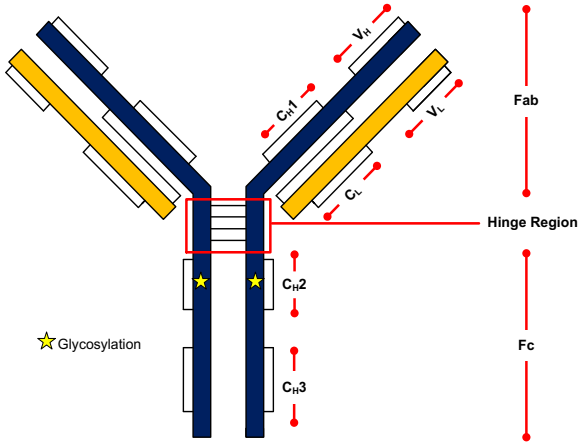
目次

1. 緒言 2
2. 非臨床試験計画概要....4
3. 薬理試験（モジュール2.6.2） 6
3.1 効力を裏付ける試験....6
3.2 副次的薬理試験....7
3.2.1 CGRP及びCGRP受容体の特異性....7
3.2.2 CGRP及びCGRP受容体の発現及び分布 8
3.2.3 CGRP受容体拮抗作用と全身血圧の変化の関連性 9
3.2.4 CGRP受容体拮抗作用と血管収縮及び心臓虚血脆弱性との関連性....11
3.2.5 CGRP受容体拮抗作用が骨代謝に影響する可能性 12
3.2.6 CGRP受容体拮抗作用が胃粘膜完全性に影響する可能性 13
3.2.7 正常妊娠時に推定されるCGRPの役割 13
3.2.8 CGRP及びCGRP受容体拮抗作用の呼吸恒常性への影響....14
3.2.9 CGRP受容体拮抗作用とがん原性リスクの関連性 14
3.3 安全性薬理試験....15
4. 薬物動態（モジュール2.6.4） 16
4.1 分析法 16
4.2 吸収 16
4.3 分布 17
4.4 代謝 17
4.5 排泄 17
4.6 薬物動態学的薬物相互作用試験....17
5. 毒性試験（モジュール2.6.6） 18
5.1 単回投与毒性試験....18
5.2 反復投与毒性試験....18
5.3 遺伝毒性試験....19
5.4 がん原性試験....19
5.5 生殖発生毒性試験....19
5.5.1 胚・胎児発生及び出生後の発達....19
5.5.2 幼若動物を用いた試験....20
5.6 局所刺激性試験....21
5.7 その他の毒性試験....21
5.7.1 免疫原性試験....21
5.7.2 免疫毒性試験....21
5.7.3 作用機序解明試験....22
5.7.4 依存性試験 22
5.7.5 代謝物に関する試験....22
5.7.6 不純物に関する試験....22
5.7.7 その他の試験....22
5.7.7.1 組織交差反応性試験....22
5.7.7.2 エレヌマブ：ヒト摘出冠動脈を用いた試験....23
5.7.8 環境への配慮....23
6. 考察及び結論....24
7. 参考文献 26

1. 緒言

エレヌマブ（AMG 334）は、チャイニーズハムスター卵巣細胞において遺伝子組換えにより産生されるヒトモノクローナル免疫グロブリンG2（IgG2）抗体である。エレヌマブは1344個のアミノ酸から構成され、分子量は約150 kDaである（図 1）。

図 1　エレヌマブ構造の模式図



Heavy chains are shown in blue and light chains are shown in orange
V_H is the variable domain of the heavy chain
C_H1, C_H2, and C_H3 are the constant domains of the heavy chain
V_L is the variable domain of the light chain
C_L is the constant domain of the light chain

エレヌマブはカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）受容体（-R）の細胞外領域に高親和性（解離定数［K_d］：56 pmol/L）で結合することにより作用を発現する。エレヌマブは、ヒトCGRP-RでのCGRPの作用を強力に拮抗し、その50%阻害濃度（IC_{50}）は2.3 nmol/Lである。

CGRPは片頭痛の病態生理における主要な伝達物質として関与している（Durham, 2004、Edvinsson and Goadsby, 1994）。片頭痛は、中枢神経処理の変化（脳幹核の活性化、皮質の過興奮性、拡延性皮質抑制）及び三叉神経血管系の活性化（神経ペプチド放出の誘発により、頭蓋内血管及び硬膜の疼痛性炎症を引き起こす可能性がある）を伴う神経血管性の疼痛症候群と考えられている（Karsan and Goadsby, 2015）。片頭痛は発現頻度の低い反復性片頭痛と発現頻度の高い慢性片頭痛を両端としたひとつのスペクトルであることが提唱されており、両分類の病態生理は共通しており、同様の中枢及び末梢神経系構造が関与している（Diener et al, 2012）。

CGRPはカルシトニン（CT）ファミリーペプチドに属し、三叉神経節及び三叉神経核などの末梢及び中枢神経系において広範囲に発現され、α-CGRP（主に片頭痛の疼痛機序に関与）及びβ-CGRP（報告は少ないが、皮膚、腸及び腸神経に存在）の2つのアイソフォームが存在する。α-CGRPは、11番染色体のCT/CGRP遺伝子の選択的スプライシングによって産生される37個のアミノ酸からなるペプチドである。β-CGRPは、3個のアミノ酸が異なり、近傍の別の遺伝子でコードされる（Hoovers et al, 1993、McLatchie et al, 1998、Mulderry et al, 1998）。CGRP-Rは、Gタンパク質共役型CT様受容体（CLR）及び1回膜貫通型タンパク質である受容体活性調節タンパク質1（RAMP1）で構成される複合体である（Hay et al, 2006、Hay et al, 2008、Walker et al, 2010）。

これまでの報告から、CGRPは、片頭痛の病態生理に関連する侵害受容調節因子かつ血管拡張物質であることが示されている（Karsan and Goadsby, 2015）。

エレヌマブは成人の片頭痛発作の発症抑制薬として開発しており、70 mgの用量を月1回皮下（SC）投与する。

本概括評価は、モジュール2.6及びモジュール4に記載した薬理、薬物動態（PK）及び毒性に関する資料について総合的に評価し、エレヌマブの臨床使用における安全性を予測することを目的とする。

2. 非臨床試験計画概要

エレヌマブの非臨床試験計画は、バイオ医薬品の既存の規制ガイダンス、特に、医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインのICH S6(R1)、ICH M3(R2)及びICH S5(R2)に準拠した。

反復投与毒性試験では、臨床プログラムと一致させるために、いずれも投与経路は皮下投与とした。エレヌマブはヒト及びカニクイザルのCGRP-Rを同程度の効力で阻害したが、ラット、ウサギ及びイヌのCGRP-Rには効力は弱いか、又は生物活性を示さなかった。マウスとの交差反応性については、種特異的領域におけるアミノ酸配列がラットと相同性が高いことから、検討しなかった。これらのことから、臨床プログラムの妥当性を裏付ける薬理試験、PK試験及び毒性試験にはカニクイザルを用いた。エレヌマブは、ヒトCGRP-Rに対する作用（IC_{50}：2.3 nmol/L）と同様に、カニクイザルCGRP-Rを強力に阻害し、そのIC_{50}値は5.7 nmol/Lであるが、ラットCGRP-Rに対しては阻害作用を示さない（IC_{50}：>10 μmol/L）。エレヌマブは、ウサギ及びイヌのCGRP-R（K_i：それぞれ230及び260 nmol/L）と比較して、ヒトCGRP-R複合体（K_i：20 pmol/L）に対して10000倍を超える高い結合親和性を示した。カニクイザルにおけるエレヌマブによるCGRP-R拮抗作用の薬力学的（PD）根拠は、*in vivo*でのカプサイシン（CAP）誘発皮膚血流量（DBF）増加が用量依存的に阻害されたことから示された（モジュール2.6.2 第2.6項）。反復投与毒性試験ではPD解析は実施しなかったが、反復投与毒性試験での用量は、CAP誘発DBFの*in vivo*試験において最大薬理反応が認められた用量／曝露量よりも十分に高い曝露量が得られた用量であった。エレヌマブは、反復投与毒性試験では週2回又は3回、拡充型出生前及び出生後の発生に関する試験（ePPND）では2週に1回（Q2W）投与した。エレヌマブの全身曝露量は、すべての毒性試験で酵素免疫測定法を用いて検討し、遊離型エレヌマブを算出した。用量及び投与頻度は、ICH S6(R1)ガイドラインに従って、ヒトのリスク評価を容易とすることを目的として、広い薬物曝露量範囲及び適切な安全域が得られるように設定した。非臨床薬理試験の大半は、Amgen社（Thousand Oaks, CA）で実施し、PK試験及び主要な毒性試験（トキシコキネティクス［TK］を含む）は、委託研究機関（[redacted]）で実施した。毒性試験及びTK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（GLP）に従って実施し、経済協力開発機構（OECD）の基準を満たすものであった。

非臨床安全性についてのまとめ

エレヌマブの開発中に非臨床安全性における問題は確認されなかった。非臨床毒性試験として、エレヌマブを最高225 mg/kgの用量まで投与した探索的1カ月間反復投与毒性試験（皮下投与、週2回又は3回）、単回静脈内（IV）投与群（100 mg/kg）を含む1カ月間反復投与毒性試験（皮下投与、週2回、最高225 mg/kg）、3及び6カ月間の複合的な反復投与毒性試験（皮下投与、週2回、最高150 mg/kg）、胚・胎児発生に関する試験／出生後の発生に関する試験（皮下投与、50 mg/kg、2週に1回）を実施した。また、ヒト組織の完全パネル及び特定のカニクイザル組織を用いた*in vitro*組織交差反応性試験、並びにエレヌマブで考えられる血管作動性反応の有無を検討するための*in vitro*摘出ヒト冠動脈試験も実施した。反復投与毒性試験では、一部の動物において投与に起因する皮下投与部位の変化が認められた。エレヌマブに関連する所見は、一部の動物における抗エレヌマブ免疫複合体の循環に伴う免疫介在性病変と一致した血管炎を示す病理組織学的変化のみであり、エレヌマブに関連し、ヒトにおけるリスクの評価に意義のある毒性は他にはみられなかった。3及び6カ月

間の複合的な反復投与毒性試験では、試験の投与期間中に低用量25 mg/kg群の3匹において抗エレヌマブ中和抗体が検出され、これに伴い、投与期間中のエレヌマブの曝露量が低下した。これらの動物はTK評価から除外した。抗エレヌマブ結合抗体が別の2匹（低用量25 mg/kg群の1匹及び高用量150 mg/kg群の1匹）において検出されたが、TKパラメータには影響はなかったことから、エレヌマブの安全性評価の信頼性は高いと判断した。カニクイザルにヒトタンパク質を投与すると、抗ヒトタンパク質抗体が発現することが多いが、動物モデルにおける免疫原性は、ヒトにおける抗薬物抗体（ADA）発現頻度又は免疫関連有害事象の予測性が低い。妊娠カニクイザルにエレヌマブを50 mg/kgの用量で2週に1回、妊娠（GD）20～22日目から分娩まで皮下投与したところ、忍容性は良好であり、母動物への毒性はみられず、胎児／出生児の死亡率に影響はなく、出生児の成長及び発達に対する影響は生後6カ月後までみられなかった。

反復投与毒性試験で検討した用量での曝露マージンは、ヒトで用いられた用量140 mgの約123倍であり、臨床投与レジメンの妥当性が裏付けられている（表 2）。

結論として、これらの非臨床結果において、ヒトでのリスクとして懸念される安全性の徴候はみられなかった。

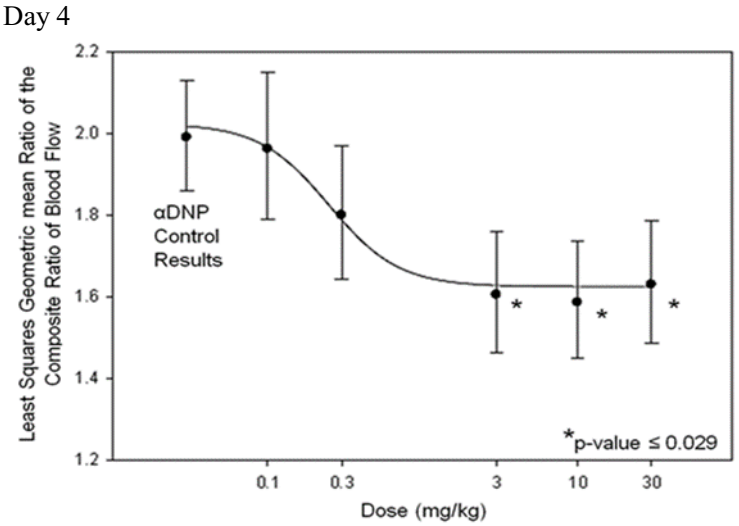
3. 薬理試験（モジュール2.6.2）

エレヌマブは、ヒトCGRP-Rに対するヒトアンタゴニスト抗体である。この薬理学的作用を説明する*in vitro*及び*in vivo*非臨床薬理試験については、モジュール2.6.2 第2項に詳述する。

