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]

2.6.6　毒性試験の概要文
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 4
2.6.6.1 まとめ 5
2.6.6.1.1 毒性試験の要約 5
2.6.6.1.2 動物種の選定 10
2.6.6.2 単回投与毒性試験 10
2.6.6.2.1 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（試験番号 7140-123；GLP 非適用） 10
2.6.6.2.2 雄カニクイザルにアニフロルマブを単回静脈内投与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（試験番号 7140-142、GLP 非適用） 11
2.6.6.2.3 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（試験番号 7140-131、GLP 適用） 12
2.6.6.3 反復投与毒性試験 13
2.6.6.3.1 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（試験番号 [redacted].263.01、GLP 適用） 13
2.6.6.3.2 カニクイザルにアニフロルマブを 39 週間反復静脈内投与あるいは皮下投与（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（試験番号 7140-129、GLP 適用） 14
2.6.6.4 遺伝毒性試験 17
2.6.6.5 がん原性試験 17
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 18
2.6.6.6.1 カニクイザルを用いた 9 カ月間（39 週間）反復静脈内あるいは皮下投与毒性試験における雄の受胎能評価（試験番号 7140-129、GLP 適用） 19
2.6.6.6.2 カニクイザルを用いた 9 カ月（39 週間）間反復静脈内あるいは皮下投与毒性試験における雌の受胎能評価（試験番号 7140-129、GLP 適用） 21
2.6.6.6.3 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（試験番号 [redacted].263.11、GLP 適用） 21
2.6.6.6.4 幼若動物を用いた毒性試験 22
2.6.6.7 局所刺激性試験 23
2.6.6.8 その他の毒性試験 23
2.6.6.8.1 アニフロルマブのヒト組織交差反応性試験（試験番号 IM1595、GLP 適用） 23
2.6.6.8.2 アニフロルマブのカニクイザル組織交差反応性試験（試験番号 IM1596、GLP 適用） 24
2.6.6.8.3 免疫毒性 26

2.6.6.9 考察及び結論 26
2.6.6.10 図表 32
2.6.6.11 参考文献 32

表目次

表 1 アニフロルマブの非臨床毒性試験一覧 8
表 2 カニクイザルを用いたアニフロルマブの単回静脈内投与毒性試験（試験番号 7140-123、GLP 非適用） 11
表 3 カニクイザルを用いたアニフロルマブの単回静脈内あるいは皮下投与毒性試験（試験番号 7140-142、GLP 非適用） 12
表 4 カニクイザルを用いたアニフロルマブの単回静脈内投与毒性試験（試験番号 7140-131、GLP 適用） 12
表 5 カニクイザルを用いたアニフロルマブの 4 週間反復静脈内投与毒性試験（含 7 週間回復性）（試験番号 [redacted].263.01、GLP 適用） 13
表 6 カニクイザルにアニフロルマブを 39 週間反復静脈内投与あるいは皮下投与（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試験（試験番号 7140-129、GLP 適用） 14
表 7 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（試験番号 [redacted].263.11、GLP 適用） 21
表 8 カニクイザルを用いた非臨床試験の静脈内投与群における曝露量と最大推奨臨床用量における曝露量の比較（39 週間反復投与毒性試験：試験番号 7140-129 及び拡充型出生前及び出生後の発生生殖毒性試験：試験番号 [redacted].263.11） 31

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
AUC	area under the blood concentration time curve：薬物濃度時間曲線下面積
BALT	bronchus-associated lymphoid tissue：腸管関連リンパ組織
C3	third component of complement：補体第 3 成分
C_{max}	maximum drug concentration：最高血中濃度
DB	day after birth：出生後日数、誕生日= DB0
ECG	electrocardiogram：心電図
ePPND	enhanced pre- and postnatal development：拡充型出生前及び出生後の発生
Fc 領域	fragment, crystallizable：免疫グロブリン重鎖定常領域
FcγR	Fc gamma receptor：Fcγ 受容体
GALT	gut associated lymphoid tissue：気管支/細気管支関連リンパ組織
GD	Gestation Day：妊娠後日数、妊娠日=GD0
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
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-α, -β	interferon-alpha, -beta：インターフェロン α あるいは β
IFNAR1, 2	subunit 1, 2 of the type I interferon receptor alpha/beta receptor：I 型インターフェロン受容体のサブユニット 1 あるいはサブユニット 2
IgE, G, M	immunoglobulin E, G, M：免疫グロブリン E、G、あるいは M
IgG1κ	IgG1 kappa：免疫グロブリン G1 Kappa
IV	intravenous：静脈内
K_D	dissociation contact：解離定数
KHL	keyhole limpet hemocyanin：キーホールリンペットヘモシアニン
LD	Lactation Day：授乳開始後日数、新生児誕生日=LD0
mAb	monoclonal antidody：モノクローナル抗体
MAR1-5A3	monoclonal antibody reacts with mouse IFNAR1：マウス IFNAR1 に対する mAb
MEDI-546	MEDI-546：アニフロルマブの開発番号
MHC	major histocompatibility complex：主要組織適合性複合体
MRHD	maximum recommended human dose：最大推奨臨床用量
NOAEL	no observed adverse effect level：無毒性量
PBMC	peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核球
PD	pharmacodynamics：薬力学
SC	subcutaneous：皮下
SLE	systemic lupus erythematosus：全身性エリテマトーデス
TDAR	T cell dependent antibody response：T 細胞依存性抗体産生
TK	toxicokinetics：トキシコキネティクス

2.6.6.1 まとめ

アニフロルマブは、I 型インターフェロン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（mAb）である。アニフロルマブは I 型インターフェロンの IFNAR1 への結合を競合的に阻害することにより、I 型インターフェロンシグナル伝達を遮断する。

2.6.6.1.1 毒性試験の要約

アニフロルマブはマウスインターフェロン α（IFN-α）の生物活性を阻害しないことから、アフリカミドリザル細胞（COS7 細胞）の結合性及び中和活性に基づき、カニクイザルを薬理学的に意義のある非臨床毒性評価動物種に選択した。このことは、ヒト、カニクイザル及びアフリカミドリザル IFNAR1 におけるアニフロルマブのエピトープ配列が保存されていることからも支持される。アニフロルマブは、ヒト及びカニクイザルの末梢血単核球（PBMC）の IFNAR1 のいずれにも同様に良好に結合する。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ことから、カニクイザルはアニフロルマブの非臨床毒性試験に適切な動物種と考えられる。特に記載がない限り、非臨床毒性試験で使用した溶媒は、2.35%リジン及び 0.02%ポリソルベート 80 を含む 10 mM のヒスチジン緩衝液（pH 6.0）である。

薬理学的に意義のある非臨床毒性試験動物種の選択をサポートするために、アニフロルマブ組織交差反応性試験（GLP 適用）2 試験を正常ヒト及びカニクイザルの組織標本を用いて実施した。正常ヒト及びカニクイザル組織のアニフロルマブによる染色結果は、公表論文における各組織における IFNAR1 発現と一致しており、薬理学的に意義のある非臨床毒性評価動物種としてカニクイザルを使用することの適切性が更に支持された。

カニクイザルを用いたアニフロルマブの静脈内（IV）及び皮下（SC）投与による単回及び反復投与毒性試験を実施した。100 mg/kg までの単回 IV 投与後、又は 5 mg/kg の単回 SC 投与後では、アニフロルマブによる有害な所見はみられなかった。アニフロルマブ単回 IV 投与試験で 5 mg/kg の追加 IV 投与した 3 頭中、1 頭の動物に過敏症反応と一致する兆候がみられ、投与を繰り返すことにより悪化し、抗ヒスタミン薬の IV 投与により軽減した。明らかな過敏症反応の根本的なメカニズムを特定するために実施した検査及び探索的分析（抗薬物抗体（ADA）反応のサイトカイン分析、アイソタイピング分析及び特性評価）では、ADA 反応発現との関連以外の決定的な情報を明らかにすることはできなかった。しかしながらこの 1 頭でみられた過敏症様反応は、その後実施した 1 カ月間の反復投与毒性試験（無毒性量（NOAEL）はこの試験の最高用量である 30 mg/kg/週）では観察されなかった。

カニクイザルを用いた 9 カ月間反復投与毒性試験では、アニフロルマブを週 1 回 39 週間 IV 投与（0、5 又は 50 mg/kg/週）、あるいは SC 投与（0、15 又は 60 mg/kg/週）した。アニフロルマブを投与した雄 24 頭中 5 頭で、いくつかの器官中の中小動脈に局所性動脈炎が認められたが、雄の溶媒対照群及び雌ではアニフロルマブ投与に関係なく認められなかったことから投与に起因したものではないと考えられた。投与期間終了時と比較して、13 週間の回復期間終了時の動物では本所見の重症度は低く、概してその炎症範囲は狭かった。本試験の雌における NOAEL は、IV 投与では 50 mg/kg/週、SC 投与では 60 mg/kg/週であり、これらは本試験の最高用量であった。雄については、動脈炎の発現は種特異的な免疫原性によるものである可能性があり、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。観察された動脈炎に基づくと、雄の NOAEL は、IV 投与で 5 mg/kg/週未満、SC 投与で 15 mg/kg/週と考えられる。NOAEL の決定に、観察された動脈炎を考慮しない場合、雄の NOAEL は、IV 投与で 50 mg/kg/週、SC 投与で 60 mg/kg/週となり、これらは本試験の最高用量で

あった。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、ヒトでの免疫原性にはサルでの免疫原性ほどの強さ（免疫原性率及び相対力価に基づく）は認められなかったため、最大推奨臨床用量（MRHD）に対する安全域の算出には、雄の動脈炎を NOAEL の決定要因として考慮しない場合の IV 投与の NOAEL（50 mg/kg/週）を使用した。

局所刺激性を、単回及び反復投与試験におけるアニフロルマブの IV 投与及び SC 投与の各部位においてドレイズ評価法による皮膚刺激性の評価、剖検所見及び病理組織学的所見により評価した。その結果、いずれの試験においても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。また、アニフロルマブを投与した動物の免疫学的評価（イムノフェノタイピング、血液学的分析、T 細胞依存性抗原反応（抗キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）抗体及び免疫組織の病理組織学的検査）において、免疫系に対する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。

雌受胎能は、GLP 適用 9 カ月間（39 週間）反復投与毒性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。同様に、雄受胎能も GLP 適用 9 カ月間（39 週間）反復投与毒性試験において評価した。評価項目は、精液検査、精子形成ステージ検査、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、精巣及び精巣上体）である。その結果、雄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。さらに、精子評価パラメータ（射精又は剖検）に統計学的に有意な、あるいは生物学的に意味のある差異はいずれの時点においてもみられなかった。アニフロルマブを投与した雄 2 頭（それぞれ、SC 60 mg/kg 投与群の投与期間終了時剖検の 1 頭及び IV 50 mg/kg 投与群の回復期間終了時剖検の 1 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（詳細については 2.6.6.6.1 を参照）。

カニクイザルを用いた拡充型出生前及び出生後の発生生殖毒性試験（ePPND；Stewart, 2009）を実施した。検討した用量でアニフロルマブ投与に起因する影響（母体、胎児又は出生児）は認められなかった。胚・胎児喪失の発生率にも影響はみられず、流産にも影響はみられなかった。さらに、死産数は溶媒対照群及び試験施設の過去の発生率と同じであり、免疫学的評価（KLH 免疫による免疫グロブリン M（IgM）及び免疫グロブリン G（IgG）の力価、末梢血のイムノフェノタイピング、血液学的分析及びリンパ器官の病理組織学的検査（脾臓、胸腺及びリンパ節）を含む、出生児の成長及び発育はカニクイザルの正常範囲内であった。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。

