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）

2.6.1 緒言

大塚製薬株式会社

目次

目次 2
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 3
2.6.1 緒言 3
2.6.1.1 名称及び化学構造式 3
2.6.1.2 フレマネズマブ（遺伝子組換え）の薬理作用 4
2.6.1.3 アジョビ皮下注 225 mg シリンジの予定する効能・効果及び用法・用量 4

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

フレマネズマブは，強力かつ選択的にカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）と結合し，CGRP の両異性体（α-及び β-CGRP）と CGRP 受容体との結合を阻害する。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。

フレマネズマブを作製するにあたり，2 つの変異を Fab の重鎖可変領域に導入して結合性を向上させた。さらに，抗体の Fc 領域のエフェクター機能を制限するため，フレマネズマブの重鎖定常部に 2 つの変異を導入した。この機能喪失変異は，フレマネズマブが抗体依存性細胞傷害作用を活性化せず，補体系を介した細胞溶解を惹起しないように設計された。

反復投与毒性試験に使用したフレマネズマブ製剤のすべてのロットは，第 I 相及び第 II 相の工程の材料を用いて生産された。解析データが一致することから判断すると，第 III 相の材料は非臨床試験並びに第 I 相及び第 II 相試験用に生産された材料と同等である。

トキシコキネティクス評価により，本抗体の消失半減期が長いことを確認し，投与方法は適切であることが裏付けられた。また動物試験における本剤の曝露量が確認された。

ICH S6（R1）及び M3（R2）ガイドラインに準拠した一連の毒性試験を実施した。これにはサルを用いた慢性（6 ヵ月間）毒性試験，安全性薬理試験（心血管系の評価に加え呼吸器系及び中枢神経系も評価），生殖毒性試験が含まれる。静脈内及び皮下以外の投与経路によるウサギの局所刺激性試験も実施した。

試験は GLP に準拠し，バリデートされた生物学的分析方法を用いて血漿中薬物濃度の定量及び抗薬物抗体の検出を行った。

上記の試験の結果から，フレマネズマブが適切な動物モデルにおいて有効であり，安全性に関する特別な問題は特定されなかったことが示されている。総括すると，一連の非臨床試験から臨床使用に関する懸念は示されなかった。

2.6.1.1　名称及び化学構造式

フレマネズマブの名称及び化学構造式は以下のとおりである。

一般名：　INN　Fremanezumab

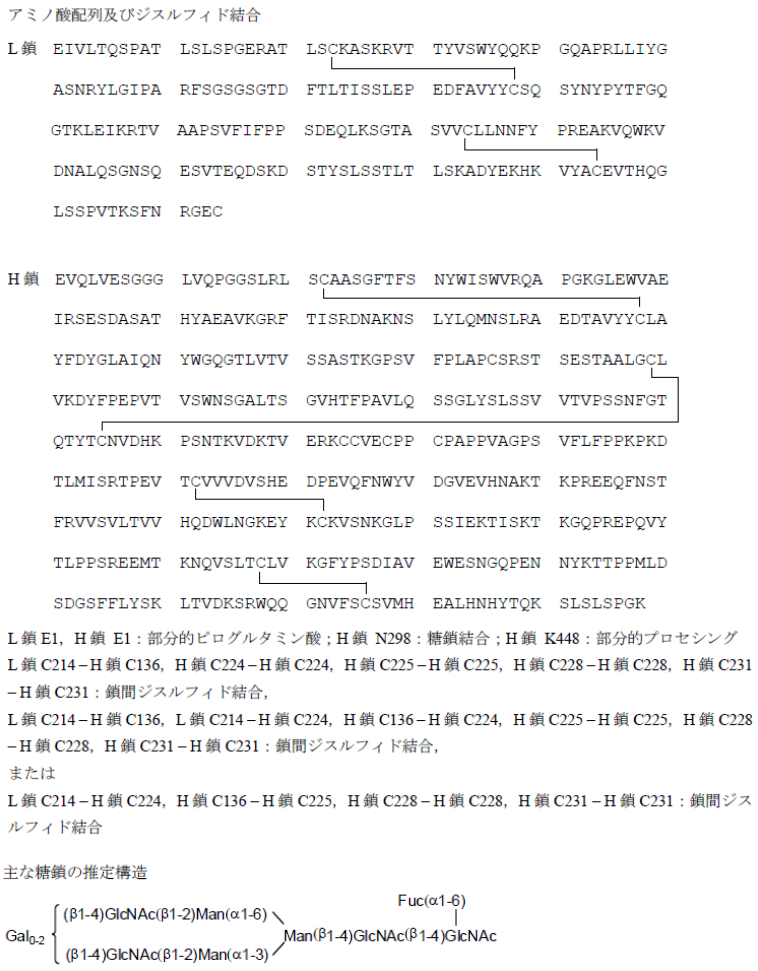
　　JAN　フレマネズマブ（遺伝子組換え）（日本名）

　　Fremanezumab (genetic recombination)（英名）

CAS 登録番号：1655501-53-3

コード番号：N02CD03

構造式（本質）：フレマネズマブは，遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体であり，マウス抗ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）抗体の相補性決定部，ヒトフレームワーク部及びヒト IgG2 の定常部からなる。H 鎖の Ala331 及び Pro332 がそれぞれ Ser に置換されている。フレマネズマブは，チャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される。フレマネズマブは，448 個のアミノ酸残基からなる H 鎖（γ2 鎖）2 本及び 214 個のアミノ酸残基からなる L 鎖（κ 鎖）2 本で構成される糖タンパク質（分子量：約 148,000）である。



L鎖E1，H鎖 E1：部分的ピログルタミン酸；H鎖 N298：糖鎖結合；H鎖 K448：部分的プロセシング
L鎖C214－H鎖C136，H鎖C224－H鎖C224，H鎖C225－H鎖C225，H鎖C228－H鎖C228，H鎖C231－H鎖C231：鎖間ジスルフィド結合，
L鎖C214－H鎖C136，L鎖C214－H鎖C224，H鎖C136－H鎖C224，H鎖C225－H鎖C225，H鎖C228－H鎖C228，H鎖C231－H鎖C231：鎖間ジスルフィド結合，
または
L鎖C214－H鎖C224，H鎖C136－H鎖C225，H鎖C228－H鎖C228，H鎖C231－H鎖C231：鎖間ジスルフィド結合

主な糖鎖の推定構造

分子式：$C_{6470}H_{9952}N_{1716}O_{2016}S_{46}$（タンパク質部分）

2.6.1.2　フレマネズマブ（遺伝子組換え）の薬理作用

フレマネズマブ（遺伝子組換え）は，カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）に選択的に結合し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ヒト化モノクローナル抗体である。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カニクイザルに対し，フレマネズマブ（遺伝子組換え）は，血管拡張及び血流量増加を抑制した。

2.6.1.3　アジョビ皮下注 225 mg シリンジの予定する効能・効果及び用法・用量

アジョビ皮下注 225 mg シリンジの予定する効能・効果及び用法・用量を表 2.6.1-1 に示した。

表 2.6.1-1　アジョビ皮下注 225 mg シリンジの予定する効能・効果及び用法・用量

効能・効果	片頭痛発作の発症抑制
用法・用量	通常，成人にはフレマネズマブ（遺伝子組換え）として4週間に1回225 mgを皮下投与する，又は12週間に1回675 mgを皮下投与する。