3.1 効力を裏付ける試験

エレヌマブは、ヒト内因性CGRP-Rを発現するヒト神経芽細胞腫（SK-N-MC）細胞におけるCGRP誘発cAMP蓄積に対して拮抗作用を示し、そのIC_{50}値は2.3 nmol/Lであった（R20100181試験、Manoukian et al, 2019、Shi et al, 2016）。エレヌマブはSK-N-MC細胞膜のヒトCGRP-Rへの[^{125}I]-CGRPの結合に対して競合的拮抗作用を示し、そのK_i値は20 pmol/Lであった（R20100182試験、Shi et al, 2016）。[^{125}I]- エレヌマブは単独で高親和性及び飽和性にヒトCGRP-Rに結合し、そのK_d値は56 pmol/Lであった。また、[^{125}I]- エレヌマブの解離半減期（t_{off}）は67分であった（R20100183試験）。エレヌマブ（最高10 µmol/L）は、細胞株（HEK及びMCF-7）を用いたcAMP機能試験において、アドレノメデュリン（ADM）1受容体、ADM2受容体、CT受容体及びアミリン（AMY）受容体に対する機能活性を示さなかった（R20100185試験）。エレヌマブはカニクイザルCGRP-Rに対して強力な機能拮抗作用を示し、そのIC_{50}値は5.7 nmol/Lであった。また、ウサギ及びイヌのCGRP-Rに対する親和性は低かった（K_i：ウサギ及びイヌでそれぞれ230及び260 nmol/L）。ラットCGRP-Rに対するエレヌマブの機能拮抗活性は、10 µmol/Lまで認められなかった（R20100184試験）。マウス及び他の非霊長類との交差反応性については、種特異的領域におけるアミノ酸配列がラットと相同性が高いことから、検討しなかった。この結果から、薬理試験、PK試験及び毒性試験においてカニクイザルを用いた。非臨床PD試験では、雄カニクイザルにおけるCAP誘発DBF増加に対する各種用量のエレヌマブの抑制作用を評価した。エレヌマブの静脈内投与は、CAP誘発DBF増加を用量依存的に阻害した。顕著な阻害作用を示した最低用量は0.3 mg/kgであり、3 mg/kg以上の用量では顕著、かつ最大の阻害に達した（図 2）。

図 2　カニクイザルのカプサイシン誘発皮膚血流量増加に対するエレヌマブ投与4日後の阻害作用



αDNP = anti-dinitrophenyl antibody

Cynomolgus monkeys were given IV fusions of AMG 334 (0.1 to 30 mg/kg) or control anti-dinitrophenol antibody (αDNP) (4 mg/kg) on day 0. On Day 4 (4 days post-AMG 334), after obtaining a post-drug baseline, capsaicin (CAP) solution at a dose of 1 mg was added topically inside of rubber O rings, which were placed on the skin on the ventral side of the forearms or the medial thighs of cynomolgus monkeys, and dermal blood flow (DBF) was measured by a laser Doppler imager. The increase in DBF caused by CAP topical application was expressed as least squares geometric mean ratio of the composite ratio for statistical analysis. Data are expressed as the mean ±SEM.

AMG 334 inhibited CAP-induced increase in DBF relative to αDNP with a clear dose response on Day 4 ($p = 0.001$ with 1-sided trend test). Using the E_{max} model of analysis 3, 10, and 30 mg/kg doses each produced a significant effect.

Source: Study R20100187; Shi et al, 2016

3.2　副次的薬理試験

3.2.1　CGRP及びCGRP受容体の特異性

CT/CGRPファミリーのペプチドホルモンには、CT、AMY、CGRP、ADM及びインテルメジン（IMD）がある。*Calca*遺伝子は、これらのペプチドホルモンのうち、CT及びα-CGRPの2つをコードしている。これら2つのペプチドは選択的スプライシングを介して生成され、組織特異的であり、甲状腺C細胞においてエクソン1、2、3及び4が同時にスプライシングされる場合にはCT mRNAとなり、主に神経細胞においてエクソン1、2、3、5及び6が同時にスプライシングされる場合にはα-CGRP mRNAとなる（Rosenfeld et al, 1983）。CGRPの別の形態であるβ-CGRP（ヒトにおいてはα-CGRPと3個のアミノ酸が異なる）は、別の遺伝子で産生され、主に腸及び腸神経において発現する（Mulderry et al, 1988）。α-CGRP（本資料全体でCGRPと称す。37個のアミノ酸からなるペプチドであり、分子量は3789.4 Da）は、最も広範囲に研究されていると共に、最も豊富に存在するCGRPの型であるが、αとβ型の薬理作用の違いはわずかである（Bailey and Hay, 2006）。

CT/CGRPファミリーのホルモンの生理活性は、異なる複数の受容体複合体を介している（McLatchie et al, 1998）。この受容体複合体は、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）及び固有の受容体活性調節タンパク質（RAMP）によって形成される。GPCRにはCT受容体（CTR）及びCT様受容体（CLR）の2種がある。RAMPには、RAMP1～3の3種があり、これらRAMPの基本構造は類似しており、大きな細胞外領域、1回膜貫通領域及び短い細胞内領域が共通している。各種ペプチドホルモンの受容体特異性については、表 1に示す。

表 1　カルシトニンファミリーの各種ペプチドの受容体特異性

Receptor	Receptor Components	Ligand
CGRP	CLR + RAMP1	CGRP > IMD > ADM
ADM1	CLR + RAMP2	ADM >> CGRP
ADM2	CLR + RAMP3	ADM = IMD > CGRP
CTR	CTR	Calcitonin
AMY1	CTR + RAMP1	Amylin
AMY2	CTR + RAMP2	Amylin
AMY3	CTR + RAMP3	Amylin

ADM = adrenomedullin; AMY = amylin; CGRP = calcitonin gene-related peptide; CLR = calcitonin like receptor; CTR = CT receptor; IMD = intermedin; RAMP = receptor activity modifying protein. Adapted from Poyner et al., 2002.

CTRとCLRのアミノ酸相同性は50%超であるが、CTRは単独でCTに特異的に結合するのに対し、CLRは単独ではいずれの特異的リガンドにも結合せず、CLRが1種のRAMPとヘテロ二量体を形成することよって、リガンドへの結合が可能となる。RAMPはCTR及びCLRのみと相互作用するわけではなく、クラスIIの他のGPCR（Christopoulos et al, 2003）及びクラスIIIのGPCRであるカルシウム感知受容体（CaSR）（Bouschet et al, 2005）とも二量体を形成する。また、各種リガンドは、それらの特異的受容体に対して非常に高い親和性を示すが、リガンドと受容体との交差反応性がみられる場合もある。

CGRP-Rは、主に中枢神経系、末梢神経系及び心血管系で発現する（Wimalawansa, 1996）。また、免疫細胞、骨、気道、消化器系及び胎盤にもCGRP-Rが存在する。上記組織におけるCGRPの生理的及び理論的な役割、並びにCGRP-R拮抗作用から考えられる影響を以下に要約し、その詳細についてはモジュール2.6.2 第3項に詳述する。

3.2.2　CGRP及びCGRP受容体の発現及び分布

CGRP-Rは、7回膜貫通型タンパク質のCLRと1型膜貫通タンパク質のRAMP1で構成されている（Hay et al, 2006、Hay et al, 2008、Walker et al, 2010）。第3のタンパク質である受容体成分タンパク質（RCP）は、Gタンパク質共役及び受容体活性化に必要であるが、リガンド結合との関連性については明らかではない（Prado et al, 2002）。

ラット、サル及びヒト脳の放射性標識CGRP試験、mRNA発現解析及び免疫組織化学的検査から、線条体、丘、中脳水道周囲灰白質（中心灰白質）、傍小脳脚核、三叉神経核、孤束核、小脳、海馬、扁桃体などの各種脳領域において、CGRP及びその受容体の発現が確認された（Van Rossum et al, 1997、Christopoulos et al, 1995、Eftekhari and Edvinsson, 2011）。げっ歯類の末梢神経系では、CGRPは末梢の細い無髄C線維（知覚神経）及び有髄Aδ線維に主に発現し、血管と密に関連する神経において最も高頻度で認められている（Wimalawansa, 1996）。モルモットでは、C線維において他のペプチド（特にタキキニンのサブスタンスP及びニューロキニンA）と共存することが明らかにされている（Lundberg et al, 1985）。

心血管系では、心血管恒常性を制御している末梢血管周囲神経、心外膜動脈、洞房結節、房室結節などにおいて、中枢神経系領域と同様に広範なCGRP免疫活性がげっ歯類で確認されている（Hökfelt et al, 1992）。また、げっ歯類、モルモット及びヒト心臓のオートラジオグラムから、結節

伝導系及びペースメーカー細胞の他にも、抵抗血管内膜及び心筋においてCGRP-Rが確認された（Coupe et al, 1990、Ono et al, 1989）。

ヒト胎盤の免疫蛍光染色では、臍帯動脈・静脈、絨毛膜動脈・静脈及び幹絨毛血管、並びに胎盤絨毛の栄養膜層においてCGRP-Rが認められた（Dong et al, 2004）。放射免疫測定では、妊婦における血漿中CGRP濃度の上昇が示されている（Stevenson et al, 1986）。CGRP濃度の上昇は、妊娠中に必要とされる代謝亢進に適応するための生理的適応を助けるものと推察されているが、妊娠中におけるCGRPの特定の役割については不明である（Chang and Hsu, 2013）。

各種動物の免疫系においては、CGRPを含有する知覚神経が一次及び二次リンパ器官で確認（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応［RT-PCR］及び免疫蛍光法）されており、また、*in vitro*ではヒトBリンパ球（Bracci Laudiero et al, 2002）、Tリンパ球（Wang et al, 2002）、単球（Bracci Laudiero et al, 2005）などの活性化した免疫細胞によってCGRPが産生される。マウスでは、CGRPはランゲルハンス細胞（Ding et al, 2008）、骨髄由来マクロファージ（Fernandez et al, 2001）、ナチュラルキラー（NK）細胞（Umeda and Arisawa, 1989）、樹状細胞、T細胞（Mikami et al, 2011、Mikami et al, 2014）などの種々の免疫細胞に結合し、これらを介してシグナル伝達することが機能活性又はmRNA発現の評価から示されている。ヒトにおける報告より、CD34陽性造血前駆細胞（Harzenetter et al, 2002）、ランゲルハンス細胞（Asahina et al, 1995）、樹状細胞（Carucci et al, 2000）及び末梢血単核細胞（Fox et al, 1997）においてCGRP-R活性が確認されている。

骨におけるCGRP-R発現に関する情報は非常に少ない。破骨細胞系細胞では、マウス骨髄マクロファージにおいてCGRP（並びにAMY及びADM）に対する受容体の発現が示された（Granholm et al, 2008）。ラット骨芽初代培養細胞のRT-PCR及びノーザンブロット解析ではCLRの発現が示されたが、RAMP1の発現レベルは非常に低かった（Naot et al, 2001）。骨片から増殖させたヒト培養骨芽細胞様（骨芽初代培養細胞）においてもCGRP-Rが認められた（Naot et al, 2007）。また、ラット骨端海綿骨の骨組織においてもCGRP免疫反応性知覚神経線維が認められたことから、CGRPは骨代謝制御の役割を担っている可能性が示唆された（Irie et al, 2002）。

CGRPは気道全体わたり知覚神経線維に存在し、CGRP-Rは肺血管に豊富に存在する（McCormack et al, 1989）。免疫標識試験では、消化管の内臓求心性神経においてCGRPが確認された（Sternini, 1992）。ラットでは、CGRPを放出する脊髄求心性神経は、組織血流量を増加させることによって胃酸による胃粘膜損傷に対する抵抗性を増大させるため、胃局所の恒常性に関与することが示された（Holzer, 2000）。