投与期間が 39 週間までのカニクイザルを用いた反復 IV 又は SC 投与毒性試験において、アニフロルマブ投与に起因した増殖性又は前腫瘍性の影響を示唆する所見は認められなかった。アニフロルマブはマウス IFNAR1 に結合せず、マウス IFN-α の生物活性を阻害しないため、通常のげっ歯類を用いた 2 年間のがん原性試験によるアニフロルマブの発がん性リスクの直接評価は不可能であり、さらに、*in vivo* 発がん性評価において、一般的に、カニクイザルは適切な動物種とみなされていない。直接アニフロルマブの *in vivo* 発がん性評価は実行不可能であるため、代替 *in vivo* オプション（代替試薬を含む）が検討され、利用可能な文献のレビューに基づき科学的根拠の重要度（weight of evidence）のリスク評価を行った。そこで、げっ歯類における IFNAR 遮断時の潜在的な発がん性を精査するために、IFNAR1 及び IFNAR2 欠損マウス、MAR1-5A3 抗体（アニフロルマブの潜在的発がん性リスク評価に利用可能な試薬抗体）を含む IFN- α/β 及び抗 IFN-α/β 抗体を投与したマウスを用いた試験から得られた既存文献情報を評価した（これらのモデルでは一般的に、げっ歯類において IFNAR 遮断による発がん性増加が示されている）。これらの

利用可能な代替モデル及び試薬で実施した科学的根拠の重要度に基づくと、既存文献と同物質を用いた追加の *in vivo* 試験を実施しても、現存する実験結果の結論に大きな影響を与えるものではないと考えられた。従って、発がん性の潜在的リスクは、追加の動物モデルを用いた *in vivo* 試験を実施せずとも、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））と考えられる。詳細については 2.6.6.5 を参照。

結論として、ICH S6（R1）ガイドラインに従い、カニクイザルを用いた適切なアニフロルマブの非臨床毒性試験を実施し、これらの試験は、予定している適応症での推奨用量、投与経路及び投与スケジュールでのアニフロルマブの製造販売承認申請を適切にサポートしていると考える。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 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発生生殖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。

6 つの毒性試験におけるトキシコキネティクス結果は、2.6.4 項を参照。

表 1　　アニフロルマブの非臨床毒性試験一覧

試験種	試験番号 （報告書記載場所）	試験報告書	動物種	投与 経路	試験施設	GLP 適合性
単回投与毒性	7140-123 (4.2.3.1.1)	Non-GLP Single-Dose Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Immunotoxicology Study with MEDI-546 in Cynomolgus Monkeys	カニクイザル	IV	[redacted], [redacted], USA	非 GLP
	7140-142 (4.2.3.1.2)	Non-GLP Study to Evaluate the Toxicity, Toxicokinetics, Pharmacodynamics, and Immunogenicity of MEDI-546 in Male Cynomolgus Monkeys Following Single Intravenous or Subcutaneous Administration	雄カニクイザル	IV SC	[redacted], [redacted], USA	非 GLP
	7140-131 (4.2.3.1.3)	GLP Single IV Dose Toxicity Study of MEDI-546 in Cynomolgus Monkeys with Toxicokinetics and Immunogenicity Evaluation	カニクイザル	IV	[redacted], [redacted], USA	GLP
反復投与毒性	[redacted].263.01 (4.2.3.2.1)	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	カニクイザル	IV	[redacted], [redacted], USA	GLP
	7140-129 (4.2.3.2.2)	A 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	カニクイザル（性成熟）	IV SC	[redacted], [redacted], USA	GLP
遺伝毒性	ICH S6（R1）ガイドラインに基づき遺伝毒性試験は実施していない（2.6.6.4 参照）。					
がん原性	がん原性試験は実施していない（2.6.6.5 参照）.					
生殖発生毒性	[redacted].263.11 (4.2.3.5.3)	Assessment of Effects of MEDI-546 on Pre- and Postnatal Development When Administered by Intravenous Infusion Once Every Two Weeks to Pregnant Cynomolgus Monkeys Starting on Gestation Day 20 to Early Lactation Period	雌カニクイザル（性成熟）	IV	[redacted], [redacted], USA	GLP

表 1　　アニフロルマブの非臨床毒性試験一覧

試験種	試験番号 （報告書記載場所）	試験報告書	動物種	投与 経路	試験施設	GLP 適合性
その他の毒性試験（組織交差反応性試験）	IM1595 (4.2.3.7.7.2)	Cross-Reactivity Study of MEDI-546-Alexa Fluor 488 with Normal Human Tissues	ヒト	NA	[redacted] USA	GLP
	IM1596 (4.2.3.7.7.1)	Cross-Reactivity Study of MEDI-546-Alexa Fluor 488 with Normal Cynomolgus Monkey Tissues	カニクイザル	NA	[redacted] USA	GLP

GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、アニフロルマブは MEDI-546 と表記、NA=該当なし、IV=静脈内、SC=皮下　.

2.6.6.1.2 動物種の選定

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（*Macaca fascicularis*）を薬理学的に意義のある非臨床毒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 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多種の遺伝子組み換えカニクイザル 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正常組織でアニフロルマブの広範にわたる染色がみられ、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さらに裏付けられた。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。従って、カニクイザルは薬理学的に関連した毒性試験評価のための唯一の適切な動物種である。アニフロルマブの非臨床薬理試験の詳細については、2.6.2 項を参照。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

アニフロルマブの急性毒性は、3 つの単回投与毒性試験にて評価した。100 mg/kg までの用量では、アニフロルマブの静脈内投与による急性毒性の兆候はみられなかった。

2.6.6.2.1 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（試験番号 7140-123；GLP 非適用）

カニクイザルを用いたアニフロルマブの単回静脈内投与試験を実施した（試験番号 7140-123、GLP 非適用）。本試験では 1 群 10 頭（5 頭/性/群）の 4 群とし、アニフロルマブを 0（溶媒対照：10 mM ヒスチジン緩衝液、pH 6.0）、5、30 あるいは 100 mg/kg の用量で投与した。投与容量は、5 mL/kg、投与速度は 10 mL/kg/hour とし、30 分かけて単回静脈内投与（1 日目）した（表 2）。免疫原性の潜在的リスクを評価するために（15 日目のイムノフェノタイピングによる受容体占有率結果の異常値から、抗アニフロルマブ抗体の産生が示唆された）、5 mg/kg 投与群の雄 2 頭及び雌 1 頭には、37 日目及び 50 日目にアニフロルマブ 5 mg/kg を追加静脈内投与した。3 日目に 1 群当たり雄雌各 2 頭の動物を剖検し、残りの動物は 70 日目までの観察後、剖検することなく試験から外した。

毒性評価項目は、死亡、一般状態（月経を含む）、身体的検査（心拍数、呼吸数及び体温を含む）、体重、臨床病理学的検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査及び尿検査）、イムノフェノタイピング、器官重量、剖検及び病理組織学的検査であった。血液サンプルは、トキシコキネティクス、免疫原性（抗アニフロルマブ抗体）、IFNAR1 受容体占有率、サイトカイン分析及びイムノフェノタイピングのために、試験を通じて様々な間隔で採取した。トキシコキネティクスの結果については 2.6.4.8.1 項を参照。

表 2　カニクイザルを用いたアニフロルマブの単回静脈内投与毒性試験（試験番号 7140-123、GLP 非適用）

群番号	被験物質	動物数（雄/雌）	投与経路	用量（mg/kg）	動物数（雄/雌）	
					剖検（3 日目）	70 日目までの観察（剖検せず）
1	溶媒対照*	5/5	IV	0	2/2	3/3
2	アニフロルマブ	5/5	IV	5[a]	2/2	3[a]/3[a]
3	アニフロルマブ	5/5	IV	30	2/2	3/3
4	アニフロルマブ	5/5	IV	100	2/2	3/3

IV=静脈内
*溶媒対照=10 mM ヒスチジン緩衝液（pH 6.0）
[a] 第 2 群（5 mg/kg）の 3 頭（雄 2 頭、雌 1 頭）には 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（合計 3 回投与）した。

本試験において、すべての動物に死亡はみられず、100 mg/kg までアニフロルマブによる有害な所見はみられなかった。本試験の NOAEL は、最高用量の 100 mg/kg であり、このときの曝露量は、平均 $AUC_{0\text{-}inf}$ 値として 40700 µg·day/mL、平均 C_{max} 値として 3020 µg/mL であった。

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（雄 2 頭及び雌 1 頭）では、37 日目に過敏症反応と一致する兆候（皮膚発赤、並びに鼻口部及び眼窩周囲のしわ）が雄 1 頭にみられ、この雄では、50 日目にこれらの所見に加え、嘔吐及び行動変化（閉眼、警戒の欠如）を含むより重篤な反応がみられたが、抗ヒスタミン薬（Benadryl®）の静脈内投与により症状は緩和された。一方、同様に 5 mg/kg を追加静脈内投与した他の 2 頭（雄雌各 1 頭）では、いかなる臨床症状の異常はみられなかった。この過敏症反応の発現機序を明らかにするため、検査及び探索的分析（サイトカイン分析（血清）、アイソタイピング分析及び ADA 反応）を実施したが、ADA 反応との関連以外、決定的な情報を明らかにすることはできなかった。

5 mg/kg のアニフロルマブを追加静脈内投与した動物の 70 日目における免疫原性の結果は、1:3072000 から 1:6144000 の範囲での ADA 力価を示し、特異性試験の結果、これらの 3 頭すべての動物で無関係なヒト IgG1 抗体を認識した。これは、アニフロルマブに対する反応が主であるが、非特異的な抗ヒト IgG 応答の存在も示している。アイソタイピング分析では、過敏症反応の兆候がある雄 1 頭のみで、追加投与前である 22 日目（IgM も）と 29 日目にアニフロルマブに対する IgE 抗体が検出された。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 頭すべての動物に IgE 抗体を認めた。しかしながら、過敏症反応と一致する兆候がみられたこの 1 頭のみの所見は、その後実施した 4 週間（試験番号 [redacted].263.01）及び 39 週間（試験番号 7140-129）の反復投与毒性試験のいずれの試験でもみられず再現性はなかった。

2.6.6.2.2　雄カニクイザルにアニフロルマブを単回静脈内投与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（試験番号 7140-142、GLP 非適用）

アニフロルマブを 5 mg/kg の用量で雄カニクイザル（雄 3 頭/群）に単回 IV あるいは単回 SC 投与（皮下投与溶媒：8%トレハロース及び 0.02%ポリソルベート 80 を含む 10 mM ヒスチジン緩衝液、pH 6.0）する（1 日目）試験を実施した（試験番号 7140-142、GLP 非適用、表 3）。静脈内投与における投与容量は 3.84 mL/kg、投与速度は 7.7 mL/kg/hour で 30 分かけて投与、一方、皮下投与における投与容量は 0.83 mL/kg、投与はボーラス投与とした。本試験では溶媒対照群は設

定しなかった。投与後動物を 28 日間観察し、剖検せずに試験から外した。毒性評価項目は、死亡、一般状態（投与部位における皮膚刺激性及び定性的摂餌量を含む）、身体的検査（心拍数、呼吸数及び体温を含む）及び体重であった。また、血液サンプルをトキシコキネティクス、免疫原性、*ex vivo* 薬力学的評価のため試験を通じて様々な間隔で採取した。トキシコキネティクスの結果については 2.6.4.8.2 項を参照。

表 3　　カニクイザルを用いたアニフロルマブの単回静脈内あるいは皮下投与毒性試験（試験番号 7140-142、GLP 非適用）

群番号	被験物質	投与経路	用量（mg/kg）	投与容量（mL/kg）	雄動物数
1[a]	アニフロルマブ	IV	5	3.84	3
2	アニフロルマブ	SC	5	0.83	3

IV=静脈内、SC=皮下
[a] 第 1 群は皮下投与時のバイオアベイラビリティを決定するための全身性コントロール。

試験期間中に死亡はみられなかった。雄カニクイザルにアニフロルマブを 5 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの曝露量は平均 $AUC_{0\text{-}t}$ 値として 723 µg·day/mL、平均 C_{max} 値として 129 µg/mL、一方、単回皮下投与したときの曝露量は平均 $AUC_{0\text{-}t}$ 値として 1110 µg·day/mL、平均 C_{max} 値として 188 µg/mL であり、全身毒性及び皮膚毒性の兆候はみられず、また、2 つの投与経路間で著しい差はみられなかった。

