第 2 部　CTD の概要

一般名：アニフロルマブ（遺伝子組換え）

版番号：[redacted]

2.4　非臨床試験の概括評価
アニフロルマブ（遺伝子組換え）

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

目次 2
略語及び専門用語一覧表 3
2.4.1　非臨床試験計画概略 5
2.4.2　薬理試験 8
2.4.2.1　アニフロルマブについて 8
2.4.2.2　効力を裏付ける試験 9
2.4.2.3　副次的薬理試験 11
2.4.2.4　安全性薬理試験 11
2.4.2.5　薬力学的薬物相互作用試験 11
2.4.3　薬物動態試験 11
2.4.3.1　非臨床薬物動態試験の概要 11
2.4.3.2　吸収 11
2.4.3.3　分布 12
2.4.3.4　代謝 12
2.4.3.5　排泄 12
2.4.4　毒性試験 12
2.4.4.1　動物種選択根拠 12
2.4.4.2　単回投与毒性 13
2.4.4.3　反復投与毒性 13
2.4.4.4　遺伝毒性 15
2.4.4.5　がん原性 15
2.4.4.6　生殖発生毒性 15
2.4.4.7　局所刺激性試験 15
2.4.4.8　その他の毒性試験 16
2.4.5　総括及び結論 16
2.4.6　参考文献 18

表目次

表 1　アニフロルマブ又は抗 IFNAR サロゲート抗体の非臨床薬理試験一覧 7
表 2　アニフロルマブの非臨床毒性試験一覧 7

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
ADA	Anti-drug antibody：抗薬物抗体
ADCC	Antibody-dependent cell cytotoxicity　：抗体依存性細胞傷害
AUC	Area under the concentration-time curve：血清中濃度－時間曲線下面積
C3	Complement C3：補体第 3 成分
CD	Cluster of differentiation：白血球分化抗原
CDC	Complement-dependent cytotoxicity：補体依存性細胞傷害
[redacted]	[redacted]
C_{max}	Maximum serum concentration：最高血清中濃度
CYP	Cytochrome P450：シトクロム P450
DNA-IC	DNA immune complex：DNA 免疫複合体
ePPND	enhanced pre- and postnatal development：拡充型出生前及び出生後の生殖発生毒性
FcRn	Neonatal Fc receptor：胎児性 Fc 受容体
FcγR	Fc gamma receptor：Fcγ 受容体
GD	Gestation day：妊娠日数
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GVH-SSc	Graft-vs-host-induced systemic sclerosis：移植片対宿主誘発全身性強皮症
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
IFN	Interferon　：インターフェロン
IFNAR	Interferon alpha receptor：インターフェロンα受容体
IFNAR1	Interferon alpha receptor subunit 1：インターフェロンα受容体のサブユニット 1
Ig	Immunoglobulin：免疫グロブリン
IgGκ	Immunoglobulin G1 kappa：免疫グロブリン G1κ
IL-6	Interleukin-6：インターロイキン-6
IL-8	Interleukin-8：インターロイキン-8
ISRE	IFN-stimulated response element：インターフェロン応答配列
K_D	Equilibrium dissociation constant：平衡解離定数
LD	Lactation day：授乳日数
mAb	Monoclonal antibody：モノクローナル抗体
MRHD	Maximum recommended human dose：最大推奨臨床用量
NOAEL	Non Observed Adverse Effect Level：無毒性量
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核細胞
pDC	Plasmacytoid dendritic cell：形質細胞様樹状細胞
SLE	Systemic lupus erythematosus：全身性エリテマトーデス
STAT	Signal transducer and activator of transcription (proteins)　：シグナル伝達兼転写活性化因子
$t_{½}$	Terminal half-life：消失半減期

略語及び専門用語	用語の説明
TLR	Toll-like receptor　：Toll 様受容体
TNFα	Tumor necrosis factor α：腫瘍壊死因子 α
T_{max}	Time to maximum serum concentration：最高血清中濃度到達時間

2.4.1　非臨床試験計画概略

アストラゼネカはアニフロルマブについて、標準治療を受けた中等症から重症の全身性エリテマトーデス（SLE）の成人患者の治療を適応として開発を進めている。

SLE は、全身のあらゆる器官系が冒されうる複雑で慢性の経過をたどる不均一な自己免疫疾患である。そのため、SLE 患者は様々な臨床症状を呈する。これらの臨床症状は多くの患者にとっては深刻であり、身体機能の低下、雇用の喪失、健康関連の生活の質への重大な影響、度重なる入院加療、累積的で不可逆的な臓器障害を来し、早期死亡の原因にもなりうる（Nived et al 2002、Alarcón et al 2004）。臓器障害は、SLE の疾患活動性そのものや、ステロイドや他の免疫抑制剤の慢性使用に伴う治療関連の副作用によって蓄積する。

アニフロルマブは、I 型インターフェロン α 受容体のサブユニット 1（IFNAR1）に対するヒト免疫グロブリン G1 kappa（IgG1κ）モノクローナル抗体であり、2 本の同一軽鎖と 2 本の同一重鎖で構成され、抗体全体の分子量は約 148 kDa である。

アニフロルマブは、IFNAR1 に対し高い特異性及び高親和性にて結合する抗 IFNAR1 ヒト IgG1κ モノクローナル抗体であり、この結合によって I 型 IFN のシグナル伝達が阻害され、それにより IFNα、IFNβ 及び IFNω を含む全ての I 型 IFN の生物活性が阻害される。また、アニフロルマブは IFNAR1 の細胞内移行を誘導し、これにより、受容体会合に利用可能な細胞表面の IFNAR1 の発現レベルも低下させる。受容体を介した I 型 IFN のシグナル伝達を遮断することにより、IFN 応答性の遺伝子発現が抑制され、下流の炎症及び免疫のプロセスや事象も抑制される（Riggs et al 2018）。アニフロルマブは、結晶形成フラグメント（Fc）を介したエフェクター機能を防ぐために Fcγ 受容体（FcγR）への結合を抑えるように改変された抗体である。これまでのところ、このような薬理学的作用機序を有し、製造販売承認された治療薬はない。

I 型 IFN が SLE などの自己免疫疾患の発症機序に中心的な役割を果たしていることを示すエビデンスが報告されてきている（Psarras et al 2017、Lichtman et al 2012）。I 型 IFN 又は I 型 IFN 誘導性遺伝子の発現レベルは SLE の疾患活動性、重症度及び臨床症状に関連するとされている（Bengtsson et al 2000、Baechler et al 2003、Kirou et al 2005、Postal et al 2012）。SLE の成人患者のほとんど（最高 87%）は I 型 IFN 誘導性遺伝子の発現レベルが上昇している（Bengtsson et al 2000、Bengtsson et al 2017）。したがって、I 型 IFN のシグナル伝達を標的とすれば、SLE 患者に治療上のベネフィットがもたらされるものと期待される。アニフロルマブの非臨床開発として、本薬の作用機序並びに I 型 IFN によるシグナル伝達、遺伝子発現及び細胞応答に対する抑制作用を評価するとともに、本薬の薬物動態（PK）特性及び毒性プロファイルも検討した。

非臨床開発のために、サル細胞を用いた結合性及び中和活性に基づいてカニクイザルを適切な非臨床安全性評価動物種として選択した。アニフロルマブは、カニクイザル IFNAR1 に対する交差反応性を有し、結合親和性はヒト末梢血単核細胞（PBMC）の IFNAR1 と同等であった。また、サル IFNAR1 発現サル細胞における遺伝子組換えカニクイザル IFN-α サブタイプの生物活性と、ヒト IFNAR1 発現ヒト細胞における遺伝子組み換えヒト IFN-α サブタイプの生物活性に対し、アニフロルマブは同程度の中和能を示した。組織交差反応性試験結果から、ヒト及びカニクイザルの組織で広範にわたるアニフロルマブの染色がみられ、組織における IFNAR の広範にわたる発現に関する公表論文（de Weerd et al 2007）と一致し、カニクイザルは毒性試験評価に適切な動物種であることが更に裏付けられた。一方、アニフロルマブはマウス IFNAR1 には結合せず、マウス IFN-α の生物活性を阻害しなかった。これらの結果に基づき、げっ歯類は薬理学的に適切な動物種ではないと考えられた。したがって、カニクイザルはアニフロルマブの薬理学的に関連した毒性試験評価のための適切な動物種である。