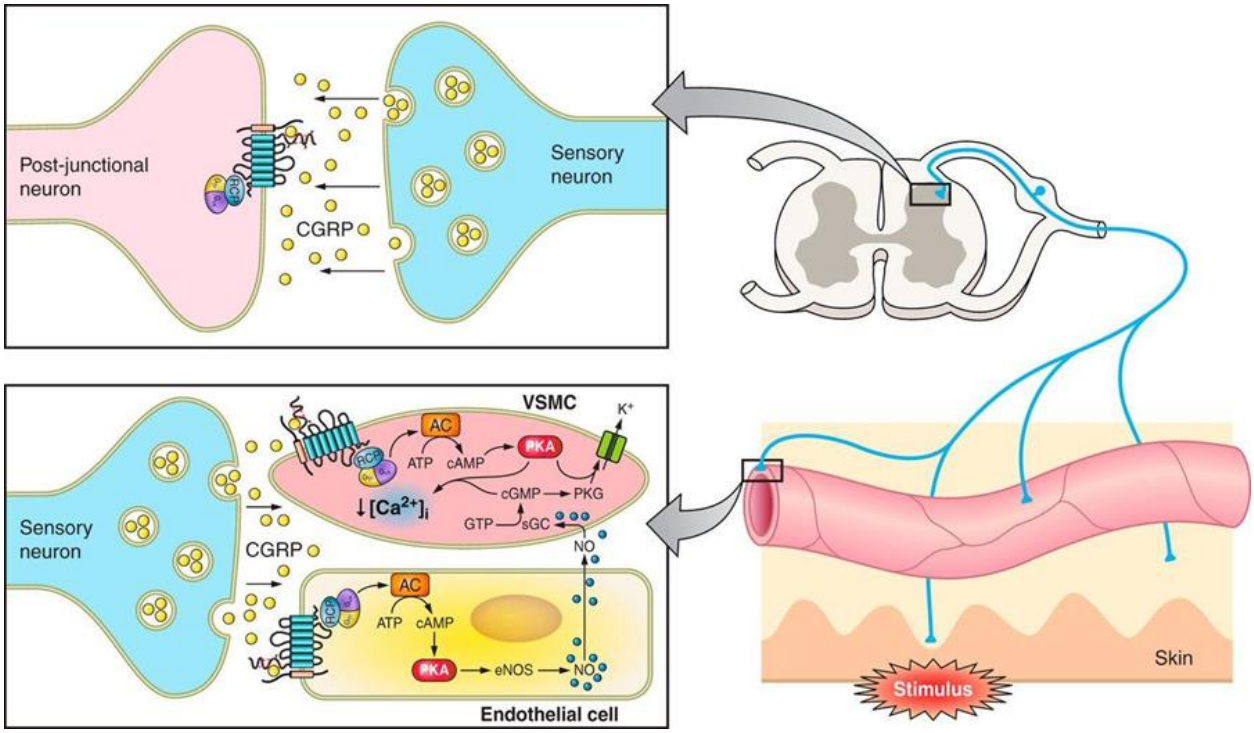
なお、多くの組織がリガンド（放射免疫測定法）及び受容体（免疫組織化学的検査又はmRNA発現解析）のいずれにも陽性反応を示したが、これらが、受容体 - リガンド結合に至る程に隣接しているか否かについてはほとんど不明であることに留意されたい。また、特定の組織部位でCGRPが検出されたことが、同部位においてCGRP-Rも存在することをそのまま示唆するわけではなく、また、その逆の場合でも同じである。

3.2.3　CGRP受容体拮抗作用と全身血圧の変化の関連性

CGRPは、放出部位でパラクラインとして作用する血管拡張物質である（図 3）。このためCGRP-Rを阻害することで、理論的には全身血圧上昇のリスクの可能性がある（Brain et al, 1985）。CGRP

含有線維は、通常、血管と密に関連しており（Uddman et al, 1986）、特に、動脈血行においてCGRPは血管作動性物質としての役割を担っている（Holzer, 1992）。

図 3　CGRP介在性シグナル伝達



CGRP = calcitonin gene-related peptides; VSMC = vascular smooth muscle.
Source: From Russell et al, 2014

外因性CGRPの投与は、脳血管、冠血管、腎血管などの複数の血管床において血管拡張を誘発した（Brain and Grant, 2004）。げっ歯類では、外因性CGRPの投与による血管拡張作用は選択的受容体拮抗薬BIBN4096BSによって顕著に阻害された（Tam et al, 2006）。CGRPの全身投与では、正常血圧ラット及び高血圧ラットにおいて血圧の低下が生じ、また、健康成人及び心血管系に疾患を有する患者においては血管拡張作用が認められている（Russell et al, 2014）。

しかし、CGRP-R拮抗薬を用いた試験の結果から、ラット、ヒトなどの複数の動物種においてCGRPは正常個体における全身血圧の生理的制御に関与しないことが示唆された（Russell et al, 2014）。CGRPは心臓保護物質として機能するADM、キニン、ナトリウム利尿ペプチド、ウロコルチンなどの数多くの神経ペプチドのうちの1つに過ぎない（Burley et al, 2007）。他の各種神経ペプチド及びパラクリン因子と比較したときのCGRPの血管拡張における相対的寄与については不明である。

エレヌマブの毒性試験では、血圧上昇作用は認められなかった。心血管系に特化したカニクイザルを用いた単回投与試験（113726試験）では、エレヌマブは、225 mg/kgまでの用量で血圧上昇を誘発しなかった。ヒト摘出冠動脈を用いた*in vitro*試験では、エレヌマブは血管収縮張力を変化させなかったが、スマトリプタンは近位及び遠位冠動脈を濃度依存的に収縮させた（121150試験）。

これらの結果と一致して、24時間携帯式の血圧測定などの臨床結果及び血圧値と血清中エレヌマブ濃度との曝露 - 反応解析において、エレヌマブ投与による収縮期及び拡張期血圧の上昇は認めら

れなかった（20101268試験）。同様に、健康成人におけるエレヌマブとスマトリプタンの併用投与は、安静時血圧に対して、スマトリプタン単独と比較して臨床的意義がある、あるいは更なる効果（相加的効果）を示さなかった（20140255試験）。また、第II相試験と第III相試験を統合したデータでは、収縮期及び拡張期血圧の値並びに血圧上昇の有害事象の発現頻度において、エレヌマブとプラセボとの間で臨床的意義のある差はみられなかった（モジュール2.7.4）。

以上、CGRPは*in vivo*及び*in vitro*のいずれにおいても強力な血管拡張作用を示す（Brain and Grant, 2004）。しかし、*in vitro*及び*in vivo*において、CGRP-R拮抗薬でCGRP-Rを薬理学的に阻害した結果、直接的な血管収縮はみられなかった（121150試験、Edvinsson et al, 2010、Verheggen et al, 2002）。また、開発中の複数のCGRP拮抗薬が、非臨床試験及び臨床試験のいずれにおいても血行動態に影響していないことから（113726試験、Walter et al, 2014、Depre et al, 2013）、正常個体の血管恒常性におけるCGRPの役割は低いことが示唆された。

3.2.4　CGRP受容体拮抗作用と血管収縮及び心臓虚血脆弱性との関連性

CGRPは血管拡張作用を有するため、CGRP-R阻害による理論的な心血管安全性リスクの一つは、特に冠循環において、虚血関連疾患ないし病態下での代償性血管拡張が低下することである。

心血管系におけるCGRP-R拮抗作用の関与について、*in vitro*、*ex vivo*及び*in vivo*動物モデルで数多く検討した。

ヒト摘出冠動脈を予め収縮させた*in vitro*試験では、近位及び遠位冠動脈において、エレヌマブによる血管運動反応性はみられなかったが、スマトリプタンでは血管収縮が誘発された（121150試験）。同様の結果が低分子CGRP-R拮抗薬で認められた（Chan et al, 2010、Lynch et al, 2010、Edvinsson et al, 2010）。

マウス摘出心臓（Zhong and Wang, 2007、Wang and Wang, 2005）及びモルモット摘出心臓（Song et al, 2001）を用いた*ex vivo*試験では、CGRP-R拮抗薬$CGRP_{8-37}$によるCGRP-Rの阻害は、心機能及び虚血後の回復に影響しなかった。

種々の動物モデルを用いた*in vivo*試験では、心機能及び心臓虚血におけるCGRPの役割について検討した。ラットを用いた*in vivo*麻酔下虚血再灌流試験では、冠動脈閉塞（虚血）前又は再灌流時に薬理用量を大きく上回る用量の外因性CGRPを持続投与すると、心筋梗塞サイズが顕著に縮小した。しかし、虚血再灌流処置開始前のCGRP-R拮抗薬（BIBN4096BS：olcegepant）の投与は、虚血性梗塞サイズに影響しなかったことから、本試験における虚血状態での内因性CGRP放出は、心血管保護効果を示すには十分ではないことが示唆された。この所見は、虚血再灌流処置前の外因性CGRP投与がCGRP濃度を約8倍増加させたのに対し、本試験における虚血中の内因性CGRP放出量増加は約2倍であったという結果からも説明できる。このことから、薬理用量を大きく上回る用量のCGRPは心血管保護作用を示すが、内因性に放出されるCGRPの濃度は極めて低く、心血管保護作用を示すには不十分であることが示唆された（Wu et al, 2001）。無麻酔下においてテレメトリーを装着したイヌでは、ペプチド性CGRP-R拮抗薬$CGRP_{8-37}$による内因性CGRPの阻害は、全身及び局所血流量に影響しなかったが、外因性CGRPの投与は局所血管床の顕著な血管緊張低下を誘発し、平均動脈血圧を低下させた（Shen et al, 2001）。この結果は、麻酔処置したラット（Arulmani et al, 2004）及びブタ（Kapoor et al, 2003）を用いた別の試験において、olcegepantでCGRP-Rを阻害したと

きに心筋血流量の変化はみられなかったことと一致する。拡張型心筋症を合併する心筋梗塞のイヌ心不全モデルでは、CGRP-R拮抗薬$CGRP_{8-37}$は心機能に影響しなかったが（Shen et al, 2003）、スマトリプタンは同様の試験において虚血重症度を悪化させ、反応性充血を低下させた（Lynch et al, 2009）。急性局所心筋虚血（断続的な短期心房ペーシングと急性冠動脈狭窄の併用による）イヌモデルでは、ペプチド性CGRP-R拮抗薬$CGRP_{8-37}$は、虚血重症度及び冠血流量に影響しなかった。また、外因性CGRPは、冠血流量及び虚血重症度に影響しなかった（Regan et al, 2009）。さらに、麻酔処置したブタ（冠動脈構造がヒト心臓に最も類似する動物種）を用いた虚血再灌流試験では、外因性CGRPは血圧低下を誘発し、虚血後の冠血流量を増加させたが、CGRP及び$CGRP_{8-37}$のいずれの投与によっても、冠動脈梗塞サイズは変化しなかった（Källner et al, 1998）。

健康成人、片頭痛患者あるいは安定狭心症患者を対象とした低分子CGRP-R拮抗薬の臨床試験において、心血管系の有害事象はみられなかった（Van der Schueren, 2011、Chaitman et al, 2012）。再現性のある運動時間を示す安定狭心症患者を対象としたトレッドミル運動試験では、エレヌマブは、プラセボと比較して総運動時間に有意差を示さなかった。また、第II相試験と第III相試験を統合した結果による心血管リスク評価では、心血管安全性の問題となるリスク及びその可能性の増加は認められなかった（モジュール2.7.4）。

3.2.5　CGRP受容体拮抗作用が骨代謝に影響する可能性

骨におけるCGRPの役割は明らかではない。ラットでは、CGRP陽性ニューロンが海綿骨で検出されており、また、骨芽初代培養細胞は分化しCGRP-Rを発現する。このため、CGRPは骨代謝において何らかの役割を有している可能性があるとの仮説が立てられている（Irie et al, 2002）。卵巣摘出ラットにCGRPを投与すると、卵巣摘出による骨量低下が部分的に抑制された（Valentijn et al, 1997）。*In vitro*では、CGRPは、ヒト歯髄細胞において骨形成タンパク質2（BMP2）の発現を誘発することが示された（Calland et al, 1997）。しかし、α-CGRPノックアウトマウスでは、軽度の骨減少のみが認められた（Schinke et al, 2004）。骨においてはCGRP及びAMYに特異的な受容体は別々に存在するという仮説があるが、共通の受容体が存在しCGRPよりもAMYに対して高い親和性を有するという報告もある。（Cornish et al, 1999）。カニクイザルを用いた反復投与毒性試験では、インタクトオステオカルシン（OC）、骨型アルカリ性ホスファターゼ（BAP）、インタクトI型プロコラーゲン-N-プロペプチド（P1NP）、I型コラーゲン-C-テロペプチド（CTx）、I型コラーゲン-N-テロペプチド（NTx）などの骨形成及び骨吸収バイオマーカーを評価した。エレヌマブを、最高用量150 mg/kgまでの用量で週2回、最長6カ月間、皮下投与したところ、同時対照及び投与前値と比較して、骨形成マーカー（OC、BAP及びP1NP）値及び骨吸収マーカー（CTx及びNTx）値に影響はなかった。また、骨の病理組織学的変化もみられなかった（113732試験）。さらに、ePPND試験では、放射線検査において出生児の骨格の変化はみられなかった。同様に、健康成人及び片頭痛患者における骨代謝回転バイオマーカーのP1NP及びCTxの投与前値からの変化量に、エレヌマブ群とプラセボ群との間で臨床的意義のある差はみられなかった（モジュール2.7.4）。