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）

2.6.2 薬理試験の概要文

大塚製薬株式会社

目次

目次.....2
略号一覧.....3
2.6.2 薬理試験の概要文.....4
2.6.2.1 まとめ.....4
2.6.2.1.1 効力を裏付ける *in vitro* 試験.....5
2.6.2.1.2 効力を裏付ける *in vivo* 試験.....7
2.6.2.2 副次的薬理試験.....10
2.6.2.3 安全性薬理試験.....11
2.6.2.3.1 *In vitro* 安全性薬理試験.....12
2.6.2.3.2 *In vivo* 安全性薬理試験.....12
2.6.2.4 薬力学的薬物相互作用試験.....15
2.6.2.5 その他の試験.....15
2.6.2.6 考察及び結論.....15
2.6.2.7 引用文献.....16

略号一覧

略号	省略していない表現
$5\text{-}HT_{1B/D}$	5-ヒドロキシトリプタミン 1B/D 受容体
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
CRLR	カルシトニン受容体様受容体
C_{max}	最高血漿中濃度
ECG	心電図
EC_{50}	50%効果濃度
ED_{50}	50%有効量
FcγR	Fcγ 受容体
GLP	医薬品の安全性試験の実施に関する基準
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	50%阻害濃度
IgG	免疫グロブリン G
iv	静脈内
K_D	平衡解離定数
KinExA	結合平衡除外法
KLH	キーホールリンペットヘモシアニン
mAb	モノクローナル抗体
NOAEL	無毒性量
PR	房室結節遅延
RAMP1	受容体活性調節蛋白 1
sc	皮下

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

フレマネズマブ（開発コード TEV-48125，別名 PF-04427429，RN307，LBR-101）は，マウス前駆体由来のヒト化 IgG2Δa κ mAb である。本剤は，CGRP の 2 つのアイソフォーム（α-及び β-CGRP）に結合して，これらが CGRP 受容体に結合するのを阻害する，強力かつ選択的な CGRP 抗体である。

本剤は CGRP に特異性を示し，近縁のファミリーペプチドであるアミリン，カルシトニン，インテルメジン，アドレノメデュリンには結合しない。抗体のエフェクター機能を抑えるために，H 鎖定常部には 2 つの変異（A330S 及び P331S）が導入されている [1]。これらの機能喪失型変異は，フレマネズマブが抗体依存性細胞傷害の促進や補体系を介した細胞溶解の誘発等を抑えるために導入されている。これらの作用が生じると，細胞溶解やオプソニン化，サイトカイン放出，炎症といった好ましくない事象を引き起こす可能性がある。

片頭痛の病態生理に CGRP が重要な役割を果たしていることはよく知られている。CGRP は，三叉神経終末及び三叉神経節に広範に分布している [2,3]。末梢（血液脳関門の外側）で CGRP が放出されると，血管拡張や神経性の炎症が生じる [4,5]。中枢シナプスでは，CGRP が痛みの伝達の調節に関与している [3,4]。したがって，CGRP が末梢での片頭痛発症と中枢での片頭痛の調節の両面で，重要な役割を担っていることが示唆されている [3,4]。

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 [6]。

ヒトを対象とした試験の結果からは，片頭痛の病態生理に CGRP 系が一定の役割を果たしていることが示されている。ヒトの三叉神経血管系では，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。この CGRP は硬膜血管系で，硬膜血管を拡張させ，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 [7]。三叉神経系の末梢神経節で CGRP をブロックすることで，三叉神経系の一次及び二次ニューロンの脱感作が生じると考えられる。

In vitro のデータでは，フレマネズマブは CGRP の C 末端に結合して CGRP 受容体との相互作用を妨げ，生理機能を阻害することが示されている。ヒト及び同一アミノ酸配列を持つカニクイザルの CGRP に対する本剤の結合親和性はピコモル単位で 1 桁台であり，ウサギ及びラットの CGRP に対する親和性はより低い（500～800 pM 程度）（表 2.6.2.1-1 参照）。近縁のファミリーペプチドであるアミリン，カルシトニン，インテルメジン及びアドレノメデュリンには結合しない。フレマネズマブは，CGRP による細胞内 cAMP 量の増加を機能的に阻害することがセルベースアッセイで確認されている。

表 2.6.2.1-1　　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	gcntatcvth rlagllsrsg gmvksnfvpt nvgseaf	537 pM

[a] 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。ヒトとサル間での α-CGRP のアミノ酸配列の同一性は，Uniprot よりヒト[Entry ID P06881 (CALCA_HUMAN)]及びサル[Entry ID A0A2K2K5VW77 (A0A2K5VW77_MACFA)]の情報を取得し確認した。UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. Nucleic Acids Res. 47: D506-515 (2019)

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を用いて，ラット又はカニクイザルで CGRP による血管拡張又は皮膚血流量増加を誘導した。これらのモデルを用いて，*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。試験の結果は以下のとおりである。

- 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。
- 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。
- 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。

このほか，後述する動物モデルもフレマネズマブが片頭痛症状を軽減する可能性を示している。

フレマネズマブの安全性薬理パラメータは，カニクイザルを用いた主要毒性試験，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。1 ヵ月間及び 3 ヵ月間の毒性試験では，心電図及び心拍数に投与と関連した変化はみられなかった。フレマネズマブ 100 mg/kg を単回 iv 投与したとき，サルの心血管系パラメータ及び体温に変化は生じなかった。また，中枢神経系及び呼吸系への影響の可能性について検討するために，最高 300 mg/kg をラットに投与する独立した単回投与安全性薬理試験を 2 試験実施した。これらの試験のデータから，フレマネズマブは 300 mg/kg までの用量で中枢神経系及び呼吸系に影響を及ぼさないことが示され，NOAEL は高用量の 300 mg/kg であると判断された。

2.6.2.1.1　　効力を裏付ける *in vitro* 試験

In vitro 試験における，フレマネズマブの CGRP に対する結合性は以下のとおりである。

- フレマネズマブは CGRP の C 末端に選択的に結合して，CGRP と CGRP 受容体との結合相互作用を阻害した。
- セルベースアッセイにおいて，フレマネズマブはラット及びヒトの α-及び β-CGRP に高い親和性で結合し，CGRP と CGRP 受容体との結合による cAMP 産生を阻害した。

2.6.2.1.1.1　CGRP 受容体との結合阻害作用

（概要表 2.6.3.1，報告書番号 DPR-2017-039，100516，DPR-2017-023，DPR-2017-036）

フレマネズマブは CGRP に高い特異性を示し，近縁のファミリーメンバーであるアミリン，カルシトニン，アドレノメデュリン及びインテルメジンには結合しない。動態解析において，アドレノメデュリンとは一過性の弱い相互作用が認められたが，親和性は極めて低く［K_D>2 μM］，特異的な相互作用ではないと考えられる（DPR-2017-039 試験）。CGRP のアラニンスキャニング変異導入解析では，CGRP の 33 位及び 37 位の点突然変異（G33A 及び F37A）によってフレマネズマブに対する親和性が著しく低下することから，フレマネズマブの結合エピトープには C 末端の最後の 5 つのアミノ酸が含まれることが確認された。ほかの関連ペプチドと比較して，CGRP に対するフレマネズマブの親和性及び選択性には，C 末端のアミノ酸がアミド化されたフェニルアラニンであることが重要であった（100516 試験）。このエピトープは，ヒト CGRP の C 末端に位置する 9 個のアミノ酸から成るペプチドとフレマネズマブとの複合体の共結晶構造解析で確認されており，この解析からフレマネズマブと抗原の間に生じるタンパク質間相互作用のインターフェースが完全に明らかになっている（DPR-2017-023 試験）。