アニフロルマブを用いた 11 の非臨床薬理試験（サロゲート抗 IFNAR1 抗体を用いた 2 つの非臨床 *in vivo* 試験を含む）及び 8 の非臨床毒性試験を含む合計 19 の非臨床試験を実施した（表 1

及び表 2）。8 の非臨床毒性試験のうち、6 試験は GLP 及び ICH ガイドライン、特に ICH S6（R1）に準拠した。重要な非臨床毒性試験はすべて、OECD GLP ガイドラインに従い、OECD 加盟国で実施した。残り 2 試験（試験番号 7140-123 及び 7140-142）は GLP 非適用試験で、重要ではない毒性試験である。

アニフロルマブの生化学的特徴及び機能的特性を明らかにするために、一連の非臨床薬理試験を実施し、以下の項目について検討した。

- ヒト及びカニクイザル PBMC におけるアニフロルマブの平衡解離定数（K_D）
- アニフロルマブの結合エピトープ
- アニフロルマブの作用機序：IFNAR 発現細胞に対する IFN-α 2a の結合の阻害、及び IFNAR1 の細胞内移行の誘導
- I 型 IFN 誘導性 STAT1 リン酸化の阻害
- 組換え及び内在性ヒト I 型 IFN 誘導性のインターフェロン応答配列（ISRE）の活性化阻害
- 組換えカニクイザル及びマウス I 型 IFN 誘導性 ISRE 活性の阻害
- I 型 IFN 誘導性遺伝子発現の阻害
- I 型 IFN 自己増幅ループ、形質細胞様樹状細胞の活性化及びサイトカイン産生、並びに形質細胞分化の抑制
- I 型 IFN 誘導性単球分化、並びに炎症性サイトカイン及びケモカインの産生抑制
- アニフロルマブの FcγR または胎児性 Fc 受容体（FcRn）への結合
- アニフロルマブの抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性及び補体依存性細胞傷害（CDC）活性

I 型 IFN の阻害が疾患に重要な役割を果たすという概念を裏付けるために、自己免疫の実験モデルにおいて、抗 IFNAR サロゲート抗体（5A3）を用いた 2 つの追加研究が行われた。

- ループスマウスモデルにおける抗 IFNAR サロゲート抗体（5A3）の薬力学的活性
- 全身性強皮症マウスモデルにおける抗 IFNAR サロゲート抗体（5A3）の薬力学的活性

アニフロルマブの非臨床薬物動態特性は以下の 6 つの毒性試験より評価した。

- カニクイザルにアニフロルマブを単回静脈内投与したときの毒性、トキシコキネティクス及び免疫原性試験（GLP 非適用）
- 雄カニクイザルにアニフロルマブを単回静脈内あるいは皮下投与したときの毒性、トキシコキネティクス、薬力学及び免疫原性試験（GLP 非適用）
- カニクイザルにアニフロルマブを単回静脈内投与したときの毒性、トキシコキネティクス及び免疫原性試験（GLP 適用）
- カニクイザルにアニフロルマブを 4 週間反復静脈内投与（含 7 週間の回復性）したときの毒性、トキシコキネティクス及び免疫原性試験（GLP 適用）
- カニクイザルにアニフロルマブを 39 週間反復静脈内あるいは皮下投与（含 12 週間の回復性）したときの毒性、トキシコキネティクス及び免疫原性試験（GLP 適用）
- 妊娠カニクイザルを用いた静脈内投与による出生前及び出生後の生殖発生毒性試験（GLP 適用）

アニフロルマブの非臨床安全性プロファイルは以下 8 試験で評価した。

- 正常ヒト及びカニクイザル組織を用いた組織交差反応性試験

- カニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験
- カニクイザルを用いた反復投与毒性試験
- カニクイザルを用いた拡充型出生前及び出生後の生殖発生毒性試験

局所刺激性、安全性薬理、免疫毒性及び雄雌の受胎能については、単回及び反復投与毒性試験並びに拡充型出生前及び出生後の生殖発生毒性試験で評価した。

表 1 アニフロルマブ又は抗 IFNAR サロゲート抗体の非臨床薬理試験一覧

Study Number	Study Title	Species/ROA	GLP Yes/No
Primary Pharmacodynamics			
RIA546-0001	Absence of Binding of MEDI-546 to Fc Gamma Receptors I and IIIA	*In Vitro*	No
RIA546-0002	Determination of the Equilibrium Dissociation Constants (K_D) of MEDI-546 in Human and Cynomolgus Monkey PBMCs	*In Vitro*	No
RIA546-0004	Mapping of the MEDI-546 Binding Epitope	*In Vitro*	No
RIA546-0003	MEDI-546 Antagonizes the Binding of IFN-a2a to IFNAR Expressing Cells and Induces the Internalization of IFNAR1	*In Vitro*	No
RIA546-0006	Inhibition of Type-1 IFN Induced Activation of the Interferon Stimulated Response Element by MEDI-546	*In Vitro*	No
RIA546-0008	Effect of Immobilized MEDI-546 on Activation of the Interferon Stimulated Response Element	*In Vitro*	No
RIA546-0010	Anti-IFNARI Monoclonal Antibody (MEDI-546) Binds Fc Gamma Neonatal Receptor (FcRn) but not Fc Gamma Receptors IIA and IIB	*In Vitro*	No
RIA546-0012	Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity Assays with MEDI-546	*In Vitro*	No
RIA546-0009	MEDI-546 Does Not Exhibit Complement-Dependent Cytotoxicity In Vitro	*In Vitro*	No
RIA546-0011	Protection by Anti-Mouse IFNAR1 mAb 5A3 in an Accelerated NZB/W F1 Mouse Model of Lupus	Murine/IP	No
RIA546-0007	Efficacy of a Mouse Surrogate Anti-Interferon Alpha Receptor 1 Monoclonal Antibody in a Murine Model of Systemic Sclerosis	Murine/IP	No

Fc = fragment crystallisable; FcRn = Neonatal Fc receptor; IFN = interferon; IFNAR1 = interferon alpha receptor subunit 1; IP = intraperitoneal; K_D = Equilibrium Dissociation Constant; MEDI-546 = anifrolumab; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; ROA = route of administration

表 2 アニフロルマブの非臨床毒性試験一覧

Study Number	Study Title	Species/ROA	GLP (Yes/No)
7140-123	Single-Dose Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Immunotoxicology Study with MEDI-546 in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus Monkey/IV	No

表 2 アニフロルマブの非臨床毒性試験一覧

Study Number	Study Title	Species/ROA	GLP (Yes/No)
7140-142	Single Intravenous or Subcutaneous Dose Toxicity, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Immunogenicity Study of MEDI-546 in Male Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus Monkey/IV or SC	No
7140-131	Single IV Dose Toxicity Study of MEDI-546 in Cynomolgus Monkeys with Toxicokinetics and Immunogenicity Evaluation	Cynomolgus Monkey/IV	Yes
[redacted].263.01	A 4-Week Repeat Intravenous Dose Toxicity Study of MEDI-546 in Cynomolgus Monkeys, with TK and Immunogenicity Evaluation, Followed by a 7-Week Recovery Period	Cynomolgus Monkey/IV	Yes
7140-129	9-month (39-week) Repeat Subcutaneous Injection and Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Immunogenicity Study With MEDI-546 in Cynomolgus Monkeys With a 12-Week Recovery Period	Cynomolgus Monkey/IV or SC	Yes
[redacted].263.11	Assessment of Effects of Anifrolumab on Pre- and Postnatal Development When Administered by Intravenous Infusion Once Every Two Weeks to Pregnant Cynomolgus Monkeys Starting on GD20 to Early Lactation Period	Cynomolgus Monkey/IV	Yes
IM1595	Cross-reactivity Study of MEDI-546-Alexa Fluor 488 with Normal Human Tissues	Human/NA	Yes
IM1596	Tissues Cross-reactivity Study of MEDI-546-Alexa Fluor 488 with Normal Cynomolgus Monkey Tissues	Cynomolgus Monkey/NA	Yes