3.2.6 CGRP受容体拮抗作用が胃粘膜完全性に影響する可能性

CGRPの胃損傷保護作用の機序として、ソマトスタチン胃分泌阻害作用及び直接的な血管拡張作用を介した粘膜充血など、いくつかの機序が推察されている（Evangelista, 2009）。外因的に胃酸分泌を亢進したラットモデルでは、内因性CGRPは胃酸分泌を低下させ（Taché et al 1984）、CGRP拮抗薬の静脈内投与はCGRPの胃酸分泌阻害作用を抑制した（Saeki et al, 2000）。CGRPによる胃粘膜血流量の制御は、胃粘膜保護及び修復機序の1つであると考えられている。ラット及びマウスでは、低用量CGRPの末梢投与は、実験的に誘発した胃潰瘍を改善することが示されている（Clementi et al, 1993、Ohno et al, 2008）。CGRPファミリーの他のメンバー（ADM及びAMY）を含む多くのペプチドは胃粘膜保護を促進することが報告されていることから（Taché, 2012）、共力的かつ重複性の機序及び経路が複数存在すると考えられる。これに対して、CGRPは腸の炎症に関与し、運動性障害を誘発するとの仮説が立てられており、低分子CGRP-R拮抗薬はマウスの炎症を抑制し、胃運動性を回復させることが示された（Glowka et al, 2015）。エレヌマブの最長6カ月間の反復投与毒性試験では、消化器系関連の一般状態の変化及び病変はみられなかった（モジュール2.6.6 第3項）。

これらの結果と一致して、臨床試験において、消化器系炎症及び潰瘍のリスクの増加はみられなかった。臨床試験で認められた消化器系関連有害事象で、エレヌマブに関連すると考えられる有害事象は、軽度から中等度の便秘のみであった（モジュール2.7.4）。

3.2.7 正常妊娠時に推定されるCGRPの役割

CGRP及びCGRP-Rは、ヒト母体及び胎児・胎盤組織において確認されている（Dong et al, 2004）。ヒトでは、妊娠中に循環血中CGRP濃度が増加する。しかし、ラットでは妊娠中に後根神経節における発現増加が認められたものの（Lanlua et al, 2001）、ヒトでの循環血中CGRPの正確な起源については未だ不明である（Stevenson et al, 1986）。妊娠に伴う子宮胎盤血流量の増加及び子宮血管抵抗の低下がみられており（Roberts, 1989、Magness, 1998）、CGRPは、強力な血管拡張物質として機能的に重要である可能性が推察されている。また、正常血圧妊婦から得られた胎盤の血管組織及び栄養膜において、CGRP-R発現の減少が示された（Dong et al, 2004）。ニトロ-L-アルギニンメチルエステルで子癇前症を誘発した妊娠ラットにおいて、妊娠17日目から分娩後2日目までCGRPを静脈内持続投与した結果、妊娠中の血圧は低下し、胎児の成長及び生存率が改善された（Yallampalli et al, 1996）。これに対して、妊娠ラットに妊娠17日目から20日目までCGRP-R拮抗薬である$CGRP_{8-37}$を持続皮下投与した結果、血圧上昇、胎児体重減少及び出生児の死亡率上昇がみられた（Gangula et al, 2002）。このような状態は、正確な生理的状態を表すものではないと考えられ、興味深いことに、α-CGRPノックアウトマウスでは受胎能及び生存能も確認され、同腹児の正常な発生もみられた（Lu et al, 1999）。また、最近の所見では、妊娠中におけるADMの役割はCGRPよりも顕著であることが確認されている（Senna et al, 2008、Lenhart et al, 2014）。カニクイザルを用いたエレヌマブのePPND試験（113734試験）では、母体及び胎児発生において、エレヌマブに関連する所見はみられなかった。

3.2.8 CGRP及びCGRP受容体拮抗作用の呼吸恒常性への影響

CGRPは気道全体にわたる知覚神経線維に存在し、肺における血管の緊張度の制御に関与しており、また、肺では、CGRP-Rが肺静脈において豊富に存在する（McCormack et al, 1989）。低酸素肺高血圧症ラットにCGRPを投与すると、慢性低酸素肺高血圧症の発症が抑制され（Keith, 2000）、これは、CGRPの血管拡張作用によるものと考えられた。CGRPは気道機能並びに気管支過敏症及び喘息の発現機序において重要な作用を有する可能性がある（Palmer et al, 1987）。しかし、CGRPは*in vitro*でヒト及びモルモットの気道を収縮及び弛緩しなかった（Cadieux et al, 1999）。α-CGRPノックアウトマウスでは抗原誘発性の気道過敏症（AHR）が軽減されたが（Aoki-Nagase et al, 2002）、アレルゲンを投与して感作させたマウスへのCGRP拮抗薬の投与は、AHR及び気道炎症の発症を抑制しなかったことから、CGRPはAHRの発現を仲介しないことが示唆された（Dakhama et al, 2002）。また、喘息患者から得られた気管支組織を検討した試験では、CGRP発現の増加は認められなかった（Howarth et al, 1995、Chanez et al, 1998）。全体として、呼吸恒常性におけるCGRPの役割は不明である。カニクイザルを用いたエレヌマブの毒性試験（113724及び113732試験）では、呼吸困難に関連する一般状態の変化及び病理組織学的変化はみられなかった。また、テレメトリー装着カニクイザルを用いた単回投与試験においても、呼吸数の変化はみられなかった（113726試験）。

これらの結果と一致して、臨床試験においてもエレヌマブ投与による急性気道感染症や喘息のような慢性病態などの気道疾患はみられなかった（モジュール2.7.4）。

3.2.9 CGRP受容体拮抗作用とがん原性リスクの関連性

エレヌマブは、げっ歯類において生物学的活性を示さないモノクローナル抗体であるため、がん原性リスクを評価する非臨床試験は適切ではないことから、これらの試験は実施しなかった。エレヌマブはカニクイザルにおいて生物学的活性を示すが、本動物種はがん原性リスク評価に適切なモデルではない。また、CGRP拮抗作用と悪性腫瘍の関連性を示す直接的証拠はない。ノックアウトモデルの免疫機能、細胞増殖及び表現型特徴についての評価で得られた証拠から、エレヌマブの長期臨床使用によるがん原性リスクはないと結論付けられた。これらの評価を裏付ける代表的な所見を以下に示すと共に、モジュール2.6.2 第3.8項に詳述する。

- 腫瘍増殖及び発生に対するCGRPの作用について、腫瘍増殖の直接的仲介物質としての作用及び免疫変化を介して働く間接的仲介物質としての作用を考察した。種々の免疫細胞（ランゲルハンス細胞、樹状細胞、マクロファージ、CD34陽性造血前駆細胞など）はCGRP-Rを発現する。CGRPは主に神経原性血管拡張物質として作用するが、樹状細胞、単球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞及びT細胞に対して広範な抑制性の活性を示し、炎症の下方制御又は回復も行う。腫瘍免疫監視機構はこれらの細胞が支配していることを考慮すると、CGRP阻害は先天性及び適応性免疫を増強又は正常化する可能性があり、腫瘍免疫監視機構を障害しないと考えられる。
- CGRPと悪性腫瘍の関連性を示す直接的証拠はない。CGRPノックアウトマウスにおいて、過形成及び腫瘍形成を示唆する所見もみられていない。患者では、小細胞肺がん、前立腺がん、乳がん、甲状腺がんなどの特定のがんから得られた血漿及び腫瘍のいずれにおいても、CGRPの

増加がみられた。*In vitro*では、ヒト肺胞上皮細胞（CGRP拮抗作用がCGRP誘発性増殖を抑制した）、ヒト前立腺がん由来細胞、げっ歯類シュワン細胞及び平滑筋細胞などの各種細胞株において、CGRPは増殖を亢進させた。また、腫瘍移植CGRPノックアウトマウスは、腫瘍容積減少及び血管新生低下を示した。以上から、CGRP拮抗作用にがん原性はないと考えられる。

- エレヌマブはヒトIgG2抗体であり、1344個のアミノ酸からなり、分子量は約150 kDaである。高分子量のエレヌマブは、細胞拡散しないことから、DNA又は染色体成分と直接的に反応しないと考えられる。このため、エレヌマブには遺伝毒性はないと考えられる。また、エレヌマブは、通常の発がんプロモーターでもないと推察される。カニクイザルを用いた毒性試験では、ヒトで用いられた用量の140 mgの123倍もの曝露量で、細胞肥大、細胞過形成、組織傷害、組織炎症、前がん病変などの腫瘍形成の病理組織学的リスク因子はみられなかった。また、免疫系、内分泌器官及び生殖器官において器官重量の変化がなく、肉眼的及び病理組織学的変化もなかったことから、免疫抑制及びホルモン変動はみられないことが示された。

結論として、対象とする薬物標的に関する情報、効力を裏付ける試験、副次的薬理試験、発現及び分布、包括的な公表論文に基づいた本評価から、エレヌマブの片頭痛治療薬としての長期臨床使用によって、片頭痛患者のがん原性リスクは増加しないと考えられる。

3.3 安全性薬理試験

心血管評価項目、呼吸数及び神経行動学的検査におけるエレヌマブの影響について、テレメトリー装着カニクイザルを用いて検討した。

25又は225 mg/kgの用量での単回皮下投与で、エレヌマブに関連する不整脈及びECG波形の変化はみられなかった。エレヌマブに関連するQRS及びQTc間隔の変化はみられなかった。また、PR間隔、心拍数及び血圧に生物学的意義のある変化はみられず、体温、呼吸数及び神経行動学的検査においてもエレヌマブに関連する変化はみられなかった。

エレヌマブはモノクローナル抗体であり、hERGイオンチャネルと相互作用しないと考えられるため、エレヌマブのhERGイオンチャネル電流阻害作用の有無については検討しなかった（Vargas et al, 2013）。

上記の結果は、反復投与毒性試験における結果（モジュール2.6.6 第3項）及び臨床試験において血行動態の有害事象は認められなかったこと（モジュール2.7.4）と一致した。

4. 薬物動態（モジュール2.6.4）

カニクイザルに用量0.1～300 mg/kgのエレヌマブを静脈内及び皮下投与したときのPKを評価した。一部の試験では、ADAの生成についても評価した。PKデータをプールしてモデルを構築し、総合的PKパラメータを算出した。主な所見は以下の通りである。

- 単回静脈内投与したときの最高血清中濃度（C_{max}）及び血清中濃度－時間曲線下面積（AUC）は、0.1～3 mg/kgの範囲で用量比を上回る増加を示し、3～300 mg/kgの範囲で用量に比例して増加した。
- エレヌマブを反復皮下投与したときの蓄積係数は小さく、用量25～225 mg/kgを4週間反復皮下投与したときで約2倍、25及び150 mg/kgを3及び6カ月間反復皮下投与したときで1.6～3.0倍であった。
- 標的介在性消失と一致する非線形性のPKを示した。
- 皮下投与時のバイオアベイラビリティは60%と推定された。
- モノクローナル抗体に典型的な分布容積を示し、血管外への分布は限られていることが示唆された。
- 一部の動物でADAが検出され、これに伴って血清中薬物濃度の低下が認められたが、薬理学的及び毒性学的に意味のある用量でのPK評価を損なうものではなかった。

