizumab は，ヒトで期待される作用機序と同じ機序で，かつ同等の親和性で huCD19 Tg マウスの huCD19 陽性 B 細胞に結合し，その数を減少させる.

Inebilizumab 投与により，EAE マウスの CD19 陽性 B 細胞及び形質細胞が効果的に減少し，その結果，血液中及び CNS 中の自己抗体が全体的に減少する．これにより，Inebilizumab を投与したマウスの疾患スコアが有意に低下した．また，別の自己免疫疾患マウスモデルである Sle1-huCD19 Tg マウスにおいても，Inebilizumab は血液中及び組織内の B 細胞，並びに脾臓中の形質細胞を減少させると共に，血清中の総免疫グロブリン，自己抗体及び炎症マーカーを減少させた.

Inebilizumab の独立した安全性薬理試験は実施していない．反復投与毒性試験の中で実施した一般状態観察により，中枢神経系，心血管系，呼吸器系に対する作用の有無を評価した．いずれの試験でも，これらの器官に関連する有害作用は認められず，また病理組織学的変化も認められなかった．組織交差反応性試験では，心臓，肺，腎臓，脳，消化管を含む重要組織の細胞膜への Inebilizumab の結合は認められなかった.

huCD19 Tg マウスを用いて単回 IV 投与毒性試験及び最長 6 ヶ月間の反復 IV 投与毒性試験を実施した結果，いずれの試験でも最高用量まで良好な忍容性を示した．これらの IV 投与毒性試験では毒性学的に意義のある変化は認められず，最低用量から Inebilizumab の薬理作用である B 細胞減少及び B 細胞減少に起因する変化が認められたが，いずれも回復性が認められた．したがって，各試験の無毒性量は評価した最高用量と考えられ，単回 IV 投与毒性試験では 50 mg/kg，1 ヶ月間反復 IV 投与毒性試験では 36.6 mg/kg/週，3 ヶ月間及び 6 ヶ月間反復 IV 投与毒性試験では 30 mg/kg/週と結論した.

IV 投与時と SC 投与時の毒性を比較するために実施した 3 ヶ月間反復 SC 投与毒性試験では，IV 投与及び SC 投与の両経路で同様に他の反復 IV 投与毒性試験で認められた全身の B 細胞減少と，B 細胞減少に起因する変化が認められた.

遺伝毒性試験は実施していない．がん原性試験は，Inebilizumab がげっ歯類の CD19 に結合しないことから実施しなかった．Inebilizumab の非臨床及び臨床試験結果，並びに公知情報から，Inebilizumab の長期投与が患者の生涯発がんリスクを上昇させるという明らかな懸念は示されなかった.

huCD19 Tg マウスを用いた Inebilizumab の受胎能及び胚・胎児発生に関する IV 投与試験では，受胎率の低下が認められたが，胚・胎児発生への影響は認められなかった．胎児の末梢血及び肝臓で huCD19 陽性 B 細胞の減少が認められたことから，Inebilizumab は胎盤を通過し胎

児の B 細胞を減少させることが示唆されたが，胎児においてこの B 細胞の減少に起因する影響は認められなかった. huCD19 Tg マウスを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する IV 投与試験では，母動物（F_0），出生児（F_1）の成長，生存率，生殖能及び神経発達並びに胎児（F_2）の胚・胎児発生に影響は認められなかった．一方，母動物（F_0）への Inebilizumab 投与により，出生児（F_1）の B 細胞が減少し，その B 細胞減少の回復後においても抗体産生能の低下が認められた.

Inebilizumab の独立した局所刺激性試験は実施しなかったが，反復投与毒性試験の一部として投与部位を評価した．その結果，Inebilizumab の静脈内投与に起因する肉眼的及び病理組織学的変化は認められなかった.

組織交差反応性試験では，ヒト及び huCD19 Tg マウスの B 細胞の細胞膜に Inebilizumab による染色が認められたが，Fischer-344 ラットでは認められなかった．ヒト，ラット，huCD19 Tg マウスのすべてで，複数の組織及び細胞の細胞質に Inebilizumab による染色が認められたが, 細胞内に交差反応性エピトープが存在したとしても *in vivo* 条件下で Inebilizumab のような高分子は細胞内エピトープに到達できないと推定された.