GD = gestation day; IV = intravenous; MEDI-546 = anifrolumab; NA = not applicable; ROA = route of administration; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetics

2.4.2 薬理試験

個々の非臨床薬理試験の一覧を表 1 に示す。なお、薬理試験の概要文及び概要表はそれぞれ 2.6.2 項及び 2.6.3 項に示している。

2.4.2.1 アニフロルマブについて

IFNAR1 に対する完全ヒト型特異的モノクローナル抗体は、[redacted]を発現させた[redacted]細胞株で[redacted]を免疫することにより、[redacted]社が作製したものである。当初、IgG1κ 抗体の 9D4 が治療薬候補として選択された。その後、9D4 の Fc 領域を意図的に改変して 3 箇所にアミノ酸置換（L234F/L235E/P331S）を導入し、これにより FcγRI、FcγRIIIA 及び C1q への特異的結合が生じないようにした（試験番号 RIA546-0001）。この 9D4 の 3 つのアミノ酸残基を変異させた抗体がアニフロルマブ（MEDI-546）である。

2.4.2.2 効力を裏付ける試験

アニフロルマブの結合親和性、特異性、作用機序及び効力を把握し、SLE のような I 型 IFN 活性の調節不全に起因する疾患の治療薬となる可能性を探索するため、複数の *in vitro* 試験を実施した。なお、SLE 及び全身性強皮症のマウスモデルを用いた薬理作用及び有効性の評価では、サロゲート抗体である抗マウス IFNAR1 抗体 5A3 を使用した。

ヒト及びカニクイザルの PBMC に発現する IFNAR1 へのアニフロルマブの結合を直接飽和結合試験にて検討した。その結果、ヒト INFAR1 に対するアニフロルマブの K_D は 0.29 ± 0.29 nM であった。カニクイザル INFAR1 へのアニフロルマブの結合も、K_D は 0.65 ± 0.74 nM となり、ほぼ同様であった（試験番号 RIA546-0002）。

アニフロルマブの結合エピトープをマッピングしたところ、IFNAR1 のサブドメイン 3 の範囲内と特定され、276 位～279 位（YLLR）のアミノ酸残基がアニフロルマブの結合に重要であることが判明した。ヒト IFNAR1 のこの領域はカニクイザルの IFNAR1 でも保存されている。しかし、このサブドメイン 3 をマウス IFNAR1 のサブドメイン 3 に置き換えると、アニフロルマブと結合しなかった（試験番号 RIA546-0004）（Peng et al 2015）。

アニフロルマブの作用機序を評価するため、アニフロルマブによる ^{125}I 標識 IFN-α2a の IFNAR 発現細胞への結合阻害能を検討した。その結果、アニフロルマブは IFNAR を発現している Daudi 細胞への ^{125}I 標識 IFN-α2a の結合を競合的に阻害し、EC_{50} 値は 0.14 nM であった（試験番号 RIA546-003）（Peng et al 2015）。共焦点顕微鏡による解析とフローサイトメトリーにより、アニフロルマブは THP-1 細胞及びヒト単核球上の抗体-IFNAR1 複合体の急速な細胞内移行を誘導することも明らかとなった（試験番号 RIA546-003）（Wang et al 2013、Riggs et al 2018）。

リガンド誘導性の IFNAR1/2 によるシグナル伝達をアニフロルマブが阻害するかどうかを明らかにするため、アニフロルマブの STAT1 Tyr 701（STAT1 の 701 位のチロシン残基）リン酸化抑制能を検討した。その結果、アニフロルマブは単球において、組換え IFN-α2 及び形質細胞様樹状細胞（pDC）由来 I 型 IFN 刺激による STAT1 リン酸化を完全に阻害した（試験番号 RIA546-0006）（Riggs et al 2018）。

リガンド誘導性の STAT1/2 リン酸化の下流及び I 型 IFN 誘導性遺伝子のプロモーターに含まれる ISRE と結合する転写活性化複合体の形成についても検討した。I 型 IFN 誘導性の ISRE 活性に及ぼすアニフロルマブの影響を評価するため、アニフロルマブを ISRE-ルシフェラーゼレポーター細胞とともにインキュベートし、細胞を組換え及び生物由来の I 型 IFN で刺激した。その結果、アニフロルマブは、検討した全 14 種の組換えヒト I 型 IFN（100 IU）（12 種の IFN-α サブタイプ、IFN-β 及び IFN-ω からなる）による ISRE の活性化を強力に阻害し、IC_{50} 値は 0.004～0.3 nM の範囲であった。アニフロルマブは、核酸を含む免疫複合体又は CpG-A により刺激した pDC に由来する I 型 IFN 及び SLE 患者の血清中に存在する I 型 IFN による ISRE 活性化を阻害した。（試験番号 RIA546-0006）（Riggs et al 2018）。

アニフロルマブがアゴニスト活性を示すかどうかを明らかにするため、培養プレート表面に固定したアニフロルマブ（以下、固定化アニフロルマブ）とともに ISRE 応答性レポーター細胞をインキュベートした。その結果、ISRE 応答性レポーター細胞は僅か 1.7 IU の I 型 IFN でも検出可能であったが、固定化アニフロルマブでは、バックグラウンドレベルを超える ISRE 応答性レポーター細胞の活性化は認められなかったため、アニフロルマブはアゴニスト活性を示さないことが示唆される（試験番号 RIA546-0008）。

ISRE 応答性レポーター細胞アッセイを再び用いて、アニフロルマブがカニクイザル及びマウス I 型 IFN 活性を阻害するかどうかを評価した。ISRE-ルシフェラーゼをトランスフェクトしたサル COS7 細胞株を用いた場合、アニフロルマブは 100 IU の組換えカニクイザル IFN-α8、IFN-α16、IFN-α21、IFN-β及び IFN-ωを強力に阻害し、その IC_{50} 値は 0.05～0.43 nM であった。一方、

ISRE-ルシフェラーゼをトランスフェクトしたマウス MLE 細胞株では、組換えマウス I 型 IFN-α のアニフロルマによる阻害は起こらなかった。これらのデータからも、非臨床安全性評価において薬理学的に毒性評価モデルに適した動物種として（げっ歯類ではなく）カニクイザルを選択したことの妥当性が追認される（試験番号 RIA546-0006）。

I 型 IFN によるシグナル伝達は 100 を超える遺伝子の転写活性化と発現を誘導する。そこでアニフロルマブが I 型 IFN 誘導性の遺伝子発現に及ぼす影響を評価するため、TLR アゴニストの CpG-A で PBMC を刺激して 21 遺伝子の発現を調べた。CpG-A を介して I 型 IFN が産生されると、IFNAR 依存性のシグナル伝達が誘起され、7 例の健康なドナーの検体では I 型 IFN 誘導性遺伝子発現が 20～100 倍に増加した。アニフロルマブは、TLR アゴニストの存在下で I 型 IFN の 21 遺伝子の発現誘導を平均で 86%阻害した。このことから、この遺伝子発現抑制が *in vivo* での有用な薬力学マーカーになる可能性が示唆された（Riggs et al 2018）。