2.6.6.2.3　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（試験番号 7140-131、GLP 適用）

カニクイザルを用いた単回 IV 投与毒性試験を実施した（試験番号 7140-131、GLP 適用、表 4）。本試験では各群 6 頭（3 頭/性/群）の 5 群を設定し、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、30 分かけて静脈内投与した（試験 1 日目、投与容量は 5 mL/kg、投与速度は 10 mL/kg/hour）。これらの用量は、薬効発現用量における安全性と IFNAR1 受容体占有率を評価するとともに、受容体占有が検出されない用量を決定するための用量として選択した。28 日間の観察期間終了後、29 日目にすべての動物を剖検した。

毒性評価項目は、死亡、一般状態（定性的摂餌量を含む）、身体的検査（心拍数、呼吸数、及び体温を含む）、体重、器官重量、剖検（全動物）及び病理組織学的検査（溶媒対照群及び最高用量　1 mg/kg 群の動物のみ）である。血液サンプルは、トキシコキネティクス、免疫原性（抗アニフロルマブ抗体）、薬力学的検査（INF-α/β 誘導遺伝子発現の中和活性）及び IFNAR1 受容体占有率解析のために、試験を通じて様々な間隔で採取した。トキシコキネティクスの結果については 2.6.4.8.3 項を参照。

表 4　　カニクイザルを用いたアニフロルマブの単回静脈内投与毒性試験（試験番号 7140-131、GLP 適用）

群番号	被験物質	投与経路	用量（mg/kg）	29 日目剖検動物数（雄/雌）
1	溶媒対照*	IV	0	3/3
2	アニフロルマブ	IV	0.003	3/3

群番号	被験物質	投与経路	用量（mg/kg）	29 日目剖検動物数（雄/雌）
3	アニフロルマブ	IV	0.03	3/3
4	アニフロルマブ	IV	0.3	3/3
5	アニフロルマブ	IV	1	3/3

IV=静脈内
*溶媒対照=2.35%リジン及び 0.02%ポリソルベート 80 を含む 10 mM ヒスチジン緩衝液（pH 6.0）

カニクイザルにアニフロルマブを 30 分かけて単回 IV 投与した結果、0.003～1 mg/kg の用量範囲においてアニフロルマブ投与に起因する影響はみられなかった。*In vitro* ゲノム解析による受容体占有率分析及び薬力学的分析から、本実験で投与されたアニフロルマブの用量は薬理学的活性を有する範囲にあることが示唆された。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 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（試験番号 [redacted].263.01、GLP 適用）

カニクイザルにアニフロルマブを 0、0.5、5 あるいは 30 mg/kg の用量で、週 1 回 IV 投与（1、8、15 及び 22 日目の合計 4 回投与）する 4 週間反復静脈内投与毒性試験を実施した（試験番号 [redacted].263.01、GLP 適用、表 5）。投与容量は 5 mL/kg、投与速度は 10 mL/kg/hour とし、30 分かけて静脈内投与した。本試験では 1 群 12 頭（6 頭/性/群）の 4 群を設け、29 日目及び 7 週間の回復期終了時（71 日目）のそれぞれの時期に雄雌各 3 頭（/群）を剖検した。

表 5 カニクイザルを用いたアニフロルマブの 4 週間反復静脈内投与毒性試験（含 7 週間回復性）（試験番号 [redacted].263.01、GLP 適用）

群番号	被験物質	動物数（雄/雌）	投与経路	用量（mg/kg）	剖検動物数（雄/雌）	
					29 日目（投与終了期間時）	71 日目（回復期終了時）
1	溶媒対照*	6/6	IV	0	3/3	3/3
2	アニフロルマブ	6/6	IV	0.5	3/3	3/3
3	アニフロルマブ	6/6	IV	5	3/3	3/3
4	アニフロルマブ	6/6	IV	30	3/3	3/3

IV=静脈内
*溶媒対照= 2.35%リジン及び 0.02%ポリソルベート 80 を含む 10 mM ヒスチジン緩衝液（pH 6.0）

毒性評価項目は、死亡、一般状態（投与部位の皮膚に対する Draize 評価を含む）、定性的摂餌量、体重、血圧、心電図、眼科学的検査、臨床病理学的検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査及び尿検査）、器官重量、剖検及び病理組織学的検査である。血液サンプルは、トキシコキネティクス及び免疫原性解析のために、試験を通じて様々な間隔で採取した。トキシコキネティクスの結果については 2.6.4.8.4 項を参照。

試験期間中すべての動物に死亡はみられなかった。一般状態、投与部位の皮膚に対する Draize 評価、摂餌量、体重、眼科学的検査、心電図（ECG）、血圧、臨床病理学的検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査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。溶媒対照群及び 0.5 mg/kg 群と比較して、5 及び 30 mg/kg 群で、最初の 9 日間（10 日目）に被験物質投与に関連した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、有害な所見とはみなさなかった。さらに、他のアニフロルマブの反復投与毒性試験では、同様な乾燥便の所見はみられなかった。本試験における NOAEL は最高用量の 30 mg/kg/週であり、この時の曝露量は、平均 $AUC_{0\text{-}7\ day}$ 値として 11100 μg·day/mL、平均 C_{max} 値として 2640 μg/mL であった。

2.6.6.3.2 カニクイザルにアニフロルマブを 39 週間反復静脈内投与あるいは皮下投与（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（試験番号 7140-129、GLP 適用）

性成熟したカニクイザルを用いたアニフロルマブの IV あるいは SC 投与による 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 回の静脈内投与（0：溶媒対照、5 あるいは 50 mg/kg）及び皮下投与（0：溶媒対照、15 あるいは 60 mg/kg）により 39 週間、それぞれ合計 40 回投与した。なお、静脈内投与の溶媒対照群では 2.35%リジン及び 0.02%ポリソルベート 80 を含む 10 mM ヒスチジン緩衝液（pH 6.0）を、皮下投与の溶媒対照群では 8%トレハロース及び 0.02%ポリソルベート 80 を含む 10 mM ヒスチジン緩衝液（pH 6.0）を投与した（表 6）。静脈内投与の投与容量は 5 mL/kg、投与速度は 10 mL/kg/hour とし、30 分かけて投与した。一方、皮下投与の投与容量は 1 mL/kg とした。本試験では、性成熟したカニクイザル（投与開始時の年齢：雄；5～7 年齢、雌；3～4 年齢）を 1 群 12 頭（6 頭/性/群）の 5 群に分け、剖検を 277 日目（274 日目の最終投与日の 3 日後：3 頭/性/群）あるいは 360 日目（回復期間 12 週間の観察終了日後：3 頭/性/群）に実施した。

表 6　カニクイザルにアニフロルマブを 39 週間反復静脈内投与あるいは皮下投与（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（試験番号 7140-129、GLP 適用）

群番号	被験物質	動物数（雄/雌）	投与経路	用量（mg/kg）	剖検動物数（雄/雌）	
					277 日目（投与終了時）	360 日目（回復期終了時）
1	溶媒対照*	6/6	IV/SC	0	3/3	3/3
2	アニフロルマブ	6/6	IV	5	3/3	3/3
3	アニフロルマブ	6/6	IV	50	3/3	3/3
4	アニフロルマブ	6/6	SC	15	3/3	3/3
5	アニフロルマブ	6/6	SC	60	3/3	3/3

IV=静脈内、SC=皮下
*溶媒対照：IV=2.35%リジン及び 0.02%ポリソルベート 80 を含む 10 mM ヒスチジン緩衝液（pH 6.0）、SC = 8%トレハロース及び 0.02%ポリソルベート 80 を含む 10 mM ヒスチジン緩衝液（pH 6.0）

毒性評価項目は、死亡、一般状態（投与部位の皮膚に対する評価及び定性的摂餌量を含む）、身体的検査、体重、眼科学的検査、ECG、血圧、精子形成ステージ検査、精液検査（射精又は剖

検）、月経周期、補体第 3 成分（C3）及び Bb 成分、補体 B 因子、イムノフェノタイピング、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査（精子形成ステージ検査を含む）である。血液サンプルは、トキシコキネティクス、免疫原性、サイトカイン分析及び IFN-α/β 誘導遺伝子発現の中和（試験番号 7140-129 、薬力学アッセイ参照）のため、試験を通じて様々な間隔で採取した。トキシコキネティクスの結果については 2.6.4.8.5 項を参照。IFN-α/β 誘導遺伝子発現の中和 PD アッセイ分析は、これまでのアニフロマブの毒性試験とは異なり本試験では分析できなかった。IFN-α/β 誘導遺伝子発現の中和 PD アッセイは、これまでの PD アッセイとフローサイトメトリー受容体占有率アッセイ（アニフロルマブを 1 mg/kg の用量で 1 週間静脈内投与したときに、受容体占有率とゲノム中和がみられる；試験番号 7140-131 参照）の測定に基づき、本試験で用いた用量及びレジメンは、安全性評価のために薬力学的に活性なレベルであった。

試験期間中に死亡例はなく、一般状態、身体的検査、皮膚刺激性、体重、定性的摂餌量、眼科学的検査、ECG、月経周期、イムノフェノタイピング、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、精液検査、器官重量及び剖検所見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。アニフロルマブ静脈内あるいは皮下投与に起因する投与部位の局所臨床症状及び病理組織学的所見に影響は認められなかった。

投与期間終了時に、生理学的重要性は限定的ではあるがアニフロルマブ投与に関連した所見として、60 mg/kg 皮下投与群で血圧低下傾向、並びに 50 mg/kg を静脈内投与した群の雄で C3 の濃度に可逆的増加がみられた。

脾臓のリンパ濾胞サイズのアニフロルマブ投与に起因した軽微な増加が、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、5 mg/kg 及び 50 mg/kg を静脈内投与した雌の各 1 頭に認められたが、脾臓の平均脳重量比の変化との関連性はみられなかった。

投与期間終了時の剖検時に、アニフロルマブを 60 mg/kg 皮下投与した群の 1 頭の精巣に、精子形成ステージ検査で他のすべての動物とは著しく異なる精子パラメータの異常を伴う顕著な片側のびまん性精細管上皮変性が認められた。50 mg/kg 静脈内投与群の回復群の 1 頭において、正常な運動性及び精子数と相関し、回復期間の途中で採取した射精精液中における精子欠損（精細管変性と関連している可能性が高い）からの正常な精子への回復性を示す、パキテン期にある精母細胞及び精子細胞の軽度の細胞数減少が認められた。これらの精巣の所見をアニフロルマブ投与に関連するとみなさなかった理由の詳細については、2.6.6.6.1 に記載した。

アニフロルマブ投与に起因したリンパ濾胞のサイズ及び/又は数の軽微な増加が、投与期間終了時及び/あるいは回復期間終了時、雄雌の一部のリンパ節に認められた。投与期間終了時、雄の胸腺皮質及び髄質中のリンパ球数にも軽微な減少が認められ、アニフロルマブ投与の影響と考えられた。回復期間終了時の雄においても同様に胸腺皮質におけるリンパ球数減少が認められた。

アニフロルマブを投与した雄 24 頭中 5 頭（21%）に、いくつかの器官内の中小動脈に局所性炎症（動脈炎）が認められたが、雄の溶媒対照群ではみられず、雌ではアニフロルマブ投与に関係なく認められなかった（0%：0/24 頭）。この動物種における血管炎の自然発生率は 6%であることが報告されており（Chamanza et al, 2006）、本試験の実施施設における投与期間が 26 週間以上の試験では、背景データにおいて“血管の炎症”と診断された頻度は 2/167 頭（1.2%）であった。本試験において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、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

管周囲への浸潤が認められ、様々な器官組織で認められた。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。さらに、回復期間終了時には、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。認められた動脈炎の重症度は 5 段階評価（グレード 1～5、グレード 5 は最も重度を表す）でグレード 1～3 であり、グレード 2 の頻度が高かった。多くの動物で明らかではあるが、回復期間終了時の雄では投与期間終了時の雄と比較して局所性動脈炎がより多くの動物で認められたものの、顕著ではなく、概してその炎症範囲は狭かった。