4.1 分析法

すべての分析法をモジュール2.6.4及びモジュール2.6.5 表2に示す。

要約すると、カニクイザル血清中のエレヌマブ濃度は、一対の抗イディオタイプ抗体を用いた酵素免疫測定（ELISA）法、又は、マウスFcを結合させた遺伝子組換えヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）受容体によりエレヌマブを捕捉し、マウス抗ヒトIgG Fc抗体により検出することで測定した。これらの方法は高感度で特異的であった。すべての方法がGLP基準を満たしているか、又は（GLP毒性試験用の方法は）GLPに適合していた。

抗エレヌマブ結合抗体の検出には、バリデートされた電気化学発光（ECL）に基づくブリッジングイムノアッセイ法を使用し、一部の初期試験では、適格性を確認したECLに基づく一般的な間接的種特異的分析法を使用した。ADA陽性と判定された試料については、バリデートされたセルベースバイオアッセイ法を用いて、中和活性の分析を行った。また、一部の毒性試験において、バリデートされたECLに基づくイムノアッセイ法を用いて血中免疫複合体を評価し、1つの非GLP試験で中和抗体分析法の代わりにバリデートされたセルベースアッセイ法を用いて生物活性を有するエレヌマブの測定を行った。

4.2 吸収

エレヌマブの吸収について、モジュール2.6.4 表3及び表4、並びにモジュール2.6.5 表3に示す。

すべての非臨床PK試験及びTK評価を行った毒性試験のデータを統合し、線形及び非線形飽和性消失を考慮した母集団PKモデルを用いて解析した。予備的なノンコンパートメント法によるPK解析から、血清中濃度は1000 ng/mL未満で標的介在性薬物動態の可能性が示唆されたことから、モデ

ルに非線形飽和性消失を組み込んだ。真のPKパラメータを適切に推定するため、ADAが確認された試料及びADAが確認された後に同じ動物から採取した試料は、PK解析から除外した。

皮下投与後のバイオアベイラビリティは約60%であり、吸収半減期は約0.94日であった。AUCの平均蓄積係数は、25～225 mg/kgを週2回4週間反復皮下投与したときで約2倍、25及び150 mg/kgを週2回3及び6カ月間反復皮下投与したときで1.6～3.0倍であった。曝露量に明確な性差は認められなかった。静脈内投与したときのC_{max}及びAUCは、0.1～3 mg/kgの範囲で用量比を上回る増加を示し、3～300 mg/kgの範囲で用量にほぼ比例して増加した。

4.3 分布

分布試験は実施しなかった。エレヌマブの分子量から、IgG抗体の血清から組織への分布は限定的である。母集団モデル解析から、エレヌマブの定常状態における分布容積は、血漿容量の2～5倍に相当する250 mLと推定された（Tabrizi et al, 2010、Lobo, et al 2004）。

4.4 代謝

モノクローナル抗体製剤の場合、通常の異化分解により、小さなペプチド及び個々のアミノ酸へと代謝されると予想されることから代謝試験は実施しなかった。

4.5 排泄

エレヌマブの分子量から、モノクローナル抗体が尿中に排泄されることはないと予想される（Keizer et al, 2010）。したがって、エレヌマブの排泄を測定する特別な試験は実施しなかった。

4.6 薬物動態学的薬物相互作用試験

CGRPを標的とする抗体では、薬物間相互作用は生じないと予想されることから、特別な非臨床薬物動態学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

5. 毒性試験（モジュール2.6.6）

エレヌマブの非臨床安全性プロファイルを特徴づけるため、カニクイザルを用いた包括的な一連の毒性試験を実施した（モジュール2.6.6及びモジュール2.6.7）。

5.1 単回投与毒性試験

ICH S6(R1) に従い、エレヌマブについて単独の単回投与毒性試験は実施しなかった。しかし、1カ月間反復投与毒性試験で単回静脈内投与群（100 mg/kg）を設けたところ、この用量で急性毒性はみられなかった。さらに、カニクイザルを用いた安全性薬理試験（モジュール2.6.2 第4項）の単回投与後（225 mg/kg、皮下投与）及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験の225 mg/kgまでの用量での初回投与後（モジュール2.6.6 第3項）において、急性毒性は認められなかった。

5.2 反復投与毒性試験

モジュール2.6.7 表6、表7A及び表7Bを参照。

エレヌマブの毒性及びTKプロファイルを評価するため、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験を実施した。

雄のカニクイザルを用いた探索的な1カ月間反復投与毒性試験において、エレヌマブを75 mg/kg（週2回又は3回）及び225 mg/kg（週2回）の用量で皮下投与したところ、エレヌマブ関連の所見は認められなかった。

カニクイザルを用いた1カ月間反復投与毒性試験において、エレヌマブを25、75及び225 mg/kgの用量で週2回皮下投与した。また、エレヌマブの100 mg/kgの用量での単回静脈内投与による評価も実施した。一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、ECG、体温、呼吸数、臨床検査、肉眼観察及び器官重量において、エレヌマブ関連の変化は認められなかった。病理組織学的検査では、エレヌマブに直接関連する変化はみられなかった。25 mg/kg群の雌1匹で、循環血中抗エレヌマブ免疫複合体の発現による二次的な免疫複合体関連病変（リンパ節の化膿性肉芽腫性炎症）の合併症がみられたため、29日目に安楽死させた。NOAELは高用量の225 mg/kg（皮下投与、週2回）に設定され、この用量でのC_{max}は3000 µg/mL、$AUC_{0\text{-}7d}$は16800 µg·day/mLであった。100 mg/kgの用量で単回静脈内投与したときの曝露量は、C_{max}が2510 µg/mL、$AUC_{0\text{-}14d}$が7780 µg·day/mLであった。

カニクイザルを用いた3及び6カ月間の複合的な反復投与毒性試験において、エレヌマブを25又は150 mg/kgの用量で週2回皮下投与した。25 mg/kg群の14匹中3匹で、本試験の投与期間中に抗エレヌマブ抗体（ADA）が検出され、それに関連して投与期間中のエレヌマブの曝露量が減少した。これらの動物はTK解析から除外した。投与期間中に異なる2匹（25 mg/kg群の1匹及び150 mg/kg群の1匹）で結合抗体が検出されたが、測定可能な薬物曝露量への影響は認められなかった。少数例でADAが発現したにもかかわらず、エレヌマブ投与群の薬物曝露量は、全試験期間を通して確実な毒性評価を可能にするものであった。一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、ECG、体温、呼吸数、臨床検査、骨形成又は骨吸収のマーカー、肉眼観察及び器官重量において、エレヌマブ関連の変化は認められなかった。エレヌマブに関連する変化は、皮下投与部位における単核細胞浸潤のみであった。150 mg/kg群の雄1匹における病理組織学的変化として、ADA及び免疫複合体の発現に

よる二次的な免疫介在性血管炎症が観察された。NOAELは高用量の150 mg/kgに設定され、この用量でのC_{max}は2620 µg/mL、$AUC_{0\text{-}7d}$は15300 µg·day/mLであった。

エレヌマブ投与群の高い薬物濃度が、投与期間中のイムノアッセイにおけるADAの検出を妨害した可能性があるため、バリデートされた循環血中免疫複合体（CIC）アッセイも実施し、反復投与毒性試験におけるADAの有無を評価した。少数例で循環血中抗エレヌマブ免疫複合体が検出され、それに関連して、一部の動物では、免疫介在性病変に一致する病理組織学的変化が観察された。ヒトタンパク質をカニクイザルに投与すると、それに関連して、しばしばヒトタンパク質に対する抗体が発現することから、動物モデルにおける免疫原性は予測的価値が低く、ヒトでの免疫原性発現率及びADAによる免疫介在性有害事象の発現頻度を過大に推定するものである（Ponce et al, 2009、Bugelski and Treacy, 2004、Koren et al, 2002）。

5.3 遺伝毒性試験

エレヌマブは完全に天然アミノ酸から構成される遺伝子組換えモノクローナル抗体であり、無機リンカー、合成有機リンカー及びその他の非タンパク質部分を含有しない。したがって、エレヌマブはDNA又はその他の染色体物質と直接反応しないと考えられることから、ICH S6(R1) に従い、遺伝毒性試験は実施しておらず、その計画もない。

5.4 がん原性試験

エレヌマブはげっ歯類において生物学的活性を示さないモノクローナル抗体であるため、げっ歯類モデルを用いたがん原性試験は実施できない。このため、ICH S6(R1) に従い、非臨床試験は実施しなかったが、エレヌマブのがん原性の有無に関する包括的な評価を、予定している薬物の標的及び経路に関する知見、効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験、非臨床試験で得られたデータ並びに特にがん原性リスクを検討した包括的な文献レビューに基づいて実施した。これらの評価から、エレヌマブの長期臨床使用に関連するがん原性リスクはないと結論される（詳細はモジュール2.6.2 第3項参照、このうちリスク評価の要約についてはモジュール2.6.2 第3.8項参照）。

5.5 生殖発生毒性試験

エレヌマブの生殖発生に関する非臨床安全性プロファイルを、カニクイザルを用いたePPND試験で検討したところ、この試験においてエレヌマブ関連の生殖発生への影響は認められなかった。

5.5.1 胚・胎児発生及び出生後の発達

モジュール2.6.7 表14を参照。

カニクイザルを用いたePPND試験において、使用経験のない50匹の成熟した妊娠カニクイザルに、エレヌマブを0又は50 mg/kgの用量で妊娠20～22日から分娩まで、2週に1回皮下投与し（最多で1匹当たり11回投与）、母動物及びその出生児の発生への影響を評価するとともに、妊娠期から出生

までエレヌマブを投与した母動物の出生児について、生後6カ月まで成長及び発達への影響を評価した。

TK解析によると、妊娠133日の投与後における成熟カニクイザルの平均エレヌマブ曝露量値（C_{max}及びAUC_{0-14d}）は、それぞれ422 µg/mL及び4280 µg· day/mLであった。分娩後／生後観察期間における母動物／出生児の平均血清中エレヌマブ濃度は、分娩後／生後14、28及び91日において、それぞれ66／117 µg/mL、23／46 µg/mL及び0.009／0.188 µg/mLであった。エレヌマブ濃度がおおむね定量下限を下回ったのは、母動物では分娩後91日より後であり、出生児では全例が生後91日より後であった。カニクイザルではIgG2モノクローナル抗体の胎盤移行性が知られていること（Moffat et al, 2014）及び生後の出生児における母動物由来のIgGの全身曝露量が無視しうる程度であること（Van de Perre, 2003、Hurley and Theil, 2011）に基づくと、観察された出生児の曝露は、子宮内で胎盤を介して生じた可能性がある。

対照群の母動物2匹で、検出可能な濃度のエレヌマブが認められた（1匹は妊娠48～76日、他の1匹は妊娠104～127日）。対照群の母動物1匹及びその出生児で、それぞれ分娩後14～28日及び生後14～98日に、検出可能な濃度のエレヌマブがみられた。また、対照群の別の出生児1匹で、生後14日のみに検出可能な濃度のエレヌマブが認められた。溶媒対照のコンタミネーション検査を実施したが、検出可能な濃度のエレヌマブがみられた原因は判明しなかった。被験物質への曝露が一過性であったことから、これらの動物を対照として使用することに問題はなく、TKを含めた本試験の全体的解釈に影響を及ぼすものではないと考えられた。

エレヌマブを妊娠カニクイザルに50 mg/kgの用量で2週に1回で皮下投与したときの忍容性は良好であった。一般状態観察、摂餌量、体重、妊娠期間及び妊娠成績／生後成績（すなわち胎児死亡率又は出生児死亡率）には、エレヌマブ関連の変化は認められなかった。

母動物及び出生児発生に関する無影響量（NOEL）は50 mg/kg（2週に1回）であった。

5.5.2　幼若動物を用いた試験

エレヌマブは、小児（6歳以上、12歳未満）及び青少年（12歳以上、18歳未満）を含めた片頭痛発作の発症抑制の目的で開発中である。

反復投与毒性試験で評価した動物の年齢は、少なくともヒトの性成熟過程における小児期後期／前期思春期に相当する。たとえば、カニクイザルの1カ月間反復投与毒性試験（113724試験）では開始時2.5～4.3歳の動物を使用し、3及び6カ月間反復投与毒性試験（113732試験）では、開始時4.3～7.4歳の動物を使用した。上記の毒性試験における年齢の範囲は、おおむねヒトでは約10歳以上に相当するが、一部の生後事象（免疫系の発達など）は、より若いヒトの年齢に外挿するのが適切と考えられる（Morford et al, 2011、Martin and Weinbauer, 2010、Beck et al, 2006）。これらの反復投与毒性試験の結果から、12歳以上の小児被験者を対象とした評価は、非臨床安全性の観点から支持される。