活性化 pDC の IFNAR シグナル伝達も、やはり I 型 IFN 産生に必要な遺伝子発現をアップレギュレートすることから、結果として I 型 IFN の自己増幅が生じる。アニフロルマブで I 型 IFN のシグナル伝達を遮断すると、CpG-A 又は DNA-IC 刺激下での pDC による I 型 IFN の産生が約 80%抑制された。アニフロルマブはまた、共刺激分子のアップレギュレーション並びに CpG-A 刺激下での pDC による炎症性サイトカイン TNFα、IL-6 及び IL-8 の産生も部分的に抑制した（Riggs et al 2018）。

形質細胞分化に及ぼすアニフロルマブの作用を検討するため、共培養した pDC と B 細胞を CpG-A 及び MEGACD40L®で刺激した。これらの実験条件で、I 型 IFN の産生及び B 細胞の形質細胞への分化が促進された。また同条件下でアニフロルマブを添加したところ、形質細胞への分化が濃度依存的に抑制された（Riggs et al 2018）。

アニフロルマブは I 型 IFN 介在性の単球の分化も濃度依存性に抑制した（CD38 及び CD123 のアップレギュレーション並びに炎症性の IL-6、IP-10、MCP-1、MCP-2 の産生抑制に基づいて評価）（試験番号 RIA546-0006）。

IFNAR1 などの細胞表面受容体に結合した抗体は、FcγR を有する細胞に結合してエフェクター機能の活性化を促進する可能性がある。このリスクを回避するため、アニフロルマブの Fc 領域には 3 カ所の変異（L234F、L235E、P331S）が導入されている。これらの変異により、改変前の親抗体 9D4 と比較して FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB 及び FcγRIIIA へのアニフロルマブの結合が大幅に抑制され、ADCC 及び CDC のリスクが低減された（Riggs et al 2018）。重要なことに、アニフロルマブのエンドソーム FcRn に対する結合能は、親抗体 9D4 と比較して変化がなかった（試験番号 RIA546-0010）。FcRn への正常な結合は、抗体のリサイクル及び体内動態の維持には不可欠なものである。

抗体媒介性のエフェクター機能を評価するため、ADCC 及び CDC のアッセイ系を用いてアニフロルマブを評価した。その結果、アニフロルマブは PMBC をエフェクター細胞とした場合、B 細胞に対して ADCC 活性を示さず、NK 細胞株をエフェクター細胞とした場合も IFNAR 発現ヒト 293F 細胞に対して ADCC 活性を示さなかった（Riggs et al 2018）（試験番号 RIA546-0012）。アニフロルマブはまた、IFNAR 発現 Daudi B 細胞に対する CDC 活性も誘導しなかった（Riggs et al 2018）（試験番号 RIA546-0009）。

アニフロルマブはマウス IFNAR1 に結合しなかったため、マウス自己免疫疾患モデルにおいて I 型 IFN の重要性を実証する際には、サロゲート抗体である抗マウス IFNR 抗体 5A3 を使用した。ループス腎炎の加速発症モデルである NZB/W F1 マウスに 5A3 を投与して I 型 IFNAR1 を遮断したところ、I 型 IFN 誘導性遺伝子発現の誘導が抑制され、腎障害の発症及び重症度が低下した（試験番号 RIA546-0011）。また、強皮症のマウスモデルである移植片対宿主誘発強皮症

（GVH-SSc）モデルでは、5A3 の投与によって IFN シグナル伝達が阻害され、それにより皮膚の炎症、血管損傷及び皮膚の線維化が抑制された（試験番号 RIA546-0007）（Delaney et al 2016）。

2.4.2.3 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.4.2.4 安全性薬理試験

アニフロルマブの安全性薬理については、 カニクイザルの皮下及び静脈内への単回又は反復投与による毒性試験で評価した。中枢神経系（行動観察）、呼吸器系（呼吸数）、腎臓（尿検査）及び心血管系（心拍数、心電図及び血圧）について評価し、いずれのパラメータでもアニフロルマブ投与に関連した所見は認められなかった。さらに、これらの試験で病理組織学的検査も行ったが、9 カ月齢（39 週齢）のカニクイザルを用いた試験（試験 7140-129 参照；詳細はセクション 2.4.4.3 参照）で観察された動脈炎（種特異的な免疫原性である可能性がある）を除き、生命維持を司る重要な器官でアニフロルマブ投与に起因した有害な影響は認められなかった。以上の結果から、非臨床毒性試験で評価した安全性薬理のパラメータのいずれについても、アニフロルマブ投与に関連した有害所見は認められなかった。

2.4.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的作用に基づく薬物相互作用を評価する試験は実施しなかった。

併用薬によるアニフロルマブの代謝に対する影響については、アニフロルマブの代謝における CYP 酵素の寄与は小さいため、薬物動態学的な薬物相互作用を起こす可能性はないと予測される。アニフロルマブは IgG1 モノクローナル抗体であり、標的の IFNAR を介した除去経路、及び FcRn 経路により除去される。これらの除去機構は、CYP 酵素に依存しないものである。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 非臨床薬物動態試験の概要

アニフロルマブの非臨床薬物動態及び免疫原性について、カニクイザルにアニフロルマブを最大 100 mg/kg の用量で静脈内及び皮下に単回又は反復投与した 6 つの毒性試験（単回投与毒性試験［試験 7140-123、7140-142 及び 7140-131］、4 週間反復投与毒性試験［試験 [redacted].263.01］、39 週間反復投与毒性試験［試験 7140-129］、出生前及び出生後の生殖発生毒性試験［試験 [redacted].263.11］）で評価した（表 2 参照）。薬物動態試験の概要文を 2.6.4 項に、概要表を 2.6.5 項に示した。

皮下投与後の投与部位からアニフロルマブの吸収は緩やかであり、最高血清中濃度到達時間（t_{max}）は投与後約 2 日であった。血清中アニフロルマブ濃度の終末相の傾きは静脈内及び皮下投与で同程度であった。曝露量に明らかな性差は認められなかった。概して、静脈内及び皮下投与におけるアニフロルマブの最高血清中濃度（C_{max}）は概ね用量に比例し、血清中濃度－時間曲線下面積（AUC）は用量比を上回る増加を示した。AUC の非線形は、アニフロルマブの標的抗原（IFNAR1）を介した消失の影響と考えられた。アニフロルマブの消失半減期（$t_{½}$）は用量依存的であり、低用量では 1 週間未満であったが、高用量の反復投与では 2 週間を超えていた。新生児動物の血中にアニフロルマブが認められ、アニフロルマブは母動物の血中から胎盤を通過して胎児に移行したものと考えられた。

2.4.3.2 吸収

カニクイザルを用いてアニフロルマブ皮下投与時の吸収について評価した。皮下投与約 2 日後に C_{max} に到達し、静脈内投与と比較した皮下投与のバイオアベイラビリティは約 79%であった。

2.4.3.3 分布

分布に関する試験は実施していない。アニフロルマブは IgG のため、その分布は主に細胞外液に限定されると考えられる（Ryman et al 2017）。

2.4.3.4 代謝

代謝に関する試験は実施していない。アニフロルマブはモノクローナル抗体のため、その代謝は小さなペプチド及びアミノ酸への分解であり、活性代謝物の生成はないと考えられる。

2.4.3.5 排泄

排泄に関する試験は実施していない。アニフロルマブはモノクローナル抗体であり、腎排泄はないと考えられる。アニフロルマブの主な 2 つの消失経路は、内因性の IgG と同じ細網内皮系による消失、及び標的抗原（IFNAR1）を介した消失である。

