アジョビ皮下注 225 mg シリンジ

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

2.4 非臨床試験の概括評価

大塚製薬株式会社

目次

目次 2

略号一覧 4

2.4　非臨床試験の概括評価 6

2.4.1　非臨床試験計画概略 6

2.4.1.1　GLP 準拠 10

2.4.2　薬理試験 10

2.4.2.1　効力を裏付ける試験 10

2.4.2.1.1　効力を裏付ける *in vitro* 試験 10

2.4.2.1.2　効力を裏付ける *in vivo* 試験 12

2.4.2.2　副次的薬理試験 13

2.4.2.3　安全性薬理試験 14

2.4.2.3.1　心血管系への影響 14

2.4.2.3.2　中枢神経系への影響 15

2.4.2.3.3　呼吸系への影響 15

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験 15

2.4.3　薬物動態試験 15

2.4.3.1　分析法 16

2.4.3.1.1　血漿中フレマネズマブの測定 16

2.4.3.1.2　抗薬物抗体の測定 16

2.4.3.2　吸収 16

2.4.3.3　分布 17

2.4.3.4　代謝 18

2.4.3.5　排泄 18

2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用 18

2.4.4　毒性試験 18

2.4.4.1　単回投与毒性試験 18

2.4.4.2　反復投与毒性試験 19

2.4.4.2.1　Sprague Dawley ラットを用いた反復投与毒性試験 19

2.4.4.2.2　カニクイザルを用いた反復投与毒性試験 20

2.4.4.3　遺伝毒性試験 24

2.4.4.4　がん原性試験 24

2.4.4.5　生殖発生毒性試験 24

2.4.4.5.1 ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する複合試験 24
2.4.4.5.2 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 25
2.4.4.5.3 ラットを用いた出生前及び出生後の発生（PPND）に関する試験26
2.4.4.5.4 幼若動物を用いた試験 26
2.4.4.6 局所刺激性試験 27
2.4.4.7 その他の毒性試験 28
2.4.4.7.1 組織交差反応性試験 28
2.4.4.7.2 ヒト全血を用いたサイトカイン放出試験 28
2.4.4.7.3 溶血性試験 28
2.4.5 総括及び結論 29
2.4.5.1 薬理試験の概要 29
2.4.5.2 薬物動態試験の概要 29
2.4.5.3 毒性試験の概要 30
2.4.5.3.1 安全域の算出 30
2.4.5.3.2 免疫原性の概要 31
2.4.5.4 総括及び結論 31
2.4.6 付録 33
2.4.7 参考文献 34

表 1 フレマネズマブの非臨床プログラムの概要 7
表 2 フレマネズマブの CGRP に対する親和性－種間比較..... 11
表 3 入力されていない eCTD モジュールの項 33

略号一覧

略号	省略していない表現
ADA	抗薬物抗体
AUC	血漿中濃度 - 時間曲線下面積
cAMP	環状アデノシン一リン酸
CGRP	カルシトニン遺伝子関連ペプチド
CL	血漿クリアランス
CM	慢性片頭痛
C_{max}	最高血漿中濃度
CRLR	カルシトニン受容体様受容体
CYP	チトクロームP450
DDI	薬物間相互作用
ECG	心電図
EC_{50}	50%効果濃度
ECL	電気化学発光
ED_{50}	50%有効量
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
EFD	胚・胎児発生
EMA	欧州医薬品庁
ELISA	酵素免疫測定法
FcγR	Fcγ受容体
FDA	アメリカ食品医薬品局
GD	妊娠日齢
GLP	医薬品の安全性試験の実施に関する基準
hERG	human ether-a-go-go 関連遺伝子
HRP	西洋ワサビペルオキシダーゼ
IC_{50}	50%阻害濃度
ICH	医薬品規制調和国際会議
ID	イディオタイプ
IgG	免疫グロブリンG
IHC	免疫組織化学的検査
IL-1β	インターロイキン1β
IL-6	インターロイキン6
INFγ	インターフェロンγ
iv	静脈内
KinExA	結合平衡除外

MAA	医薬品製造販売承認申請
mAb	モノクローナル抗体
NOAEL	無毒性量
NZW	ニュージーランドホワイト種
PAMS	過ヨウ素酸メセナミン銀
PIP	小児医薬品開発計画
PND	出生後日齢
PPND	出生前及び出生後の発達に関する試験
PSP	小児医薬品開発計画
RAMP1	受容体活性調節蛋白1
sc	皮下
SD	Sprague Dawley
SPR	表面プラズモン共鳴法
$t_{1/2}$	血漿中消失半減期
TCR	組織交差反応性
TK	トキシコキネティクス
TNFα	腫瘍壊死因子α
V_{ss}	定常状態時の分布容積

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

フレマネズマブ（開発コード LBR-101，PF-04427429，RN307，TEV-48125）は，片頭痛患者への sc 投与による予防的治療のために開発中のヒト化 IgG2Δa/κ mAb である。本薬は強力かつ選択的な CGRP 結合物質で，CGRP の 2 つのアイソフォーム（α-及び β-CGRP）が CGRP 受容体に結合するのを阻害する。

CGRP は片頭痛分野で最もよく研究されている神経ペプチドの 1 つで，中枢及び末梢のいずれにおいても片頭痛発作の過程で中心的な役割を果たす[1,2]。CGRP は，末梢（血管拡張，炎症，蛋白浸出），三叉神経節，脳内部といった多くの部位で片頭痛の病態生理に関わっていると考えられている[3]。研究者らは，先に報告された低分子薬の安全性面の問題を考慮し，片頭痛の予防薬として，CGRP を標的とする mAb を開発した[4,5]。この新しいタイプの生物製剤は CGRP 又は CGRP 受容体のいずれかに特異的に作用するため，低分子薬で認められた標的外に起因する毒性を持たないと期待される [5]。

フレマネズマブの開発は Rinat Neuroscience 社によって開始された。20[redacted] 年，同社は Pfizer 社に買収された。20[redacted] 年 [redacted] 月，Labrys Biologics 社が Pfizer 社からフレマネズマブを取得し，本薬の開発の責任を引き継いだ。20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日，Teva Pharmaceuticals 社は Labrys Biologics 社の買収を完了して，フレマネズマブの最終開発段階の責任を引き継ぐことになった。2017 年 5 月 15 日，大塚製薬は，Teva 社とフレマネズマブの国内におけるライセンス契約を締結し，この JNDA を提出しているところである。

3.2.P.2.2，第 1 項（製剤開発）に詳述したように，フレマネズマブ注射剤は，プレフィルドシリンジ入りの滅菌済み，無色ないし淡黄色の注射用製剤水溶液である。フレマネズマブ製剤は，16 mM ヒスチジン，6.6% w/v スクロース，0.136 mg/mL EDTA，0.02% w/v ポリソルベート 80 の溶液（pH5.5）に，150 mg/mL のフレマネズマブの活性タンパク質を含有する。第 I 相，第 II 相及び第 III 相試験に用いたフレマネズマブ製剤の製造工程は，それぞれ工程 1P（第 I 相），工程 2P（第 II 相）及び工程 3P（第 III 相）と称する。

第 I 相及び第 II 相試験用のフレマネズマブの原薬及び製剤の製造工程は，[redacted] 社によって最初に開発された。Teva 社は，元の原薬製造工程を最適化し，改善後の工程で第 III 相臨床試験用のフレマネズマブの原薬及び製剤を製造した。[redacted] 社と Teva 社が製造した製品の同等性を確認するため，同等性分析試験を実施し，第 III 相の製造スケールで生産されたフレマネズマブのバルク製品と，第 I 相及び第 II 相の工程の材料から生産された注射用液を比較した。物理化学的及び生物学的試験（一次構造，分子量，翻訳後修飾，二次/高次構造，生物活性，純度及び不純物に重点を置く）で得られた結果は，製品品質の同等性を示していた。すなわち，示された分析データから，第 III 相の製品は，品質の点で，第 I 相及び第 II 相の工程で生産された製品と同等であると考えられる。

主要な反復投与毒性試験に使用したフレマネズマブ製剤は，第 I 相及び第 II 相の工程により生産された。より最近の試験，すなわち，ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験，ラットを用いた安全性薬理試験，並びにウサギを用いた局所刺激性試験は，第 III 相において製造された原薬を使用した。上に示した情報から，非臨床試験に用いた材料と製剤

は，製品品質の点で，臨床試験で用い，市販用にも予定しているものと同等であると考えられる（詳細な情報は 3.2.S.2.6；3.2.P.2.3；3.2.P.2.2，第 1 項に示す）。

フレマネズマブについて実施した非臨床試験の一覧を表 1 に示す。

表 1 フレマネズマブの非臨床プログラムの概要

試験番号/ 治験依頼者参照番号	試験/報告書標題	投与経路	GLP 準拠	実施施設
薬理試験				
8225-772/ 1001061	カプサイシン刺激によるカニクイザルの皮膚発赤に対するRN307の効果	iv	GLP 非準拠	[redacted]
121231	閉鎖式頭窓（CCW）を設けたラットを用いるPF-04427429（RN307）による神経性血管拡張の抑制の測定	ivボーラス	GLP 非準拠	[redacted]
121930	伏在神経を用いた*in vivo*アッセイにおけるPF-04427429（RN307）による神経性発赤の抑制	iv	GLP 非準拠	[redacted]
DPR-2017-038	ラットの薬物乱用頭痛	sc	GLP 非準拠	[redacted]
DPR-2017-037	脳震盪ラットモデルにおけるCGRP依存性疼痛及び頭痛関連行動の発現：外傷後頭痛の機序への影響（マウス前駆体）	ip	GLP 非準拠	[redacted]
100516	ヒト及びラットCGRPに対するPF-04427429（RN307）の結合親和性及び特異性のBiacoreによる測定	*in vitro*	GLP 非準拠	[redacted]
092905	cAMPセルベースアッセイ及び受容体結合アッセイによるヒト及びラットα-CGRPに対するPF-04427429（RN307）の阻害活性の測定	*in vitro*	GLP 非準拠	[redacted]
DPR-2017-023	フレマネズマブの共結晶構造決定	*in vitro*	GLP 非準拠	[redacted]
DPR-2017-039	ヒトCGRPに結合するフレマネズマブ（TEV-48125）の生物物理学的特性及び特異性	*in vitro*	GLP 非準拠	[redacted]
DPR-2017-036	フレマネズマブ（RN307）のKinExAによる溶液親和性測定	*in vitro*	GLP 非準拠	[redacted]
111747	治療用モノクローナル抗体PF-04427429のヒトIgG Fcγ受容体結合アッセイ	*in vitro*	GLP 非準拠	[redacted]
08GR358	テレメータを装着した雄カニクイザルにPF-04427429を静脈内投与する安全性薬理試験の心血管系評価	*in vivo*	GLP	[redacted]
AB21439/ DS-2017-011	ラットにsc投与したときの作用を評価するIrwin試験	sc	GLP	[redacted]
AB21440/ DS-2017-014	ラットにsc投与したときの全身プレスチモグラフィーによる呼吸パラメータ測定	sc	GLP	[redacted]

薬物動態試験				
7651-113	マウスを用いた単回静脈内投与PK試験	iv	GLP 非準拠	[redacted]
7651-114	ラットを用いた単回静脈内投与PK試験	iv	GLP 非準拠	[redacted]
7651-112	サルを用いた単回静脈内投与PK試験	iv	GLP 非準拠	[redacted]
7651-116	ウサギを用いた単回静脈内投与PK試験	iv	GLP 非準拠	[redacted]
毒性試験				
一般毒性				
07AM203[a]	雄ラットを用いた単回投与毒性試験	iv	GLP 非準拠	[redacted]
08GR354	ラットを用いた1ヵ月間反復投与毒性試験（TK測定及び免疫原性評価を含む）	iv	GLP	[redacted]
11LJ014 (8244107)	ラットを用いた3ヵ月間反復投与毒性試験（TK測定及び免疫原性評価を含む）	iv/sc	GLP	[redacted]
08GR296	サルを用いた1ヵ月間反復投与毒性試験（TK測定及び免疫原性評価を含む）	iv	GLP	[redacted]
09GR293[a]	雄サルを用いた1ヵ月間反復投与毒性試験（TK測定及び免疫原性評価を含む）	sc	GLP	[redacted]
10SN155 (8230269)	サルを用いた3ヵ月間反復投与毒性試験（TK測定及び免疫原性評価を含む）	iv/sc	GLP	[redacted]
8292076 (DS-2015-010)	サルを用いた6ヵ月間慢性毒性試験（TK測定及び免疫原性評価を含む）	sc	GLP	[redacted]
生殖発生毒性試験				
09GR291	妊娠ラットを用いた用量設定試験	iv	GLP 非準拠	[redacted]
09GR439	妊娠ラットを用いた用量設定試験	iv	GLP 非準拠	[redacted]
AB20826 (DS-2015-008)	妊娠ウサギを用いた用量設定試験（TK評価を含む）	sc	GLP 非準拠	[redacted]
AB20856/ DS-2015-018	ラットを用いた受胎能及びEFDに関する複合試験	sc	GLP	[redacted]
AB20827/ DS-2015-022	ウサギを用いたEFD試験	sc	GLP	[redacted]
AB21437/ DS-2016-068	ラットを用いた出生前及び出生後の発生（PPND）に関する試験	sc	GLP	[redacted]
AB21837/ DS-2017-034	幼若ラットを用いた用量設定試験	sc	GLP	[redacted]
AB21438/ DS-2017-022	幼若ラットを用いた毒性試験	sc	GLP	[redacted]
局所刺激性試験				
AB21806/ DS-2017-025[a]	ウサギを用いた局所刺激性試験	さまざまな投与経路［sc，iv，筋肉内（im），傍静脈，動脈内］	GLP	[redacted]
その他				