アニフロルマブ投与動物 48 頭中 11 頭（22.9%）に ADA が検出され、用量が低いほどその検出個体数が多かったが、免疫応答の頻度と強度に明らかな性差はみられなかった。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 ADA/薬物複合体形成及びその沈着に関連している（Bussiere and Johnson, 2010 、Todd, 2010）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た。脈絡叢の結合組織中あるいは坐骨神経の神経周囲及び神経内結合組織中の小動脈あるいは細動脈の血管壁における顆粒沈着は、よく見られる部位での免疫複合体沈着及びその後の血管あるいは血管周囲における病理所見として報告されている（Cochrane and Hawkins, 1968、Germuth, 1953、Kniker and Cochrane, 1968、Rojko et al, 2014、Leach et al, 2014）。ICH S6 ガイドライン（ICH S6（R1））で概説されているように、これらのタイプの免疫原性評価は非臨床結果の解釈には有用であるが、ヒトでの免疫原性を予測するものではない。

アニフロルマブの Fc 領域は、FcγRIA、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA 及び C1q の特異的結合を排除することによりエフェクター機能を除去するように改変されている（詳細については 2.6.2 項参照）。今回観察された動脈炎の発症機序の可能性の一つとして、アニフロルマブの直接的なアンタゴニストもしくはアゴニスト作用が動脈に影響を与え、観察された所見が導かれたと考えられる。しかしながら、固相化したアニフロルマブを用いた架橋（cross-linking）試験結果からは、アニフロルマブの IFNAR1 に対するアゴニスト作用はみられなかった（2.6.2 項参照）。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、Müller 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、アニフロルマブの直接的作用による可能性が低いことが示唆される。同様に、病理組織学的検査、一般状態及び臨床病理学的結果からも、この動脈炎が感染によることを示唆する証拠は認められなかった。最後に、投与製剤の分析結果は正常であり、本試験で用いた製剤におけるアニフロルマブの凝集体量も正常範囲内（1.2%以下の凝集体量、データ示さず）であったことから、アニフロルマブの凝集体がこの動脈炎の原因である可能性も低いと考えられた。

結論として、本試験における雌の NOAEL は、静脈内投与では 50 mg/kg/週（平均 C_{max} = 4510 ± 1200 µg/mL、平均 $AUC_{0\text{-}7day}$ = 21600 ± 5780 µg·day/mL）、皮下投与では 60 mg/kg/週（平均 C_{max} = 3230 ± 1120 µg/mL、平均 $AUC_{0\text{-}7day}$ = 19500 ± 5620 µg·day/mL）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な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。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は否定できない。観察された動脈炎を NOAEL の決定要因として考慮する場合、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、雌と同様に、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、MRHD に関する安全域の算出には、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。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」についてのガイドライン（ICH S6（R1））によれば、“従来の医薬品について通常実施されてきた遺伝毒性試験の範囲と種類は、バイオ医薬品には適切なものではなく必要とされない”ため、アニフロルマブの遺伝毒性及び変異原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高分子タンパク質と考えられる。アニフロルマブは、自然界に存在するアミノ酸のみで構成されるモノクローナル抗体であり、無機又は有機合成したリンカー及び他の非タンパク質成分は含有していない。従って、アニフロルマブが DNA 及び他の染色体成分と直接相互作用する可能性は極めて低い。

2.6.6.5 がん原性試験

アニフロルマブは SLE の長期治療を目的としていることから、アニフロルマブの長期投与による毒性評価は、前述したカニクイザルを用いた反復静脈内及び反復皮下投与毒性試験（GLP 適用）にて評価した。アニフロルマブを静脈内投与では 50 mg/kg まで、皮下投与では 60 mg/kg までの用量で週 1 回、最大 39 週間反復投与したが、器官重量の有害な変化及び前がん病変を示唆する病理組織学的所見は認められなかった。

アニフロルマブはマウスの IFNAR1 には結合せず、マウス IFN-α の生物活性を阻害しないため、従来のげっ歯類を用いたがん原性評価（2 年間のがん原性試験）では、アニフロルマブの発がん性リスクを直接評価することはできない。従って、これらの潜在的な制限を認めた上で、マウスと反応する類似抗体/サロゲート抗体を投与したマウスモデル、あるいは標的を欠損したマウスモデルに関する論文（Bugelski et al, 2010a、Bugelski et al, 2010b、Bussiere et al, 2009、Vahle et al, 2010 及び ICH S6（R1））等に基づき、*in vivo* 非臨床がん原性試験戦略が臨床的に意味のあるリスク評価情報を提供することに焦点を当てた発がん性リスク評価を実施した。考慮した *in vivo* 評価系は、IFNAR1 及び IFNAR2 欠損マウス（I 型 IFN 受容体は、IFNAR1 及び IFNAR2 の 2 つのサブユニットから構成）と、抗 IFN-α/β 抗体あるいは抗 IFNAR1/IFNAR2 抗体（MAR1-5A3 抗マウス IFNAR1 抗体は現在入手可能な試薬抗体）を投与したマウスの 2 つの *in vivo* 系である。

科学的根拠の重要度（weight of evidence）からのアプローチの一部として、利用可能な I 型 IFN のがん原性に関する文献を精査した。公表文献では、I 型 IFN の抗腫瘍特性が報告されている。他の文献では、I 型 IFN がシグナル伝達経路を誘導し、最終的には腫瘍細胞の細胞周期休止及びアポトーシスを引き起こす可能性があることが報告されている（Takaoka et al, 2003）。その他の影響としては、I 型 IFN の抗増殖活性に寄与するがん遺伝子発現の抑制及びがん抑制遺伝子の誘導、並びに免疫認識を増強し得る MHC クラス I 発現の増加が報告されている（Gutterman, 1994）。この I 型 IFN の刺激作用は、NK 細胞（Gidlund et al, 1978、Swann et al, 2007）、T 細胞（Curtsinger et al, 2007）、樹状細胞（Le Bon et al, 2003）及び B 細胞（Le Bon and Tough, 2008）を含む抗腫瘍活性に潜在的に関連する白血球サブセットで観察されている。I 型 IFN は、腫瘍微小環境での催炎症性変化の促進（腫瘍部位への化学的走化性強化による T 細胞のホーミング及び樹状細胞による抗原提示能の増加（Ferrantini et al, 2007、Melero et al, 2006））及び局所的な免疫抑制活性低下による拒絶反応の促進に作用している可能性がある。マウスの SC 投与部位以外には効果がみられていない（Ferrantini et al, 2007）ことから、IFN-α の局所作用は非常に重要であると思われる。

I 型 IFN 遮断による発がん性リスクに対する影響も報告されている。抗 IFN-α/β 抗体を投与した無胸腺マウスを用いた初期の研究では、いくつかの異種形質転換細胞、ヒト前立腺腫瘍細胞及び肝がん細胞の増殖（移植性）の増強が実証され、内因性 IFN-α/β は、いくつかの同種腫瘍細胞の増殖耐性に重要であることが報告されている（Gresser et al, 1983、Gresser et al, 1988）。I 型 IFN 受容体のマウス IFNAR1 サブユニットに特異的な抗体である MAR1-5A3 を野生型マウスに投与した場合、未処理のナイーブな同系の野生型宿主、又は対照抗体で処理された野生型マウスでは効率的に排除されたいくつかの免疫原性メチルコラントレン肉腫の拒絶反応が抑制された（Sheehan et al, 2006）。さらに、抗腫瘍免疫反応が成功したときの IFN-α/β の時間的要因を検討したその後の試験では、I 型 IFN は、免疫原性腫瘍に対する免疫応答の開始時に作用することに加え、腫瘍拒絶のエフェクター期の後半にも作用することが示唆された。

さらに、IFNAR1 欠損マウスでは、化学物質による誘導後、皮膚に乳頭腫形成がみられ（Takaoka and Taniguchi, 2003）、メチルコラントレン誘発性肉腫でチャレンジした IFNAR1 欠損 129/Sv マウスは、野生型マウスに比べ、腫瘍形成に対して有意に高い感受性を示し、より早く腫瘍を形成した。同様な報告が IFNAR1 欠損 C57BL/6 マウス及び IFNAR2 欠損 C57BL/6 マウスを用いて確証され明らかとなっている。IFNAR1 欠損マウスに由来するいくつかのメチルコラントレン誘発性肉腫を野生型マウスに移植したところ、リンパ球依存性の拒絶反応がみられ、正常な免疫応答をするマウス由来の腫瘍よりも免疫原性が高いことが示唆された。また、IFN-α/β は腫瘍細胞あるいは宿主のどちらに直接影響し介在したのかを明らかにするための研究が行われている。IFN-α/β 細胞に応答するあるいは応答しない腫瘍細胞を用いた研究では、IFN-α/β が宿主の造血細胞に影響を及ぼすことにより抗腫瘍応答を触媒する可能性があることが示唆された（Dunn et al, 2005、Dunn et al, 2006、Smyth, 2005）。

要約すると、最大 39 週間の投与期間の IV 及び SC の反復投与毒性試験においてアニフロルマブによるカニクイザルでの増殖性又は前腫瘍性の所見は認められなかった。アニフロルマブはマウス IFNAR1 に結合せず、マウス INF-α の生物活性を阻害しないため、2 年間のげっ歯類を用いたがん原性試験ではアニフロルマブの発がん性リスクを直接評価することはできない。同様に、カニクイザルは一般的に *in vivo* 発がん性評価の適切な動物種とはみなされていない。このように直接的なアニフロルマブの *in vivo* 発がん性評価は実行不可能であるために、代替 *in vivo* 評価系（代替試薬を用いた評価も含む）を検討し、利用可能な文献に基づき科学的根拠の重要度からのリスク評価を実施した。げっ歯類の IFNAR1 を遮断したときの発がん性を評価するため、IFNAR1 及び IFNAR2 欠損マウス、IFN-α/β 及び抗 IFN-α/β 抗体、並びに MAR1-5A3 抗体（アニフロルマブの発がん性リスク評価に利用可能な試薬抗体）を含む IFN-α/β 及び IFN-α/β 抗体を投与したマウスを用いた試験で得られた既存文献を精査した。一般的にこれらのモデルは、げっ歯類において IFNAR 遮断による発がん性の増加が示されているものであった。抗体等を用いた上記既存 *in vivo* 系試験の再実施は、これまでの研究結果の結論に大きな影響を与えることはないと考えられたことから実施しなかった。動物モデルを用いた追加の *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））と考えられる。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

文献では、I 型 IFN 受容体が欠損したマウスでは、発育障害はみられないことが報告されている。Müller らは、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、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（Müller et al, 1994）。また、Hwang らは、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ことを報告している（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。

2.6.6.6.1 カニクイザルを用いた 9 カ月間（39 週間）反復静脈内あるいは皮下投与毒性試験における雄の受胎能評価（試験番号 7140-129、GLP 適用）