小児における安全性をさらに担保するための非臨床試験として、カニクイザル発生時の母動物曝露によりエレヌマブの影響の有無を評価するePPND試験を実施した。生後3カ月（ヒトでは0～2歳に相当する［Weinbauer et al, 2012］）までの新生児曝露（胎盤移行の結果）がみられたが、出生児の

成長及び発達にはエレヌマブに関連した影響は認められなかった。第5.5.1項に記述したように、発生に関するNOELは50 mg/kg（2週に1回）であった。

今後の臨床試験への6歳以上、12歳未満の小児の組入れを担保するため、幼若カニクイザルを用いた毒性試験を計画中である。

5.6 局所刺激性試験

エレヌマブについて、単独の局所刺激性試験は実施しなかった。エレヌマブの局所刺激性の評価は、反復投与毒性試験における毒性評価の一環として実施した。不忍容を示唆する肉眼的変化はみられなかった。皮下／静脈内投与部位に肉眼的変化あるいは軽微から中等度の病理組織学的変化がみられたが、投与に起因するものでエレヌマブの薬理作用との関連性はないと考えられた。

5.7 その他の毒性試験

5.7.1 免疫原性試験

免疫原性を評価するために特異的にデザインされた試験は実施しなかった。その代わり、抗エレヌマブ抗体のアッセイを、カニクイザルを用いた3つの反復投与毒性試験（114005試験、113724試験及び113732試験）、1つの薬理試験（R20100187試験）及び1つのTK試験（113591試験）で実施した。上記のすべての試験について、それぞれモジュール2.6.6、モジュール2.6.2、モジュール2.6.4に要約する。3及び6カ月間反復投与毒性試験（113732試験）では、投与期間中に低用量群（25 mg/kg）の14匹中3匹で抗エレヌマブ中和抗体が検出され、それに伴いエレヌマブ曝露量が減少した。これらの動物はTK評価から除外した。この試験では、異なる2匹（低用量25 mg/kg群の1匹及び高用量150 mg/kg群の1匹）で抗エレヌマブ結合抗体が検出されたが、TKパラメータへの影響はみられなかったことから、エレヌマブの確実な安全性評価が可能であった。

すべてのエレヌマブ投与群における高い血清中薬物濃度が、投与期間中のイムノアッセイによるADA検出に干渉した可能性があるため、ADAの有無を評価するための代替法として、バリデートされたCICアッセイを実施した。循環血中抗エレヌマブ免疫複合体が少数例で検出され、それに関連して免疫介在性病変に一致する病理組織学的変化が認められた。ヒトタンパク質をカニクイザルに投与すると、それに関連して、しばしばヒトタンパク質に対する抗体が発現することから、動物モデルにおける免疫原性は、ヒトにおけるADAの発現頻度又は免疫を介した有害事象についての予測的価値は低い（Ponce et al, 2009、Bugelski and Treacy, 2004、Koren et al, 2002）。

臨床試験において、エレヌマブに対する抗体を評価した。免疫原性の結果及び影響の解析を、免疫原性総括報告書（モジュール5）に要約する。

5.7.2 免疫毒性試験

エレヌマブの反復投与毒性試験で得られた結果、本薬の薬理学的特性、予定対象患者集団及びICH S8に従って考慮した他の要因に基づくと、懸念は確認されなかったことから、更なる免疫毒性試験は必要ないと考えられた。

5.7.3　作用機序解明試験

いずれの非臨床毒性試験においてもエレヌマブに関連した毒性はみられなかったことから、作用機序解明試験は実施しなかった。

5.7.4　依存性試験

エレヌマブの薬物乱用又は誤使用の可能性を示唆するエビデンスはなく、いずれも認められていないことから、規制ガイドラインICH M3(R2) に従い、依存性試験は実施しなかった。他の抗体と同様に、エレヌマブの一部は血液脳関門を通過する可能性があるが、中枢における濃度（血中濃度の0.3%以下）及び活性は低いと予想される（St-Amour et al, 2013、Watts and Dennis, 2013、Poduslo et al, 1994、Triguero et al, 1989、Jones and Shusta, 2007、Frank et al, 2011、Yu and Watts, 2013）。カニクイザルの脳脊髄液中におけるエレヌマブ濃度は、血清中濃度の0.1%未満であった（114005試験）。動物試験に関して、テレメーター装着カニクイザル（113726試験）、反復投与毒性試験（113724及び113732試験）及び出生児（113734試験）での神経行動変化は、それぞれヒトで用いられた用量の140 mg 4週に1回投与での定常状態におけるヒトC_{max}の38倍、88倍及び3.4倍までの曝露量で認められなかった。

さらに、文献（効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験を含む）の包括的レビューによると、CGRP及びその受容体は、鎮静、多幸症、知覚及びその他の認知のゆがみ、幻覚並びに気分変化といった乱用の原因となることが確認されている正の向精神作用を示さないと考えられる。これまでに実施されたエレヌマブの臨床試験において、乱用性を特徴づける有害事象は確認されていない（モジュール2.7.3及びモジュール2.7.4）。

5.7.5　代謝物に関する試験

モノクローナル抗体の代謝は、通常の異化的分解により、低分子ペプチド及び個々のアミノ酸が生成すると予想されることから、代謝物に関する試験は適切でないと考えられる（モジュール2.6.4）。このため、代謝物に関する試験は必要ないと考えられた。

5.7.6　不純物に関する試験

エレヌマブはバイオテクノロジー由来の医薬品であることから、不純物についての試験は該当しない。

5.7.7　その他の試験

モジュール2.6.7 表17を参照。

5.7.7.1　組織交差反応性試験

組織内の抗原決定基に対するモノクローナル抗体及び関連する抗体様産物の結合を特徴づけるために実施した組織交差反応性（TCR）試験は、免疫組織化学的（IHC）手法を採用した*in vitro*組織

結合アッセイである（ICH S6(R1)）。エレヌマブについて2つのTCR試験を実施した。1つはヒトから採取した正常組織の完全なパネルを用いた試験であり、他の1つはカニクイザルから採取した限定的な組織を用いた試験であった（モジュール2.6.6 第8.7項）。

カニクイザル：特異的なAlexa-エレヌマブ染色が、小脳及び脊髄に認められた。大脳切片には特異的染色はみられなかった。

ヒト：特異的なAlexa-エレヌマブ染色が、ヒトの小脳、脊髄及び下垂体に認められた（予想される発現部位に一致していた）。小脳では分子層灰白質の神経網にびまん性染色がみられ、脊髄では神経網に散在性の細線維状染色が認められた。下垂体前葉細胞の細胞質にも顆粒状染色がみられた。

組織交差反応性試験における免疫組織化学的検査の方法は、人工的で非生理的な条件を示すものであり、この方法では、候補となるモノクローナル抗体がヒト又は動物の組織切片に直接適用される。これにより、*in vivo*投与では通常到達しない細胞及び組織（すなわちCNS）のコンパートメントに抗体が接近する（St-Amour et al, 2013、Watts and Dennis, 2013、Poduslo et al, 1994、Triguero et al, 1989、Jones and Shusta, 2007、Frank et al, 2011、Yu and Watts, 2013）。モノクローナル抗体は高分子であり、非病的状態では血液脳関門を容易に通過しないため（Boado et al, 2010、Pardridge, 2007）、小脳及び脊髄の実質コンパートメントにはほとんど接近しない。同様に、エレヌマブはモノクローナル抗体であり、細胞膜を通過しないため、細胞の細胞質コンパートメントに接近しないと予想される。下垂体の細胞内構成要素への結合は、エレヌマブに関して安全性上の懸念となるものではないと考えられる。カニクイザルを用いた最長6カ月間の反復投与毒性試験において、脳、脊髄及び下垂体の病理組織学的変化は認められなかった。また、カニクイザルの拡充型出生前及び出生後の発生に関する試験において、出生児の神経行動変化はみられなかった。したがって、組織交差反応性試験でみられた染色は、ヒトにおける安全性上の懸念を提示するものではない。

5.7.7.2　エレヌマブ：ヒト摘出冠動脈を用いた試験

ヒト冠動脈におけるエレヌマブの血管収縮能を、*in vitro*で5-$HT_{1B/1D}$受容体アゴニストのスマトリプタン（陽性対照）との比較により評価した。

エレヌマブは、検討した最高濃度（1 μmol/L）までのいずれの濃度においても、冠動脈の収縮を誘発しなかった。エレヌマブはCGRPを介した血管拡張を競合的に阻害した。スマトリプタンは血管収縮を誘発し、エレヌマブとスマトリプタンの併用による作用はスマトリプタン単独での作用と同じであった。

5.7.8　環境への配慮

第4.4項及び第4.5項に記述したように、エレヌマブのようなモノクローナル抗体は、内在性プロテアーゼにより異化されて、個々のアミノ酸及び／又は低分子ペプチドになる可能性が高く、分子量が大きいため、未変化体の尿中排泄はないと考えられる。このため、活性薬物の排泄はないと予想される。これらの理由により、環境におけるエレヌマブの曝露は懸念とはならないと考えられる。

6. 考察及び結論

エレヌマブの非臨床試験方針は、バイオ医薬品に関する既存の規制ガイダンス、特にICHガイドラインICH S6(R1)、ICH M3(R2)及びICH S5(R2)に一致する開発経路に従ったものである。エレヌマブはヒト及びカニクイザルのCGRPを同程度の効力で阻害するが、ラットの受容体は阻害しないため、臨床プログラムを担保するための薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験には、カニクイザルを使用した。すべての反復投与毒性試験では、臨床投与経路に合わせ皮下投与経路を使用した。用量及び投与頻度は、薬物曝露量の動的範囲及びヒトへのリスク評価を可能にする適切な曝露量比が、いずれも得られるように設定した。エレヌマブの非臨床プログラムで得られた主要な結論を以下に示す。

- *In vitro*で、エレヌマブはヒト及びカニクイザルのCGRP-Rを同程度の効力（IC_{50}：それぞれ2.3及び5.7 nmol/L）で阻害するが、ラットCGRP-Rは阻害しない（IC_{50}：>10 µmol/L）。
- エレヌマブはヒトCGRP-R複合体に高親和性で結合し（結合親和性［K_i］：20 pmol/L）、ウサギ及びイヌのCGRP-Rに対する結合親和性（K_i：それぞれ230及び260 nmol/L）と比較して、ヒトCGRP-Rに対して10000倍超の差の結合親和性を示した。
- *In vivo*におけるエレヌマブによるCGRP-R拮抗作用のPD根拠は、カニクイザルにおいてCAP誘発DBF増加が阻害された（顕著な阻害作用を示した最低用量は0.3 mg/kgであり、3 mg/kg以上の用量では顕著な、最大の阻害に達した）ことから示された。
- カニクイザルを用いた単回及び反復投与試験でエレヌマブのPK及びTKの特徴を評価した。
- 標的介在性消失と一致して、エレヌマブの曝露量は非線形性を示し、曝露量の非線形性の程度は、最低用量で最も顕著であり、高用量では減少した。
- 非臨床試験で抗エレヌマブ抗体が検出された。結合抗体（CICを含む）の総発現率は11～77%の範囲であり、中和抗体の総発現率は9～67%の範囲であった。ADAは早い場合には投与14日後に検出され、これに伴って血清中濃度が低下したが、エレヌマブのPK及びTK評価に対する全般的影響はなく、PD活性の評価にも影響はなかった。
- エレヌマブの反復投与毒性試験を、カニクイザルを用いて、225 mg/kgまで（1カ月間）又は150 mg/kgまで（最長6カ月間）の用量で実施したところ、エレヌマブを介した毒性のエビデンスは示されなかった。3及び6カ月間の複合的な反復投与毒性試験において、投与期間中に、抗エレヌマブ中和抗体は投与動物の10%未満で検出されたが、曝露量の明らかな変化は認められなかった。少数例でADAの発現がみられたにもかかわらず、エレヌマブ投与群における薬物曝露量は、全試験期間を通して的確な毒性評価を可能にするものであった。最長6カ月間の反復投与毒性試験におけるNOAELは、検討した最高用量（150 mg/kg）であり、この用量での曝露マージン（AUCに基づく）は、ヒトで用いられた用量の140 mgと比較して123倍である。反復投与毒性試験において、循環血中抗エレヌマブ免疫複合体が少数例で検出され、一部の動物では、それに関連して、免疫介在性病変に一致する病理組織学的変化が観察された。
- エレヌマブのがん原性の有無に関する包括的な評価を、予定している薬物の標的及び経路に関する知見、効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験、非臨床試験で得られたデータ並びに特にがん原性リスクを検討した文献レビューに基づいて実施した。これらの評価によると、エレヌマブの長期臨床使用に関連するがん原性リスクはないと結論される。