フレマネズマブはヒト α-CGRP, ヒト β-CGRP 及びラット β-CGRP にほぼ同等の高い親和性で結合し（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）ことが表面プラズモン共鳴法による解析で示されている（100516 試験）。別の解析法である KinExA では，ヒト，ラット及びウサギの α-CGRP に対する K_D は，それぞれ 2.2，889 及び 537 pM であった（DPR-2017-036 試験）。前述の試験では結合親和性について複数の計算例が報告されており（表 2.6.2.1-1），親和性の数値には幅がある。これは一般的なことで，試験法の違い［装置の種類，試験法，試験デザイン，タンパク質のロット，タンパク質の種類（抗体全体か Fab かなど）及び温度等が含まれる］を反映している。報告された数値の例は，いずれも典型的な一次結合･解離動態を示しており，フレマネズマブが特異的抗原である α-CGRP 及び β-CGRP に対して高い親和性で結合する特性を持つことが示された。

2.6.2.1.1.2　CGRP 受容体への結合阻害作用及び cAMP 産生阻害作用

（概要表 2.6.3.1，報告書番号 092905）

ヒト ^{125}I-α-CGRP とヒト CGRP1 受容体との結合をフレマネズマブが阻害するか否か検討した。フレマネズマブは濃度依存的にこれらの結合を阻害し，その IC_{50} は 18.9±8.2 nM（平均値±標準誤差，以下同様）であった。

また，α-CGRP の結合による CGRP 受容体シグナル伝達に対する本薬の阻害効果を検討するために，ヒト細胞株（SK-N-MC）およびラット細胞株（L6）を用いて，受容体活性化による cAMP 産生に対する作用を検討した。フレマネズマブは α-CGRP に結合し，CGRP 受容体活性化による cAMP 産生を阻害した。ヒト細胞株における EC_{50} は 71±19.6 nM，ラット細胞株における EC_{50} は 102.2±38.8 nM であり，同程度の阻害作用であった。

2.6.2.1.2　効力を裏付ける *in vivo* 試験

2.6.2.1.2.1　神経性血管拡張及び血流量増加阻害作用

（概要表 2.6.3.1，報告書番号 121930，121231，8225-772）

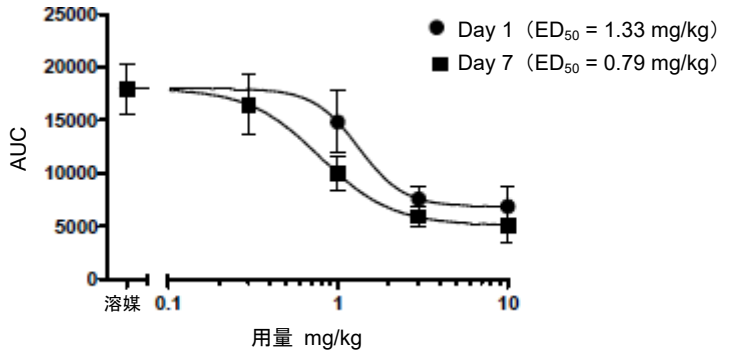
目的：神経への電気刺激又は皮膚へのカプサイシン塗布による神経性血管拡張動物モデルを用いて，ラット又はカニクイザルに CGRP による血管拡張亢進又は皮膚血流量増加を誘導した。これらのモデルを用いて，*in vivo* におけるフレマネズマブの血管拡張及び血流量増加の阻害能を検討する。

2.6.2.1.2.2　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（報告書番号 121930）

方法：フレマネズマブ 0.3，1，3，10 mg/kg を単回投与したラットを用いて，1 及び 7 日後に伏在神経を電気刺激し足皮膚の血流量を測定した。

成績: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 ED_{50} は，それぞれ 1.3 mg/kg 及び 0.8 mg/kg であった（121930 試験）。

図 2.6.2-1　投与後 1 及び 7 日のフレマネズマブによる皮膚神経性発赤の抑制



各種用量のフレマネズマブを静脈内投与した（1 mL/kg）。溶媒は PBS + 0.01% Tween 20。
Day1 溶媒；n=32，1mg/kg；n=9，3mg/kg；n=9，10mg/kg；n=5
Day7 溶媒；n=32，0.3mg/kg；n=8，1mg/kg；n=11，3mg/kg；n=10，10mg/kg；n=5,
AUC は任意の Doppler flux units の変化に時間を乗じ算出した。
Graph Pad Prism を用いて非線形回帰で ED_{50} 値を推定した。

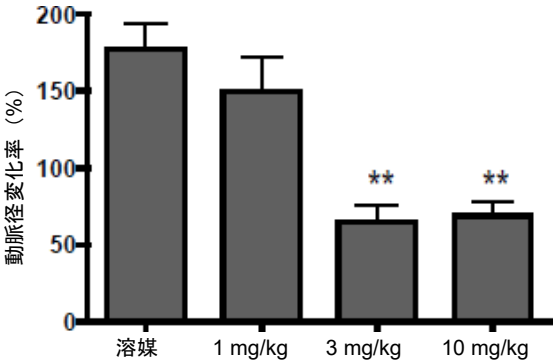
2.6.2.1.2.3　閉鎖式頭窓（CCW）を設けたラットを用いる PF-04427429（RN307）による神経性血管拡張の抑制の測定（報告書番号 121231）

方法：CCW 処置したラットにフレマネズマブ 1，3，10 mg/kg を単回投与し， 7 日後に硬膜表面の電気刺激による中硬膜動脈径の拡大を測定した。

成績：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，単回静脈内投与後 7

日に最大効果が認められた（121231 試験）。

図 2.6.2-2　　フレマネズマブによる中硬膜動脈径拡大の長期的な抑制



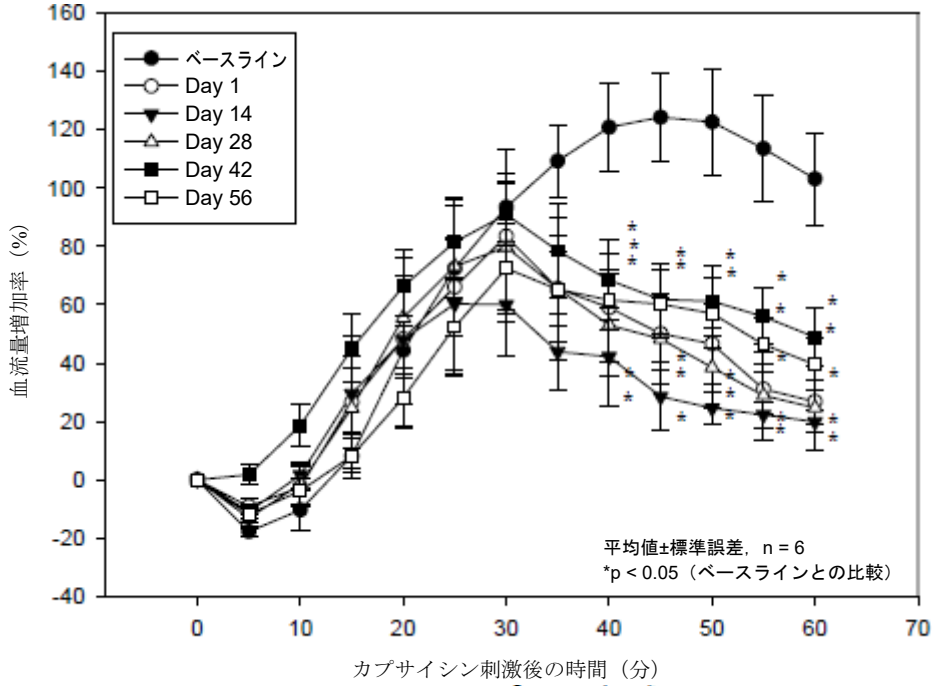
フレマネズマブは電気刺激後の中硬膜動脈径の拡大を長期にわたって抑制することが示された。投与後 7 日の中硬膜動脈の直径拡大の抑制。**p = 0.01（溶媒との比較，ANOVA 後，Dunnett 検定）
平均値±標準誤差，溶媒；n=8，1mg/kg；n=6，3mg/kg；n=6，10mg/kg；n=7。