2.4.4 毒性試験

非臨床毒性試験一覧を表 2 に示す。毒性試験の概要文及び概要表は、2.6.6 及び 2.6.7 にそれぞれ示す。

当該規制ガイダンス、特に ICH S6（R1）、ICH M3（R2）、及び ICH S5（R2）に準拠して、アニフロルマブの非臨床安全性プロファイルを特徴付ける一連の包括的な毒性試験を実施した。

これら結果はさらに、静脈内投与毒性試験における無毒性量（NOAEL）と、300 mg を 4 週間毎に 1 回静脈内投与する最大推奨臨床用量との間には十分な安全域が存在することを示している。

非臨床毒性試験には、単回静脈内投与による受容体占有率試験（GLP 非適用）、2 つの GLP 適用毒性試験（単回静脈内投与毒性試験、及び 7 週間の回復性評価を含めた 4 週間週 1 回の反復静脈内投与毒性試験）、12 週間の回復性評価を含めた 9 カ月間（39 週間）週 1 回の反復静脈内投与及び皮下投与毒性試験の 4 つのカニクイザルを用いた毒性試験（GLP 適用）が含まれる。さらに、ヒト及びカニクイザル組織を用いて、組織交差反応性試験（GLP 適用）も実施した。

2.4.4.1 動物種選択根拠

サルの細胞を用いたアニフロルマブの結合性及び中和活性に基づき、非臨床安全性評価のための薬理学的に関連した動物種としてカニクイザルを選択した。アニフロルマブは、カニクイザルの IFNAR1 と交差反応し、ヒト及びカニクイザルの PBMC との結合試験結果に基づくと、ヒト IFNAR1 と同様な結合親和性を示す。ヒト IFNAR1 の K_D は 0.29 ± 0.11 nM、カニクイザル IFNAR1 の K_D は 0.65 ± 0.42 nM であった。さらに、アニフロルマブは、サル IFNAR を発現するサル細胞（アフリカミドリザル細胞：COS7 細胞）の組換えカニクイザル IFN-α サブタイプの生物活性と、ヒト IFNAR を発現するヒト細胞の同じヒト IFN-α サブタイプの生物活性に対し、同等の中和能を示した（2.6.2.2 参照）。ヒト IFNAR1 のエピトープは、アフリカミドリザルで保存されており、COS7 細胞を用いたアニフロルマブ評価の根拠が裏付けられる。一方、アニフロルマブは、マウス IFNAR1 とは結合せず、マウス IFN-α の生物活性を阻害しない（2.6.2.2 参照）。

これらデータに基づくと、げっ歯類は薬理学的に関連のある動物ではなく、カニクイザルがアニフロルマブの薬理学的に関連する毒性を評価するのに適した動物と考えられた。ヒト及びカニクイザル組織を用いた組織交差反応性試験において、ヒトとカニクイザルはアニフロルマブで同様な染色プロファイルを示し、カニクイザルは毒性評価動物として適切であることが更に裏付けられた。

2.4.4.2　単回投与毒性

最初にアニフロルマブを毒性学的に意義のある用量である 5、30、あるいは 100 mg/kg の用量で静脈内投与したときの毒性を評価した（試験番号 7140-123、GLP 非適用）。

アニフロルマブを 100 mg/kg（本試験の最高用量であり NOAEL）までの用量で、30 分かけて単回静脈内投与した結果、投与に起因する毒性はみられなかった。37 日目及び 50 日目に、5 mg/kg のアニフロルマブを追加静脈内投与した 3 頭中 1 頭で、過敏症反応と一致する臨床所見がみられその所見は、50 日目（3 回目投与時）に最大となった。このサルの症状は、抗ヒスタミン剤（[redacted]）を投与することで緩和され、試験終了時まで新たな所見はみられなかった。この過敏症反応の発現機序を明らかにするため、探索的分析（サイトカイン分析、アイソタイピング分析、及び抗アニフロルマブ抗体反応特異性の特性評価）を実施した。IgE、IgA 及び IgM クラスを評価したが、抗アニフロルマブ抗体の主要アイソタイプは IgG であると考えられた（アイソタイピングアッセイの技術的制限から IgG は評価できず）。アイソタイピング分析では、追加投与前の 22 日目及び 29 日目に、追加投与後に臨床症状がみられた動物のみで、アニフロルマブに対する IgE 応答が検出され（IgM も 22 日目にこの動物で認められた）、アニフロルマブの 2 回の追加投与後の 70 日目に、合計 3 回投与した 3 頭の動物すべてに IgE 抗体が認められた。しかしながら、特性評価及びサイトカイン分析結果には、過敏症誘発の可能性との明確な相関関係はみられなかった。また、この 1 頭のみの過敏症様反応所見は、その後実施した反復投与毒性試験では認められなかった。

アニフロルマブを 0、0.003、0.03、0.3 あるいは 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与した試験では、薬理学的に適切な用量における安全性を評価し、受容体占有率が検出されない最小用量を決定するために実施した。その結果、28 日間の観察期間中アニフロルマブ投与に起因する有害な所見はみられなかった（試験番号 7140-131、GLP 適用）

2.4.4.3　反復投与毒性

カニクイザルを用いた 1 カ月間反復静脈内投与毒性試験では、アニフロルマブを 0.5、5、あるいは 30 mg/kg の用量で週 1 回、合計 4 回静脈内投与し、その毒性を評価した（試験番号 [redacted].263.01、GLP 適用）。回復期間も含めた試験期間中毒性評価項目にアニフロルマブ投与に起因する有害な変化は認められなかった。5 及び 30 mg/kg 投与群では乾燥便の発現頻度の増加がみられた。しかしながら、この変化は一過性のものであり、他の臨床症状とは関連せず、投与期間終了前に治療を行うことなく消失したことから、有害事象とはみなさなかった。さらに、その後のアニフロルマブの反復投与毒性試験では、乾燥便の所見はみられなかった。カニクイザルにアニフロルマブを週に 1 回静脈内投与（合計 4 回）した本試験における NOAEL は最高用量の 30 mg/kg/週と考えられた。

性成熟したカニクイザルを用いたアニフロルマブの静脈内あるいは皮下投与による 9 カ月間（39 週間）反復投与毒性試験を実施した（試験番号 7140-129、GLP 適用）。アニフロルマブを 1 週間に 1 回、静脈内投与（5 あるいは 50 mg/kg）、並びに皮下投与（15 あるいは 60 mg/kg）した。投与期間終了時の剖検時、5 あるいは 50 mg/kg の静脈内投与群の雌、又は 60 mg/kg の皮下投与群の雌で、脾臓の平均脳重量比が統計学的に有意に増加し、アニフロルマブ投与に起因する可能性が考えられたが（脾臓の絶対重量に有意な変化はなし）、回復期間の終了時には明らかな差はなかった。アニフロルマブ投与に起因する脾臓のリンパ濾胞サイズの軽微な増加が、60 mg/kg を皮下投与した雄 2 頭及び雌 1 頭、並びに 50 mg/kg を静脈内投与した雄 3 頭及び雌 1 頭に認められ、60 mg/kg を皮下投与あるいは 50 mg/kg を静脈内投与した雌に認められた脾臓の平均脳重量比の増加と相関していた。回復期間終了時、脾臓のリンパ濾胞サイズの軽微な増加が、60 mg/kg を皮下投与した雄 1 頭、50 mg/kg を静脈内投与した雌 1 頭及び 5 mg/kg を静脈内投

与した雌 1 頭に認められたが、脾臓の平均脳重量比との関連性は認められなかった。投与期間終了時、アニフロルマブを投与した雄胸腺の皮質及び髄質中におけるリンパ球数の軽微な減少が認められたが、これはアニフロルマブ投与に起因するものと考えられ、回復期間終了時の雄においても類似の胸腺皮質におけるリンパ球数減少が認められた。