08GR369	ヒト血液を用いたPF-04427429の1日間*in vitro*溶血・適合性試験	*in vitro*	GLP 非準拠	[redacted]
111320	治療用モノクローナル抗体PF-04427429の*in vitro*ヒト全血サイトカイン放出試験	*in vitro*	GLP 非準拠	[redacted]
組織交差反応性（TCR）試験				
IM1329	ラットの組織を用いた組織交差反応性試験	*in vitro*	GLP	[redacted]
IM1355	ウサギの組織を用いた組織交差反応性試験	*in vitro*	GLP	[redacted]
IM1328	サルの組織を用いた組織交差反応性試験	*in vitro*	GLP	[redacted]
IM1327	ヒト組織を用いた組織交差反応性試験	*in vitro*	GLP	[redacted]

[a] 雄のみを使用した 07AM203，DS-2017-025 及び 09GR293 試験を除き，*in vivo* 試験はすべて雌雄動物を用いて実施した。

cAMP：環状アデノシン一リン酸，CGRP：カルシトニン遺伝子関連ペプチド，EFD：胚・胎児発生，GLP：医薬品の安全性試験の実施に関する基準，IgG：免疫グロブリン G，iv：静脈内，PK：薬物動態，sc：皮下，TK：トキシコキネティクス

様々な動物種での CGRP に対する *in vitro* 結合アッセイ（データを表 2 及び 2.6.3.2 に示す）で示されたように，非臨床試験では，Sprague Dawley（SD）ラット，New Zealand White ウサギ及びカニクイザルが適切な動物種と考えられる。SD ラットとカニクイザルはともに薬理学的反応を示す動物種である。

フレマネズマブの安全性薬理パラメータ（心血管パラメータ及び呼吸数）は，主要毒性試験及び雄カニクイザルを用いた独立した安全性薬理試験において評価した。また，単回 sc 投与したときの中枢神経系及び呼吸器への影響の可能性について検討するため，追加の独立した試験を実施した（2.6.3.4）。

一般毒性は SD ラット及びカニクイザルの両方を用いて評価した。ラットには，iv 及び sc 投与の両経路で最長 3 ヵ月間投与した。サルには，iv 及び sc 投与の両経路で最長 3 ヵ月間，また，sc 投与で最長 6 ヵ月間の試験を行った（2.6.7.7）。

さらに，フレマネズマブのウサギ及びラットを用いた生殖発生毒性試験が完了している（2.6.7.12-14）。

フレマネズマブについては，*in vitro* サイトカイン放出，FcγR 結合，FcRn 及び血小板数の各アッセイを含む，モノクローナル抗体に対して推奨される多くのアッセイによる評価も実施した。組織交差反応性試験をヒト，サル，ウサギ及びラットの組織で実施し，結合パターンを組織間又は動物種間で比較するとともに，フレマネズマブの標的以外に対する結合の可能性を検討した（2.6.7.17）。

この非臨床開発プログラムは 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」[6]）及び ICH M3（R2）ガイドライン（「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施についてのガイダンス」[7]）に準拠している。

遺伝毒性及びがん原性試験は，ICH S6（R1）に記載されているように，バイオテクノロジー応用医薬品では一般に適切でないことから，フレマネズマブについては実施しなかった。

2.4.1.1 GLP 準拠

フレマネズマブの非臨床プログラムは，薬理作用，薬物動態，毒性及び免疫原性/免疫毒性を，動物を用いて又は *in vitro* で評価する試験から構成されている。安全性プログラムの主要試験はすべて GLP 基準に準拠していた。

毒性試験におけるフレマネズマブの曝露量の分析は，バリデートされた方法を用いて GLP に準拠した操作を実施し，血漿中の薬物及び特異的 ADA 濃度を検出した。GLP 基準に従って実施したすべての試験で少数の GLP 違反があったが，試験結果や結果の解釈に影響を与えるようなものではなかった。これらの違反については，個別の試験報告書に記載されている。

2.4.2 薬理試験

CGRP は 2 つのアイソフォーム（α-及び β-CGRP）のある神経ペプチドで，これらのアイソフォームはいずれも種間（マウス，ラット，ヒト以外の霊長類，ヒト）で高度に保存されている。α-CGRP は末梢神経系の主要アイソフォームであるのに対し，β-CGRP は主に腸神経系に存在する。ヒト化モノクローナル抗体であるフレマネズマブは，CGRP（リガンド）に直接結合し，その作用を阻害する抗体で，α-及び β-CGRP が CGRP 受容体に結合するのを阻害する。フレマネズマブによって認識されるエピトープは CGRP の C 末端にある。

CGRP は，末梢及び中枢神経系の両方で産生され，強力な血管拡張性ペプチドとして作用する。CGRP は，CRLR と呼ばれる G 蛋白共役受容体と RAMP1 から構成される，ヘテロマー受容体を介して作用する。

ヒト臨床試験の結果から，片頭痛の病態生理に CGRP は一定の役割を果たしていることが確認されている。三叉神経血管系で一次感覚ニューロンの活性化に伴い，CGRP が放出される場合がある。CGRP は硬膜血管系で硬膜血管を拡張させる働きがあり，これに伴い痛みに関与する局所の神経線維を活性化させる可能性がある。この仮説の裏付けとして，CGRP を投与すると頭痛や片頭痛を生じることが確認されている[8]。片頭痛患者の頸静脈血では血漿中 CGRP 濃度が上昇しており，また，CGRP 受容体アンタゴニストは片頭痛の治療に有効であることは確認されている[9,10]。

様々な動物種での CGRP に対する *in vitro* 結合アッセイ（データを表 2 に示す）から，非臨床試験の動物種として，ラット，ウサギ及びサルを用いることは適切と考えられる。

フレマネズマブについては，CGRP の中和，ラット及びサルの複数の実験モデルでの血管拡張抑制，並びにラットモデルでの片頭痛誘因によるアロディニア（片頭痛患者の一般的症状の 1 つ）の軽減に対する有効性を裏付けるため，様々な *in vitro* 及び *in vivo* アッセイが実施されている（2.6.2，2.6.3.2，資料番号 DPR-2017-038，DPR-2017-037）。ヒトの片頭痛と類似の症状を呈する動物モデルがないことは留意すべきであるが，血管拡張モデルと行動を指標とする疼痛モデルの両方でフレマネズマブが有効であったことから，片頭痛症状をコントロールできると予測できる。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 効力を裏付ける *in vitro* 試験

フレマネズマブは，ラット，ウサギ及びヒトの CGRP に高い親和性で結合することが示された。また，アミノ酸配列が同一であることから，サルとヒトの CGRP のフレマネズマブに対する親和

性は等しいと考えられる（表 2 ，概要表 2.6.3.1, 報告書番号 DPR-2017-036 参照）。

表 2 フレマネズマブの CGRP に対する親和性－種間比較

動物種	CGRP配列	親和性[a]（K_D）
ヒト（α）[b]/サル（α）	acdtatcvth rlagllsrsg gvvknnfvpt nvgskaf	2.2～9.5 pM[c]
ラット（α）	scntatcvth rlagllsrsg gvvkdnfvpt nvgseaf	740～889 pM
ウサギ（α）	gcntatcvth rlagllsrsg gmvksnfvpt nvgseaf	537 pM

親和性は抗体溶液を用いる KinExA 法を用いて測定した（DPR-2017-036 試験）。

[b] 末梢神経系には α-CGRP が多く分布している。

[c] アミノ酸配列は同一であることから，親和性は等しいと考えられる。

フレマネズマブはヒト α-CGRP，ヒト β-CGRP 及びラット β-CGRP にほぼ同等の親和性で結合し（平衡解離定数 K_D はそれぞれ 63，155 及び 152 pM），ラット α-CGRP に対する親和性はやや低い（K_D = 2570 pM）ことが SPR による解析で示されている（100516 試験）。

複数の方法によって，フレマネズマブは CGRP の C 末端のエピトープに結合することが確認されている（DPR-2017-023 試験）。このエピトープは全体が 29～37 位のアミノ酸に含まれる。本薬は CGRP に高い特異性を示し，インテルメジン，アドレノメデュリン，アミリン，カルシトニンなど，他のカルシトニンファミリーペプチドには結合しない（100516 試験及び DPR-2017-039 試験）。

CGRP のアラニンスキャニング変異導入解析の結果，結合親和性を決定する重要な残基は，CGRP の 33 位と 37 位アミノ酸（G33A 及び F37A）及び C 末端のアミド化されたフェニルアラニンであり，これらの変異によりフレマネズマブに対する親和性の顕著な低下が確認された。これらの残基は抗体との相互作用に重要で，この相互作用が，他の関連ペプチドと比較して，フレマネズマブの CGRP に対する高い親和性及び選択性を有する一因になっている（100516 試験及び DPR-2017-023 試験）。

また，ヒトとラットではエピトープのアミノ酸配列の相同性が 87.5%である（結晶構造解析では，エピトープ内で 8 残基に 1 ヵ所の違いしか認められない）ことも考慮できる点である。

フレマネズマブの機能活性は複数のセルベースアッセイで確認されている（092905 試験）。CGRP と受容体の結合は，G 蛋白を共役した cAMP 産生を誘導する。しかし，フレマネズマブ存在下では，この CGRP による cAMP 産生誘導が阻害され，その EC_{50} は，ヒト及びラットの cAMP アッセイでそれぞれ 71 ±19.6（平均値±標準誤差，以下同様）及び 102.2 ±38.8 nM であった。

CGRP と受容体の結合に対するフレマネズマブの阻害活性も放射標識リガンドを用いて検討されている。フレマネズマブはヒト ^{125}I-α-CGRP（10 pM）の受容体への結合を阻害し，IC_{50} は 18.9 ± 8.2 nM であった。

抗体医薬品のもう 1 つの重要な機能は，アイソタイプ特異的な IgG FcγR 結合能である。GLP 非準拠試験（111747 試験）において，Biacore センサーチップにアミンカップリングさせた各種遺伝子組換えヒト FcγR に対するフレマネズマブ（ロット番号 [redacted]）の結合能を評価した。フレマネズマブの結合能を，抗キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）抗ヒト IgG1 抗体及び複数の IgG2 抗体を含む，対照抗体の結合能と比較した［最高濃度 30 µM（4.5 mg/mL）又は 60 µM（9 mg/mL，FcγR IIA のみ）］。IgG2 モノクローナル抗体と比較すると，フレマネズマブは典型

的な IgG2 分子と同様の挙動を示し，ヒト FcγR I，FcγR IIA，FcγR IIIA（158V 及び 158F），及び FcγR IIIB に対する結合能は低かった。これに対して，対照の IgG1 抗体（抗 KLH IgG1 抗体）は，低親和性受容体である FcγR IIA 131R を除くすべての Fcγ 受容体に高い結合能を示した。

2.4.2.1.2 効力を裏付ける *in vivo* 試験

神経への電気刺激又は皮膚へのカプサイシン塗布による神経性血管拡張動物モデルは，CGRP の薬理活性評価において確立されたモデルであり，硬膜血管系の血管拡張は片頭痛の病態生理の一部であることから，片頭痛のモデルとして適切であると考えられる[11]。これらのモデルを作製し，ラット又はカニクイザルに血管拡張又は皮膚血流量増加を誘導した。複数の試験でこれらのモデルを用い，*in vivo* におけるフレマネズマブの CGRP の機能に対する阻害能を検討した。試験の結果，以下のことが示された。

- フレマネズマブは，伏在神経の電気刺激によるラット足皮膚の血流量増加を単回投与後 7 日間以上にわたって抑制した。投与後 1 及び 7 日に測定した ED50（50%有効量）は，それぞれ 1.3 mg/kg 及び 0.8 mg/kg であった（121930 試験）。
- フレマネズマブは，硬膜表面の電気刺激によるラットの中硬膜動脈の血管拡張を単回投与後 7 日間以上にわたって抑制した。有意差を示す投与用量は 3 mg/kg で，単回 iv 投与後 7 日に最大効果が認められた（121231 試験）。
- フレマネズマブは，カニクイザルにおけるカプサイシン刺激による皮膚発赤反応を 56 日間以上にわたって用量依存的に抑制した。カプサイシン刺激による前腕皮膚の血流増加を抑制するために，フレマネズマブ 1，10 又は 100 mg/kg を単回 iv ボーラス投与した。フレマネズマブによる抑制作用の程度及び期間は用量依存的であり，10 及び 100 mg/kg 投与では投与後最長 56 日まで抑制が認められた（8225-772 試験）。
- フレマネズマブは，薬物乱用頭痛のげっ歯類モデルで有効性が確認された。低分子薬（モルヒネ及びスマトリプタン）を用いてラットを感作し，眼窩周囲に皮膚アロディニアを誘導した（顔面アロディニアは片頭痛患者に頻発する症状である）。適当なウォッシュアウト期間後，アロディニアは軽減した。その後，動物に片頭痛誘因となる刺激［一酸化窒素又は強い光によるストレスのいずれか］を与えた。このモデルでは，片頭痛誘因刺激の結果，血清 CGRP 濃度が上昇する。感作後の片頭痛誘因刺激による眼窩周囲皮膚アロディニア再発の閾値は，モルヒネ又はスマトリプタンで感作した場合と同程度であった。フレマネズマブ 30 mg/kg を前投与したところ，媒体又は対照の CGRP に結合しないアイソタイプ抗体に比べて片頭痛誘因による皮膚アロディニアが抑制された（DPR-2017-038 試験）。
- フレマネズマブのマウス前駆体（ヒト化前）は，軽度頭部外傷のげっ歯類モデルの症状軽減に対する有効性が確認された。軽度頭部外傷を誘導したラットに抗 CGRP 抗体（30 mg/kg）を反復投与後，片頭痛誘因の 1 つであるニトログリセリンを投与した。抗 CGRP 抗体は，投与による脳過敏症の軽減に効果を示した（von Frey フィラメント試験で測定）（DPR-2017-037 試験）。