Fischer-344 ラットを用いて実施した組織分布試験では，精細管内の細胞のみに Inebilizumab による染色が認められた．更に Fischer-344 ラットを用いて精巣に対するオフターゲット毒性を検討したところ，評価した最高用量の 25 mg/kg/週まで精巣への影響は認められなかった.

huCD19 Tg マウスを用いた Inebilizumab の 1 ヶ月間反復 IV 投与試験では，用量比例的な増加を上回る全身曝露の増加が認められた．0.675，3.71 及び 36.6 mg/kg の Inebilizumab を最終投与した後の蓄積比は，2.75～4.36 の範囲であった．最終投与後の $t_{1/2}$ は，0.675，3.71 及び 36.6 mg/kg 用量群でそれぞれ 7.78，12.0 及び 14.7 日であった．3 ヶ月間反復 IV 投与試験では，huCD19 Tg マウスに Inebilizumab を初回 IV 投与したとき，TK は非線形であり，$AUC_{0\text{-}7d}$ 及び C_{min} の増加は用量比例的な増加を上回った．一方，定常状態においては，Inebilizumab の非線形曝露の程度は初回時よりも小さかった．この結果は，B 細胞の消失に伴う抗原シンク効果の減弱によるものと思われる．huCD19 Tg マウスを用いた胎盤通過に関する試験において，胎児の血清中 Inebilizumab 濃度が母体の血清中濃度と比して同程度であったことから，胎児へ Inebilizumab が移行することが明らかとなった.

以上より，Inebilizumab は huCD19 を特異的に認識し，CD19 陽性 B 細胞に対する強力な ADCC を有する．huCD19 Tg マウスに Inebilizumab を投与した結果，末梢血及びリンパ系組織中の huCD19 陽性 B 細胞の減少が一貫して認められた．これは，想定される Inebilizumab の薬理作用である．この減少は，用量依存的に回復する．また，B 細胞の減少は，血清中免疫グロブリンの蓄積を阻害する．同様に，EAE マウスモデルにおいて，Inebilizumab は抗体分泌細胞を含む B 細胞群を効率的に減少させ, それにより血清中 Ig 及び自己抗体を減少させた. huCD19 Tg マウスを用いた最長 6 ヶ月間の反復 IV 投与毒性試験において，Inebilizumab は良好な忍容性を示し，無毒性量は評価した最高用量の 30 mg/kg/週であった．臨床試験で NMOSD 患者に 300 mg の Inebilizumab を初回，2 週目及び以後 6 か月間隔で点滴静脈注射したときの AUC_{inf} と，6 ヶ月間反復 IV 投与毒性試験の無毒性量である 30 mg/kg/週を投与したときの AUC の比

から求めた安全係数は 55 倍と算出された．なお，6 ヶ月間反復 IV 投与毒性試験と臨床試験との投与間隔の違いを補正するため，6 ヶ月間反復 IV 投与毒性試験における AUC は，定常状態における $AUC_{0\text{-}7d}$ を 26 倍した値を用いた．以上の非臨床試験データより，NMOSD 患者において Inebilizumab は安全かつ有効な治療薬となることが期待される．

2.4.6　参考文献一覧

1. Chen D, Blazek M, Ireland S, Ortega S, Kong X, Meeuwissen A, et al. Single dose of glycoengineered anti-CD19 antibody (MEDI551) disrupts experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting pathogenic adaptive immune responses in the bone marrow and spinal cord while preserving peripheral regulatory mechanisms. J Immunol. 2014 Nov 15;193(10):4823-32.
2. Chen D, Ireland SJ, Davis LS, Kong X, Stowe AM, Wang Y, et al. Autoreactive CD19+CD20- Plasma Cells contribute to disease severity of Experimental Autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2016; Feb 15; 196:1541-1549.
3. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 1;108(9):3701-6.
4. Greenberg BM, Graves D, Remington G, Hardeman P, Mann M, Karandikar N, et al. Rituximab dosing and monitoring strategies in neuromyelitis optica patients: creating strategies for therapeutic success. Mult Scler. 2012 Jul;18(7):1022-6.
5. Jarius S, Paul F, Franciotta D, Waters P, Zipp F, Hohlfeld R, et al. Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. Nat Clin Pract Neurol. 2008 Apr;4(4):202-14.
6. Jarius S, Wildemann B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. Nat Rev Neurol. 2010 Jul;6(7):383-92.
7. Kim SH, Kim W, Li XF, Jung IJ, Kim HJ. Repeated treatment with rituximab based on the assessment of peripheral circulating memory B cells in patients with relapsing neuromyelitis optica over 2 years. Arch Neurol. 2011 Nov;68(11):1412-20.
8. Matlawska-Wasowska K, Ward E, Stevens S, Wang Y, Herbst R, Winter SS, et al. Macrophage and NK-mediated Killing of Precursor-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Targeted with a-Fucosylated Anti-CD19 Humanized Antibodies. Leukemia. 2013 June; 27(6): 1263-74.
9. Zhou LJ, Smith HM, Waldschmidt TJ, Schwarting R, Daley J, Tedder TF. Tissue-specific expression of the human CD19 gene in transgenic mice inhibits antigen-independent B-lymphocyte development. Mol Cell Biol. 1994 Jun;14(6):3884-94.