- カニクイザルにおける拡充型出生前及び出生後の発生に関する試験では、妊娠、胚・胎児発生並びに出生後の成長及び発達への影響は認められなかった。母動物及び出生児発生に関するNOELは、検討した最高用量（50 mg/kg、2週に1回）であり、ヒトで用いられた用量140 mgを月1回投与と比較した曝露マージンは17倍であった。生後3カ月までの新生児曝露量に基づくと、エレヌマブの胎盤移行のエビデンスが示された。

これらの非臨床データによると、ヒトへのリスクに関して懸念される安全性シグナルはなく、特定されたNOAEL/NOELと臨床用量の間で十分な曝露マージンが得られると考えられる（表 2）。エレヌマブに関する臨床安全性データを注意深く精査した結果は、この結論に一致するものである。

提案中の本製剤の添付文書は、エレヌマブの薬理学的及び毒性学的特性を十分に反映したものである。この中には、受胎能、妊娠、授乳及び小児患者に関連した医療従事者及び患者への適切な情報及び推奨事項が含まれている。

以上、モジュール2.6及びモジュール4に記載された薬理、薬物動態及び毒性の資料が網羅する範囲は、申請予定の効能効果である片頭痛発作の発症抑制におけるエレヌマブの推奨される用法・用量（70 mgを月1回、皮下投与）で販売承認申請を適切に担保するものである。

表 2　カニクイザルを用いたエレヌマブの主要な毒性試験における曝露マージン

	Human Exposure [a]		Exposure Multiple (Based on $AUC_{0\text{-}T}$)		Exposure Multiple (Based on C_{max})	
Human Dose (mg)	$AUC_{0\text{-}28d}$ (μg·day/mL)	C_{max} (μg/mL)	Monkey 6 month [b]	Monkey ePPND [c]	Monkey 6 month [b]	Monkey ePPND [c]
140 QM SC	496	34	123	17	77	12

AUC = area under the unbound AMG 334 serum concentration-time curve; C_{max} = maximum observed concentration; ePPND = enhanced pre-postnatal development; GLP = good laboratory practice; NOAEL = no observed adverse effect level; NOEL = no observed effect level; QM = once a month; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetic.

[a] Predicted from human population PK model Pharmacometrics Report 123319)

[b] Calculation based on TK parameters at the NOAEL of 150 mg/kg SC on day 169 from the 6 month GLP monkey toxicology study (Study 113732); $AUC_{0\text{-}7d}$ = 15300 μg·day/mL, C_{max} = 2620 μg/mL

[c] Calculation based on TK parameters at the NOEL of 50 mg/kg SC on gestation day 133 from the GLP ePPND study in the cynomolgus monkey (Study 113734); $AUC_{0\text{-}last}$ (last = 336h [14d]) = 4280 μg·day/mL, C_{max} = 422 μg/mL

The exposure margins were calculated by the following equations:

$$\text{AUC Exposure Margin} = \frac{\text{Monkey AUC}}{\text{Human AUC}} \times \frac{\text{Human AUC interval (28d)}}{\text{Monkey AUC interval (7 or 14d)}}$$

$$C_{max}\ \text{Exposure Margin} = \frac{\text{Monkey } C_{max}}{\text{Human } C_{max}}$$

7. 参考文献

Aoki-Nagase T, Nagase T, Oh-hashi Y, et al. Attenuation of antigen-induced airway hyperresponsiveness in CGRP-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 283:L963-970.

Arulmani U, Schuijt MP, Heiligers JP, Willems EW, Villalón CM, Saxena PR. Effects of the calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonist BIBN4096BS on α- CGRP-induced regional haemodynamic changes in anaesthetised rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004;94:291-297.

Asahina A, Hosoi J, Murphy GF, Granstein RD. Calcitonin gene-related peptide modulates Langerhans cell antigen-presenting function. *Proc Assoc Am Physicians*. 1995; 107:242-244.

Bailey RJ and Hay DL. Pharmacology of the human CGRP1 receptor in Cos 7 cells. *Peptides.* 2006;27:1367–1375.

Beck MJ, Padgett EL, Bowman CJ, et al. Nonclinical juvenile toxicity testing. In: Hood RD, ed. *Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach*. 2nd ed. CRC Press; 2006;263-327.

Boado RJ, Zhou Q-H, Lu JZ, Hui EK-W, Pardridge WM. Pharmacokinetics and brain uptake of a genetically engineered bifunctional fusion antibody targeting the mouse transferring receptor. *Mol Pharm*. 2010;7:237-244.

Bugelski PJ, Treacy G. Predictive power of preclinical studies in animals for the immunogenicity of recombinant therapeutic proteins in humans. *Curr Opin Mol Ther*. 2004;6:10-16.

Bouschet T, Martin S, Henley JM. Receptor-activity-modifying proteins are required for forward trafficking of the calcium-sensing receptor to the plasma membrane. *J Cell Sci.* 2005;118:4709–4720.

Bracci-Laudiero L, Aloe L, Buanne P, et al. NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF? *J Neuroimmunol*. 2002;123:58-65.

Bracci-Laudiero L, Aloe L, Caroleo MC, et al. Endogenous NGF regulates CGRP expression in human monocytes, and affects HLA-DR and CD86 expression and IL-10 production. *Blood*. 2005;106:3507-3514.

Brain SD and Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev.* 2004; 84: 903–934.

Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 1985;313:54-56.

Burley DS, Hamid SA, Baxter GF. Cardioprotective actions of peptide hormones in myocardial ischemia. *Heart fail Rev*. 2007; 12:279-291.

Cadieux A, Monast NP, Pomerleau F, Fournier A, Lanoue C. Bronchoprotector properties of calcitonin gene-related peptide in guinea pig and human airways: Effect of pulmonary inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:235-243.

Calland, JW, Harris SE, Carnes DL et al. Human pulp cells respond to calcitonin gene-related peptide in vitro. *J Endod*. 1997;23:485-489.

Carucci JA, Ignatius R, Wei Y, et al. Calcitonin gene-related peptide decreases expression of HLA-DR and CD86 by human dendritic cells and dampens dendritic cell-driven T cell-proliferative responses via the type I calcitonin gene-related peptide receptor. *J Immunol.* 2000;164:3494-3499.

Chaitman BR, Ho AP, Behm MO, et al. A randomized, placebo-controlled study of the effects of telcagepant on exercise time in patients with stable angina. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;91:459-466.

Chan KY, Edvinsson L, Eftekhari S, et al. Characterization of the calcitonin gene-related peptide receptor antagonist telcagepant (MK-0974) in human isolated coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;334:746-752.

Chanez P, Springall D, Vignola AM,et al. Bronchial mucosal immunoreactivity of sensory neuropeptides in severe airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:985-990.

Chang CL and Hsu SYT. Roles of CLR/RAMP receptor signaling in reproduction and development. *Cur Protein Pept Sci.* 2013;14:393-406.

Christopoulos A, Christopoulos G, Morfis M, et al. Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *J Biol Chem.* 2003; 278:3293–3297.

Christopoulos G, Paxinos G, Huang XF, et al. Comparative distribution of receptors for amylin and the related peptides calcitonin gene related peptide and calcitonin in rat and monkey brain. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995;73:1037-1041.

Clementi G, Amico-Roxas M, Caruso A, Cutuli VMC, Maugeri S, Prato A. Protective effects of calcitonin gene-related peptide in different experimental models of gastric ulcers. *Eur J Pharmacol.* 1993;238:101-104.

Cornish J, Callon KE, Lin CQx, et al. Comparison of the effects of calcitonin gene related peptide and amylin on osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 1999;14:1302-1309.

Coupe MO, Mark JCW, Yacoub M, Oldershaw PJ, Bames PJ. Autoradiographic mapping of calcitonin gene-related peptide receptors in human and guinea pig hearts. *Circulation.* 1990;81:741-747.

Dakhama A, Kanehiro A, Mäkelä MJ, Loader JE, Larsen GL, Gelfand EW. Regulation of airway hyperresponsiveness by calcitonin gene-related peptide in allergen sensitized and challenged mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1137-1144.

Depre M, MacLeod C, Palcza J, et al. Lack of hemodynamic interaction between CGRP-receptor antagonist telcagepant (MK-0974) and sumatriptan: Results from a randomized study in patients with migraine. *Cephalgia*. 2013;33,1292-1301.

Diener HC, Dodick DW, Goadsby PJ, Lipton RB, Olesen J, Silberstein SD. Chronic migraine classification, characteristics and treatment. *Nat Rev Neurol*. 2012;8:162-171.

Ding W, Stohl LL, Wagner JA, Granstein RD. Calcitonin gene-related peptide biases Langerhans cells toward Th2-type immunity. *J Immunol.* 2008;181:6020-6026.

Dong YL, Vegiraju S, Chauhan M, et al. Involvement of calcitonin gene-related peptide in control of human fetoplacental vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H230-H239.

Durham PL. CGRP-receptor antagonists – a fresh approach to migraine therapy? *N Engl J Med.* 2004;350:1073-1075.

Edvinsson L, Chan KY, Eftekhari S, et al. Effect of the calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonist telcagepant in human cranial arteries. *Cephalgia*. 2010;30:1233-1240.

Edvinsson L and Goadsby PJ. Neuropeptides in migraine and cluster headache. *Cephalalgia.* 1994;14:320-327.

Eftekhari S and Edvinsson L. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its receptor components in human and rat spinal trigeminal nucleus and spinal cord at C1-level. *BMC Neurosci.* 2011;12:112.

Evangelista, S. Role of calcitonin gene-related peptide in gastric mucosal defence and healing. *Curr Pharm Des.* 2009;15:3571-3576.

Fernandez S, Knopf MA, Bjork SK, McGillis JP. Bone marrow-derived macrophages express functional CGRP receptors and respond to CGRP by increasing transcription of c-fos and IL-6 mRNA. *Cell Immunol.* 2001;209:140-148.

Fox FE, Kubin M, Cassin M, et al. Calcitonin gene-related peptide inhibits proliferation and antigen presentation by human peripheral blood mononuclear cells: effects on B7, interleukin 10, and interleukin 12. *J Invest Dermatol.* 1997;108:43-48.

Frank RT, Aboody KS, Najbauer J. Strategies for enhancing antibody delivery to the brain. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1816:191-198.

Gangula PR, Dong YL. Wimalawansa SJ, Yallampalli C. Infusion of pregnant rats with calcitonin gene-related peptide (CGRP)8-37, a CGRP receptor antagonist, increases blood pressure and fetal mortality and decreases fetal growth. *Biol Reprod.* 2002;67:624-629.

Glowka TR, Steinebach A, Stein K, et al. The novel CGRP receptor antagonist BIBN4096BS alleviates a postoperative instestinal inflammation and prevents postoperative ileus. *Neurogastroenterol Motil.* 2015:27:1038-1049.

Granholm S, Lundberg P, Lerner UH. Expression of the calcitonin receptor, calcitonin receptor-like receptor, and receptor activity modifying proteins during osteoclast differentiation. *J Cell Biochem*. 2008;104:920–933.

Harzenetter MD, Keller U, Beer S, Riedl C, Peschel C, Holzmann B. Regulation and function of the CGRP receptor complex in human granulopoiesis. *Exp Hematol.* 2002;30:306-312.

Hay DL, Poyner DR, Quirion R. International Union of Pharmacology. LXIX. Status of the calcitonin gene-related peptide subtype 2 receptor. *Pharmacol Rev.* 2008; 60:143-145.

Hay DL, Poyner DR and Sexton PM. GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther.* 2006;109:173-197.

Hökfelt T, Avidsson U, Ceccatelli S, et al. Calcitonin gene-related peptide in the brain, spinal cord, and some peripheral systems. *Ann NY Acad Sci.* 1992;657:119-134.

Holzer P. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1992;121:49–146.

Holzer P. Local microcirculatory reflexes and afferent signalling in response to gastric acid challenge. *Gut.* 2000;47:iv46-iv48.

Hoovers JMN, Redeker E, Speleman F, et al. High-resolution chromosomal localization of the human calcitonin/CGRP/IAPP gene family members. *Genomics.* 1993;15:525-529.

Howarth PH, Springall DR, Redington AE, Djukanovic R, Holgate ST, Polak JM. Neuropeptide-containing nerves in endobronchial biopsies from asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;13:288-296.