2.4.2.2　副次的薬理試験

上記及び薬理試験の概要文の 2.6.2 に記載したモデルを除いて，可能性のある CGRP 阻害の薬理作用に関して他の動物モデルを用いた試験は行っていない。

CGRP は強力な血管拡張作用を有するため，創傷治癒や妊娠などの生理的過程に作用するおそれがあるので，CGRP が創傷治癒及び妊娠に対する副次的薬理作用の可能性を詳細に検討し（2.6.2.2），その要約を以下に示す。

妊娠

CGRP 受容体拮抗薬である $CGRP_{8-37}$ を投与したラットの妊娠高血圧腎症や子宮内胎児発育遅延などの重篤な状態には，CGRP 阻害が関与すると考えられている。注目すべき点は，投与した $CGRP_{8-37}$ が CGRP 受容体のみに特異的なだけではなく，CGRP ファミリーのほかのメンバー（すなわちインテルメジン）の作用も阻害すると考えられていることである。また，α-CGRP 欠損マウスは繁殖能力があり，生存可能で，正常な産仔へ発育する[12]。

全般的に，本文献報告は，妊娠における CGRP の関与を間接的かつ推測的に述べており，CGRP と乳汁分泌に関する情報は述べられていない。さらに，CGRP ファミリーのペプチドが関与しあい，シグナル伝達カスケード，生殖，妊娠及び胚胎児発生に及ぼす影響については未だに解明されていないが，上記の証拠は，これらの過程に複数のペプチドが関与することを示唆している。

フレマネズマブの非臨床安全性データは上記の情報と一致する。以上を要約すると，フレマネズマブを生殖発生毒性試験で検討したところ，受胎能，初期又は後期胚胎児発生，並びに出生前及び出生後の発育への影響は認められなかった。

しかしながら，CGRP の阻害による臨床的な影響及び妊娠への影響に関する情報が少ないこと，また片頭痛患者集団は妊娠可能な女性も含まれている可能性があること，妊娠時における臨床的帰結の可能性については RMP に記載のある通りにモニタリングを行う。

創傷治癒：

CGRP が組織修復及び創傷治癒に関与する可能性を示す証拠は，いくつかの非臨床試験で認められている。組織修復及び創傷治癒過程における CGRP の役割は，その血管拡張作用とケラチノサイトに対する直接的な増殖作用と考えられている。CGRP ノックアウト（KO）マウスモデルでは，創傷治癒遅延が認められている。

血管拡張作用及び抗炎症作用において，作用機序が重複する内因性神経ペプチドが数多く存在することを考慮する必要がある。このため，創傷治癒に必要な微小血管の血流量に対する作用が，CGRP の阻害によって著しく影響を受けるとは考えにくい。

さらに，フレマネズマブを投与された患者では，プラセボを投与された患者と比較しても創傷治癒及び皮膚の炎症に関連するリスクが増加することはなく，フレマネズマブの標的となる集団の併存疾患による創傷治癒遅延のリスクは高くない。

結論として，非臨床に関する文献は，妊娠及び創傷治癒が CGRP の受容体又はリガンドの影響を受ける可能性があるという理論上の生理学的影響を示している。しかし，Teva 社が遂行した生殖毒性試験のデータパッケージでは，フレマネズマブの悪影響を示す証拠は認められていない。さらに，臨床試験では，フレマネズマブを投与した患者に創傷治癒遅延を示す証拠は認められなかった。

2.4.2.3　安全性薬理試験

ICH S6（R2）ガイドラインに従い，フレマネズマブの安全性薬理パラメータについては，毒性試験の一部で，及び雄カニクイザルを用いた独立した心血管系安全性薬理試験において評価した。毒性試験では，臨床での投与方法になる可能性のある iv 投与と sc 投与の両投与経路を用いたが，独立した心血管系安全性薬理試験では曝露量を最大にし，他の適応の裏付けとなるように，iv 投与を用いた。

また，ラットを用いて，呼吸器系及び中枢神経系（CNS）安全性薬理試験を単回 sc 投与で行った（2.6.3.4, Studies DS-2017-014 及び DS-2017-011）。

2.4.2.3.1　心血管系への影響

CGRP は強力な内因性血管拡張物質であり，正常環境下と異常環境下のいずれにおいても，CGRP が血圧に及ぼす作用に大きな注目が集まっている[13]。各種の CGRP 受容体アンタゴニストの包括的な開発の中で，CGRP 阻害がもたらすいくつかの影響が検討された。注目すべき点として，CGRP 受容体アンタゴニストの投与は冠血管収縮を誘導しないことが *in vitro* 及び *in vivo* のデータによって示唆されており，これは 5-$HT_{1B/D}$ 受容体アゴニストとは対照的である。同様に，CGRP アンタゴニストの投与は虚血状態のイヌの冠動脈に作用を及ぼさなかったが，5-$HT_{1B/D}$ 受容体アゴニストを投与すると梗塞領域が拡大した[14]。また，CGRP 拮抗作用は，一部の降圧薬による血管拡張作用に影響を及ぼさず，狭心症患者のトレッドミル運動時間に影響しなかった[15,16]。

フレマネズマブの *in vitro* ヒトカリウムチャネル hERG 試験（薬剤による QT 間隔延長の可能性を検討するため通常用いられる試験）は実施していない。これは，mAb が hERG チャネルの細胞外又は細胞内（ポア）領域と相互作用する可能性が非常に低いため，標的に特異的に結合する mAb の特性を考慮すると，hERG チャネル活性を直接阻害することはまず考えられないためである。さらに，mAb は細胞膜を通過できない大分子（>140000 Da）であるため，一般的な低分子薬とは異なり，無秩序な hERG チャネル内のポアに到達してこれをブロックすることはできないと考えられる[17]。

心血管系安全性試験（08GR358 試験）では，テレメータを装着した覚醒下カニクイザル（雄，N = 8）に対して，最初に媒体を静脈内投与し，6 日後に同じ動物にフレマネズマブ 100 mg/kg を単回 iv ボーラス投与した。すべての動物について，投与前約 1 時間から媒体又は被験物質投与後約 22 時間までと，Day 3，7，10 及び 14 に再度，テレメトリーによる心電図，血圧及び活動データを継続的に記録した。Day 1，3，7，10 及び 14 には中核体温及びフレマネズマブの全身曝露量も測定した。その結果，一部の動物で収縮期及び拡張期血圧の軽度の低下（5 mmHg 未満）が一過性に認められた。血圧低下は媒体投与と比較して統計的に有意であったが，記録された変化はいずれも 5 mmHg を超えず，生物学的に重要なものとは考えられなかった。心拍数，心電図データ及び体温には変化は認められなかった。

本試験において，iv ボーラス投与後 4 時間に測定した平均血清中濃度は 3500 µg/mL，平均曝露量（AUC_{316h}）は 288000 µg·h/mL であった。

血圧及び心電図データについては，サルにフレマネズマブを 300 mg/kg までの用量で週 1 回，静脈内又は sc 投与した 3 ヵ月間反復投与毒性試験でも検討した（8230269 試験）。この試験にお

いて，体温，心電図及び血圧に影響は認められなかった。また，投与動物の心臓に肉眼的及び病理組織学的所見は認められなかった。

サルにフレマネズマブを 300 mg/kg/week までの用量で sc 投与した 6 ヵ月間反復投与毒性試験（DS-2015-010 試験）では，体温，呼吸数及び心拍数を，投与前期に 1 回，投与前 2～4 時間，Day 85 及び 176 の投与後約 24 時間，並びに回復期の Day 113 に各 1 回記録した。被験物質投与に関連する所見は認められなかった。

2.4.2.3.2　　中枢神経系への影響

ラットの中枢神経系へのフレマネズマブの影響を Irwin 試験で評価した（DS-2017-011 試験）。3 群の SD ラットにフレマネズマブ 0，100 及び 300 mg/kg を単回 sc 投与し，主な中枢及び末梢神経系機能に関する一連の行動及び生理学的パラメータを，投与前と，投与後 1，24，48，72，120 及び 168 時間に評価した。フレマネズマブの投与は検討したパラメータに影響を及ぼさなかった。したがって， NOAEL は検討した高用量である 300 mg/kg であると判断され，平均血漿中濃度（投与後約 73 時間に測定）は雄が 1684 µg/mL，雌が 2034 µg/mL であった。

2.4.2.3.3　　呼吸系への影響

DS-2017-014 試験において，ラットに sc 投与したときの呼吸パラメータを全身プレチスモグラフィーを用いて測定した。

SD ラット雌雄各 8 匹からなる 3 群に，フレマネズマブ 0（媒体対照），100 及び 300 mg/kg を単回 sc 投与した。各動物は，プレチスモグラフィー用チャンバーに個別に収容し，少なくとも 1 時間馴化させた。その後，動物の呼吸パラメータ（一回換気量，毎分換気量，呼吸数）を少なくとも 30 分間測定してベースラインとした。馴化後，動物にフレマネズマブを投与し，投与後 24，48 及び 72 時間に再びプレチスモグラフィーチャンバーに移すまでケージに戻しておいた。

検討した呼吸パラメータへの影響に異常は認められなかった。

各動物について，投与前（投与の少なくとも 3 日前），無作為割付け時点，次いで投与後約 73 時間に薬物動態解析用の採血を行った。その結果，NOAEL は検討した高用量である 300 mg/kg であると考えられ，このときの平均血漿中濃度は雄が 1742 µg/mL，雌が 3044 µg/mL（投与後約 73 時間測定）であった。

結論として，上記の各種試験で所見がなかったことから，フレマネズマブが心血管系，呼吸器系及び中枢神経系に対し，生物学的に重要な変化を生じさせる懸念は認められなかった。

フレマネズマブの臨床開発プログラムを構成する試験のデータからは，理論上のリスクに関する安全性の懸念は生じておらず，非臨床試験で心血管所見がなかったことと一致していた（2.7.4, 安全性概要）。

2.4.2.4　　薬力学的薬物相互作用試験

フレマネズマブの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

フレマネズマブの非臨床薬物動態試験及び TK 試験の概要を 2.6.4 及び 2.6.5 に示す。

要約すると，フレマネズマブの薬物動態は一般的なヒト IgG2 抗体のものと一致しており，ラット及びサルのいずれでも，CL が低く，V_{ss} が小さく，$t_{1/2}$ が長かった。

ラットに最長 3 ヵ月間，サルに最長 6 ヵ月間，週 1 回 iv 又は sc 投与して TK プロファイルを検討したところ，全身曝露量に一貫した性差は認められなかった。また，単回投与時の全身曝露量は用量の増加比に応じて増加したが，週 1 回反復投与時は用量の増加比に応じた量をやや下回った。

2.4.3.1 分析法

毒性試験を実施したラット，サル及びウサギにおけるフレマネズマブ及び抗薬物（フレマネズマブ）抗体（ADA）の血漿中濃度を測定するため，複数の ELISA 法を開発した。

2.4.3.1.1 血漿中フレマネズマブの測定

マウス，ラット，ウサギ及びサルを用いた初期の薬物動態試験では，フレマネズマブの血漿中濃度を ELISA 法を用いて測定した。この ELISA 法は，ヒト CGRP を固相化した 96 穴マイクロプレートを用いてフレマネズマブを捕捉するものであった。形成された免疫複合体を， HRP を結合させた抗ヒト IgG Fc 特異的マウス mAb を検出抗体に用いて測定した。

ラット及びサルを用いた TK 試験では ECL 法を用いた。抗イディオタイプモノクローナル抗体（抗 ID mAb ; 21E11）をプレートに固相化してフレマネズマブを捕捉させ，これを HRP 標識した抗ヒト IgG2 mAb を検出抗体に用いて測定した。

後期の安全性薬理試験，TK 試験及び生殖発生毒性試験では，抗 ID mAb（21E11）を捕捉抗体，HRP 標識した抗ヒト IgG2 Fc 特異的マウス mAb を検出抗体とする ELISA 法のバリデーションを実施し測定した。