投与期間終了時、60 mg/kg 皮下投与群の数頭で血圧の低下傾向が、50 mg/kg 静脈内投与群の雄で C3 濃度の可逆的増加傾向がみられた。これらはアニフロルマブ投与に起因すると考えられるが、その生理学的重要性は限定的なものであった。

投与期間終了時の剖検時では、50 mg/kg 静脈内投与群の雄 2 頭において、アニフロルマブ投与に起因する動脈炎が複数の器官で認められた。回復期間終了時には、雄 3 頭（5 及び 50 mg/kg 静脈内投与群の各 1 頭、並びに 60 mg/kg 皮下投与群の 1 頭）において、アニフロルマブ投与に起因する動脈の炎症が認められた。より多くの動物でみられたものの、回復期間終了時の雄における炎症性変化は、投与期間終了時の雄と比べ顕著ではなく、概してその炎症範囲は狭かった。本試験で観察された動脈炎は、局所性/部分的なものであり、同一の動脈組織切片中には、所見なしの部位と動脈炎部位が混在する特徴が認められた。この所見は、壊死、巨細胞、好酸球、あるいは肉芽腫を伴っておらず、主として、リンパ球及びマクロファージの血管壁及び血管周囲への浸潤がみられ、様々な器官組織で認められた。

6 カ月齢までの IFNAR 欠損マウスを用いた報告において、病理解剖学的及び病理組織学的異常は動脈炎を含めて観察されておらず（Hwang et al 1995、Muller et al 1994）、また、IFN-α に対する抗体（MEDI-545; sifalimumab）をカニクイザルに最長 1 年間投与した毒性試験においても、同様な所見は認められなかったことからも、観察された動脈炎は、アニフロルマブ投与に起因したものではないことが示唆される。

ヒト以外の霊長類におけるアニフロルマブのこれまでの免疫原性に関する情報を考慮すると、これら血管病変は、恐らく免疫複合体形成に関連している外来性ヒトタンパク質に対する動物の種特異的な慢性的免疫介在性反応の結果であると考えられ、ヒトにおける安全性との関係は不明である。この可能性は、血管を標的としない既知のヒト mAb を投与したサルにおいて、同様な血管病変が認められることが報告された最近の文献によってサポートされる。これらの文献では、この所見は、ADA/薬物複合体の沈着が原因である可能性が高いと考えられている（Bussiere and Johnson 2010、Todd 2010）。アニフロルマブ試験における動脈炎の所見は、同様な種特異的な免疫原性の結果である可能性が高いが、アニフロルマブに対する抗体産生以外の要因である可能性も否定できない。

結論として、本試験における雌の NOAEL は、静脈内投与で 50 mg/kg/週（平均 C_{max}：4510 ± 1200 µg/mL 及び平均 $AUC_{0\text{-}7d}$：21600 ± 5780 µg·d/mL）及び皮下投与で 60 mg/kg/週（平均 C_{max}：3230 ± 1120 µg/mL 及び平均 $AUC_{0\text{-}7d}$：19500 ± 5620 µg·d/mL）であり、どちらも試験の最高用量であった。雄で観察された動脈炎は、種特異的免疫原性の結果である可能性が高く、ヒトにおける安全性との関連性は不明である。ただし、アニフロルマブに対する抗体産生以外の要因の可能性も否定できない。観察された動脈炎を NOAEL の決定要因として考慮する場合の雄の NOAEL は、静脈内投与で 5 mg/kg/週未満、皮下投与で 15 mg/kg/週であった。一方、動脈炎を NOAEL の決定要因として考慮しない場合の雄の NOAEL は、静脈内投与では 50 mg/kg/週、皮下投与では 60 mg/kg/週であり、これらは検討した最高用量である。これまでに終了した臨床試験において、アニフロルマブ投与に起因する非 SLE 性血管炎は認められておらず、ヒトでの免疫原性はサルの免疫原性ほど認められなかった（免疫原性率及び相対力価に基づく）ため、最大推奨臨床用量（MRHD）に関する安全域の算出は、動脈炎を NOAEL の決定要因として考慮しない場合の静脈内投与の NOAEL（50 mg/kg）を使用した。

2.4.4.4　遺伝毒性

ICH S6（R1）に従い、バイオテクノロジー応用医薬品では、通常実施される標準的な遺伝毒性試験の実施は求められていないことから、アニフロルマブの遺伝毒性試験は実施していない。アニフロルマブは、核膜あるいはミトコンドリア膜を通過したり、DNA や核内の他の染色体物質と直接相互作用したりすることはないと考えられる高分子タンパク質である。

2.4.4.5　がん原性

IFNAR1 及び IFNAR2 欠損マウス、IFN-α/β 及び抗 IFN-α/β 抗体（アストラゼネカ社が利用可能なアニフロルマブの発がん性リスク評価のための MAR1-5A3 抗体を含む）を投与したマウスの試験で得られた公表論文（これらのモデルでは、概して IFNAR 遮断はげっ歯類における発がん性の増加を示す）を基に発がん性を考察した。その結果、これらの報告は、げっ歯類における IFNAR1 遮断による発がん性を特徴づけるのに十分であると判断した。これら抗体等を用いた *in vivo* 試験の再実施は、これまでの実験結果の結論に大きな影響を与える可能性は低いと考えられた。追加の動物モデルを用いた *in vivo* がん原性試験を実施せずとも、その潜在的な発がん性リスクは、臨床試験、製品ラベル及びリスク管理の実践において悪性腫瘍の発生を継続的にモニタリング監視することで最も軽減できる（ICH S6（R1、2011）と考えられる。

2.4.4.6　生殖発生毒性

文献では、I 型 IFN 受容体欠損マウスでは発育障害はみられないことが報告されている。Műller らによれば、IFN-α/β 受容体欠損マウスはメンデルの法則による遺伝形質頻度で得られ、繁殖可能であり、生後 6 カ月齢まで明らかな表現型の異常はみられなかったことを報告している（Muller et al 1994）また、Hwang らの報告によれば、I 型 IFNs による細胞増殖及び細胞分化の調整に関する説得力のある証拠があるにもかかわらず、成体 IFNAR1 欠損マウスには異常な胎児発育及び形態学的変化に関する肉眼的兆候は認められなかった（Hwang et al 1995）。これらの欠損マウスの生殖能力から、I 型 IFN は妊娠のために必須ではないことが示唆されている。これら報告と一致して、妊娠カニクイザルを用いたアニフロルマブの静脈内投与による拡充型出生前及び出生後の生殖発生毒性試験（ePPND 試験）では、母動物及び出生児にアニフロルマブ投与に起因する影響はみられなかった。本試験では、妊娠カニクイザル（16～17 頭/群）に隔週で、溶媒対照あるいは 30 あるいは 60 mg/kg のアニフロルマブを GD20 日目から LD28 日目（授乳期間中は 3 回投与）頃までの期間静脈内投与し、出生児を分娩後 208～212 日目の期間観察した。その結果、本試験における母動物及び出生児に対する NOAEL は最高用量 60 mg/kg/2 週と考えられた。

雌の受胎能は、GLP 適用の 9 カ月（39 週間）間反復投与試験において評価した。評価項目は、月経周期、器官重量（卵巣及び子宮）及び病理組織学的検査（卵巣、子宮、子宮頚部及び膣）である。その結果、雌の受胎能にアニフロルマブ投与に起因する影響は認められなかった（試験番号 [redacted].263.11）。同様に、雄の受胎能も GLP 適用の 9 カ月間（39 週間）反復投与試験において評価した（試験番号 [redacted].263.01）。評価項目は、精液検査、精子形成ステージ分析、器官重量（前立腺、精嚢、及び精巣上体）及び病理組織学的検査（前立腺、精嚢及び精巣上体）である。その結果、雄の受胎能にアニフロルマブ投与に起因する影響は認められなかった。アニフロルマブを投与した雄 2 頭の精巣に、病理組織学的所見が認められた。しかしながら、これら 2 頭の精巣の所見はアニフロルマブ投与に起因するものではないと考えられた（詳細については 2.6.6.6.1 を参照）。