性成熟カニクイザルに週 1 回、アニフロルマブを IV 投与（0、5、あるいは 50 mg/kg）、あるいは SC 投与（0、15、あるいは 60 mg/kg）した 9 カ月（39 週）間反復投与試験（試験番号 7140-129、GLP 適用）にて、雄の受胎能を評価した。雄受胎能評価項目は、精液検査（精子運動性、精子数、精子形態及び精子形成ステージ）、器官重量（下垂体、前立腺、精嚢、精巣及び精巣上体）、並びに剖検、病理組織学的検査（前立腺、精嚢、精巣上体及び精巣）である。統計学的に有意で生物学的に意味のある精子検査項目の異常は、射精による精液採取時及び剖検時のいずれの時点においても認められなかった。アニフロルマブを投与した 2 頭の精巣に、病理組織学的所見が認められた。投与期間終了剖検時（277 日目、最終投与 274 日目から 3 日後）、60 mg/kg を SC 投与した雄 1 頭において、左精巣の精細管に顕著な変性が認められた。しかし、右精巣では軽度な萎縮/変性が認められたのみで、同様な血液供給を受けている対になった器官の間で所見の重症度は一貫していなかった。この動物の精細管は様々な程度の剥離及び精細管上皮細胞の損失を伴っており、左精巣の精細管上皮の変性が進行していたが、精子成熟の特定の細胞型及びステージに影響はみられなかった。精液は投与開始前に 2 回、6 週目、20 週目及び投与期間終了時剖検の約 1 週前、並びに回復期間終了の約 1 カ月前に電気的刺激法により射精精液を採取した。精子サンプルもまた投与期間終了時の剖検時及び回復期間終了時の剖検時において、運動性、精子数及び形態学的検査のために採取した。投与期間終了時の剖検時に、この採取時点での溶媒対照群と比較して、この動物（60 mg/kg を SC 投与した雄 1 頭）ではまた、精子数の減少及び運動精子なし（0%）がみられたが、この動物での計画剖検前の精液サンプルの精子数（137.5×100 万精子細胞/mL）及び運動性（43.3%）、並びに 60 mg/kg の SC 投与群の精子数（129.4×100 万精子細胞/mL）及び運動性（23.1%）は、溶媒対照群の平均精子数（101.1×100 万精子細胞/mL）及び平均運動性（14.2%）に比べ、どちらも高いものであった。この動物では、投与前の 2 時点のいずれにおいても運動性を評価するのに十分な精子数がサンプル中に存在しなかったことは考慮すべきである。この変動は、投与期間中にも認められ、その運動性は 6 週目で 13.2%、20 週目で 84.6%、最終射精時で 43.3%であった。同様に、この動物の投与前の 2 時点における射精精液中の精子濃度（×100 万精子細胞/mL）は、1.8 及び 14.6 と大きな変動を認めた。投与期間中、この精子濃度（×100 万精子細胞/mL）の変動は続き、6 週目では 1.6、20 週目では 379.9 及び最終射精時で 137.5 であった。投与前の射出精液精子数の変動、左右の精巣間における一貫性のない病理組織学的所見、及び平均 C_{max} 値がより高く、$AUC_{0\text{-}7d}$ 値が軽微に高かった 50 mg/kg を静脈内投与した他の雄では、この採取時点で同様な所見が認められなかったことを考えると、この所見は投与に起因するものではないと考えられた（この動物では、抗アニフロルマブ抗体は検出されず、トキシコキネティクスプロファイルは同じ群の他の動物と同様であった）。

回復期間終了時の剖検時（360 日目）、50 mg/kg を静脈内投与した 1 頭では、精子形成ステージの VII から XII にあるパキテン期精母細胞を含む生殖細胞の軽度枯渇が認められ、ステージ I から VI の精子細胞数が減少する結果となった。323 日目（回復開始 1 カ月後）の射出精液では、運動性を有する精子は存在せず、大きい破片として認められた（360 日目の回復期間終了後の剖検では破片は認められず）が、この動物は、試験を通じて、射出精液の結果にばらつきがみられ、投与前の 2 回の射出精液採取の内の 1 回（つまり、アニフロルマブ投与前）では精子細胞が

認められず、20 週目、投与期間終了時及び回復期間終了時剖検前の射出精液採取時点の射出精子には正常な精子運動性が認められた。

この 50 mg/kg を静脈内投与した雄でみられた回復期間終了時の精巣における病理所見は、投与と薬理学的作用の発現に関連するタイミングから、アニフロルマブの直接的影響な影響によるものではないと思われる（この動物に抗アニフロルマブ抗体は検出されず、トキシコキネティクスプロファイルは同じ群の他の動物と同様であった）。この所見がアニフロルマブの直接的な影響によるものではないことは、同じ動物の右精巣が病理組織学的に正常であった（片側性の影響）ことからも、更にサポートされる。マウスにおいて、I 型 IFN 及び IFN 誘導タンパク質は、ウイルス刺激に反応し、精巣（生殖細胞ではなく体細胞）に高度に発現することが報告されている（Dejucq et al, 1997、Dejucq et al, 1995、Dejucq et al, 1998、Melaine et al, 2003、Starace et al, 2008）。I 型 IFNs を過剰発現させているトランスジェニックマウスを用いた予備的な研究は、試験のデザインによって解釈が複雑化している（Hekman et al, 1988、Iwakura et al, 1988、Satie et al, 2011 による総説）。しかしながら、精巣に IFN-β を過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いたより最近の研究（Satie et al, 2011）では、長時間にわたる I 型 IFN 受容体の活性化は、精子形成を著しく阻害し、不妊症に繋がることが報告された。アニフロルマブの 9 カ月間反復投与毒性試験では、精巣重量にアニフロルマブ投与の影響は認められていないが、この研究では、対照と比較して約 50%の精巣重量低下及び精子形成障害による精細管萎縮も、長時間にわたる I 型 IFN 受容体の活性化に関連していることが示された。さらに、IFN レベルが増加し始めて約 3 週間後（生後 20 日目）に低受胎能及び精巣上体の精子数減少がみられ、その後 40 日以内（生後 60 日目まで）に不妊症に至った。精巣に IFN-β を過剰発現させたマウスでも、IFNAR1 欠損の状態にすると、精巣の完全性と受胎能は維持される。I 型 IFN 受容体欠損マウスにおける精子形成及び不妊症への影響は明白ではない。Müller らによれば IFN-α/βR 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、6 カ月齢まで明らかな表現型の異常はみられないことが報告されている（Müller et al, 1994）。また、Hwang らの報告では、雄雌 IFNAR1 欠損マウスは受胎能を持ち、正常サイズの同腹児が誕生している（データ示さず）。このように、I 型 IFNs は生殖及び発育に重要である可能性があるという初期の報告にもかかわらず、IFNAR1 欠損マウスに発達異常の証拠はなく、6 カ月齢までの成体マウスの器官に肉眼的及び病理組織学的異常は認められない（Hwang et al, 1995）。

ラットを用いた研究では、IFN-α の腹腔内投与は精子形成障害を誘発するとの報告（Ulusoy et al, 2004）がある一方で、ヌードラットに 3 カ月間 IFN-α を連日皮下投与した場合、精巣における精子形成が改善し、精巣上体の精子濃度が増加したとの報告（Hibi et al, 1997）もあり、相反する結果が報告されている。ヒトにおいては、不妊男性の精液中に高いレベルの IFN-α が検出され（Fujisawa et al, 1998）、不妊男性への IFN-α の投与は精子形成を回復する可能性がある（Yamamoto and Miyake, 1994）。IFN-α2β の投与は、ムンプス性精巣炎のため不妊となった男性の不妊症治療として使用されているが、この治療法による有効性は完全には確立されていない（Erpenbach, 1991、Pal, 2013、Yapanoglu et al, 2010、Yeniyol et al, 2000）。

要約すると、性成熟したカニクイザルにアニフロルマブを 9 カ月間（39 週間）反復投与した毒性試験の結果、アニフロルマブを投与した 2 頭の雄サルに投与に起因した精巣所見が認められたが、この雄 2 頭のデータからは、これらの精巣の所見がアニフロルマブ投与に起因するものではないことが示唆される。これは I 型 IFN の過剰発現（中和ではない）が精子形成を阻害する可能性があることを示唆する文献の内容と一致するものである。

2.6.6.6.2 カニクイザルを用いた 9 カ月（39 週間）間反復静脈内あるいは皮下投与毒性試験における雌の受胎能評価（試験番号 7140-129、GLP 適用）

性成熟カニクイザルに週 1 回、アニフロルマブを IV 投与では 0、5、あるいは 50 mg/kg、SC 投与では 0、15、あるいは 60 mg/kg の用量で 9 カ月（39 週）間反復投与した試験（試験番号 7140-129、GLP 適用）において、雌受胎能を評価した。雌受胎能評価項目は、月経周期、器官重量（下垂体、卵巣及び子宮）、並びに剖検及び病理組織学的検査（下垂体、卵巣、子宮、子宮頚部、膣及び乳腺）である。アニフロルマブ投与に起因する月経への明らかな影響はみられなかった。器官重量、剖検及び病理組織学的検査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。

2.6.6.6.3 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（試験番号 [redacted].263.11、GLP 適用）

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を実施した（試験番号 [redacted].263.11、GLP 適用）。受胎日を GD0 日目（Gestation Day、妊娠後日数、GD0=妊娠日）とし、妊娠後の日数を基に妊娠動物及び胎児に対する検査を実施した。本試験では、妊娠カニクイザル（16～17 頭/群）に隔週（2 週間に 1 回投与）で 0（溶媒対照；2.35%リジン及び 0.02%ポリソルベート 80 を含む 10 mM ヒスチジン緩衝液、pH6.0）、30、あるいは 60 mg/kg の用量のアニフロルマブを GD20 日目から LD（Lactation Day、授乳後日数）28 日目（授乳期間中は 3 回投与）まで静脈内投与し、分娩後から分娩後 180 ± 2 日まで母動物と出生児をモニターした（表 7）。投与した用量を完全に送達するため、投与速度は 10 mL/kg/hour、投与時間は 30 ± 3 分とした。1 群当たりの動物数は、そのデータの意味のある解釈が可能な十分な動物数とした（ICH S6（R1）、Note 5）（Jarvis et al, 2010）。

表 7　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（試験番号 [redacted].263.11、GLP 適用）

群番号	被験物質	投与経路	用量（mg/kg）	妊娠動物数	出生児数（含死産及び分娩後死亡）
1	溶媒対照*	IV	0	17(16)[a]	15
2	アニフロルマブ	IV	30	17	12
3	アニフロルマブ	IV	60	16	13

IV = 静脈内

* 溶媒対照=2.35%リジン及び 0.02%ポリソルベート 80 を含む 10 mM のヒスチジン緩衝液（pH 6.0）

[a] 雌 1 頭が GD32 日目に流産と診断され、この動物は試験から除外した。しかしながら、その後この動物は未だ妊娠していることが確認された。従って、GD32 日目まではこの雌のデータは報告書に記載されているが、胎児損失率の計算からは除外した。

母動物の毒性評価は一般状態観察、定性的摂餌量、体重、胎児の生存率、成長及び心拍数（超音波による測定）、並びに妊娠期間により実施した。母動物の血液サンプルは、トキシコキネティクス、ADA、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査及び末梢血リンパ球のイムノフェノタイピングのために採取した。妊娠動物はすべて自然分娩で出産した。母乳サンプルもトキシコキネティクス分析のために採取した（トキシコキネティクスの結果については、2.6.4.8.6 項参照）。

分娩後約 6 カ月間、母動物及び出生児の一般状態、体重及びその他のパラメータの変化を評価した。出生児は分娩後の全期間にわたって母動物と一緒に飼育され、母動物は出生児の評価終了後、試験から外した。

出生児の検査項目は、出生時検査（生存率、性比及び外形）、一般状態、体重、外形形態検査（頭幅、頭囲、眼間距離、頭殿長、尾長、胸囲、前後肢長及び肛門性器間距離）、行動検査、心拍数、機能発達（瞳孔反射、耳介反射、疼痛反応及び握力）、眼科学的検査及び X 線検査による骨格発育検査である。出生児からの血液サンプルは、臨床病理学的検査（血液学的検査、血液凝固検査及び血液生化学的検査）、トキシコキネティクス、ADA 解析のために様々な時点で採取した。また、出生後の免疫学的評価は、KLH に対する T 細胞依存型抗体（IgM 及び IgG）応答（TDAR）及び末梢血リンパ球のイムノフェノタイピング（フローサイトメトリー）を含めて実施した。出生児は分娩後 211 ± 2 日に計画屠殺され、器官重量の測定後、肉眼的検査及び病理組織学的検査（リンパ系器官（脾臓、胸腺及びリンパ節）を含む）を実施した。

アニフロルマブ投与に起因した母動物、胎児、又は出生児への影響はみられなかった。60 mg/kg 投与群の 2 頭の母動物では、難産（骨盤位分娩）のため緊急帝王切開し、同日に安楽死させたが、これらの母動物とその胎児には肉眼的変化は観察されなかった。難産は偶発的事象であり、アニフロルマブ投与との関連性はないと考えられた。