2.4.3.1.2 抗薬物抗体の測定

初期の試験では，ラット及びサルの血清試料中の ADA の検出にブリッジング ELISA 法を用いた。本分析法の感度はラットで 800 pg/mL, サルで 27 pg/mL と推定された。本方法は本薬及び CGRP に対する耐性が低かったことから，ビオチン及びジゴキシゲニンで標識した薬物を ADA と架橋させるブリッジング ELISA を用いて，サルの血清試料用に新たに分析法を改良し，バリデーションを行った。この新分析法におけるサル血清中フレマネズマブに対する耐性は最高 336 µg/mL であった。サル血清中の遊離 CGRP については最高 1200 ng/mL まで耐性があった。本方法はサルを用いた 6 ヵ月間慢性毒性試験に用いた。旧方法による ADA の測定結果は情報提供の目的でのみ記載する。測定方法に限界があるため，これらの測定結果の解釈には注意を要する。

2.4.3.2 吸収

ラット及びサルの薬物動態パラメータの値を, 2.6.4 の表 2, 全動物種の値を 2.6.5.3 に要約した。

雌雄 Han Wistar ラットに 10，30 及び 100 mg/kg を単回 iv 投与したときのフレマネズマブの PK プロファイルを検討する試験を実施した。フレマネズマブの平均 CL（約 0.004 mL/min/kg）及び平均 V_{ss}（約 0.13 L/kg）はいずれも低かったため，組織への分布は限定的であると考えられた。ラットにおけるフレマネズマブの消失は緩徐であり，10，30 及び 100 mg/kg 投与時の平均 $t_{1/2}$ はそれ

ぞれ 423，389 及び 372 時間（17.6，16.2 及び 15.5 日）であった。

雌雄カニクイザルにフレマネズマブ 10，30 及び 100 mg/kg を単回 iv 投与したとき，平均 CL（約 0.004 mL/min/kg）及び V_{ss}（約 0.1 L/kg）はいずれも低かった。10，30 及び 100 mg/kg 投与時のフレマネズマブの平均 $t_{1/2}$ は，それぞれ 260，253 及び 259 時間（10.5～10.8 日）であった。

ラット及びサルを用いた 3 ヵ月間毒性試験では，iv 及び sc の両経路で投与を行った。ラットに 300 mg/kg/week で sc 投与したときの Day 1 及び Week 13 における平均全身曝露量（AUC_{168h}）は，同用量を iv 投与したときのそれぞれ 66.8%及び 64.6%であった。同様に，サルに 100 及び 300 mg/kg/week で sc 投与したときの平均全身曝露量は，Day 1 では iv 投与したときのそれぞれ 80.7%及び 82.3%，Week 11 では 85.9%及び 92.0%，Week 13 では 81.7%及び 89.3%であった。

上記結果から，ラット及びサルにフレマネズマブを sc 投与したときのバイオアベイラビリティは比較的高く，sc 投与は適切な投与経路と判断された。ラットに対する最長 3 ヵ月間及びサルに対する最長 6 ヵ月間の反復投与では，iv 投与，sc 投与の両方において薬物の累積が認められ，本薬の長い $t_{1/2}$ によるものと考えられた。サルを用いた 6 ヵ月間毒性試験の回復期の動物を用いて終末相 $t_{1/2}$ を検討した。高用量の 300 mg/kg/week を 6 ヵ月間 sc 投与したとき，雌雄における $t_{1/2}$ は 330～501 時間であった。ラット及びサルでは，フレマネズマブの曝露量は概ね ADA に影響されなかった。サルを用いた 6 ヵ月間毒性試験の Day 85 及び Day 176 におけるフレマネズマブの曝露量は ADA 陽性動物と陰性動物で同程度であり，ADA の存在は曝露量に影響を及ぼさないと考えられた。

生殖発生毒性試験の一部として，ラット及びウサギに週 1 回 sc 投与したときの TK プロファイルも検討した。ラット，ウサギともに，曝露量は用量の増加に伴って増加し，投与期間を通じて曝露量が維持された。

2.4.3.3　分布

フレマネズマブの血漿タンパク結合試験及び組織分布試験は実施していない。ラット及びサルにおけるフレマネズマブの V_{ss} は小さかった（0.09～0.14 L/kg）。これは，IgG2 で一般的にみられる血漿容積とほぼ等しいか，わずかに大きい程度の限定的な分布と一致している[18,19]。

ウサギにフレマネズマブ 10，50 及び 100 mg/kg/week を sc 投与した EFD 毒性試験において，胎児の曝露について検討した。試験中の GD 25 での胎児中濃度を測定したところ，100 mg/kg/week の用量における胎児中濃度は，GD 18 の最終投与後での母体の C_{max} の約 9%，GD 18 の投与後 144 時間での母体の血漿中薬物濃度の約 23%であった。

受精させた雌 SD ラットにフレマネズマブ 50，100 及び 200 mg/kg を GD 6 から離乳（PND 21）まで週 1 回 sc 投与した EFD 及び PPND 発生試験の一部として，フレマネズマブの胎児曝露量を測定した。母動物，出生児とも，PND 4 及び PND 21 の投与後 72 時間に血漿中フレマネズマブ濃度の測定が可能であった。母動物におけるフレマネズマブの濃度はすべての用量で出生児より高く，PND 4 には平均 1.3～1.6 倍，PND 21 には平均 2.1～2.5 倍であった。母動物/出生児比における PND 4 と PND 21 での差はすべての用量で一貫して認められ，妊娠中及び出産後のラットで報告されている IgG mAb の $t_{1/2}$ の短縮[20]による可能性があった。

2.4.3.4　代謝

フレマネズマブは，他の抗体医薬と同様，主にタンパク分解性の異化作用を通じて代謝されると考えられる[18,19]。ICH S6(R1)ガイドラインに従い，動物でのフレマネズマブの *in vitro* 及び *in vivo* 代謝試験は実施していない。

2.4.3.5　排泄

フレマネズマブは分子量が大きく，未変化体が腎排泄される可能性は低いため[18]，動物でのフレマネズマブの排泄試験は実施していない。

2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用

フレマネズマブなどの mAb が CYP などの薬物代謝酵素と直接の相互作用を生じる可能性は低い[21]。フレマネズマブが炎症性サイトカインの放出刺激に影響を及ぼす可能性を評価する *in vitro* 試験をヒト全血を用いて実施した。フレマネズマブは，サイトカイン放出（TNFα，IL-6 及び INFγ を含む）を測定可能なレベルでは誘導しなかった。そのため，フレマネズマブが薬物代謝酵素のサイトカイン依存性調節を通じて，CYP やトランスポーターに間接的に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

2.4.4　毒性試験

ICH M3（R2）及び ICH S6（R1）ガイドラインに従った毒性試験プログラムを実施した（2.6.7 参照）。ラット及びサルは，標的配列の活性，結合性及び相同性から，それぞれ毒性学的に適切なげっ歯類の動物種及び非げっ歯類の動物種であることが確認されている。また，ウサギを用いた EFD に関する試験を実施したが，ウサギは，KinExA 法を用いて得られた結合親和性のデータから，適切な動物種であると考えられる。

2.4.2.1.1 項で述べたように，CGRP は種間で高度に保存されており，ヒトとサルのアミノ酸配列は同一である。フレマネズマブはラット及びサル/ヒトの CGRP に高い親和性で結合する（ヒト/サル α-CGRP の $K_D = 0.06$ nM；ラット α-CGRP の $K_D = 2.6$ nM）。組織交差反応性はヒト，サル，ウサギ及びラットの組織間で同程度であり，安全性評価でこれらの動物種が適切であることを示していた。ラット及びサルはともに，適切とされる電気刺激又はカプサイシン刺激による血管拡張の動物モデルとして用いた場合，本薬の投与に反応した。

2.4.4.1　単回投与毒性試験

雄ラットにフレマネズマブを 10.7，32 又は 107 mg/kg の用量で iv 単回ボーラス投与した（07AM203 試験）。フレマネズマブ投与後 7 日間，動物を観察した。一般状態，体重，摂餌量，臨床病理検査所見にフレマネズマブによる影響はなく，検査した組織に本薬の投与に関連する病理組織学的所見は認められなかった。血漿中濃度は用量に比例して増加し，最高濃度は概ね投与後 1 時間までに認められた。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

2.4.4.2.1　Sprague Dawley ラットを用いた反復投与毒性試験

2.4.4.2.1.1　1 ヵ月間静脈内投与毒性試験

フレマネズマブを 10，30 又は 100 mg/kg の用量で週 1 回，4 週間連続してラット（各群雌雄 10 匹ずつ）に iv 投与した（08GR354 試験）。さらに，媒体群及び高用量群の別の各群雌雄 5 匹ずつを，3 ヵ月間の回復性評価に使用した。フレマネズマブの投与による忍容性は良好で，本試験の投与期及び回復期の終了時に，死亡，一般状態悪化，投与に関連する臨床徴候，又は摂餌量，体重，若しくは眼科的検査所見の変化はみられなかった。また, 本試験の投与期又は回復期の終了時の，血液学的検査及び血液生化学的検査，剖検，又は病理組織学的検査で投与に関連する所見は認められなかった。Day 1 及び Day 22 の全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{168h} から評価）は用量依存的に増加した。10，30 及び 100 mg/kg/week 投与群の Day 22 の C_{max} は，Day 1 の値のそれぞれ 1.0 倍，1.3 倍及び 1.3 倍，AUC_{168h} は 1.6 倍，2.3 倍及び 1.8 倍であった。曝露量に明らかな性差はみられなかった。24 匹中 8 匹（各投与群から雄 4 匹及び雌 4 匹）は，少なくとも 1 時点で ADA 陽性であった。しかし，複数の時点で一貫して陽性を示したのはそのうち 4 匹のみで，さらに，カットオフ値より明らかに高い力価を示したのはこの 4 匹中 2 匹のみであった。これら 2 匹では Day 29 の最終 TK 測定時のフレマネズマブ曝露量が低かった。

本試験のフレマネズマブの NOAEL は, 本試験で検討した最高用量の 100 mg/kg/week であった。NOAEL での Day 22 の投与後の平均全身曝露量（AUC_{168h}）は，194000 μg·h/mL であった。この用量について算出した，臨床での 225 mg の sc 投与に対する安全域（AUC に基づく）は，約 18 倍である。臨床での 675 mg の sc 投与に対する安全域（C_{max} に基づく）は，約 23 倍である。

2.4.4.2.1.2　3 ヵ月間毒性試験

SD ラット（各群雌雄 15 匹ずつ）にフレマネズマブを 0，30，100 及び 300 mg/kg の用量で週 1 回，3 ヵ月間 iv 投与，又は 0 及び 300 mg/kg の用量で週 1 回，3 ヵ月間 sc 投与した。さらに，各群雌雄 4 匹ずつについて 4 ヵ月間の回復期を設けた（11LJ014 試験）。

フレマネズマブ投与の忍容性は良好で，被験物質に関連する影響は認められなかった。

iv 及び sc 投与のいずれの動物にも，被験物質に関連する臨床徴候，体重増加量の変化及び眼科的検査所見は認められなかった。30，100 又は 300 mg/kg/week を iv 投与した動物で摂餌量がわずかに減少したが，体重増加量への影響がなかったことから毒性所見とは考えられず，偶発所見である可能性があった。フレマネズマブの投与は，いずれの投与群でも臨床病理パラメータに影響を及ぼさなかった。注意すべき唯一の所見は，100 又は 300 mg/kg/week を iv 投与した雌雄及び 300 mg/kg/week を sc 投与した雌の，軽微ないし軽度のグロブリン値上昇であり，その結果，これらの動物では総タンパクが増加し，アルブミン/グロブリン比が低下した。また被験物質に関連する器官重量の変化，剖検所見又は病理組織学的所見はみられなかった。

したがって, 本試験の NOAEL は, iv 投与と sc 投与のいずれでも最高用量である 300 mg/kg/week である。この用量について算出した，臨床での 225 mg の投与に対する安全域（AUC に基づく）は，約 21 倍（sc 投与）から約 32 倍（iv 投与）である。臨床での 675 mg の投与に対する安全域

（C_{max} に基づく）は，約 14 倍（sc 投与）から約 43 倍（iv 投与）である。

300 mg/kg/week の用量における Week 13（投与期）の平均 C_{max} は，iv 投与で 4740 µg/mL，sc 投与で 1500 µg/mL，平均 AUC_{168h} は iv 投与で 347000 µg·h/mL，sc 投与で 224000 µg·h/mL であり，絶対バイオアベイラビリティは 64.6%であった。

Day 1 及び Week 13 とも，投与後の全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{168h} により評価）は，用量の増加に伴って増加した。Day 1 と比較すると，iv 投与したときの Week 13 の平均曝露量（AUC_{168h}）は 1.8～3.7 倍であった。週 1 回，13 週間の sc 投与後の平均曝露量は，Day 1 の投与後の 1.8 倍であった。

ADA の確認試験により，7 匹［10 mg/kg/week の iv 投与群 1 匹，300 mg/kg/week（高用量）の iv 投与群 1 匹，300 mg/kg/week の sc 投与群 5 匹］が陽性反応を示した。うち 3 匹（sc 投与群）は，投与期間終了時の Week 13 に陽性反応を示した。投与期間に ADA 陽性反応を示したこれら 3 匹の sc 投与群の動物では，フレマネズマブの血漿中濃度が他の動物より低かった。