2.6.2.1.2.4　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（報告書番号 8225-772）

方法：フレマネズマブ 1，10 又は 100 mg/kg をカニクイザルに単回静脈内ボーラス投与し，1，14，28，42 及び 56 日後にカプサイシン刺激による前腕皮膚の血流増加を測定した。

成績：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。

図 2.6.2-3　　エタノール・カプサイシン刺激による発赤反応の経時的変化：フレマネズマブ 10 mg/kg



繰り返し測定の分散分析後，時点ごとに pairwise 比較検定

結論：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ラット又はカニクイザルの神経性血管拡張動物モデルを用いて，CGRP による血管拡張亢進又は皮膚血流量増加を誘導した。これらのモデルに対し，フレマネズマブ投与は，*in vivo* における血管拡張及び血流量増加を抑制した。

2.6.2.1.2.5　アロディニア（片頭痛の一般的症状の 1 つ）の抑制作用

（概要表 2.6.3.1，報告書番号 DPR-2017-038，DPR-2017-037）

目的：げっ歯類に片頭痛誘因を投与して誘導したアロディニア（片頭痛の一般的症状の 1 つ）の抑制に対するフレマネズマブの有効性を検討する。

2.6.2.1.2.6　ストレス又は一酸化窒素により誘発したげっ歯類の薬物乱用頭痛に対するカルシトニン遺伝子関連ペプチド抗体の抑制効果

方法：低分子薬（モルヒネ又はスマトリプタン）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。適切なウォッシュアウト期間後，抗 CGRP 抗体のフレマネズマブ 30 mg/kg を前投与し，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）を与えた際の皮膚アロディニアに対する影響を検討した。

成績：抗 CGRP 抗体のフレマネズマブ 30 mg/kg を前投与した群では，溶媒又は対照の CGRP に結合しないアイソタイプ抗体投与群と比較し，片頭痛誘因による皮膚アロディニアが抑制された。

2.6.2.1.2.7　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

方法：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。

成績：抗 CGRP 抗体は，片頭痛誘因が誘発する脳過敏症及び条件付け場所嗜好性の軽減に有効であった。

結論　げっ歯類に片頭痛誘因を投与して誘導したアロディニアの抑制にフレマネズマブは有効性を示した。

2.6.2.2　副次的薬理試験

予想される CGRP 阻害の薬理作用に関して，2.6.2.1.2 項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。

強力な血管拡張作用を有する CGRP が，妊娠や創傷治癒などの生理的過程に作用するおそれがあるため，CGRP が妊娠及び創傷治癒に対する副次的薬理作用の可能性を評価した。

妊娠：

CGRP の血中濃度は，ヒト[8]及びラット[9]の妊娠期間に著しく高くなる。

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（すなわちインターメジン）の作用も阻害すると考えられていることである。さらに，$CGRP_{8-37}$ は CGRP1 受容体に対する拮抗作用を有するだけでなく，その他の CGRP ファミリーのメンバーの受容体にも影響を及ぼす[10]。また，α-CGRP 欠損マウスは生存可能で繁殖能力があり，正常胎児が発育する[11]。

カルシトニンファミリーの 5 つのすべての神経ペプチド［カルシトニン，アミリン，CGRP，アドレノメデュリン及びインテルメジン/アドレノメデュリン 2］は，胎盤及び胎児発生に関与すると考えられている。これらのペプチドのうち，アドレノメデュリン及びインテルメジンの関与を強く示す証拠があるが，これらが果たす役割が完全に解明されているわけではない。いくつかの公表論文では，これらのペプチドが正常な妊娠期間に変動し，胎盤細胞の分化と増殖を誘導することが報告されている。また，CGRP，アドレノメデュリン及びインテルメジンに対する子宮動脈の血管感受性が増大することから，これらのペプチドが関与する可能性が示唆される[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合い，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。

これに加え，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。簡潔にはフレマネズマブを生殖発生毒性試験で評価したところ，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。

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 ノックアウトマウスモデルでは，創傷治癒遅延が認められている。

ラット skin flap モデルでは，CGRP の iv 投与後に血流量及び皮膚組織生着率が共に増加し，正常な創傷治癒過程が CGRP を含む感覚神経の早期再生と関連していた[13,14]。CGRP を老齢ラットの創傷部位に外用的に投与すると，創傷治癒を促進させることが認められた[15]。また，げっ歯類における皮下の筋を含む skin flap モデルでは，CGRP の iv 投与によって皮膚組織生着率及び血流

が増加した[13]。さらに，CGRP ノックアウトマウス[16]，RAMP1（CGRP 受容体の構成要素）ノックアウトマウス[17]及び CGRP 受容体拮抗薬（$CGRP_{8-37}$）投与マウス[16]を用いた試験では，創傷治癒遅延も認められている。ただし，上記のノックアウト動物モデルの動物は正常に CGRP シグナルが伝達されることがないため，これらのデータの解釈には注意を要する。

CGRP がケラチノサイトの増殖を促進する証拠があることから，CGRP そのものが皮膚の直接的な再生を促進させる可能性もある。損傷させたヒト皮膚の移植片において，CGRP がヒト皮膚線維芽細胞からヒト皮膚筋線維芽細胞への増殖，接着及び分化を促進した[18]。CGRP は，ケラチノサイトを増殖させ[19]，ひっかき損傷評価系においてヒト気管支上皮細胞の再生を促進した[20]。

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，フレマネズマブの投与対象となる患者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：

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，完了した生殖毒性試験のデータパッケージでは，フレマネズマブによる毒性はみられていない。

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。

ただし，CGRP の阻害による臨床的な影響及び妊娠及び創傷治癒への影響に関する情報が少ないことを認識している。片頭痛患者集団は，健康な患者のほかに若年患者で主に構成されており，さらに妊娠可能な女性も含まれている。このため，市販後安全性試験を実施し，CGRP の阻害によって妊娠期間に生じるおそれのある影響を判断する。

2.6.2.3　安全性薬理試験

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 が血圧に及ぼす影響に大きく注目される。種々の 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いる。この特性は，片頭痛治療のもう 1 つの標的クラスであり，やはり血管拡張により作用すると考えられる $5\text{-}HT_{1B/D}$ 受容体アゴニストでみられた特性とは対照的である。文献レビューでは，CGRP アンタゴニストの投与は虚血状態のイヌの冠動脈に影響を及ぼさなかったが，$5\text{-}HT_{1B/D}$ 受容体アゴニストを投与すると梗塞領域が拡大した[21]。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も影響しないと考えられた[22,23]。

2.6.2.3.1 *In vitro* 安全性薬理試験

フレマネズマブの *in vitro* hERG 試験は実施していない。入手可能な文献データによれば，一般に 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は非常に低いため，その標的特異的結合特性を考慮すると，mAb が hERG チャネル活性を阻害することは考えられない。さらに，mAb は細胞膜を通過できない大分子（>140,000 Da）であるため，一般的な低分子薬とは異なり，細胞内に位置する hERG チャネルポアにアクセスしてこれをブロックすることはできないと考えられる [24]。