2.4.4.7　局所刺激性試験

アニフロルマブの局所刺激性は、静脈内及び皮下投与による単回投与毒性試験、並びに反復投与毒性試験におけるアニフロルマブ投与部位における Draize 評価、肉眼所見及び病理組織学的検

査により評価した。その結果、投与部位にアニフロルマブ投与に起因する変化は認められなかった。

2.4.4.8　その他の毒性試験

正常なヒト及びカニクイザルの両組織におけるアニフロルマブ特異的染色は、上皮、内皮、中皮、単核細胞、紡錘/樹状細胞、血管内及び漏出タンパク質様物質（血清）で認められた（試験番号 IM1595 及び試験番号 IM1596）。また、消化管の筋層間神経叢、腎臓の糸球体係蹄細胞、卵巣の顆粒膜細胞、膵臓の β 細胞、上皮小体の主細胞、下垂体の内分泌細胞及び下垂体細胞、胎盤の脱落膜細胞、並びに精巣の精原細胞にもヒト及びカニクイザルの両組織でアニフロルマブの染色が認められた。これらの染色は、IFNAR の広範にわたる組織発現に関する公表論文と一致した。

ヒト組織のみでアニフロルマブによる染色が認められた組織は、眼及び末梢神経（神経節細胞）である。3 例のドナー中 1 例で、アニフロルマブ濃度が 10 µg/mL のときのみ角膜上皮に微弱な染色が時折認められた。さらに、3 例のドナーの内 1 例で、末梢神経の神経節細胞（細胞質のみ）に、頻繁に（アニフロルマブ濃度：10 µg/mL）あるいは時折（アニフロルマブ濃度：2 µg/mL）染色が認められた。カニクイザル組織のみでアニフロルマブによる染色が認められた組織は、肺の下位気管支腺、末梢神経の軸索及び食道のマイスナー神経叢であった。肺では、3 頭のカニクイザル中 1 頭の下位気管支腺に、アニフロルマブの両濃度で、染色強度が弱～中程度の染色が時折あるいは頻繁に認められた。3 頭のカニクイザル中 1 頭の末梢神経の軸索に、アニフロルマブの両濃度で、染色強度が弱～中程度の染色が非常にまれに認められた。また、3 頭のカニクイザル中 1 頭の食道のマイスナー神経叢に、アニフロルマブの両濃度で、染色強度が弱～中程度の染色が頻繁に認められた。

2.4.5　総括及び結論

薬理試験の結果から、アニフロルマブは I 型 IFNα/β 受容体の IFNAR1 サブユニットに高い親和性で結合し、I 型 IFN を介したシグナル伝達を阻害することが示された。アニフロルマブは I 型 IFN とその受容体との結合を競合的に阻害して、リガンドを介した IFNAR1/2 ヘテロ二量体への二量体化を阻止し、シグナル伝達を遮断する。アニフロルマブはまた、IFNAR1 の細胞内移行も速やかに誘導して、受容体介在性のシグナル伝達に利用可能な細胞表面の IFNAR1 のレベルを低下させた。アニフロルマブは、全ての組換え I 型 IFN、pDC によって産生される I 型 IFN、ループス腎炎患者の血清中に存在する I 型 IFN によるシグナル伝達及び ISRE の活性を強力に阻害した。I 型 IFN の阻害により、単球及び樹状細胞の活性化、分化及び炎症性サイトカイン産生、並びに B 細胞の形質細胞への分化が抑制された。したがって、アニフロルマブは、SLE にみられる炎症を和らげ、組織病理変化を促進する獲得自己免疫応答を抑制するものと予測される。アニフロルマブは、エンドソーム内 TLR アゴニスト刺激の存在下で、I 型 IFN 誘導性 21 遺伝子の発現誘導を平均で 86%阻害した。このことから、I 型 IFN 誘導性遺伝子発現の抑制は *in vivo* での有用な薬力学マーカーになる可能性が示唆された。全ての非臨床試験を通じ、評価した安全性薬理評価パラメータのいずれについても、アニフロルマブに関連する有害な所見は認められなかった。

アニフロルマブの非臨床毒性の評価において、薬理学的に適した動物種としてカニクイザルを選択した。アニフロルマブの非臨床薬物動態及び免疫原性について、カニクイザルにアニフロルマブを最大 100 mg/kg の用量で静脈内及び皮下投与した 6 つの毒性試験（3 つの単回投与毒性試験、2 つの反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験）で評価した。概して、アニフロルマブの C_{max} は用量に比例し、AUC は用量比を上回る増加を示した。$t_{½}$は用量増加に伴い延長した。皮下投与後の投与部位からのアニフロルマブの吸収は緩やかであり、t_{max} は投与後約 2 日であった。血清中アニフロルマブ濃度の終末相の傾きは静脈内及び皮下投与で同程度であった。出生児動物

の血中にアニフロルマブが認められ、アニフロルマブは母動物の血中から胎盤を通過して胎児に移行したものと考えられた。曝露量に明らかな性差は認められなかった。

アニフロルマブ静脈内投与時の毒性を評価するため、カニクイザルを用いた 4 つの毒性試験（2 つの単回投与試験と 2 つの反復投与試験：1 カ月間及び 9 カ月間）を実施した。単回投与試験では 100 mg/kg まで静脈内投与したが、アニフロルマブの有害所見はみられず、0.3 mg/kg の用量で最小受容体占有と標的中和が認められた。最初の投与後 35 日及び 49 日目にアニフロルマブ 5 mg/kg を追加投与した 3 頭の動物のうち 1 頭に過敏症反応と一致する症状がみられ、その症状は追加投与ごとに悪化したが、抗ヒスタミン剤静脈内投与によりその症状は緩和した。この 1 頭でみられた過敏症様反応は、その後実施した 1 カ月間及び 9 カ月間（39 週間）の反復投与毒性試験では観察されなかった。

カニクイザルを用いた 1 カ月間反復静脈内投与毒性試験（GLP 適用）では、アニフロルマブを 0.5、5、あるいは 30 mg/kg/週の用量で 1 週間に 1 回、合計 4 回静脈内投与したときの毒性を評価した結果、NOAEL は、30 mg/kg/週であった。

カニクイザルを用いた 9 カ月間反復投与毒性試験（GLP 適用）では、性成熟したカニクイザルにアニフロルマブを 39 週間、週 1 回の間隔で、静脈内投与（5 又は 50 mg/kg/週）、あるいは皮下投与（15 又は 60 mg/kg/週）した。投与期間終了時の剖検時、50 mg/kg 静脈内投与群の雄 2 頭において、アニフロルマブ投与に起因する動脈炎が複数の器官で認められた。さらに、回復期間終了時、雄 3 頭（5 mg/kg 及び 50 mg/kg 静脈内投与群の各 1 頭、並びに 60 mg/kg 皮下投与群の 1 頭）において、アニフロルマブ投与に起因する動脈炎が認められた。より多くの動物でみられたものの、回復期間終了時の雄におけるこの炎症性変化は、投与期間終了時の雄と比べ顕著ではなく、概してその炎症範囲は狭かった。ヒト以外の霊長類におけるアニフロルマブの免疫原性の知見から、これらの血管病変は、恐らく免疫複合体形成に関連している外来性ヒトタンパク質に対する動物の種特異的な慢性的免疫介在性反応の結果であると考えられ、ヒトにおける安全性との関連性は不明である。この説明は、血管を標的としない既知のヒト mAb を投与したサルにおいて、同様な血管病変が認められることが記載された最近の文献によってサポートされている。これらの文献では、この所見は、ADA/薬物複合体の沈着が原因である可能性が高いと考えられている（Bussiere and Johnson 2010、Todd 2010）。アニフロルマブ試験における動脈炎の所見は、同様な種特異的免疫原性の結果である可能性が高いが、アニフロルマブに対する抗体産生以外の要因の可能性も否定できない。