2.4.4.2.2　カニクイザルを用いた反復投与毒性試験

2.4.4.2.2.1　1 ヵ月間静脈内投与又は皮下投与毒性試験

iv 投与と sc 投与の 2 つの 1 ヵ月間毒性試験を別々に実施した。

カニクイザル（各群雌雄 3 匹ずつ）にフレマネズマブを 10, 30 又は 100 mg/kg の用量で週 1 回，4 週間連続して iv 投与した（08GR296 試験）。さらに，媒体群及び高用量群ごとに別の雌雄 2 匹ずつを用い，3 ヵ月間の回復性の評価を実施した。本試験におけるフレマネズマブの投与による忍容性は良好で，投与期及び回復期において死亡，一般状態悪化，投与に関連する臨床徴候，又は摂餌量，体重若しくは眼科的検査所見の変化は認められなかった。また，本試験の投与期及び回復期に，血液学的検査，血液生化学検査，剖検所見にも投与に関連する所見は認められなかった。100 mg/kg/week の回復群の雌 1 匹に認められた軽度の胆管過形成（投与期間終了時にはなかった所見）と投与との関連性は，対応する臨床病理検査所見がないこと，発現割合が低いこと，及び程度が軽いことから不明であった。投与部位にみられた軽度の病理組織学的所見（出血，炎症，線維化など）は，本試験では対照群と比較して投与群のサルで多く認められた。これらの所見は回復期動物には認められなかったことから，毒性所見ではないと判断された。

Day 22 の投与後の全身曝露量［AUC_{168h}（雌雄合算）：10，30 及び 100 mg/kg/week でそれぞれ 40200, 84000 及び 299000 µg·h/mL］は, Day 1 の値［AUC_{168h}（雌雄合算）: 10, 30 及び 100 mg/kg/week でそれぞれ 21800，59600 及び 193000 µg·h/mL］と同程度又は Day 1 より高かった。本試験の曝露量に明らかな雌雄差はなかった。

本試験のフレマネズマブの NOAEL は 100 mg/kg/week であった。NOAEL での全身曝露量（投与 22 日目の AUC_{168h}）は, 299000 µg·h/mL であった。この用量について算出した, 臨床での 225 mg の sc 投与に対する安全域（AUC に基づく）は約 28 倍である。臨床での 675 mg の投与後 C_{max} に対する安全域は約 31 倍である。

別に実施した 1 ヵ月間 sc 投与毒性試験では，雄のカニクイザル（各群 5 匹，主要期間で雄 3 匹/群，3 ヵ月の回復期間で雄 2 匹/群）にフレマネズマブを 0，100 又は 300 mg/kg の用量で週 1 回投与した（09GR293 試験）。一般状態，眼科的検査，体重，摂餌量，ECG，臨床病理検査，剖検及

び病理組織学的検査に被験物質に関連する所見は認められなかった。臨床病理検査データでは，投与期間における総タンパク値及びグロブリン値に被験物質に関連するわずかな上昇が示された。総タンパク値は，300 mg/kg/week 投与群で軽微に上昇したが（ベースラインの平均の 1.07 倍），これは，300 mg/kg/week 投与群の投与 30 日目におけるグロブリン値の上昇（ベースラインの平均の 1.23 倍）に起因する。さらに，リンパ球数の軽微な増加（1.2 倍の増加）が投与 30 日目に高用量群で認められたが，これらは毒性所見ではないと判断した。回復期の動物の総タンパク値及びグロブリン値は，正常範囲内であった。

投与 1 日目及び 22 日目の全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{168h} により評価）は，用量の増加に伴って増加し，投与 22 日目の曝露量は投与 1 日目よりも高くなった。サルでは，用量が 3 倍（100 mg/kg/week から 300 mg/kg/week）になると，Day 1 及び Day 22 の平均 C_{max} はそれぞれ 3.2 倍及び 2.5 倍，平均 AUC_{168h} はそれぞれ 3.1 倍及び 2.7 倍に増加した。

ADA 陽性反応は，投与 15 日目に 300 mg/kg/week 投与群の 1 匹の動物で，投与 29 日目に 100 mg/kg/week 投与群の 1 匹に認められた。検討した動物で回復期に ADA 陽性を示した動物はいなかった。100 mg/kg を投与した動物における ADA の存在は，投与最終週の曝露量が同群の他の動物より低いことと相関していた。

剖検所見又は病理組織学的所見は，検討した用量のいずれにも認められなかった。これらの結果から，NOAEL は 300 mg/kg/week（AUC_{168h} = 515000 μg·h/mL）であった。この用量について算出した，臨床での 225 mg の sc 投与に対する安全域（AUC に基づく）は約 48 倍である。臨床での 675 mg の単回 sc 投与後 C_{max} に対する安全域は約 32 倍である。

2.4.4.2.2.2　3 ヵ月間毒性試験

サルを用いた 3 ヵ月間試験では，カニクイザル（各群雌雄 6 匹ずつ）にフレマネズマブを 0，10，100 及び 300 mg/kg の用量で iv に，0，100 及び 300 mg/kg の用量で sc にそれぞれ週 1 回投与し，その後 4 ヵ月間の回復期を設けた（10SN155 試験）。試験中，被験物質に関連する臨床徴候や，体重，眼科的検査，ECG 検査，体温，血圧，臨床病理検査における変化，また剖検所見は認められなかった。

被験物質に関連する眼の毛様体血管周囲の炎症が，300 mg/kg iv 投与群の雄 1 匹，300 mg/kg sc 投与群の雄 1 匹，及び 100 mg/kg iv 投与群の雌 1 匹）に認められた。3 匹の血管周囲炎はいずれも軽度で，様々な炎症性細胞（リンパ球，マクロファージ，形質細胞，好中球及び少数の多核巨細胞）が観察された。この炎症は，300 mg/kg iv 投与群の雄及び 100 mg/kg iv 投与群の雌では片眼性，300 mg/kg sc 投与群の雄では両眼性であった。炎症が血管周囲性であること，その位置及び外観は，この炎症が免疫介在性反応であることを示唆していた。そこで，罹患した眼の免疫組織化学的染色（IHC）を行い，フレマネズマブ，サルの内在性 IgG，免疫グロブリン M，補体因子 C3 及びアルブミンを含有する，免疫複合体の有無について検討した。その結果，血管周囲の炎症が認められた 3 匹すべての毛様体血管の，内膜又は中膜あるいはその両方で C3 が軽微に染色されたのに加え，これらのうち 2 匹では IgM が，1 匹では IgG も染色陽性であり，さらに 2 匹ではフレマネズマブも軽微に染色された。対照動物では IHC の所見は認められなかった。

PAMS 染色法を使って眼の切片を染色したところ，iv 投与した 2 匹の動物で，前毛様体血管の内膜，内弾性板及び中膜の均一性に変化が認められた。この原因は，血管周囲又は血管壁あるい

はその両方への炎症細胞の浸潤による破壊と考えられた。対照動物又は染色で C3 陽性を示した 300 mg/kg/week sc 投与群の動物には，このような変化はみられなかった。対照群の雌雄及び 300 mg/kg sc 投与群の雄の PAMS 染色では変化は認められなかった。

回復期終了時には眼の毛様体血管周囲の炎症は認められなかった。検査した動物のうち，300 mg/kg iv 投与群の雌 1 匹では，後膝関節包の血管周囲の軽微な炎症及び滑膜の炎症が観察された。この所見が 1 匹の動物で認められたものの投与期終了時にはみられなかったことを考慮すると，これらの変化と投与とが関連する可能性は低いと考えられた。

後に実施した，カニクイザルを用いた同程度の用量及び全身曝露量での週 1 回 sc 投与による 6 ヵ月間慢性毒性試験（詳細は次項，DS-2015-010 試験）では，血管周囲の炎症を示す所見は認められなかった。すなわち，この sc 投与慢性毒性試験では，3 ヵ月間試験で眼又は関節に認められたような病理組織学的所見は認められなかった。したがって，3 ヵ月間毒性試験の少数の動物における血管周囲炎の所見は，偶発的なものと考えられる。

以上より，sc 投与での NOAEL は 100 mg/kg/week と判断した。算出された臨床での 225 mg の sc 投与に対する安全域（AUC に基づく）は約 24 倍である。臨床での 675 mg の sc 投与後 C_{max} に対する安全域は約 16.5 倍である。

当初，サルを用いた 3 ヵ月間 iv 投与毒性試験から得られる安全域（AUC 及び C_{max} に基づく）は，眼の毛様体血管周囲の炎症から NOAEL を 10 mg/kg として算出した結果，上記の臨床での用量に対して約 3.5 倍であった。

しかし，遡って考察すると，サルの 6 ヵ月間試験で毛様体の所見が認められなかったことを考慮すれば，3 ヵ月間試験の NOAEL は両投与経路とも 300 mg/kg/week であると考えられる。

iv 及び sc 投与したときの投与 1 日目及び 13 週目の全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{168h} から評価）は，用量の増加に伴って増加した。本試験の曝露量に明らかな雌雄差はなかった。

投与 1 日目と比較すると，週 1 回 iv 投与したときの全体的な平均曝露量（AUC_{168h}）は，投与 11 週目では 1.6～3.1 倍，投与 13 週目では 1.8～3.6 倍となった。

投与 1 日目と比べ，週 1 回 sc 投与したときの全体的な平均曝露量は，投与 11 週目では 1.8～2.8 倍，投与 13 週目では 2.0～3.1 倍となった。

100 及び 300 mg/kg/week sc 投与群の平均絶対バイオアベイラビリティは，Day 1 の投与後でそれぞれ 80.7%及び 82.3%，Week 11 で 85.9%及び 92.0%，Week 13 で 81.7%及び 89.3%であった。

投与期に ADA が 10 匹の動物の血清中から検出された。内訳は，対照群の雌 4 匹，10 mg/kg/week iv 投与群の雄 1 匹及び雌 2 匹，100 mg/kg/week iv 投与群の雄 1 匹，100 mg/kg/week sc 投与群の雄 1 匹（投与前にも検出），並びに 300 mg/kg/week sc 投与群の雄 1 匹であった。投与期終了時に ADA が検出された動物は，対照群では 4 匹，投与群ではわずか 3 匹であった（10 mg/kg/week iv 投与群の雌 1 匹及び雄 1 匹，及び 100 mg/kg/week sc 投与群の雄 1 匹）。回復期に移行した 2 匹の対照動物では，抗体の陽性反応が継続して観察された。回復期には，ADA は上記以外の雄 1 匹及び雌 4 匹に検出された。内訳は，100 mg/kg/week iv 投与群の雌 1 匹，100 mg/kg/week sc 投与群の雄 1 匹及び雌 1 匹，並びに 300 mg/kg/week iv 投与群の雌 2 匹であった。iv 投与群では，ADA が存在していてもフレマネズマブの曝露量に明らかな影響は認められなかったが，sc 投与群では，特に各投与日の投与後 168 時間の時点及び回復期に，ADA が曝露量に影響を及ぼしたと推測された。抗フ

レマネズマブ抗体は媒体対照群の動物でも 33.3%（12 匹中 4 匹）に検出されたことから， 検査方法の特異性に疑問が生じ，ADA 検査結果の妥当性に対する疑問につながった。

ADA 検出方法について，特異性及び薬物耐性の評価法がないため，2.6.4 に記載したように，サルの血清試料を分析するために新規に改良された方法を，ブリッジング ELISA 法を用いてバリデートした。この新分析法において，サル血清中フレマネズマブ濃度が最高 336 µg/mL のとき，1005 ng/mL の陽性対照 ADA を検出することが可能であった。また，サル血清中の遊離 CGRP に対する耐性は最高 1200 ng/mL であった。この新分析法は，サルを用いた 6 ヵ月慢性毒性試験で使用した（DS-2015-010 試験；8292076）。

2.4.4.2.2.3　6 ヵ月間慢性毒性試験

sc 投与（週 1 回）による 6 ヵ月間慢性毒性試験をカニクイザルを用いて実施した（DS-2015-010 試験）。回復期間は 4 ヵ月間を設けた。

雌雄のカニクイザルを 4 群に割り付けた（第 1～第 4 の各群に雌雄 4～6 匹ずつ）。各群には，フレマネズマブを 0（媒体対照），10，100 又は 300 mg/kg/week の用量で，投与量を 2 mL/kg として sc 投与した。

毒性評価は，死亡率，一般状態，体重，体重の変化，身体的検査，バイタルサイン（体温，呼吸数及び心拍数），血圧測定，眼科的検査，ECG 及び臨床病理検査，剖検及び病理組織学的検査に基づいて評価した。TK 及び ADA 分析用に血液を採取した。

投与期間を通じて死亡はなかった。一般状態に被験物質に関連する所見はなく，体重，体重増加量，身体的検査，バイタルサイン，血圧測定，眼科的検査，ECG 検査，臨床病理検査でも被験物質に関連する変化は認められなかった。病理組織学的検査では標的器官は特定されず，明らかな投与部位への反応も記録されなかった。したがって，本試験の NOAEL は，検討した最高用量の 300 mg/kg/week と考えられる。この用量について算出した，臨床での 225 mg の月 1 回 sc 投与に対する安全域（AUC に基づく）は，約 158～232 倍である。臨床での 675 mg の sc 投与に対する安全域（C_{max} に基づく）は，約 156～227 倍である。