2.6.2.3.2 *In vivo* 安全性薬理試験

ICH ガイドライン [25]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，主要毒性試験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を評価するため 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するために iv 投与を用いた。これらの試験の結果に基づけば，フレマネズマブが心血管系機能に生物学的に重要な変化を引き起こすことはないと考えられた。

フレマネズマブが中枢神経系や呼吸系に及ぼす影響の評価に限定した試験をラットを用いて実施した。これらの試験において，中枢神経系及び呼吸系機能にフレマネズマブによる影響は確認されなかった。この結果は，一般毒性試験の観察結果とも一致した。

2.6.2.3.2.1 心血管系に及ぼす影響

（概要表 2.6.3.4，報告書番号 08GR358, DS-2015-010）

心血管系試験（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，最初に溶媒を iv 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 投与した。すべての動物について，溶媒又は被験物質投与前約 1 時間から投与後約 22 時間まで，テレメトリーにより心電図，血圧及び活動データ（全身動脈収縮期血圧，拡張期血圧，平均血圧，心拍数，RR 間隔，PR 間隔，QRS 間隔及び QT 間隔を含む）を継続的に記録した。また，すべての動物について，フレマネズマブ投与日を Day 1 として，Day 3，7，10 及び 14 に約 23 時間連続のテレメトリー・データを記録した。Day 1，3，7，10 及び 14 には，投与後 4 時間にあたる時刻に深部体温及びフレマネズマブの全身曝露量も測定した。フレマネズマブ 100 mg/kg の単回 iv 投与後に認められた血圧低下は溶媒投与と比較して統計的に有意であったが，記録された低下はいずれも 5 mm Hg 以下であり，生物学的に重要なものとは考えられなかった。さらに，測定したほかのパラメータに生物学的に重要と考えられる変化はみられなかった。フレマネズマブ 100 mg/kg を単回 iv 投与したとき，明らかな所見は認められなかった。

フレマネズマブ 100 mg/kg を単回 iv 投与したとき，心電図及び血圧パラメータの平均値には軽微な変化しかみられなかった。フレマネズマブの血清中濃度は iv 投与の直後に最大となると考えられるが，観察された最大の影響は予想される最高血中濃度到達時間と一致しない。したがって，これらのデータからは，フレマネズマブが心電図及び血行動態パラメータに臨床的に意味のある影響を及ぼす可能性は示されなかった。iv 投与の 4 時間後に測定した平均血漿中濃度は 3500 µg/mL，治験薬投与後 0 時間から 316 時間までの AUC は 288,000 µg·h/mL であった。

このほか，サルにフレマネズマブ 10，100 及び 300 mg/kg/week を週 1 回，反復 iv 又は sc 投与した 3 ヵ月間反復投与毒性試験を実施した（8230269 試験）。この試験において，体温及び血圧（収縮期血圧及び拡張期血圧）に被験物質投与に関連した影響は認められなかった。

この試験の投与期間及び回復期間（高濃度薬物存在下）に行った心電図測定の結果は，いずれも正常と判定された。調律に異常はみられなかった。また，全用量及び時点を通じて，QTc 間隔及びほかの心電図パラメータに有意差は認められなかった。

さらに，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。

この試験における無毒性量である 100 mg/kg（sc 投与）に基づいて算出した安全域は，ヒトに初回量 675 mg を sc 投与したときの C_{max} の約 16 倍，ヒトに 225 mg を月 1 回 sc 投与したときの AUC_{0-28} の約 24 倍である。

サルを用いた 26 週間反復投与毒性試験（DS-2015-010 試験）では，フレマネズマブ 10，100 及び 300 mg/kg/week を投与したときの体温，呼吸数及び心拍数を，未投与期，投与前 2～4 時間，投与期の Day 85 及び 176 の投与後約 24 時間（C_{max} 時点と一致すると推定される），及び回復期の Day 113 に 1 回記録した。試験期間を通じて，体温，心拍数及び呼吸数に被験物質投与に関連する所見は認められなかった。

これらの試験で得られた結果に基づけば，フレマネズマブは心血管系及び呼吸数に生物学的に重要な変化を引き起こすことはないと考えられた。

また，2.6.6 の 8.1.1 項に記載したように，検討した動物種（ラット，ウサギ，非ヒト霊長類及びヒト）のいずれにおいても心血管組織との交差反応性は認められなかった。

2.6.2.3.2.2　中枢神経系への影響

（概要表 2.6.3.4，報告書番号 AB21439/DS-2017-011）

中枢神経系への影響はラットを用いた Irwin 試験で評価した（DS-2017-011 試験）。

1 群を Sprague-Dawley（SD）ラット雌雄各 6 匹とする 3 群に，フレマネズマブ 0（溶媒対照），100 及び 300 mg/kg を投与量 2 mL/kg で単回 sc 投与した。

投与前（0 時点），投与後 1，24，48，72，120 及び 168 時間に観察を行った。各時点で直腸温を測定した。投与前及び投与後 24，48，72，120，168 時間に体重を測定した。

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 72.5 時間に薬物動態解析用の採血を行った。

雌雄 Sprague-Dawley ラットにフレマネズマブ 100 又は 300 mg/kg を投与したとき，投与後 7 日まで，主な運動機能及び自律神経機能を対象とする一連の行動パラメータ及び生理学的パラメータに影響は認められなかった。

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 72.5 時間に測定）は雄が 1,683,744 ng/mL，雌が 2,034,199 ng/mL であった。

2.6.2.3.2.3　呼吸への影響

（概要表 2.6.3.4，報告書番号 AB21440/DS-2017-014）

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。

この試験の目的は，覚醒・無拘束ラットにフレマネズマブを単回 sc 投与したときの呼吸パラメータへの影響の可能性を，全身気圧プレチスモグラフィーを用いて評価することであった。

1 群を Sprague-Dawley ラット雌雄各 8 匹とする 3 群に，フレマネズマブ 0（溶媒対照），100 及び 300 mg/kg を投与量 2 mL/kg で単回 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。次いで，動物の呼吸シグナルを少なくとも 30 分間記録・測定してベースラインとした。その後，各動物にフレマネズマブ 0，100 又は 300 mg/kg のいずれかを投与し，ケージに戻した。

投与後 24，48 及び 72 時間に動物を再びプレチスモグラフィーチャンバーに収容し，呼吸パラメータ（呼吸数，一回換気量及び分時換気量）を測定した。

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。

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。

この試験の結果は，フレマネズマブを単回 sc 投与したとき，投与後 3 日まで検討した呼吸パラメータに影響はみられないことが示されている。

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 1,742,318 ng/mL，雌が 3,044,368 ng/mL であった。

2.6.2.4　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。

2.6.2.5　その他の試験

IgG Fcγ 受容体への結合

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 Fcγ 受容体（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，ヒト抗 KLH 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［抗 KLH 抗体の濃度は 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 を除くすべての受容体に高い結合能を示した。