アニフロルマブ投与による流産はみられなかった。胎児の全体的な損失（子宮内胎児死亡及び GD135 日目より前/GD135 日目の妊娠中絶）は、溶媒対照群では 6.3%（1/66 頭）、アニフロルマブを 30 あるいは 60 mg/kg 投与した群では、それぞれ、29.4%（5/17 頭）及び 18.8%（3/16 頭）であった。これらの 9 例の胎児損失のうち、8 例は GD50 日目よりも前に認められた。この期間は、自然発生的な胚・胎児損失発生率が最も高く（Fujimoto et al, 1983）、胎児へのアニフロルマブ曝露が最も低いと予想される期間である。30 mg/kg 群の胎児損失は、溶媒対照群及び 60 mg/kg 群のそれと比較して高かったが、その発生率は試験実施施設における背景データの平均又は範囲内（平均発生率：14.2 ± 10.2 %（平均 ± SD）、全体的な背景発生率の範囲：0.0～33.3%）であった。

アニフロルマブ投与による妊娠期間への影響及び母動物への投与に関連すると考えられる妊娠中/分娩後の所見は認められなかった。アニフロルマブ投与群の胎児/出生児の損失は、試験実施施設の背景データの範囲と同程度であり、カニクイザルを用いたこのタイプの出生試験結果として予想されるものであった。

出生児では、一般状態、体重、生存率、並びに骨格所見、行動評価、抗 KLH 抗体アッセイ、血液学的検査、血液生化学的検査及びフローサイトメトリーなどの機能的及び形態学的発達の検査項目に、アニフロルマブ投与に起因する変化はみられなかった。実施した免疫学的評価（KLH 免疫 IgM 及び IgG 力価、末梢血のイムノフェノタイピング、血液学的分析及びリンパ系器官（脾臓、胸腺、リンパ節）の病理組織学的検査）結果は、出生児カニクイザルの正常範囲内であった。溶媒対照群の出生児 1 頭は DB（day after birth：出生後日数）16 日目に安楽死させ、60 mg/kg 群の出生児 2 頭では DB1 日目に死亡がみられたが、これらの出生児では、投与に関連した肉眼的変化は観察されなかった。これらの出生児の死亡はいずれも偶発的なものであり、アニフロルマブ投与との関連性はないと考えられた。結論として、本試験における母動物及び出生児に対する NOAEL は最高用量である 60 mg/kg/2 週と考えられた。

2.6.6.6.4 幼若動物を用いた毒性試験

アニフロルマブの幼若動物を用いた毒性試験は実施していない。

2.6.6.7 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（試験番号7140-142）、並びに反復投与毒性試験（試験番号 [redacted].263.01 及び 7140-129）におけるアニフロルマブ投与部位の皮膚に対する Draize 評価、肉眼的検査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。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 アニフロルマブのヒト組織交差反応性試験（試験番号 IM1595、GLP 適用）

アニフロルマブの組織交差反応性試験を、ヒト 3 例から得られた正常組織由来の凍結組織切片を用いて検討した（試験番号 IM1595、GLP 適用）。本試験では Alexa Fluor-148 で標識したアニフロルマブによる間接免疫ペルオキシダーゼ染色法を用いた。アニフロルマブ 2 濃度（2 及び 10 μg/mL）について実施し、陽性対照標本（ヒト末梢血単球）ではいずれの濃度においても中～強度の染色性が認められた。アニフロルマブは陰性対照標本（ヒト末梢血塗抹標本における好中球）とは特異的反応が認められなかった。陰性対照抗体である r3-47-Alexa488 では、陽性対照標本、陰性対照標本のいずれにおいても特異的反応は認められなかった。アニフロルマブ-Alexa488 は陽性対照標本に対して特異的反応性を示し、陰性対照標本に対しては陰性対照抗体と同様に特異的反応性を示さなかったことから、このアッセイが高感度、特異的、かつ再現性を有することが示唆される。

ヒト組織を用いた組織交差反応性試験では、アニフロルマブ特異的染色が上皮、内皮、中皮、単核球及び紡錘/樹状細胞で認められた。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アニフロルマブの染色性が認められた。ヒト組織パネルにおけるアニフロルマブ特異的染色分布は、組織における IFNAR の広範にわたる発現に関する論文報告（de Weerd et al, 2007）と一致していた。その染色性の詳細は以下の通りである。

ヒト単核細胞：アニフロルマブにより染色される主な細胞は、副腎マクロファージ、消化管の腸管関連リンパ組織（GALT）、肝臓のクッパー細胞、肺の気管支/細気管支関連リンパ組織（BALT）、肺胞マクロファージ、リンパ節の細網内皮系、リンパ球及びリンパ節マクロファージ、胎盤のホーフバウアー細胞、脾臓のリンパ球、胸腺リンパ球、扁桃のリンパ球/樹状細胞のような主として定住リンパ球及び組織マクロファージからなる単核細胞であった。心臓、腎臓、肝臓、卵管、脾臓、膵臓、下垂体、前立腺、唾液腺、横紋（骨格）筋、甲状腺、膀胱及び子宮（頸部）などの組織の間質細胞においても、少数のリンパ球やマクロファージに染色が認められた。単核細胞におけるアニフロルマブの染色強度にはばらつきがあり、その染色強度は 2 つの抗体濃度で同等である場合もあれば、低い抗体濃度で染色強度が低下する場合もあった。さらに、細胞質や細胞膜の染色の多様性は、検討した組織パネル全体の単核細胞に認められたが、細胞質は細胞膜に比べより高頻度に染色された。

ヒト上皮：副腎皮質、乳腺、眼（角膜）、消化管粘膜（結腸、食道、小腸及び胃）、腎尿細管、肝細胞及び胆管、肺細胞及び気管支/細気管支、卵巣の生殖上皮細胞、卵管粘膜、膵臓の腺房及び腺管、胎盤の栄養膜、前立腺、唾液腺の腺房及び腺管、皮膚表皮及び付属器、脊髄上衣細胞、胸腺のハッサル小体、甲状腺の濾胞細胞及び濾胞周縁細胞、扁桃粘膜及び陰窩粘膜、尿管粘膜、膀胱粘膜、子宮内膜、子宮頸部表面粘膜、並びに子宮腺にアニフロルマブの上皮染色性が認められた。さらに、本試験での上皮細胞の染色強度は多様であり、2 つの抗体濃度で染色強度が

同等である場合もあれば、低い抗体濃度で染色強度が低下する場合も存在した。細胞質及び細胞膜の染色強度の多様性は、検討した組織パネル全体で認められたが、細胞質染色は細胞膜染色に比べその染色頻度は高かった。

ヒト内皮：内皮の染色は、脳（大脳及び小脳）、乳腺、眼、消化管（食道及び胃）、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、卵管、上皮小体、胎盤、唾液腺、脊髄、横紋（骨格）筋、扁桃、尿管、膀胱及び子宮（子宮体部の内膜及び子宮頸部）を含む多くの組織で認められた。本試験での内皮の染色性には染色強度と染色親和性の双方において多様性が認められた。すなわち、2 つの抗体濃度で染色強度が同等の場合もあれば、低い抗体濃度では染色強度が低下する場合も存在した。さらに、細胞質や細胞膜の染色性の多様性は、検討した組織パネル全体で認められたが、細胞質染色は細胞膜染色に比べより高頻度で認められた。

ヒト中皮：脾臓の中皮において、アニフロルマブの染色が認められた。染色性はアニフロルマブの 2 濃度の両方で認められ、染色強度は弱～中程度であり、染色頻度は低かった。

ヒト紡錘/樹状細胞：結合組織間質及びいくつかの組織の被膜（中枢神経系髄膜及び末梢神経系の神経周膜を含む）中の線維芽細胞及び線維細胞の紡錘/樹状細胞にアニフロルマブ特異的染色が認められた。また、この染色は、副腎の被膜及び間質、脳（大脳）髄膜、消化管（結腸、食道、小腸及び胃）固有層、心臓間質、末梢神経の神経周膜、扁桃間質及び膀胱間質で認められた。本試験での紡錘/樹状細胞の染色は、染色強度と染色親和性において多様性がみられた（2 つの抗体濃度で染色強度が同等の場合もあれば、低い抗体濃度で染色強度が低下、もしくは染色が認められない場合もある）。検討したヒト組織パネルでの紡錘/樹状細胞における染色はすべて細胞質であった。

ヒトタンパク質様物質（血清漏出性）：組織切片によっては、アニフロルマブに染色されるタンパク質様物質が血管内、並びにこれに隣接する実質及び間質組織に認められた。この染色では、2 つの抗体濃度で染色が同等な場合（高親和性）、低い抗体濃度では染色が低下する場合（中等度親和性）、あるいは、低い抗体濃度では認められない場合もあるなど、染色性の強度、頻度及び親和性は多様であった。

ヒトのその他の部位：アニフロルマブの染色は、消化管（結腸、食道、小腸及び胃）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、末梢神経の神経節細胞、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認められた。これらの部位における染色は、染色性の強度及び染色親和性が多様であった。また、これらの部位における染色はすべて細胞質に限定されていた。

2.6.6.8.2 アニフロルマブのカニクイザル組織交差反応性試験（試験番号 IM1596、GLP 適用）

アニフロルマブの組織交差反応性試験をカニクイザル 3 頭から得られた正常組織由来の凍結組織切片を用いて検討した（試験番号 IM1596、GLP 適用）。本試験では Alexa Fluor-148 で標識したアニフロルマブによる間接免疫ペルオキシダーゼ染色法を用いた。アニフロルマブ 2 濃度（2 及び 10 μg/mL）について実施し、陽性対照標本（ヒト末梢血単球）ではいずれの濃度においても中～強度の染色性が認められた。アニフロルマブは陰性対照標本（ヒト末梢血塗抹標本における好中球）とは特異的反応が認められなかった。陰性対照抗体である r3-47-Alexa488 では、陽性対照標本、陰性対照標本のいずれにおいても特異的反応は認められなかった。アニフロルマブ-Alexa488 は陽性対照標本に対して特異的反応性を示し、陰性対照標本に対しては陰性対照抗体と同様に特異的反応性を示さなかったことから、このアッセイが高感度、特異的、かつ再現性を有することが示唆される。

カニクイザル組織を用いた組織交差反応性試験では、アニフロルマブ特異的染色が、上皮、内皮、中皮、単核球及び紡錘/樹状細胞、血管内及び血清漏出性タンパク様物質で認められた。また、アニフロルマブは、消化管の筋層間神経叢、食道のマイスナー神経叢、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染色性が認められた。観察されたヒト及びカニクイザル組織のアニフロルマブ染色は、組織における IFNAR の広範な発現に関する公表された報告と一致しており、関連する毒性評価モデルとしてのカニクイザルを更に支持している。その染色性の詳細は以下の通りである。

カニクイザル単核細胞：アニフロルマブにより染色される主な細胞は、副腎マクロファージ、消化管の GALT、肝臓のクッパー細胞、肺の BALT、肺胞マクロファージ、リンパ節の細網内皮系、リンパ球及びリンパ節マクロファージ、胎盤のホーフバウアー細胞、脾臓、胸腺及び扁桃のような主として定住リンパ球及び組織マクロファージからなる単核細胞であった。肝臓、卵管、膵臓、末梢神経（血管内も含む）、前立腺、唾液腺、皮膚、脊髄、横紋（骨格）筋、甲状腺、膀胱及び子宮（頸部）などの組織の間質細胞においても、少数のリンパ球やマクロファージに染色が認められた。単核細胞におけるアニフロルマブの染色強度にはばらつきがあり、その染色強度は 2 つの抗体濃度で同等である場合もあれば、低い抗体濃度で低下した場合もあった。さらに、細胞質や細胞膜の染色の多様性は、検討した組織パネル全体の単核細胞に認められたが、細胞質染色は細胞膜染色に比べより高頻度で認められた。