初回投与（投与 1 日目），投与 85 日目及び 176 日目の雌雄における血漿中濃度 - 時間プロファイルの特徴を明らかにした。さらに，300 mg/kg/week 投与群の回復期の動物から TK 分析用の血漿試料を採取した。用量の増加に伴って曝露量が増加し，投与 1 日目，85 日目及び 176 日目の曝露量増加は用量比例的と考えられた。すべての用量で，曝露量は投与の反復に伴って増加した。曝露量は投与 85 日目又は 1 日目よりも 176 日目の方が高かった。TK プロファイルに雌雄差を示唆する特徴は認められなかった。回復期の動物では，最終投与から 120 日後までフレマネズマブの血漿中濃度が測定可能であった（採取した最終試料の血漿中濃度はすべての動物で 18.4～76.7 µg/mL）。サルを用いた 6 ヵ月間の毒性試験で, 回復期の動物を用いて終末相 $t_{1/2}$ を検討した。高用量の 300 mg/kg/week を 6 ヵ月間 sc 投与したとき，雌雄における $t_{1/2}$ は 330～501 時間であった。確認分析後の ADA の評価の結果，投与群の計 5 匹（中用量群の 8 匹中 3 匹及び高用量群の 12 匹中 2 匹）と対照群の 1 匹の試料が陽性であることが示されたが，低力価であった。ADA 陽性の動物では曝露量に対する明らかな影響は認められなかった（2.6.4.3.3 参照）。

2.4.4.3　遺伝毒性試験

医薬品について通常行われる遺伝毒性試験の範囲と種類はバイオテクノロジー応用医薬品には適用されないという ICH S6（R1）のガイダンスに従い，フレマネズマブの遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.4.4.4　がん原性試験

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開発についての考察）では，標準的ながん原性試験は，フレマネズマブのようなモノクローナル抗体を含むバイオテクノロジー応用医薬品には，一般的に適切ではないとしている。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

フレマネズマブについて一連の生殖発生毒性試験を，SD ラット及びニュージーランドホワイト（NZW）ウサギを用いて実施した［それぞれ，受胎能及び EFD に関する複合試験（ラット）と EFD 試験（ウサギ）］（2.6.7.12, Study DS-2015-018 and 2.6.7.13, Study DS-2015-022 参照）。

妊娠 SD ラットを用いて 300 mg/kg までの用量で iv 投与した 2 件の用量設定試験（09GR291 試験及び 09GR439 試験）を実施したが，母動物又は胎児に対する毒性は認められなかった。これら 2 件の試験は，のラットを用いた受胎能及び EFD に関する複合試験の前に実施した。また，妊娠 NZW ウサギを用いた用量設定試験も実施し，その後 EFD 試験を実施した。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した（DS-2016-068 試験）。

幼若ラットを用いた用量設定試験を実施し（DS-2017-034 試験），その後，毒性試験を実施した（DS-2017-022 試験）。

さらに，GLP に準拠したフレマネズマブの一般毒性試験では，週 1 回，最長 6 ヵ月間 sc 投与を行ったが，げっ歯類及び非げっ歯類のいずれにも生殖器官に所見は認められなかった（2.6.7.7.2, 4-6, Studies 8244107/11LJ014, 09GR293, 8230269/10SN155, 8292076/ DS-2015-010 参照）。

2.4.4.5.1　ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する複合試験

受胎能及び EFD に関する複合試験を，ラット（各群雌雄 24 匹ずつ）を用いて実施した（DS-2015-018 試験）。本試験の目的は，フレマネズマブを 50，100 及び 200 mg/kg/week の用量で週 1 回，配偶子形成期から交配期間，さらに硬口蓋の閉鎖までの期間，ラットに sc 投与したときの，雌雄の生殖能力及び胚胎児発生に及ぼす影響を評価することであった。母動物の全身曝露量も検討した。

本試験の用量は，非妊娠ラットに 300 mg/kg/week までの用量で iv 投与又は sc 投与した 3 ヵ月間毒性試験に基づいて選択した。

試験期間を通して，雌雄の一般状態，体重及び摂餌量を観察した。性周期は，投与期間前から交尾が確認されるまで，膣スメアにより毎日観察した。フレマネズマブの血漿中濃度測定用として，各群雌雄 9 匹ずつの血液試料を，投与初日及び投与最終週の剖検前に採取した。妊娠した雌ラットについては GD 20 に帝王切開時検査を行い，胎児の検査を行った。また，卵巣重量を記録した。雄は投与終了後に剖検した。精巣及び精巣上体は，重量測定後，精子検査に使用した。

剖検時には，雌を肉眼的に観察し，妊娠子宮の重量を測定した。すべての胎児の体重を測定し，

性別判定及び外形異常の有無の検査を行った。各同腹児の半数の胎児について，内臓異常の有無を検査した後，骨格検査を行った。残りの胎児は，連続切片による頭部の内臓検査用に固定処理した。

以上の測定及び検査結果から，上述した評価項目のいずれにもフレマネズマブに関連する所見は認められなかった。フレマネズマブは，受胎能への影響，雌雄親動物毒性及び次世代に対する毒性作用を示さなかった。また，胚・胎児の生存性への影響及び胎児の骨格又は内臓の発生異常は認められなかった。以上のことから，親動物及び胚・胎児発生に対する NOAEL は，本試験の高用量である 200 mg/kg/week と判断された。

この用量での C_{max} 及び AUC_t は，投与 9 週目の雄（週 1 回，合計 10 回投与）でそれぞれ 3530 µg/mL 及び 460000 µg·h/mL，GD 17 の雌（週 1 回，合計 8 回投与）でそれぞれ 2060 µg/mL 及び 95500 µg·h/mL であった。雄ラットと比較して雌ラットの曝露量が低値であった原因は，妊娠期間及び分娩後の雌で IgG mAb の $t_{1/2}$ が雄の $t_{1/2}$ より短かったためと考えられる [20]。

安全域の算出のため，動物試験の週 1 回投与時の曝露量 AUC_∞ に 4 を乗じ，ブリッジング試験のヒトでの月 1 回投与に合わせた。

曝露量（AUC）に基づいて算出した，臨床での 225 mg の sc 投与に対する安全域は，雄で約 43 倍，雌で約 9 倍であった。C_{max} に基づく安全域は，雄で 19 倍，雌で 32 倍であった。

ただし，雌ラットの AUC に基づく安全域は，最後の試料採取が投与 7 日後ではなく，72 時間後であった（その後これらの動物について帝王切開時検査が行われた）ため，過小評価された可能性があることを考慮に入れるべきである。

2.4.4.5.2　　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

妊娠 NZW ウサギを用いた EFD 試験の用量設定試験（DS-2015-008 試験）を実施した。交配した雌 NZW ウサギ 6 匹にフレマネズマブを 0，50，100 及び 200 mg/kg の用量で 6 日間ごとに 1 回（GD 6，12 及び 18），1 ヵ所又は（最高用量の 200 mg/kg まで投与できるように）2 ヵ所に sc 投与した。

本試験の目的は，EFD 試験のために適切な用量を選択できるようにデータを得ることであった。結果，胚・胎児に対する毒性を示す所見はいずれの用量でも認められなかった。

TK の評価では，いずれの投与動物でもフレマネズマブの血漿中濃度は投与後 144 時間まで定量可能であり，試験期間を通じて動物は測定可能な濃度のフレマネズマブに曝露されていたことが示された。C_{max} 及び AUC は，GD6 及び 18 の両日で用量の増加に伴って増加した。GD6 のフレマネズマブの全身曝露量は，50～200 mg/kg の範囲で用量比例的に増加したと考えられる。GD 18 では，フレマネズマブの全身曝露量は，50～100 mg/kg の範囲で用量比例的に増加すると判断された。

EFD 試験では，交配した雌 NZW ウサギ 24 匹（主試験群 20 匹，サテライト群 4 匹）に対し，フレマネズマブを 10，50 及び 100 mg/kg の用量で，GD 6，12 及び 18 に sc 投与した（DS-2015-022 試験）。さらに，妊娠個体数を確保するために対照群，中用量群及び高用量群にそれぞれ 8 例を追加して投与したところ，最終的帝王切開時の主群妊娠個体数は対照群で 25 例，10 mg/kg 投与群で 17 例，50 mg/kg 投与群で 21 例，100 mg/kg 投与群で 22 例であった。

投与期間を通じて，一般状態，体重及び摂餌量の変化，並びに投与部位の異常はいずれの投与

群でも認められなかった。

形態異常を含め，明らかな胚胎児毒性は，いずれの用量でも認められなかった。このため，母動物及び胚・胎児発生に対する NOAEL は，本試験で検討した最高用量の 100 mg/kg であると判断した。

100 mg/kg での AUC_{144h} は 215000 μg·h/mL であり，曝露量に基づいて算出した，ヒトでの 225 mg の投与に対する安全域は，20 倍であった。C_{max} から算出した安全域は，ヒトに 675 mg を sc 投与したときに測定された最高濃度の 22 倍である。

試験の GD 25 に胎児の血漿中濃度を測定した。100 mg/kg の用量での胎児の C_{max} は母動物の C_{max} の約 9%であった。

2.4.4.5.3　ラットを用いた出生前及び出生後の発生（PPND）に関する試験

GLP に準拠し，ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する本試験（DS-2016-068 試験）では，フレマネズマブを 0，50，100 及び 200 mg/kg の用量で，受胎した雌に GD6 日目から離乳時 PND21 まで sc 投与した場合の，母動物及び出生児への影響を評価した。また，TK 用の血液試料を採取し，母動物及び出生児の曝露量を確認した。

本試験期間において，母動物又は胚・胎児に対するフレマネズマブ関連の毒性は認められなかった。母動物へのフレマネズマブ投与は，F1 出生児の性成熟及び出生後の発育に悪影響を及ぼさなかった。

フレマネズマブの血漿中濃度は緩徐に上昇し，投与後 24～72 時間に t_{max} に達した。すべての群で，血漿試料の最後の濃度測定時点は投与後 120 時間であり，これは血液の最終採取時点であった。フレマネズマブの単回及び反復 sc 投与時の曝露量（C_{max} 及び AUC_t）は用量比例的に増加した。すべての用量で，妊娠 6 日から分娩後 21 日までフレマネズマブの C_{max} 及び AUC_t 値は同程度であったが， 分娩後 4 日の値はわずかに低かった。平均すると，母動物のフレマネズマブ濃度は，出生児の値に対し，すべての用量において PND 4 で 1.3～1.6 倍，PND 21 で 2.1～2.5 倍であった。PND4 と 21 の濃度比の差はすべての用量で一貫しており，妊娠期間及び分娩後の雌ラットで報告された IgG mAb の $t_{1/2}$ の短縮に起因すると考えられる [20]。

いずれの用量でもフレマネズマブに関連する影響がなかったことから，ラットの胚・胎児発生及び出生前・出生後の発生，並びに出生児の生殖能力に対する NOAEL は 200 mg/kg であると判断した。200 mg/kg の用量での AUC_{120h} は 147000 μg·h/mL となり，算出した安全域は，ヒトでの 225 mg 投与時の曝露量と比較して 14 倍であった。C_{max} から算出した安全域は，ヒトに 675 mg を sc 投与したときに測定された最高濃度の 13 倍である。

2.4.4.5.4　幼若動物を用いた試験

用量設定試験（DS-2017-034 試験）では PND28 のラット雌雄各 8 例を 1 群とする計 4 群に，フレマネズマブを PND28 から PND63 までの週 1 回，合計 6 回（PND28，35，42，49，56，63）sc 投与した。用量は 0，50，150 及び 450 mg/kg/week として投与した。評価項目として一般状態，体重，摂餌量，臨床病理学的検査，剖検，生後発達（体重及び脛骨長で評価），性成熟検査（膣開口日及び陰茎亀頭包皮開裂日）を設定した。また，TK 用の血液試料を採取し，全身曝露量を評価した。

本試験の条件下では，投与部位に一過性のごく軽度から境界明瞭な水腫がみられたのみであり，いずれの投与用量においてもフレマネズマブ投与による忍容性は良好であった。よって次に実施する幼若毒性試験における最高投与量は 450 mg/kg が選択された。

続いて，幼若動物を用いた毒性試験を実施した（DS-2017-022 試験）。PND28 のラット雌雄各 20 例を 1 群とする計 4 群に，フレマネズマブを 0，50，150 及び 450 mg/kg/week の用量で PND28 から PND63 までの週 1 回，合計 6 回（PND28，35，42，49，56，63）sc 投与し，さらに 6 週間の休薬群を設けた。

投与期間を通じてフレマネズマブ投与による忍容性は良好で，主に 450 mg/kg/week の投与部位に軽度の一過性の水腫がみられたのみであった。150 及び 450 mg/kg/week の投与部位にみられた所見は，病理組織学的に皮下水腫及び亜急性炎症であったが毒性学的意義はないと考えられた。

生後発達（体重，脛骨長及び骨密度），神経行動学的発達，性成熟及び交配能への影響は試験期間を通じて異常はみられなかった。

臨床病理学的検査では，リンパ球数減少及びごく軽度のグロブリン値の上昇及び A/G 比の減少がみられたが，これらの所見は循環血中のフレマネズマブ（モノクローナル抗体）による影響と考えられた。

全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{168h} により評価）は，雌雄ともに 50，150 及び 450 mg/kg/week の用量に従って増加していた。フレマネズマブの週 1 回の反復投与により雌雄ともにいずれの投与群においても蓄積性を示した。