本試験における雌の NOAEL は、静脈内投与では 50 mg/kg/週、皮下投与では 60 mg/kg/週であり、これらは検討した最高用量である。雄で観察された動脈炎は種特異的免疫原性により発現した可能性があるが、ヒトにおける安全性との関連は明確ではない。観察された動脈炎を NOAEL の決定要因として考慮する場合、雄の NOAEL は、静脈内投与で 5 mg/kg/週未満、皮下投与で 15 mg/kg/週であった。一方、動脈炎を NOAEL の決定要因として考慮しない場合、雄の NOAEL は、静脈内投与では 50 mg/kg/週、皮下投与では 60 mg/kg/週であり、これらは検討した最高用量である。これまでに終了した臨床試験において、アニフロルマブ投与に起因する非 SLE 性血管炎は認められておらず、ヒトでの免疫原性はサルでの免疫原性ほど認められなかった（免疫原性率及び相対力価に基づく）ため、MRHD に関する安全域の計算には、動脈炎を NOAEL の決定要因として考慮しない場合の静脈内投与の NOAEL（50 mg/kg/週）を使用した。

アニフロルマブのカニクイザルを用いた静脈内投与による拡充型出生前及び出生後の生殖発生毒性試験（ePPND）を実施した結果、母動物あるいは出生児にアニフロルマブ投与に起因する有害所見は認められなかった。本試験における NOAEL は、最高用量である 60 mg/kg/2 週と考えられた。雌の受胎能は、GLP 適用の 9 カ月間（39 週間）反復投与試験において評価した結果、雌受胎能にアニフロルマブ投与に起因する影響は認められなかった。雄受胎能も GLP 適用の 9 カ月間（39 週間）反復投与試験において評価した。アニフロルマブを投与した雄 2 頭の精巣に病理

組織学的所見が認められたが、これらの 2 頭の精巣の所見はアニフロルマブ投与に起因するものではないと考えられた。このことは I 型 IFN の過剰発現（中和ではない）は、精子形成を障害する可能性があることを示唆する I 型 IFN に関する文献と一致するものである。

安全域は、NOAEL で観察された定常状態での曝露量（39 週間反復投与毒性試験及び拡充型出生前及び出生後の生殖発生毒性試験）及び臨床母集団薬物動態モデルから予測される第 48～52 週の MRHD（300 mg を 4 週間毎に 1 回静脈内投与）での曝露量（Anifrolumab Population PK 報告書、5.3.3.5 参照）を用いて算出し、動物とヒトの投与頻度の差異も考慮した。I 型 IFN 遺伝子シグネチャー試験のステータスがクリアランス上の共変量として同定されたため、I 型 IFN 遺伝子シグネチャー試験で I 型 IFN が高値の場合あるいは低値の場合の両方について MRHD での曝露量が考慮され、それぞれ 2.6.6 毒性試験概要文（表 8）に示した。最も保守的なアプローチ（IFN 遺伝子シグネチャー試験で I 型 IFN が低値であった被験者の MRHD での曝露量に基づく）では、39 週間反復投与毒性試験ではその安全域は AUC で約 58 倍、C_{max} で約 33 倍、拡充型出生前及び出生後の生殖発生毒性試験ではその安全域は AUC で約 28 倍、C_{max} で約 17 倍であった。

結論として、本申請資料のモジュール 2.6 の概要文及び概要表並びにモジュール 4 に記載したアニフロルマブの薬理、薬物動態及び毒性に関する資料の範囲は、申請適応症における推奨用量、投与経路及び投与スケジュールに関し、アニフロルマブの製造販売承認申請をサポートするのに適応なものである。

2.4.6 参考文献

Alarcón et al 2004

Alarcón GS, McGwin G Jr, Uribe A, Friedman AW, Roseman JM, Fessler BJ et al. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic lupus cohort (LUMINA). XVII. Predictors of self-reported health-related quality of life early in the disease course. Arthritis Rheum 2004;Jun 15;51(3):465-74.

Baechler et al 2003

Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. PNAS 2003;100(5):2610-15.

Bengtsson et al 2017

Bengtsson AA, Ronnblom L. Role of interferons in SLE. Best Practice and Research Clinical Rheumatology 2017;31:415-428.

Bengtsson et al 2000

Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm G, Vallin H, et al. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. Lupus 2000;9:664-71.

Bussiere and Johnson 2010

Bussiere J and Johnson C. Case Study on the Impact of Immunogenicity on Adverse Effects in Toxicology Studies and Consequences for the Clinical Development Program. Medical Intelligence Solutions 2010:619.

de Weerd et al 2007

de Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. J Biol Chem 2007;282(28):20053-7.

Delaney et al 2016

Delaney TA, Morehouse C, Brohawn PZ, Groves C, Colonna M, Yao Y et al. Type I IFNs Regulate Inflammation, Vasculopathy, and Fibrosis in Chronic Cutaneous Graft-versus-Host Disease. J Immunol 2016;197(1):42-50.

Hwang et al 1995

Hwang SY, Hertzog PJ, Holland KA, Sumarsono SH, Tymms MJ, Hamilton JA et al. A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92(24):11284-8.

Kirou et al 2005

Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Peterson MGE, Crow MK. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. Arthritis & Rheumatism 2005;52(5):1491-1503.

Lichtman et al 2012

Lichtman EI, Helfgott SM, Kriegel MA. Emerging therapies for systemic lupus erythematosus--focus on targeting interferon-alpha. Clin Immunol. 2012 Jun;143(3):210-21.

Muller et al 1994

Muller U, Steinhoff U, Reis LFL, Hemmi S, Pavloc J, Zinkernagel RM, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. Science 1994;264:1918-21.

Nived et al 2002

Nived O, Jonsen A, Bengtsson AA, Bengtsson C, Sturfelt G. High predictive value of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for survival in systemic lupus erythematosus. The Journal of Rheumatology 2002:29(7):1-4.

Peng et al 2015

Peng L, Oganesyan V, Wu H, Dall'Acqua WF, Damschroder MM. Molecular basis for antagonistic activity of anifrolumab, an anti-interferon-α receptor 1 antibody. MAbs 2015;7(2):428-39.

Postal et al 2012

Postal M, Sinicato NA, Peliçari KO, Marini R, Lavras Costallat LT, Appenzeller S. Clinical and serological manifestations associated with interferon-α levels in childhood-onset systemic lupus erythematosus. Clinics (São Paulo) 2012;67(2):157-62.

Psarras et al 2017

Psarras A, Emery P, Vital EM. Type I interferon – mediated autoimmune diseases: pathogenesis, diagnosis and targeted therapy. Rhematology 2017;56:1662-75.

Riggs et al 2018

Riggs JM, Hanna RN, Rajan B, Zerrouki K, Karnell JL, Sagar D et al. Characterisation of anifrolumab, a fully human anti-interferon receptor antagonist antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus. Lupus Science & Medicine 2018;5:1-11.

Ryman et al 2017

Ryman JT and Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies, CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol 2017;6:576-88.

Todd 2010

Todd MD, Characterization of Potential Immune Complexes Observed in Cynomolgus Monkeys and Relationship to Observed Toxicities of Monoclonal Antibody Drug Candidates. (2010) In Proceedings of the Society of Toxicology Annual Meeting, 133. Salt Lake City, Utah.

Wang et al 2013

Wang B, Higgs BW, Chang L, Vainshtein I, Liu Z, Streicher K, et al. Pharmacogenomics and translational simulations to bridge indications for an anti-interferon-alpha receptor antibody. Clin Pharmacol Ther 2013;93(6):483-92.