2.6.2.6　考察及び結論

治験依頼者が実施し本申請書類に記載した試験は，フレマネズマブが CGRP に結合して CGRP の活性を強力に阻害することを示している。これらの *in vitro* アッセイで検討した濃度は，ヒト被験者に投与する際に予想される濃度範囲に対応している。本剤は *in vitro* で CGRP 誘導による cAMP 産生を抑制する一方で，アミリン，カルシトニン，インテルメジン，アドレノメデュリンなどのファミリーペプチドには結合しない。血管拡張を誘導した動物モデルを用いた *in vivo* 薬理試験では，フレマネズマブが電気刺激後のラット足皮膚及び中硬膜動脈の血流量増加を抑制し，カプサイシン刺激によるカニクイザル皮膚の発赤反応を用量依存的に抑制することが示されている。これらの試験で使用されたモデルでは，CGRP が硬膜血管系で作用して硬膜血管の拡張を引き起こし，この血管拡張が痛みに関与する局所の神経線維を活性化させると考えられることから，これらのモデルで片頭痛発作の発症抑制を予測することは可能である。したがって，これらのモデルに対し有効性を示したフレマネズマブは片頭痛発作の発症を抑制すると考えられる。

in vitro 試験おいて，フレマネズマブは Fcγ 受容体への結合能を示さなかったことから（111747 試験），off target 活性による安全性の懸念は比較的小さいことが示唆される。

副次的薬理試験は実施していない。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。総合的には，非臨床のデータは上記 2 つの過程に関連するフレマネズマブの有害事象は示唆されないと考えられた。

心血管系への影響の可能性を評価するために，サルを用いて安全性薬理試験を実施した。高用量（最高 300 mg/kg/week）で単回投与，又は週 1 回最長 6 ヵ月間反復投与したとき，主要臓器に被験物質投与に関連した所見を示すデータは認められない。ラットを用いて Irwin 試験及び呼吸系に関する安全性薬理試験を実施したところ，最高 300 mg/kg の用量で単回 sc 投与されたフレマネズマブは，影響を引き起こさないことが確認された。NOAEL は 300 mg/kg であると判断された。

結論として，動物を用いた薬理学的モデルから，フレマネズマブは片頭痛のモデルとして適切と考えられる動物モデルにおいて薬理活性を示し，また，主要臓器に安全性の懸念は認められなかった。

2.6.2.7 引用文献

1 Armour, KL, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM. Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities. Eur J Immunol. 1999;29:2613-2624.

2 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.

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 Raddant AC, Russo AF. Calcitonin gene-related peptide in migraine: intersection of peripheral inflammation and central modulation. Expert Rev Mol Med. 2011;13:e36.

5 Silberstein SD and Edvinsson L. Is CGRP a marker for chronic migraine? Neurology. 2013; 81(14):1184-5.

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

7 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.

8 Stevenson JC, Macdonald DW, Warren RC, Booker MW, Whitehead MI. Increased concentration of circulating calcitonin gene related peptide during normal human pregnancy. Br Med J (Clin Res Ed). 1986;293(6558):1329-30.

9 Gangula PR, Wimalawansa SJ, Yallampalli C. Pregnancy and sex steroid hormones enhance circulating calcitonin gene-related peptide concentrations in rats. Hum Reprod. 2000;15(4):949-53.

10 Hay DL, Howitt SG, Conner AC, Schindler M, Smith DM, Poyner DR. CL/RAMP2 and CL/RAMP3 produce pharmacologically distinct adrenomedullin receptors: a comparison of effects of adrenomedullin$_{22-52}$, CGRP$_{8-37}$ and BIBN4096BS. Br J Pharmacol. 2003;140(3):477-86.

11 Lu JT, Son YJ, Lee J, Jetton TL, Shiota M, Moscoso L, et al. Mice lacking α-calcitonin gene-related peptide exhibit normal cardiovascular regulation and neuromuscular development. Mol Cell Neurosci. 1999;14(2):99-120.

12 Yallampalli C, Chauhan M, Endsley J, Sathishkumar K. Calcitonin gene related family peptides: importance in normal placental and fetal development. Adv Exp Med Biol. 2014;814:229-40.

13 Kjartansson J, Dalsgaard CJ. Calcitonin gene-related peptide increases survival of a musculocutaneous critical flap in the rat. Eur J Pharmacol. 1987;142(3):355-8.

14 Karanth SS, Dhital S, Springall DR, Polak JM. Reinnervation and neuropeptides in mouse skin flaps. J Auton Nerv Syst. 1990;31(2):127-34.

15 Khalil Z, Helme R. Sensory peptides as neuromodulators of wound healing in aged rats. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1996;51(5):B354-61.

[16] Toda M, Suzuki T, Hosono K, Kurihara Y, Kurihara H, Hayashi I, et al. Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis. Biomed Pharmacother. 2008;62(6):352-9.

[17] Kurashige C, Hosono K, Matsuda H, Tsujikawa K, Okamoto H, Majima M. Roles of receptor activity-modifying protein 1 in angiogenesis and lymphangiogenesis during skin wound healing in mice. FASEB J. 2014;28(3):1237-47.

[18] Chéret J, Lebonvallet N, Buhé V, Carre JL, Misery L, Le Gall-Ianotto C. Influence of sensory neuropeptides on human cutaneous wound healing process. J Dermatol Sci. 2014;74(3):193-203.

[19] Roggenkamp D, Köpnick S, Stäb F, Wenck H, Schmelz M, Neufang G. Epidermal nerve fibers modulate keratinocyte growth via neuropeptide signaling in an innervated skin model. J Invest Dermatol. 2013;133(6):1620-8.

[20] Zhou Y, Zhang M, Sun GY, Liu YP, Ran WZ, Peng L, et al. Calcitonin gene-related peptide promotes the wound healing of human bronchial epithelial cells via PKC and MAPK pathways. Regul Pept. 2013;184:22-9.

[21] Lynch JJ, Shen YT, Pittman TJ, Anderson KD, Koblan KS, Gould RJ, Regan CP, Kane SA. 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;623(1-3):96-102.

[22] Chaitman BR, Ho AP, Behm MO, Rowe JF, Palcza JS, Laethem T, Heirman I, Panebianco DL, Kobalava Z, Martsevich SY, Free AL, Bittar N, Chrysant SG, Ho TW, Chodakewitz JA, Murphy MG, Blanchard RL. A randomized, placebo-controlled study of the effects of telcagepant on exercise time in patients with stable angina. Clin Pharmacol Ther. 2012;91(3):459-66.

[23] Van der Schueren BJ, Blanchard R, Murphy MG, Palcza J, De Lepeleire I, Van Hecken A, Depré M, de Hoon JN. The potent calcitonin gene-related peptide receptor antagonist, telcagepant, does not affect nitroglycerin-induced vasodilation in healthy men. Br J Clin Pharmacol 2011;71(5):708-717.

[24] Vargas HM, Bass AS, Breidenbach A, Feldman HS, Gintant GA, Harmer AR, Heath B, Hoffmann P, Lagrutta A, Leishman D, McMahon N, Mittelstadt S, Polonchuk L, Pugsley MK, Salata JJ, Valentin JP. Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics. J Pharmacol Toxicol Methods. 2008;58(2):72-6.

[25] ICH Topic S6 (R1) - Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals June 2011. Avaliable from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S6_R1/Step4/S6_R1_Guideline.pdf.