以上の結果から，NOAEL は最高用量の 450 mg/kg/week と判断した。

2.4.4.6　局所刺激性試験

臨床でのフレマネズマブの投与経路としては iv 投与と sc 投与を予定していることから，毒性プログラムには両投与経路による試験を含めており，それらの試験結果から投与部局所の忍容性を評価した。投与部位によくみられる軽微な病理組織学的所見が，対照群より投与群のサルで多く認められた。これらの所見は一過性で，回復群の動物には認められなかったことから，毒性所見ではないと判断された。また，これらの軽微な所見が認められたのは一部の動物であり，すべての動物で認められたものではなかった。サルを用いた 6 ヵ月間慢性毒性試験（DS-2015-010 試験）では，明らかな投与部位への反応は認められず，軽微な血管周囲性単核細胞浸潤のみが，100 mg/kg 以上を投与した雌のすべての sc 投与部位に認められた。これらの所見は雄では認められなかったため，毒性学的意義はないと判断した。

さらに，様々な投与経路で別途，局所刺激性試験をウサギを用いて実施した（Study DS-2017-025, 2.6.7.16 参照）。要約すると，NZW ウサギを各群雄 6 匹の 2 群に割り付け，第 1 群には 150 mg/mL を動脈内及び筋肉内の投与経路で単回投与し，第 2 群には傍静脈，皮下及び静脈内の投与経路で単回投与した。

投与後 24 時間又は 96 時間（すなわち，Day 2 又は Day 5）に動物を剖検した（各時点で各群 3 匹）。媒体対照と比較したが，5 つの投与経路のいずれでも，投与に関連する一般状態の変化は認められず，投与部位にも投与に関連する影響は認められなかった。

2.4.4.7　その他の毒性試験

2.4.4.7.1　組織交差反応性試験

4 件の試験を実施し，SD ラット（IM1329 試験），ウサギ（IM1355 試験），カニクイザル（IM1328 試験）及びヒト（IM1327 試験）の組織の凍結切片を用いて，フレマネズマブが交差反応性及び組織結合性を有する可能性を，2 つの濃度（2 及び 20 µg/mL）で検討した（2.6.7.17, Studies IM1329, IM1355, IM1328 and IM1327 参照）。

これらの試験で使用した組織パネルは，「Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use」（PTC FDA 1997）[22]の推奨に従った。概ね，検討した動物種全体で類似した染色パターンが認められた。ラット及びサルでは，甲状腺のコロイド，濾胞上皮及び傍濾胞（C）細胞で，ウサギでは甲状腺［少数の傍濾胞（C）細胞］及び副甲状腺（少数の上皮）で特異的な結合が認められた。ヒト正常組織では，下垂体（前葉）の上皮で結合が認められ，CGRP は下垂体の性腺刺激ホルモン分泌細胞によって産生・貯蔵されるという見方を裏付けた[23]。動物種間の軽微な差異は，試料数が少なかったこと，検査したヒト甲状腺の傍濾胞細胞が非常に少なかったこと，並びにサル及びウサギでは染色の程度が弱かったことが原因であった可能性がある。ラット，ウサギ，サル又はヒトでは，標的組織以外の組織との結合性は認められなかった。

フレマネズマブと適切な陽性対照との結合性，陰性対照物質との特異的反応性の欠如及び試験の再現性から，これらの試験は十分な感度と特異性を有することが示された。

2.4.4.7.2　ヒト全血を用いたサイトカイン放出試験

フレマネズマブによる炎症促進性サイトカインの放出刺激について，ヒト全血を用いた試験で検討した（111320 試験，2.6.7.17）。サイトカイン放出試験は，CD32 遺伝子多型の 131 His/His 対立遺伝子を保有する 2 名を含めた，8 名の健康なドナーから得た血液を用いて実施した。CD32 遺伝子は IgG Fc 受容体 II をコードし，131 His/His 対立遺伝子はヒト IgG2 アイソタイプに対する親和性を高めるが，他のヒト IgG のアイソタイプとの結合には影響しない。100 µg/mL までの濃度で検討したところ，フレマネズマブは，CD32 の 131 His/His 遺伝子多型を有する 2 名のドナーを含め，いずれのドナーでもサイトカイン（TNFα，IL-6，INFγ 及び IL-1β）の顕著な放出を誘発しなかった。試験系の妥当性は，陽性対照とした抗 CD3 抗体とのインキュベーション後にみられた反応と，陰性対照の抗 KLH IgG2 抗体（100 µg/mL）又は Dulbecco リン酸緩衝食塩水でのシグナルの欠如によって確認した。

また，フレマネズマブは非免疫性かつ可溶性（非細胞結合性）の標的に対する IgG2 アイソタイプであるため，サイトカイン放出のリスクは低いと考えられた。

2.4.4.7.3　溶血性試験

フレマネズマブの *in vitro* 血液適合性試験をヒト全血を用いて実施した（08GR369 試験）。フレマネズマブは，検討した最高濃度の 25.5 mg/mL まで血漿に対し溶血性を示さなかった。

2.4.5　総括及び結論

2.4.5.1　薬理試験の概要

フレマネズマブは，CGRP の 2 つのアイソフォーム（α-及び β-CGRP）が CGRP 受容体に結合するのを阻害する，強力な CGRP 結合物質である。フレマネズマブは CGRP に対し特異性が高く，同じファミリーに属する近縁のアミリン，カルシトニン，アドレノメデュリン及びインテルメジンとは結合しない。抗体のエフェクター機能を抑えるために，フレマネズマブの H 鎖定常部には 2 つの変異が導入されている。この機能喪失により，フレマネズマブが抗体依存性細胞傷害を促進したり，補体系を介した細胞溶解を誘発したりする作用（細胞溶解やオプソニン作用，サイトカイン放出及び炎症などを引き起こす傾向のある機能）が抑制される。実際，サイトカイン放出試験では，フレマネズマブはこのような活性を示さないことが示されている。

この CTD では，1 か月に少なくとも 4 日以上の片頭痛を呈する成人の予防薬としてのフレマネズマブの承認を目指している。本薬の治療活性の薬理学的裏付けは，片頭痛の病態生理における CGRP の明確な役割と，適切な片頭痛モデルと考えられる動物モデル（電気刺激による硬膜血流増大モデル及びカプサイシンによる皮膚の血管拡張モデル）で確認された作用に基づくものである。

この提出資料に示した開発プログラムで，フレマネズマブはヒト及びサルの CGRP に対して高い特異性を示し，その結合親和性は 2.2～9.5 pM であった。CGRP のアミノ酸配列はラットでも非常に類似しており，結合親和性は 740～889 pM であった。また，KinExA 法を用いて得られた結果から，ウサギも適切な動物種と考えられた。

フレマネズマブは，神経刺激又はカプサイシンによる複数の血管拡張モデルで，一貫して強力な血管拡張抑制活性を示し，サルのモデルではその活性は少なくとも 56 日間持続した。

したがって，これらの動物モデルはヒトでの治療活性を予測でき，かつ安全性の評価にも適切であると考えられた。

2.4.5.2　薬物動態試験の概要

複数の用量でフレマネズマブをラット及びカニクイザルに単回及び週 1 回反復投与し，薬物動態を検討した。薬物動態プロファイルは mAb に典型的なもので，V_{ss} の測定値は約 0.1 L/kg であり，組織への分布が小さいという特徴に一致していた。

フレマネズマブの $t_{1/2}$ はラットで 372～423 時間，サルで 253～260 時間であった。単回投与後の CL，V_{ss} 及び $t_{1/2}$ は，ラット及びサルとも，10～100 mg/kg の範囲でほとんど用量に依存しなかった。ラット及びサルの 3 ヵ月間試験で，反復投与後の TK の用量比例性についても検討したところ, ラット及びサルとも, 初回投与後の曝露量は用量に伴って線形に増加すると判断されたが, 反復投与後の曝露量の増加は用量に比例した割合を下回ると判断された。フレマネズマブの曝露量及び PK パラメータは，ラット及びサルのいずれでも性差は認められなかった。

フレマネズマブの長い $t_{1/2}$ という特徴から示唆される通り，iv 投与後は 1.8～3.7 倍，sc 投与後は 1.8 倍の累積が認められた。

ラット及びサルに sc 投与したときのフレマネズマブの絶対的バイオアベイラビリティはラットで 65%～67%，サルで 81%～92%であった。

結論として，フレマネズマブの薬物動態的挙動は mAb に典型的なもので，毒性試験で用いられた週 1 回の投与法は適切であったと考えられる。ヒトの $t_{1/2}$ は動物のものよりはるかに長いことから，月 1 回の投与法が支持される。

2.4.5.3　毒性試験の概要

ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験及びカニクイザルを用いた 6 ヵ月間慢性毒性試験で，フレマネズマブの安全性を確認した。試験では，iv 及び sc の両投与経路について，週 1 回の投与により検討した。生殖毒性試験としては，ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する試験，ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験，ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験，ラットを用いた PPND 試験及び幼若動物を用いた毒性試験を実施した。

遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかったが，これは関連ガイドラインに従ったものである。

毒性試験，並びにサルを用いた追加の独立した心血管系，呼吸器系及び中枢神経系の安全性試験には，安全性薬理の評価項目を含めた。これらの毒性及び安全性薬理試験で高用量（300 mg/kg/week まで）を単回投与，又は週 1 回，最長 6 ヵ月間反復投与した結果，投与に関連する所見は認められなかった。

ウサギを用いた EFD 試験では，妊娠ウサギにフレマネズマブを sc 投与したときの忍容性は良好で，いずれの用量でも母体毒性は誘発されなかった。また，いずれの用量でも胚・胎児に対する毒性を示す証拠は認められなかった。加えて，ラットを用いた受胎能及び EFD に関する複合試験が完了しているが，性周期，交尾行動，生殖能力，並びに胚・胎児の生存率及び発生には，検討したいずれの用量でも投与に関連する影響は認められなかった。さらに，ラットを用いた sc 投与による PPND 試験では，検討したいずれの用量でも投与に関連する所見は認められなかった。幼若ラットを用いた毒性試験では，投与期間を通じてフレマネズマブ投与による忍容性は良好で，剖検あるいは病理組織学的に投与部位に軽度の皮下水腫がみられたが毒性学的意義は低いと考えられた。

2.4.5.3.1　安全域の算出

各試験の NOAEL について，推奨用量 225 mg を月 1 回 sc 投与した被験者で測定された平均曝露量との比較により，安全域を算出した。安全域算出の基準として用いた臨床試験は第 I 相ブリッジング試験（TV48125-PK-10078 試験）で，この中で 225 mg と 675 mg の単回 sc 投与が行われた。本試験でフレマネズマブの血漿中濃度の測定に用いた生体試料分析法は，安全域を最も正確に求めることができるよう，最近開発され，バリデーションを行ったものである。

安全域の算出は，C_{max} と AUC の両方に基づいて行った。AUC に基づく安全域の算出では，ヒトと動物の投与方法の違い（それぞれ月 1 回投与と週 1 回投与）を考慮し，動物の AUC に 4 を乗じた。

臨床での投与方法の 1 つとして行われた負荷用量 675 mg の単回 sc 投与（CM 患者を対象とする第 III 相試験，TV48125-CNS-30049 試験）での C_{max} を評価するため，第 I 相ブリッジング試験（TV48125-PK-10078 試験）での 675 mg 単回 sc 投与後に測定された C_{max} との比較による安全域も算出した。

ラットの 3 ヵ月間試験の NOAEL である 300 mg/kg での AUC に基づく曝露量は，臨床推奨用量 225 mg（維持用量）を sc 投与した被験者での曝露量の 21 倍であり，C_{max} に基づいて算出した場合は，675 mg（負荷用量）単回 sc 投与による曝露量の約 14 倍であった。

サルの 6 ヵ月間試験の NOAEL である 300 mg/kg での AUC に基づいて算出すると，サルの曝露量は，臨床推奨用量 225 mg（維持用量）を sc 投与した被験者での曝露量の 158 倍であり，C_{max} に基づいて算出した場合は，675 mg（負荷用量）の単回 sc 投与による曝露量の 156 倍であった。

結論として，フレマネズマブの投与による忍容性は，すべての動物において，投与可能な最高用量まで良好であり，この最高用量での曝露量はヒトで意図されている曝露量よりもはるかに高かった。特定の標的器官に対する毒性は認められなかった。

2.4.5.3.2　免疫原性の概要

フレマネズマブはヒト化 mAb である。このため，動物への投与では免疫原性を示すことが予想される。

用いた ADA の検出法に特異性がなく，薬物耐性評価もなされていなかったことから，ラット及びサルの初期の試験について記載した ADA の結果は情報提供のみを意図するもので，解釈には注意を要する。ラットでは，1 ヵ月間及び 3 ヵ月間毒性試験で少数の試料が ADA 陽性であった。1 ヵ月間毒性試験では，スクリーニング試験で 8 匹が陽性であった。このうち，複数の時点で一貫して高い ADA 反応を示した動物は 2 匹のみであり，これらの動物では試験の最終測定時のフレマネズマブの曝露量が低かった。3 ヵ月間試験では，投与期間終了時の確認分析で投与動物 7 匹が陽性であった。これらの動物は高用量（300 mg/kg）の sc 投与群であり，iv 投与群の動物では一貫した反応は認められなかった。ADA が確認された sc 投与動物 2 匹では，フレマネズマブの曝露量の低下が認められた。サルでは，1 ヵ月間試験で 100 又は 300 mg/kg 投与動物の 20%で ADA が検出された。3 ヵ月間試験では，対照群で ADA 陽性反応を示す動物が高率に認められ，検査法の特異性に疑義が生じた。