カニクイザル上皮：副腎皮質、脳（大脳）の上衣細胞、乳腺、消化管粘膜（結腸、食道、小腸及び胃）、腎尿細管、肝細胞及び胆管、肺の肺細胞、気管支/細気管支及び下位気管支腺、卵巣の生殖上皮細胞、卵管粘膜、膵臓の腺房及び腺管、胎盤栄養膜細胞、前立腺及び尿道（骨盤部）、唾液腺の腺房及び腺管、皮膚表皮及びその付属器、脊髄上衣細胞、胸腺のハッサル小体、甲状腺の濾胞及び濾胞周縁細胞、扁桃表面粘膜、尿管粘膜、膀胱、子宮の子宮内膜及び子宮頸部表面粘膜、並びに子宮腺にアニフロルマブの上皮染色性が認められた。本試験における上皮細胞の染色性は、染色強度と染色親和性のどちらにおいても多様性が認められ、2 つの抗体濃度で染色強度が同等である場合もあれば、低い抗体濃度で染色性が低下する場合も存在した。細胞質及び細胞膜の染色強度の多様性は、検討した組織パネル全体で認められたが、細胞質染色は細胞膜染色に比べその染色頻度は高かった。

カニクイザル内皮：副腎、脳（小脳及び大脳）、消化管（食道）、心臓、リンパ節、卵管、末梢神経、胎盤、唾液腺、皮膚、脊髄、甲状腺、尿管、膀胱及び子宮頸部などの多くの組織で内皮が染色された。本試験における内皮細胞の染色性は、染色強度と染色親和性のどちらにおいても多様性が認められ、2 つの抗体濃度で染色強度が同等である場合もあれば、低い抗体濃度で染色強度が低下する場合も存在した。細胞質及び細胞膜の染色強度の多様性は、検討した組織パネル全体で認められたが、細胞質染色は細胞膜染色に比べその染色頻度は高かった。

カニクイザル中皮：胃及び脾臓の中皮において、アニフロルマブの染色が認められた。胃における中皮の染色は、高濃度抗体染色の場合では弱～強の染色まで認められその頻度も高かったが、低濃度抗体染色の場合ではその染色は弱く、頻度もまれであった（中等度親和性）。脾臓における中皮の染色は、両方の抗体濃度で弱～中程度で、時折観察された（高親和性）。

カニクイザル紡錘/樹状細胞：結合組織間質及びいくつかの組織の被膜（中枢神経系髄膜及び末梢神経系の神経周膜を含む）中の線維芽細胞及び線維細胞の紡錘/樹状細胞にアニフロルマブ特異的染色が認められた。また、この染色は、副腎の被膜及び間質、骨髄間質、脳（大脳）髄膜、消化管（結腸及び小腸）固有層、卵巣間質、脊髄髄膜、胸腺間質及び扁桃間質で認められた。本試験での紡錘/樹状細胞の染色は、染色強度と染色親和性において多様性がみられた（2 つの抗体濃度で染色強度が同等の場合もあれば、低い抗体濃度で染色強度が低下、もしくは染色が認められ

ない場合も存在した）。検討したカニクイザル組織パネルにおける紡錘/樹状細胞における染色はすべて細胞質であった。

カニクイザルタンパク質様物質（血清漏出性）：組織切片によっては、アニフロルマブに染色されるタンパク質様物質が血管内、並びにこれに隣接する実質及び間質組織に認められた。この染色では、2 つの抗体濃度で染色パターンが同等な場合（高親和性）、低い濃度では低下する場合（中等度親和性）、低い濃度では認められない場合もあるなど、染色性の強度、頻度及び親和性は多様であった。

カニクイザルのその他の部位：アニフロルマブの染色は、消化管（結腸、食道、小腸及び胃）の筋層間神経叢、食道のマイスナー神経叢、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、末梢神経の軸索、下垂体の内分泌細胞及び下垂体細胞、胎盤の脱落膜細胞、精巣の精原細胞にも認められた。これらの部位における染色は、染色性の強度及び染色親和性が多様であった（2 つの抗体濃度で染色強度が同等の場合もあれば、低い抗体濃度で染色強度が低下、もしくは染色が認められない場合も存在した）。また、これらの部位における染色はすべて細胞質性であった。

2.6.6.8.3 免疫毒性

免疫学的評価は、カニクイザルを用いた投与期間が 39 週間までの非臨床毒性試験において実施した。免疫学的評価項目は、イムノフェノタイピング（活性化 T 細胞、NK 細胞、B 細胞、Th 細胞及び制御性 T 細胞分布、並びに単球及びリンパ球の双方における Fc 受容体の共発現）、血液学的検査及び免疫系組織の病理組織学的検査である。その結果、免疫系に対する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。同様に、カニクイザルの T 細胞依存性抗原反応（抗 KLH 抗体）でも、アニフロルマブ投与に起因する影響はみられなかった。

2.6.6.9 考察及び結論

サル細胞へのアニフロルマブの結合性及び中和活性に基づき、非臨床毒性評価のための薬理学的に関連する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 値は 0.29 ± 0.29 nM、カニクイザル IFNAR1 の K_D 値は 0.65 ± 0.74 nM であった。さらに、アニフロルマブは、サル IFNAR を発現する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（2.6.2.2.1.2 項参照）。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 に結合せずマウス IFN-α の生物活性を阻害しない（2.6.2.2.1.3 項参照）。

これらのデータに基づくと、げっ歯類は薬理学的に適切な動物ではなく、カニクイザルがアニフロルマブの薬理学的に関連した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。

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。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方の組織パネル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 例のカニクイザル中 1 例の下位気管支腺に、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 例のカニクイザル中 1 例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 例のカニクイザル中 1 例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。

GLP 非適用である初期の単回静脈内投与試験（試験番号 7140-123）は、アニフロルマブの毒性学的に意義のある用量である 5、30 あるいは 100 mg/kg における安全性及び受容体占有率を評価するために実施した。血清中アニフロルマブの曝露量（AUC）は、5～100 mg/kg の用量範囲で非線形であり、半減期は約 5～19 日の範囲であった。

免疫原性の発現頻度は用量増加に伴い減少したことから、この試験でみられた非線形的なトキシコキネティクスは、用量群間における抗アニフロルマブ抗体産生の頻度が不均等であることが原因である可能性が考えられる。また、抗アニフロルマブ抗体を検出する試験系の能力は、サンプル中に存在する遊離アニフロルマブの濃度による影響を受ける可能性があり、これが薬物動態の非線形性の原因である可能性も考えられる。抗アニフロルマブ抗体は単回投与後にほとんどの動物に検出され、用量増加に伴って検出頻度は低下し、その頻度は後半時に増加した。最高用量である 100 mg/kg（単回投与時の NOAEL）まで、30 分かけてアニフロルマブを単回静脈内投与したが、投与に起因する影響はみられなかった。免疫原性に関する潜在的なリスクを評価するため（イムノフェノタイピングによる 15 日目の異常な受容体占有率結果は、抗アニフロルマブ抗体の存在を示唆していた）、5 mg/kg を単回投与した雄 2 頭と雌 1 頭に対して、37 日目及び 50 日目に更に 5 mg/kg のアニフロルマブを 2 回追加静脈内投与した。その結果、3 頭中 1 頭に過敏症反応と一致する臨床所見がみられ、その所見は、50 日目の 3 回目投与時に最大となった。この動物に抗ヒスタミン剤（Benadryl®）を投与した結果、その臨床症状は緩和され、試験終了時まで更なる所見はみられなかった。検査及び探索的分析（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、明らかな過敏症反応の根本的なメカニズムを特定するために実施した。アイソタイピング分析の技術的制限により IgG の評価はできず、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 であると予想された。アイソタイピング分析では、追加投与前の 22 日及び 29 日目に、追加投与後に臨床症状を示した動物においてのみ、アニフロルマブに対する IgE 応答が検出され（IgM も 22 日目にこの動物で検出された）、3 頭の追加投与動物すべてに、アニフロルマブを 2 回追加投与した後の 70 日目までに検出可能な IgE 抗体が認められた。特性評価及びサイトカイン分析の結果と過敏症反応の可能性との明確な相関関係は認められなかった。今回孤立して認められた（1 頭のみ）過敏症のような反応は、その後実施した反復投与毒性試験では認められていない。

カニクイザルを用いて、薬理学的に適切な用量で安全性及び受容体占有率を評価し、受容体占有が認められない最小用量を決定するために選択された、0.003、0.03、0.3、あるいは 1 mg/kg のアニフロルマブ用量を用いて単回静脈内投与を実施した（試験番号 7140-131、GLP 適用）。免疫

原性評価の結果、大部分の動物で抗アニフロルマブ抗体の存在が認められた。受容体占有率分析及び *in vitro* ゲノムアッセイ（全血サンプルにおける IFN 誘導性遺伝子発現プロファイル）による薬力学的解析から、本試験で投与されたアニフロルマブの用量は、薬理学的に有効な範囲であることが示された。28 日間の試験期間中、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。

カニクイザルを用いて、アニフロルマブを 0,5、5、あるいは 30 mg/kg の用量で投与する 1 カ月間反復静脈内投与毒性試験を実施した（試験番号 [redacted].263.01：GLP 適用）。この用量は、週 1 回 1 カ月間（総投与回数 4 回）投与したときの毒性を評価するために選択した。0.5 mg/kg を投与した動物における最終投与後のアニフロルマブの血中濃度は多くの時点で検出限界を下回り、15 日目におけるこれらの動物の抗アニフロルマブ抗体の検出と相関していた（検出率は 100%）。70 日間の試験期間中、アニフロルマブ投与に起因する毒性学的評価項目の有害な変化はみられなかった。ただし、溶媒対照群及び 0.5 mg/kg 群と比較して、最初の 9 日間（10 日目）には、アニフロルマブ投与に起因する乾燥便の発生頻度の増加がみられた。しかしながら、この所見は一過性のものであり、他の臨床所見を伴っておらず、投与期間終了時までには治療の必要が無く消失したため、有害な所見とはみなさなかった。加えて、この乾燥便所見は、その後実施した反復投与毒性試験においては観察されなかった。カニクイザルにアニフロルマブを週 1 回 1 カ月間（総投与回数 4 回）静脈内投与したときの NOAEL は、試験の最高用量である 30 mg/kg/週と考えられた。

カニクイザルを用いた 9 カ月間（39 週間）反復静脈内投与及び皮下投与毒性試験（試験番号 7140-129、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、静脈内投与では 5 及び 50 mg/kg 、皮下投与では 15 及び 60 mg/kg の用量で投与した。投与期間終了時の最終剖検で、5 及び 50 mg/kg を静脈内投与した雌、並びに 60 mg/kg を皮下投与した雌において、アニフロルマブ投与に起因する可能性がある脾臓/脳重量比（平均）の統計学的有意な増加がみられたが（脾臓の絶対重量では有意差なし）、回復期間終了時には認められなかった。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 頭の脾臓に、アニフロルマブ投与に起因する軽微なリンパ濾胞サイズ増加が認められ、60 mg/kg を皮下投与、あるいは 50 mg/kg を静脈内投与した雌では脾臓/脳重量比（平均）の増加を伴っていた。回復期間終了時では、60 mg/kg を皮下投与した雄 1 頭、5 及び 50 mg/kg を投与したそれぞれ雌 1 頭の脾臓において軽微なリンパ濾胞サイズ増加がみられたが、これらの動物では脾臓/脳重量比（平均）の変化との相関はみられなかった。投与期間終了時、投与された雄の胸腺の皮質及び髄質に軽微なリンパ球数減少が認められたが、これは被験物質に起因するものと考えられた。回復期間終了時、同様な胸腺皮質におけるリンパ球数減少が投与された雄動物で認められた。

投与期間終了時の剖検では、50 mg/kg を静脈内投与した雄 2 頭の複数の器官に、アニフロルマブ投与に起因した動脈の炎症（動脈炎）が認められた。回復期間終了時の剖検では、アニフロルマブ投与に起因する動脈の炎症が 3 頭の雄（5 及び 50 mg/kg を静脈内投与したそれぞれ 1 頭ずつ、60 mg/kg を皮下投与した 1 頭）で認められた。回復期間終了時における雄のこの炎症性変化は、投与期間終了時と比べ、より多くの動物でみられたもののその程度は低く、概してその範囲も狭かった。