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）

2.6.3 薬理試験概要表

大塚製薬株式会社

目次

目次 2

2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3

2.6.3.2 効力を裏付ける試験 7

2.6.3.3 副次的薬理試験 14

2.6.3.4 安全性薬理試験 15

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 18

2.6.3.1　薬理試験：一覧表

2.6.3.1　**薬理試験**　**一覧表（1）**　**被験物質**：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	CTD の記載箇所（資料番号）
(1)フレマネズマブの効力を裏付ける *in vitro* 試験					
①CGRP 受容体阻害作用					
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	表面プラズモン共鳴法（SPR）（Biacore3000^{TM}）	*in vitro*	[redacted]	100516	4.2.1.1-01
治療用モノクローナル抗体 PF-04427429（RN307）のヒト IgG Fcγ 受容体結合アッセイ	Biacore 3000 の CM5 センサーチップにアミンカップリングさせたヒト Fcγ 受容体	*in vitro*	[redacted]	111747	4.2.1.1-02（参考資料）
フレマネズマブ（RN307 の KinExA による溶液親和性測定	ウサギ，ラット及びヒト CGRPα（[redacted] 社製）	*in vitro*	[redacted]	DPR-2017-036	4.2.1.1-03（参考資料）
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	ヒト CGRP 及びカルシトニンファミリーペプチド，ヒト CGRP の切断又はアラニン置換ペプチド	*in vitro*	[redacted]	DPR-2017-039	4.2.1.1-04（参考資料）

2.6.3.1　　**薬理試験**　　**一覧表（2）**　　**被験物質**：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	CTD の記載箇所（資料番号）
フレマネズマブとヒト CGRP の C 末端ノナペプチドの共結晶化に関する最終報告書	NA	*NA*	[redacted]	DPR-2017-023	4.2.1.1-05（参考資料）
②cAMP 産生阻害作用					
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	ヒト SK-N-MC 細胞，ラット L6 細胞	*in vitro*	[redacted]	092905	4.2.1.1-06（参考資料）

2.6.3.1　　**薬理試験**　　**一覧表（3）**　　**被験物質**：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	CTD の記載箇所（資料番号）
(2)フレマネズマブの効力を裏付ける *in vivo* 試験					
①神経系血管拡張及び血流量増加阻害作用					
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	Sprague-Dawley ラット（雄） 0.3，1，3，10 mg/kg	*iv*	[redacted]	121930	4.2.1.1-07 （参考資料）
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	Sprague-Dawley ラット 1，3，10 mg/kg	*iv* ボーラス	[redacted]	121231	4.2.1.1-08 （参考資料）
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	カニクイザル，雌 1，10，100 mg/kg	*iv*	[redacted]	8225-772	4.2.1.1-09
②アロディニア（片頭痛の一般的症状の 1 つ）の抑制作用					
公表報告書：ストレス又は一酸化窒素誘発げっ歯類の薬物乱用頭痛に対するカルシトニン遺伝子関連ペプチド抗体の抑制効果	Sprague-Dawley ラット	*sc*	[redacted]	DPR-2017-038	4.2.1.1-10 (参考資料)

2.6.3.1　　**薬理試験**　　**一覧表（4）**　　**被験物質**：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	CTD の記載箇所（資料番号）
公表報告書：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）	Sprague-Dawley ラット	*ip*	[redacted]	DPR-2017-037	4.2.1.1-11（参考資料）

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

2.6.3.2　効力を裏付ける試験（1）

被験物質：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び 動物数／群	特記すべき所見	報告書番号	資料番号
(1)フレマネズマブの効力を裏付ける試験							
①CGRP 受容体阻害作用							
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	NA	*NA*	NA	NA	37°C における RN307 の平均 K_D は，ラット α-CGRP に対して 2.57 nM，ヒト α-CGRP に対して 0.063 nM（stringent 条件下で測定した場合），ラット β-CGRP に対して 0.152 nM 及びヒト β-CGRP に対して 0.155 nM である。 ラット β-CGRP，ヒト α-CGRP 及びヒト β-CGRP に対する RN307 の解離速度は非常に緩徐で，分解能の限界以下であった。 RN307 は CGRP の C 末端エピトープに結合する。 RN307 は CGRP に高い特異性を示し，アドレノメデュリン，アミリン，カルシトニンなど，ほかのファミリーメンバーには結合しなかった。	100516	4.2.1.1-01
治療用モノクローナル抗体 PF-04427429（RN307）のヒト IgG Fcγ 受容体結合アッセイ	NA	*NA*	NA	NA	Fcγ 受容体への結合を抑制するために H 鎖に変異が導入された IgG2 抗体である PF-04427429 は，対照の野生型 IgG2 抗体である抗 KLH IgG2 抗体に比べて Fcγ 受容体への結合能が低かった。検討した濃度範囲において，PF-04427429 の Fcγ 受容体に対する結合能は，FcγR IIA を除いていずれも対照の IgG1 抗体より低かった。	111747	4.2.1.1-02（参考資料）

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験（2）　　**被験物質**：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量（mg/kg）	性別及び動物数／群	特記すべき所見	報告書番号	資料番号
フレマネズマブ（RN307）とウサギ CGRPα の KinExA 法による溶液親和性測定	NA	*NA*	NA	NA	ウサギ及びラットの α-CGRP に対する親和性（K_D）は同程度で，ヒト α-CGRP に対する親和性に比べて約 240～400 倍低かった。 ラット/ウサギの α-CGRP とヒトの α-CGRP のアミノ酸配列の比較でも，35 残基（この抗体の結合エピトープ）に 1 ヵ所相違がみられる。	DPR-2017-036	4.2.1.1-03（参考資料）
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	NA	*NA*	NA	NA	切断した CGRP ペプチドによって，重要なエピトープ残基は CGRP の C 末端にあることが確認できた。 フレマネズマブがほかのカルシトニンファミリーペプチド（アミリン，アドレノメデュリン，インテルメジン，カルシトニン）と特異的に結合することはなかった。	DPR-2017-039	4.2.1.1-04（参考資料）
フレマネズマブとヒト CGRP の C 末端ノナペプチドの共結晶化に関する最終報告書	NA	*NA*	NA	NA	フレマネズマブとヒト CGRP の C 末端 9 残基の複合体共結晶構造の決定。エピトープ及びパラトープの抗体抗原間相互作用を明らかにした。	DPR-2017-023	4.2.1.1-05（参考資料）

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験（3）　　**被験物質**：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 （mg/kg）	性別及び 動物数／群	特記すべき所見	報告書番号	資料番号
②cAMP 産生阻害作用							
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	ヒト SK-N-MC 細胞，ラット L6 細胞	*NA*	0.5～3000 nM	NA	PF-04427429（RN307）は，α-及び β-CGRP が CGRP1 受容体に結合するのを阻害する CGRP アンタゴニスト（リガンドアンタゴニスト）である。 RN307 は，10 pM ^{125}I-ヒト α-CGRP のヒト CGRP 受容体への結合を阻害し，IC_{50} は 18.9 ± 8.2 nM（平均値±標準誤差，以下同様）であった。 セルベースの cAMP アッセイにおいて RN307 はヒト α-CGRP を阻害し，EC_{50} は 71 ± 19.6 nM であった。 セルベースの cAMP アッセイにおいて RN307 はラット α-CGRP を阻害し，EC_{50} は 102.2 ± 38.8 nM であった。	092905	4.2.1.1-06（参考資料）

2.6.3.2　　**効力を裏付ける試験（4）**　　**被験物質**：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 （mg/kg）	性別及び 動物数／群	特記すべき所見	報告書番号	資料番号
(2)フレマネズマブの効力を裏付ける *in vivo* 試験							
①神経系血管拡張及び血流量増加阻害作用							
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	Sprague-Dawley ラット	*iv*	0.3，1，3，10 mg/kg	試験 1 雄， 13 匹/溶媒群，8 匹/1mg/kg 群，6 匹/10mg/kg 群 試験 2 雄， （Day1）32 匹/溶媒群，9 匹/1mg/kg 群，9 匹/3mg/kg 群，5 匹/10mg/kg 群 （Day7）32 匹/溶媒群，8 匹/0.3mg/kg 群，11 匹/1mg/kg 群，10 匹/3mg/kg	ラットに各種用量（0.3，1，3，10 mg/kg）の RN307 又は溶媒を投与した。 抗 CGRP モノクローナル抗体の RN307 はラット皮膚の電気刺激による神経性発赤を抑制し，作用持続期間は 7 日以上であった。 Day 1：ED_{50} = 1.33 mg/kg Day 7：ED_{50} = 0.79 mg/kg	121930	4.2.1.1-07（参考資料）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 （mg/kg）	性別及び 動物数／群	特記すべき所見	報告書番号	資料番号
				群，5 匹 /10mg/kg 群			