2.4.3.1.2 項に記載したように，ブリッジング ELISA 法を用いて，サルの血清試料用として新たに改良した方法のバリデーションを行った。この方法のバリデーションでは，適切な選択性と CGRP（1200 ng/mL）に対して耐性があることが確認された。この新しい方法をサンプルの分析に用いた 6 ヵ月間毒性試験では，ADA の評価の結果，合計 5 匹の投与群の動物（中用量群の 8 匹中 3 匹及び高用量群の 12 匹中 2 匹）と 1 匹の対照群の動物から採取されたサンプルが陽性であることが示されたが，その力価は低かった。ADA 陽性動物において，曝露量に対する明らかな影響は認められなかった。

以上をまとめると，ラット及びサルとも，低い免疫原性応答が認められた。

本プログラムの免疫原性評価の結果は，動物での薬物動態並びに曝露量及び反応の経時変化を理解するうえで重要であるが，ヒトでの免疫原性の予測には適用できないため，フレマネズマブの臨床での免疫原性に関してはほとんど価値がない。

2.4.5.4　総括及び結論

これまで実施した非臨床試験により，フレマネズマブの CGRP 阻害剤としての有効性が適切な動物モデルを用いて確立された。フレマネズマブは，電気刺激による髄膜動脈の血流増加，又は

カプサイシン刺激による皮膚血管の血管拡張を，7 日間以上にわたって有効に抑制した。

薬理試験と探索的な安全性試験は GLP 準拠試験ではなかったが，信頼できる科学的方法を用いて実施した。

フレマネズマブの薬物動態プロファイルは，他のモノクローナル抗体のものと一致しており，すべての動物種において CL が低く，V_{ss} が小さく，$t_{1/2}$ が長かった。

安全性試験は GLP 準拠試験であり，曝露量の測定及び免疫原性の検出にはバリデーションされた方法を用いた。

本プログラムは，最新の ICH ガイドラインに従って実施した。

GLP 準拠試験に使用した被験物質は特性が十分に明らかな製剤であり，臨床試験で用いた臨床用ロットを代表する（詳細については 3.2.S.2.6 参照）。動物試験に用いた投与経路は，臨床で使用予定のものと同一であった。

非臨床安全性プログラムでは以下の所見が得られた。

- 一般毒性試験に加え，安全性薬理試験［サルの心血管系及び呼吸器系（呼吸数），ラットの中枢神経系及び呼吸器系］においても，器官系を阻害する可能性は認められなかった。
- ラット及びサルに投与したときの忍容性は良好で，週 1 回最長 6 ヵ月間の sc 投与，及び週 1 回最長 3 ヵ月間の iv 投与による試験において，特定の標的器官に対する毒性は認められなかった。
- 実施したいずれの毒性試験でも，高用量及び頻回の投与による死亡や一般状態の悪化は認められなかった。
- 6 ヵ月間反復投与慢性毒性試験の NOAEL は 300 mg/kg/week であり，すべての反復投与毒性試験で検討した最高用量であった。本用量における曝露量（AUC に基づく）は，患者に 225 mg を月 1 回 sc 投与したときに予想される曝露量の少なくとも 158 倍～232 倍であった。
- フレマネズマブの生殖毒性試験を行ったところ，受胎能並びに初期及び後期の胚・胎児発生に対する影響は，ラットで 200 mg/kg/week まで，ウサギで 100 mg/kg まで認められなかった。ラットを用いた PPND 試験でも投与に関連する影響は認められなかった。幼若ラットを用いた毒性試験では，投与期間を通じてフレマネズマブ投与による忍容性は良好で，投与部位に軽度の皮下水腫がみられのみであった。
- フレマネズマブ 150 mg/mL を 5 つの異なる経路で投与したとき，媒体対照と比較して，投与部位への反応は認められなかった。
- フレマネズマブは動物では弱い免疫原であると考えられる。ADA は投与したラット及びサルの一部でしか発現しなかったため，すべての反復投与毒性試験は問題なく完了した。

したがって，フレマネズマブは，*in vitro* 及び *in vivo* モデルの両方で頑健な薬理活性を示すと結論される。また，フレマネズマブの忍容性はすべての毒性試験を通じて良好であり，臨床曝露量に対して大きな安全域を示した。実験動物に長期間投与したとき，毒性学的な懸念は認められなかった。

2.4.6　付録

本項では，入力されていない eCTD モジュール 4 の項目のリスト，並びに該当する項の試験を実施しなかった根拠を示す。（表 3）

表 3 入力されていない eCTD モジュールの項

eCTD モジュール 4	**根拠**
4.2.1.2 副次的薬理試験	予想される CGRP 阻害の薬理作用に関して，モジュール 2.6.2 薬理試験の概要文に記載したモデル以外の動物モデルを用いた試験は行っていない。
4.2.1.4 薬力学的薬物相互作用試験	フレマネズマブの薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。予想される薬力学的 DDI の特性は，主に第 III 相臨床試験で明らかにした。フレマネズマブの臨床プログラムでは，急性期治療薬又は予防薬との併用を認めている。このため，片頭痛患者の関連する臨床データを生成することができた。これらのデータは CTD の臨床の項に示してある。
4.2.2.3 分布	一般的に，血漿タンパク結合試験及び組織分布試験は，フレマネズマブのような生物学的製剤ではなく，低分子薬について実施されている。ラット及びサルにおけるフレマネズマブの Vss は小さい（両種とも 0.09～0.14 L/kg）。これは，一般的に血漿量と同程度かやや大きいと予想される IgG2 の限定的な分布と一致している [18,19]。
4.2.2.4 代謝	ICH S6(R1)ガイドラインに従い，フレマネズマブを用いた代謝試験は実施していない。他の抗体医薬と同様に，フレマネズマブは異化作用を通じて代謝され，低分子ペプチド及び各構成アミノ酸に分解されると考えられる。この作用は十分に解明されている。
4.2.2.5 排泄	フレマネズマブは分子量が大きいため，未変化体が腎排泄される可能性は低い [18]。さらに，フレマネズマブは，タンパク質の加水分解及び既知の代謝経路である異化作用によって分解され，その分解生成物が排泄される。このため，非臨床動物種を用いたフレマネズマブの排泄試験は実施していない。
4.2.3.3 遺伝毒性試験 4.2.3.3.1 *In vitro* 試験 4.2.3.3.2 *In vivo* 試験（トキシコキネティクスの評価を含む）	高分子の治療用抗体が DNA 又はほかの染色体成分に直接相互作用すると考えられていない。 ICH S6 (R1)ガイドラインでは，通常実施されてきた遺伝毒性試験の範囲と種類はバイオテクノロジー応用医薬品には適切ではないとしている。このため，フレマネズマブの遺伝毒性試験は実施していない。

eCTD モジュール 4	根拠
4.2.3.4 がん原性試験（トキシコキネティクスの評価を含む） 4.2.3.4.1 長期がん原性試験（動物種順に；用量設定試験も含む，ただし，反復投与毒性試験又は薬物動態試験で行われたものは除く） 4.2.3.4.2 短期又は中期がん原性試験（用量設定試験も含む，ただし，反復投与毒性試験又は薬物動態試験で行われたものは除く） 4.2.3.4.3 その他の試験	ICH S6 (R1)ガイドラインでは，標準的ながん原性試験は，フレマネズマブのような mAb を含むバイオテクノロジー応用医薬品には一般的に適切ではないとしている。このため，がん原性試験は実施していない。
4.2.3.7.1 抗原性試験	該当しない。詳細な免疫毒性学的評価は CTD に記載されている。
4.2.3.7.3 毒性発現の機序に関する試験（他項に含まれていない場合）	フレマネズマブの毒性発現の機序に関する試験は実施していない。これは，毒性又は安全性に関する懸念が製品開発期間に特定されなかったためである。
4.2.3.7.4 依存性試験	フレマネズマブは mAb である。このため中枢神経系に移行するとは考えにくい。さらに，依存性の可能性を示す禁断症状は，ラット（例：Irwin 試験）及びサル（一般毒性試験）の両動物種で認められなかった。このため，依存性試験は実施していない。
4.2.3.7.5 代謝物の毒性試験	代謝物の毒性試験は実施していない。バイオテクノロジー応用医薬品は，代謝によって低分子ペプチド及び各構成アミノ酸に分解されると考えられる。バイオテクノロジー応用医薬品の代謝経路は概ね理解されているため，詳細な試験は必要ない。
4.2.3.7.6 不純物の毒性試験	フレマネズマブは遺伝子組換え mAb であり，曝露限界閾値を上回る溶出物及び浸出物（モジュール 3.2.P.2.4 参照），又は元素不純物（モジュール 3.2.P.5.5 参照）は特定されなかった。このため，不純物に関する試験は実施していない。

2.4.7 参考文献

1 Eftekhari S, Edvinsson L. Possible sites of action of the new calcitonin gene-related peptide receptor antagonists. Ther Adv Neurol Disord. 2010;3(6):369-78.

2 Olesen J. CGRP in Migraine. Cephalalgia 2011;31(5):638.

3 Ho TW, Edvinsson L, Goadsby PJ. CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. Nat Rev Neurol. 2010;6(10):573-82.

4 Mitsikostas DD, Rapoport AM. New players in the preventive treatment of migraine. BMC Med. 2015;13:279.

5 Giamberardino MA, Affaitati G, Curto M, Negro A, Costantini R, Martelletti P. Anti-CGRP monoclonal antibodies in migraine: current perspectives. Intern Emerg Med 2016;11:1045-57.

6 ICH Topic S6(R1) - Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals June 2011. Available from:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S6_R1/Step4/S6_R1_Guideline.pdf

7 ICH Topic M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. June 2009. Available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2__Guideline.pdf

8 Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. Cephalalgia 2002;22(1):54-61.

9 Ho TW, Ferrari MD, Dodick DW, Galet V, Kost J, Fan X, et al. Efficacy and tolerability of MK-0974 (telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: a randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial. Lancet 2008 Dec 20;372(9656):2115-23.

10 Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, et al; BIBN 4096 BS Clinical Proof of Concept Study Group. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. N Engl J Med 2004 Mar 11;350(11):1104-10.

11 Van der Schueren BJ, de Hoon JN, Vanmolkot FH, Van Hecken A, Depre M, Kane SA, et al. Reproducibility of the capsaicin-induced dermal blood flow response as assessed by laser Doppler perfusion imaging. Br J Clin Pharmacol 2007 Nov;64(5):580-90.

12 Lu JT, Son YJ, Lee J, Jetton TL, Shiota M, Moscoso L, Niswender KD, Loewy AD, Magnuson MA, Sanes JR, Emeson RB. Mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide exhibit normal cardiovascular regulation and neuromuscular development. Mol Cell Neurosci. 1999;14(2):99-120.

13 Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 2014;94(4):1099-142.

14 Lynch JJ, Shen YT, Pittman TJ, Anderson KD, Koblan KS, Gould RJ, et al. Effects of the prototype serotonin 5-HT(1B/1D) receptor agonist sumatriptan and the calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonist CGRP(8-37) on myocardial reactive hyperemic response in conscious dogs. Eur J Pharmacol 2009 Nov 25;623(1-3):96-102.

15 Chaitman BR, Ho AP, Behm MO, Rowe JF, Palcza JS, Laethem T, et al. A randomized, placebo controlled study of the effects of telcagepant on exercise time in patients with stable angina. Clin Pharmacol Ther 2012;91:459-66.

16 Van der Schueren BJ, Blanchard R, Murphy MG, Palcza J, De Lepeleire I, Van Hecken A, et al. The potent calcitonin gene-related peptide receptor antagonist, telcagepant, does not affect nitroglycerin-induced vasodilation in healthy men. Br J Clin Pharmacol 2011 May;71(5):708-17.

17 Vargas HM, Bass AS, Breidenbach A, Feldman HS, Gintant GA, Harmer AR, et al. Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics. J Pharmacol Toxicol Methods 2008;58(2):72-6.

18 Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. J Pharm Sci. 2004;93(11):2645-68.

19 Mascelli MA, Zhou H, Sweet R, Getsy J, Davis HM, Graham M, et al. Molecular, biologic, and pharmacokinetic properties of monoclonal antibodies: impact of these parameters on early clinical development. J Clin Pharmacol. 2007;47(5):553-65.

[20] Hubbard JJ, Laurenzana EM,Williams DK, Gentry WB, Owens SM. The fate and function of therapeutic antiaddiction monoclonal antibodies across the reproductive cycle of rats. J Pharm Exp Ther 2011;336(2):414-22.

[21] Tabrizi MA, Tseng CM, Roskos LK. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. Drug Discov Today 2006;11(1-2):81-8.

[22] Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use, FDA, 1997 (PTC 1997). Available from: http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/OtherRecommendationsforManufacturers/UCM153182.pdf.

[23] Gon G, Giaid A, Steel JH, O'Halloran DJ, Van Noorden S, Ghatei MA, et al. Localization of immunoreactivity for calcitonin gene-related peptide in the rat anterior pituitary during ontogeny and gonadal steroid manipulations and detection of its messenger ribonucleic acid. Endocrinology 1990 Dec;127(6):2618-29.