Hurley WL, Theil PK. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients* 2011:3:442-474.

ICH Harmonized Tripartite Guideline. M3(R2): Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals, 2009.

ICH Harmonized Tripartite Guideline. S6 (R1): Addendum to ICH S6: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, 2011.

ICH Harmonized Tripartite Guideline. S5 (R2): Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility, 2005.

ICH Harmonized Tripartite Guideline. S8: Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals, 2005.

Irie K, Hara-Irie F, Ozawa H, Yajima T. Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve fibers in bone tissue and their involvement in bone remodeling. *Microsc Res Tech.* 2002;58 85-90.

Jones AR and Shusta EV. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm Res.* 2007;24:1759-1771.

Källner G, Gonon A, Franco-Cereceda A. Calcitonin gene-related peptide in myocardial ischaemia and reperfusion in the pig. *Cardiovas Res.* 1998;38:493-499.

Kapoor K, Arulmani U, Heiligers JPC, et al. Effects of BIBN4096BS on cardiac output distribution and on CGRP-induced carotid haemodynamic responses in the pig. *Eur J Pharmacol.* 2003;475:69-77.

Karsan N and Goadsby PJ. CGRP mechanism antagonists and migraine management. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2015;15:25.

Keith IM. The role of endogenous lung neuropeptides in regulation of the pulmonary circulation. *Physiol Res.* 2000;49:519-537.

Keizer RJ, Huitema ADR, Schellens JHM, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet* 2010;49:493-507.

Koren E, Zuckerman LA, Mire-Sluis AR. Immune responses to therapeutic proteins in humans - clinical significance, assessment and prediction. *Curr Pharmaceut Biotech.* 2002;3:349-360.

Lanlua P, Gangula PR, Taglialatela G, Yallampalli C. Gestational changes in calcitonin gene-related peptide, nerve growth factor, and its receptors in rat dorsal root ganglia. *Biol Reprod.* 2001;65:1601-1605.

Lenhart PM, Nguyen T, Wise A, Caron KM, Herring AH, Stube AM. Adrenomedullin signaling pathway polymorphisms and adverse pregnancy outcomes. *Am J Perinatol.* 2014;31:327-334.

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

Lu JT, Son YJ, Lee J, et al. Mice lacking α-calcitonin gene-related peptide exhibit normal cardiovascular regulation and neuromuscular development. *Mol Cell Neurosci.* 1999; 14:99-120.

Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Hua X, Hökfelt T, Fischer JA. Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin. *Eur J Pharmacol.* 1985;108:315–319.

Lynch JJ, Regan CP, Edvinsson L, Hargreaves RJ, Kane SA. Comparison of the vasoconstrictor effects of the calcitonin gene-related peptide receptor antagonist telcagepant (MK-0974) and zolmitriptan in human isolated coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;55:518-521.

Lynch JJ, Shen YT, Pittman TJ, 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;623:96-102.

Magness RR. Maternal cardiovascular and other physiologic responses to the endocrinology of pregnancy. In: Bazar F, ed, *Endocrinology of Pregnancy.* Totowa, NJ: Humana Press: 1998;507–539.

Manoukian R, Sun H, Miller S, Shi D, Chan B, Xu C. Effects of monoclonal antagonist antibodies on calcitonin gene-related peptide receptor function and trafficking. J. Headache and Pain 2019; 20:44-56.

Martin PL, Weinbauer GF. Developmental toxicity testing of biopharmaceuticals in nonhuman primates: previous experience and future directions. *Int J Toxicol.* 2010;29:552-568.

McCormack DG, Mak JC, Coupe MO, Barnes PJ. Calcitonin gene-related peptide vasodilation of human pulmonary vessels. *J Appl Physiol.* 1989;67:1265-1270.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 1998;393:333-339.

Mikami N, Matsushita H, Kato T, et al. Calcitonin gene-related peptide is an important regulator of cutaneous immunity: effect on dendritic cell and T cell functions. *J Immunol.* 2011; 186:6886-6893.

Mikami N, Sueda K, Ogitani Y, et al. Calcitonin gene-related peptide regulates type IV hypersensitivity through dendritic cell functions. *PLoS One.* 2014;9:e86367.

Moffat GJ, Retter MW, Kwon G, et al. Placental transfer of a fully human IgG2 monoclonal antibody in the cynomolgus monkey, rat and rabbit: a comparative assessment from during organogenesis to late gestation. *Birth Defects Res Part B* 2014;101:178-188.

Morford LL, Bowman CJ, Blanset DL, et al. Preclinical safety evaluations supporting pediatric drug development with biopharmaceuticals: strategy, challenges, current practices. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2011;92:359-380.

Mulderry PK, Ghatei MA, Spokes RA, et al. Differential expression of α-CGRP and β-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience.* 1988;25:195–205.

Naot D, Bava U, Matthews B, et al. Differential gene expression in cultured osteoblasts and bone marrow stromal cells from patients with Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 2007;22:298–309.

Naot D, Callon KE, Grey A, Cooper GJS, Reid IR, Cornish J. A potential role for adrenomedullin as a local regulator of bone growth. *Endocrinology.* 2001;142:1849–1857.

Ohno T, Hattori Y, Komine R et al. Roles of calcitonin gene-related peptide in maintenance of gastric mucosal integrity and in enhancement of ulcer healing and angiogenesis. *Gastroenterology.* 2008;134:215-225.

Ono K, Delay M, Nakajima T, Irisawa H, Giles W. Calcitonin gene-related peptide regulates calcium current in heart muscle. *Nature.* 1989;340:721-24.

Palmer JBD, Cuss FMC, Mulderry PK, et al. Calcitonin gene-related peptide is localised to human airway nerves and potently constricts human airway smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1987; 91:95-101.

Pardridge WM. Drug targeting to the brain. *Pharmaceut Res.* 2007; 24:1733-1744.

Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood- brain barriers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:5705-5709.

Ponce R, Abad L, Amaravadi L, et al. Immunogenicity of biologically-derived therapeutics: Assessment and interpretation of nonclinical safety studies. *Regul Tox Pharm.* 2009;54:164-182.

Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, et al. International Uniton of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. Pharmacol. Rev. 2002; 54:233-246.

Prado MA, Evans-Bain B, Dickerson IM. Receptor component protein (RCP): a member of a multi-protein complex required for G-protein-coupled signal transduction. *Biochem Soc Trans.* 2002;30:460–464.

Regan CP, Stump GL, Kane SA, Lynch JJ. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonism does not affect the severity of myocardial ischemia during atrial pacing in dogs with coronary artery stenosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;328:571-578.

Roberts JM. Pregnancy related hypertension. In: Creasy RK, Resnik R eds. *Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders: 1989;777–823.

Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*. 1983;304:129-135.

Russell FA, King R. Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2014;94:1099-1142.

Saeki T, Ohno T, Boku K, Saigenji K, Katori M, Majima M. Mechanism of prevention by capsaicin of ethanol-induced gastric mucosal injury—a study in the rat using intravital microscopy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000;14:135–144.

Schinke T, Liese S, Priemel M, et al. Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking α-calcitonin gene-related peptide. *J Bone Miner Res.* 2004; 19:2049 2056.

Senna AA, Zedan M, El-Salam GEA, El-Mashad AI. Study of plasma adrenomedullin level in normal pregnancy and preclampsia. *Medscape J Med.* 2008;10:29.

Shen YT, Mallee JJ, Handt LK, et al. Effects of inhibition of α-CGRP receptors on cardiac and peripheral vascular dynamics in conscious dogs with chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;42:656-661.

Shen YT, Pittman, TJ, Buie PS, et al. Functional role of α-calcitonin gene-related peptide in the regulation of the cardiovascular system. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;298:551-558.

Shi L, Lehto SG, Zhu DXD, Sun H, Zhang J, Smith BP, Immke DC, Wild KD, Xu C. Pharmacologic characterization of AMG 334, a potent and selective human monoclonal antibody against the calcitonin gene-related peptide receptor. J Pharmacol. Exp. Therap. 2016; 356:223-231.

Song QJ, Xiao J, Deng HW, Li YJ. Role of calcitonin gene-related peptide in prostaglandins-mediated ischemic preconditioning in guinea pig hearts. *Acta Pharmacol Sin.* 2001;22:3-9.

St-Amour I, Pare I, Alata W, et al. Brain bioavailability of human intravenous immunoglobulin and its transport through the murine blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013:33:1983-1992.

Sternini C. Enteric and visceral afferent CGRP neurons. *Ann NY Acad Sci.* 1992 657:170-186.

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* 1986; 293;1329-1330.

Tabrizi M, Bornstein GG, Suria H. Biodistribution mechanism of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease. *AAPS Journal.* 2010;12:33-43.

Taché Y. Brainstem neuropeptides and vagal protection of the gastric mucosal against injury: role of prostaglandins, nitric oxide and calcitonin-gene related peptide in capsaicin afferents. *Curr Med Chem.* 2012;19:35–42.

Taché Y, Pappas T, Lauffenburger M, Goto Y, Walsh JH, Debas H. Calcitonin gene-related peptide: potent peripheral inhibitor of gastric acid secretion in rats and dogs. *Gastroenterology.* 1984;87:344–349.

Tam CW, Husmann K, Clark NC, et al. Enhanced vascular responses to adrenomedullin in mice overexpressing receptor-activity-modifying protein 2. *Circ Res.* 2006;98:262–270.

Triguero D, Buciak JB, Yang J, Pardridge WM. Blood-brain barrier transport of cationized immunoglobulin G: Enhanced delivery compared to native protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:4761-4765.

Uddman R, Edvinsson L, Ekblad E, Håkanson R, Sundler F. Calcitonin gene-relatedpeptide (CGRP): perivascular distribution and vasodilatory effects. *Regul Pept.* 1986;15:1–23.

Umeda Y and Arisawa M. Inhibition of natural killer activity by calcitonin gene-related peptide. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1989;11:309-320.

Valentijn K, Gutow AP, Troiano N, Gundberg C, Gilligan JP, Vignery A. Effects of calcitonin gene-related peptide on bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 1997;21:269–274.

Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine.* 2003;21:3374-3376.

Van der Schueren BJ, Blanchard R, Murphy MG, 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;71:708-717.

Van Rossum D, Hanisch UK, Quirion R. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997;21:649-78.

Vargas HM, Amouzadeh HR, Engwall MJ. Nonclinical strategy considerations for safety pharmacology: evaluation of biopharmaceuticals. *Expert Opin Drug Saf.* 2013;12:91-102.

Verheggen R, Bumann K, Kaumann AJ. BIBN4096BS is a potent competitive antagonist of the relaxant effects of α-CGRP on human temporal artery: comparison with $CGRP_{(8-37)}$. *Br J Pharm.* 2002;136:120-126.

Walker CS, Conner AC, Poyner DR, Hay DL. Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31:476-483.

Walter S, Alibhoy A, Escandon R, Biqal ME. Evaluation of cardiovascular parameters in cynomolgus monkeys following IV administration of LBR-101, a monoclonal antibody against calcitonin gene-related peptide. *mAbs.* 2014;6:871-878.

Wang H, Xing L, Li W, Hou L, Guo J, Wang X. Production and secretion of calcitonin gene-related peptide from human lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 2002; 130:155-162.

Wang L and Wang DH. TRPV1 gene knockout impairs postischemic recovery in isolated perfused heart in mice. *Circulation.* 2005;112:3617-3623.

Watts RJ and Dennis MS. Bispecific antibodies for delivery into the brain. *Curr Opin Chem Biol.* 2013;17:393-399.

Weinbauer GF, Chellman GJ, Rasmussen AD, Vogelwedde E. Use of primate pediatric model. In Hoberman AM and Lewis EM, eds. Pediatric Nonclinical Drug Testing. *Principles, Requirements and Practices.* John Wiley & Sons, Inc. 2012;Ch13:255-279.

Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev.* 1996;17:533-585.

Wu DM, van Zwieten PA, Doods HN. Effects of calcitonin gene-related peptide and BIBN4096BS on myocardial ischemia in anesthetized rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2001;22:588-594.

Yallampalli C, Dong YL, Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide reverses the hypertension and significantly decreases the fetal mortality in pre-eclampsia rats induced by nitro-L-arginine methyl ester. *Hum Reprod.* 1996;11:895–899.

Yu YJ, Watts RJ. Developing therapeutic antibodies for neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics.* 2013;10:459-472.

Zhong B and Wang DH. TRPV1 gene knockout impairs preconditioning protection against myocardial injury in isolated perfused hearts in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H1791-1798.