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験（5）　　**被験物質**：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量（mg/kg）	性別及び動物数／群	特記すべき所見	報告書番号	資料番号
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	Sprague-Dawley ラット	*iv* ボーラス	1，3，10 mg/kg	雄，8 匹/溶媒群，6 匹/1mg/kg 群，6 匹/3mg/kg 群，7 匹/10mg/kg 群	溶媒，臨床的に検証されている CGRP 受容体アンタゴニストである BIBN4096BS（300 µg/kg，iv），又は抗 CGRP Mab（10 mg/kg，iv）を，電気刺激がない状態で投与したところ，ベースラインの硬膜血管径及び平均動脈圧（MABP）に変化はみられず，CGRP により基礎的血管収縮は起こらないことが示された。 この Mab を投与したラット（10 mg/kg，iv，n＝6）では，電気刺激後に血管径の拡張が認められたが，拡張の程度は抗体投与後 90 及び 120 分に有意に低下した（それぞれ，55 ± 8（平均値±標準誤差）%及び 52 ± 5（平均値±標準誤差）%）。 試験の結果から，この Mab［PF-04427429（RN307）］3 mg/kg 及び 10 mg/kg を投与した動物では，投与後 7 日における電気刺激に起因する中硬膜動脈径の拡張（平均値）が，対照動物に比べて有意に抑制されることが確認された。このことから，この Mab の単回投与によって，ラットにおける硬膜血管の神経性血管拡張を長期にわたって阻害できることが示された。	121231	4.2.1.1-08（参考資料）

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験（6）　　**被験物質**：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 （mg/kg）	性別及び 動物数／群	特記すべき所見	報告書番号	資料番号
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	カニクイザル	*iv*	1，10，100 mg/kg	雌， 6匹/群	RN307は，カプサイシン刺激による発赤反応を用量依存的に抑制した。RN307を増量すると，抑制効果の持続時間は延長した。RN307 10及び100 mg/kg群では，抗体の単回投与後56日に統計的に有意な抑制が認められた。	8225-772	4.2.1.1-09
②アロディニア（片頭痛の一般的症状の1つ）の抑制作用							
公表報告書：ストレス又は一酸化窒素供与体により誘発したげっ歯類の薬物乱用頭痛に対するカルシトニン遺伝子関連ペプチド抗体の抑制効果	Sprague-Dawleyラット	*sc*	10，30 mg/kg	雄， 8～35匹/群	末梢におけるCGRPの作用を中和することによって，スマトリプタン又はモルヒネの前投与によって誘導した薬物乱用頭痛ラットモデルの片頭痛様疼痛を効果的に抑制することができた。この試験のデータから，感作状態の中枢神経系に対して，一般的な片頭痛誘因で生じた末梢でのCGRPの作用は片頭痛の原因となることが裏付けられた。	DPR-2017-038	4.2.1.1-10 （参考資料）
公表報告書：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	Sprague-Dawleyラット	*ip*	30 mg/kg	雄 6～8匹/群	脳震盪ラットの疼痛及び頭痛関連行動がマウス抗CGRP Mabの反復投与によって軽減されたことから，末梢神経におけるCGRP依存性のプロセスは発症機序の1つであることが示唆された。PTH（外傷後頭痛）様疼痛の所見が消失した後，脳震盪ラットにはCGRP依存性のニトログリセリン（GTN）に対する持続的な疼痛過敏症が認められることから，頭痛誘因に対する過敏症が持続性PTHの原因の1つであると推定された。	DPR-2017-037	4.2.1.1-11 （参考資料）

NA＝該当せず，iv＝静脈内，sc＝皮下，ip＝腹腔内，CGRP＝カルシトニン遺伝子関連ペプチド，cAMP＝環状アデノシン一リン酸，IgG＝免疫グロブリンG，Mab＝モノクローナル抗体，KLH＝キーホールリンペットヘモシアニン，ED_{50}＝50%有効量，K_D＝平衡解離定数

GLP報告書には，GLP準拠を示す文書が含まれる。

2.6.3.3　副次的薬理試験

該当せず。特に実施していない。

2.6.3.4　安全性薬理試験

安全性薬理試験				被験物質：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）			
評価対象となる器官系	動物種/系統	投与方法	用量（mg/kg）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP準拠	試験番号/参照番号
心血管系	カニクイザル	iv緩徐ボーラス	100	雄，8匹/群	本試験では溶媒又はフレマネズマブ投与に伴う有害な観察所見は認められなかった。 投与量は生物学的に妥当と考えられる量に達した。 Day 1の投与後1～3.75時間に認められた心拍数の統計的に有意な減少についても，生物学的に意味のあるレベルを下回るものである。Day 3，7，10及び14の投与後1～3.75時間及び18～22時間に認められた心拍数減少は統計的に有意な水準に達しており，重症度は中等度であると考えられる。 そのほかの心電図パラメータの測定値（PR間隔，QRS間隔及びQT間隔）のわずかな増加は，生物学的に問題となる水準を下回った。 QT間隔の変化は，観察された心拍数の変化の補正係数から予測できるものである。	GLP	08GR358

安全性薬理試験				被験物質：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）			
評価対象となる器官系	動物種/系統	投与方法	用量（mg/kg）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP準拠	試験番号/参照番号
体温，血圧，心電図	カニクイザル	iv，sc	0，10，100，300 週1回，14週間	雌雄，6匹/群（回復例：雌雄，2匹/群を含む）	体温及び血圧（収縮期血圧及び拡張期血圧）に被験物質投与に関連した影響は認められなかった。投与期間及び回復期間（高濃度薬物存在下）に行った心電図測定の結果は，いずれも正常と判定された。調律に異常はみられなかった。また，全用量及び時点を通じて，QTc間隔及び他の心電図パラメータに有意差は認められなかった。	GLP	8230269/10SN155
体温，血圧，心電図	カニクイザル	sc	0，10，100，300 週1回，26週間	雌雄，6匹/群（対照群と最高用量群，回復例：雌雄，2匹）4匹/群（中間群）	試験期間を通じて，体温，心電図パラメータに被験物質投与に関連する所見は認められなかった。	GLP	DS-2015-010

安全性薬理試験				被験物質：フレマネズマブ（遺伝子組み換え）			
評価対象となる器官系	動物種/系統	投与方法	用量（mg/kg）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP準拠	試験番号/参照番号
中枢神経系	ラット/Sprague-Dawley，Crl:OFA (SD)	sc	0，100，300	雌雄，6匹/群	神経行動学的試験結果，観察所見，体重及び直腸温に，フレマネズマブに関連した影響は認められなかった。	準拠	AB21439/DS-2017-011
呼吸器系	ラット/Sprague-Dawley，Crl:OFA (SD)	sc	0，100，300	雌雄，8匹/群	呼吸パラメータ及び観察所見に，フレマネズマブ投与に関連した影響は認められなかった。	準拠	AB21440/DS-2017-014

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

該当せず。薬物動態学的薬物相互作用試験は特に実施していない。