本試験において、アニフロルマブを投与した動物における動脈炎を合わせた全体的な発生頻度は 11%（5/48）で、雄は 21%（5/24）、雌は 0%（0/24）であった。この動物種における血管炎の自然発生率は 6%であることが報告されており（Chamanza et al, 2006）、本試験を実施した受託機関の施設において、26 週間以上の投与期間試験で“血管の炎症”と診断された自然発生率は 1.2%（2/167）であった。本試験で観察された動脈炎は、各組織切片内において正常な部分と病変部分が共存し、局所性/部分的なものであった。この所見は、主にリンパ球及びマクロファージ

の血管壁内あるいは血管周囲への浸潤がみられ、壊死、巨細胞、好酸球及び肉芽腫を伴ったものではなく、いくつかの組織/器官で本所見が認められている。

これらの動脈炎所見の発生原因としていくつか考えられるが、発生原因とみなすあるいは除外するには、更なる検討が必要である。例えば、アニフロルマブの Fc 領域は、FcγRIA、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA 及び C1q 特異的結合を排除することでエフェクター機能をなくすように改変されているが、アニフロルマブの直接的なアンタゴニストもしくはアゴニスト作用が動脈に影響を与え、観察された所見が導かれたと考える。固相化アニフロルマブを用いた架橋試験の結果は、アニフロルマブによる IFNAR1 アゴニスト活性がないことを示唆するものであった。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、Müller et al, 1994）、また、IFN-α に対する抗体（MEDI-545; sifalimumab:Study Report 7140-135）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ていないことからも、観察された動脈炎は、アニフロルマブの直接的作用から生じた可能性は低いことが示唆される。また、病理組織学的検査、一般状態及び臨床病理学的結果からも、この動脈炎が感染によることを示唆する証拠は認められなかった。投与製剤の分析結果は正常であり、本試験で用いた製剤における凝集体量も正常範囲内（1.2%以下の凝集体量、データ示さず）であったことから、アニフロルマブの凝集体がこの動脈炎の原因である可能性も低いと考えられた。

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係は不明である。この可能性は、血管を標的としないヒト 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）。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。

本試験における雌の NOAEL は、静脈内投与で 50 mg/kg/週及び皮下投与で 60 mg/kg/週であり、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、アニフロルマブの直接的影響ではないと考えられ、他の研究者（Bussiere and Johnson, 2010、Todd, 2010）により報告されている ADA/薬物複合体の沈着による可能性が考えられる血管病変と一致する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、MRHD に関する安全域の算出には、本試験において動脈炎を 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。

文献では、I 型 IFN 受容体欠損マウスでは発達障害が認められないことが報告されている。Müller 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、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（Müller 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節に対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。これらの報告と一致して、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（試験番号 [redacted].263.11、GLP 適用）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 2 週間に 1 回、溶媒対照あるいは 30 及び 60 mg/kg の用量のアニフロルマブを GD20 日目から LD（授乳後日数）28 日目（授乳期間中は 3 回投与）頃までの期間静脈内投与し、出生児は分娩後 208～212 日目の期間観察した。さらに、本試験で実施した免疫学的評価（KLH 免疫 IgM 及び IgG 力価、末梢血イムノフェノタイピング、血液学的分析、リンパ系器官（脾臓、胸腺及びリンパ節）の病理組織学的検査）において、出生児カニクイザルの結果は、出生児カニクイザルの正常範囲内であった。

雌の受胎能は、9 カ月間（39 週間）反復投与毒性試験（試験番号 7140-129、GLP 適用）において評価した結果、月経周期、器官重量（卵巣及び子宮）、並びに病理組織学的検査（卵巣、子宮、子宮頚部及び膣）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。雄の受胎能もまた、9 カ月間（39 週間）反復投与毒性試験（試験番号 7140-129、GLP 適用）において評価した結果、精液検査、精子形成ステージ検査、器官重量（前立腺、精嚢及び精巣上体）及び剖検、病理組織学的検査（前立腺、精嚢、精巣及び精巣上体）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 2 頭に所見が認められた。投与期間終了の剖検時、60 mg/kg を皮下投与した 1 頭では、左精巣に顕著な精細管変性が認められたが、右精巣は軽度の萎縮/変性が認められたのみであり、同様な血液供給を受けている対になった器官の間で変化の程度に一貫性が認められなかった。回復期間終了時の剖検時、50 mg/kg を静脈内投与した 1 頭に、ステージ VII～XII のパキテン期精母細胞を含む生殖細胞を VI の精子細胞の軽度枯渇がみられたため、結果的にステージ I～VI の精子細胞数が減少した。投与と薬理学的作用の発現に関連するタイミングから、この所見がアニフロルマブの直接的な影響によるものではないと考えられ、このことは、同じ動物の右精巣は病理組織学的に正常であり、片側性の影響であったことからも更にサポートされる。これらの精巣の所見のいずれもアニフロルマブ投与に起因したものではないという解釈は、I 型 IFN の公表論文と一致しており、I 型 IFN の過剰発現（中和/阻害ではない）が精子形成を障害する可能性があることを示唆している。

アニフロルマブ投与部位における局所刺激性を、Draize 法による評価、剖検及び病理組織学的検査によって評価したが、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カニクイザルにおける免疫毒性評価項目は、イムノフェノタイピング（活性化 T 細胞、NK 細胞、B 細胞、Th 細胞及び制御性 T 細胞分布、並びに単核球及びリンパ球の双方における Fc 受容体の共発現）、血液学的検査及び免疫系組織の病理組織学的検査である。その結果、免疫系に対する影響は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。同様に、カニクイザルの T 細胞依存性抗原反応（抗 KLH 抗体）でも、アニフロルマブ投与に起因する影響はみられなかった。

核膜又はミトコンドリア膜を通過し、DNA 又は他の染色体物質と直接相互作用することが予想されないバイオテクノロジー応用医薬品については不要とされている（ICHS6（R1））ため、アニフロルマブを用いた遺伝毒性試験は実施しなかった。

げっ歯類を用いた IFNAR1 阻害によるがん原性（一般的に、IFNAR1 阻害はげっ歯類におけるがん原性を増加させる）について、IFNAR1 及び IFNAR2 欠損マウス及び MAR1-5A3 抗体（アニフロルマブの *in vivo* 発がん性リスク評価のために利用可能な試薬抗体）を含む IFN-α/β 抗体あるいは抗 IFN-α/β 抗体を投与したマウスの試験で得られた既知の公表論文から考察した。これらの抗体等を用いた *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。動物モデルを用いた追加の *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））と考えられる。

結論として、ICH S6 (R1) ガイドラインに従って、カニクイザルを用いた適切なアニフロルマブの非臨床毒性試験を実施した結果は、予定している適応症での推奨用量、投与経路及び投与スケジュールにおける製造販売承認申請をサポートするものであった。さらに、39 週間反復静脈内投与試験における NOAEL（50 mg/kg/週：動脈炎を考慮しない場合）及び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における NOAEL（60 mg/kg/週）の投与時の曝露量と、4 週間に 1 回 300 mg をヒトに静脈内投与する最大推奨臨床用量（MRHD）との間には十分な安全域が存在した。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 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発生生殖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。

表 8　カニクイザルを用いた非臨床試験の静脈内投与群における曝露量と最大推奨臨床用量における曝露量の比較（39 週間反復投与毒性試験：試験番号 7140-129 及び拡充型出生前及び出生後の発生生殖毒性試験：試験番号 [redacted].263.11）

最大推奨臨床用量	推定ヒト曝露量[a]		39 週間反復投与毒性試験 (7140-129)[e]			拡充型出生前及び出生後の生殖発生毒性試験 ([redacted].263.11)[f]		
			50 mg/kg IV Ratios			60 mg/kg IV Ratios		
	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{0\text{-}28d}$ (day·µg/mL)	C_{max}[b]	AUC[c]	Adjusted AUC[d]	C_{max}[b]	AUC[c]	Adjusted AUC[d]
300 mg IV Q4W (IFN 高値)	125	1177	36	18	73	19	18	35
300 mg IV Q4W (IFN 低値)	135	1472	33	15	58	17	14	28

AUC = 薬物濃度時間曲線下面積; C_{max} = 最高血中濃度; d = Day; IV = 静脈内; Q4W =4 週間毎に 1 回投与

a SLE 患者へのアニフロルマブ 300mg Q4W の IV 投与後の C_{max} 及び AUC のシミュレートされたヒト平均値（4 週間以上; 48～52 週）（Anifrolumab Population PK 報告書、5.3.3.5 参照）。シミュレーションは、I 型 IFN 遺伝子シグネチャーテストのステータスと体重（04 試験及び 05 試験の患者からのサンプリングによる）、及びモデルの変量効果を考慮して実行されました。

b C_{max} 比：C_{max} =（カニクイザル定常状態 C_{max}）/（ヒト C_{max}）

c AUC 比：39 週間反復投与毒性試験（カニクイザル定常状態 $AUC_{0\text{-}7d}$ / ヒト $AUC_{0\text{-}28d}$）及び拡充型出生前及び出生後の生殖発生毒性試験（カニクイザル定常状態 $AUC_{0\text{-}14d}$ / ヒト $AUC_{0\text{-}28d}$）

d 調整された AUC 比の算出［動物（毎週 1 回又は隔週に 1 回）とヒト（4 週間毎に 1 回）の間の投与頻度の違いを考慮するため］。39 週間反復投与毒性試験では（カニクイザル定常状態 $AUC_{0\text{-}7d}$ × **4**）/（ヒト $AUC_{0\text{-}28d}$）、拡充型出生前及び出生後の生殖発生毒性試験では（カニクイザル定常状態 $AUC_{0\text{-}14d}$ × **2**）/（ヒト $AUC_{0\text{-}28d}$）

e 試験番号 7140-129（39 回目投与）の IV 投与での無毒性量（50 mg/kg）; C_{max} 平均値= 4510 µg/mL、$AUC_{0\text{-}7d}$ = 21600 day·µg/mL

f 試験番号 [redacted].263.11（最終投与）の IV 投与での無毒性量（60 mg/kg）; 母動物における C_{max} 平均値= 2380 µg/mL、$AUC_{0\text{-}14d}$ = 20900 day·µg/mL

2.6.6.10 図表

本章のすべての図表は本文中に記載した。

2.6.6.11 参考文献

Bugelski et al, 2010a

Bugelski PJ, Sachs C, Cornacoff J, Martin P, Treacy G. Immunomodulatory biopharmaceuticals and risk of neoplasia. Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing. 2010:1-32.

Bugelski et al, 2010b

Bugelski PJ, Volk A, Walker MR, Krayer JH, Martin P, Descotes J. Critical review of preclinical approaches to evaluate the potential of immunosuppressive drugs to influence human neoplasia. Int J Toxicol. 2010 Sep-Oct;29(5):435-66.

Bussiere and Johnson, 2010

Bussiere J, Johnson, C., editor. Case Study on the Impact of Immunogenicity on Adverse Effects in Toxicology Studies and Consequences for the Clinical Development Program. Proceedings of the Society of Toxicology Annual Meeting; 2010 March 2010; Salt Lake City, Utah. Doc ID-001109316.

Bussiere et al, 2009

Bussiere JL, Martin P, Horner M, Couch J, Flaherty M, Andrews L, et al. Alternative strategies for toxicity testing of species-specific biopharmaceuticals. Int J Toxicol. 2009 May-Jun;28(3):230-53.

Chamanza et al, 2006

Chamanza R, Parry NM, Rogerson P, Nicol JR, Bradley AE. Spontaneous lesions of the cardiovascular system in purpose-bred laboratory nonhuman primates. Toxicologic pathology. 2006;34(4):357-63.

Cochrane and Hawkins, 1968

Cochrane CG, Hawkins D. Studies on circulating immune complexes. 3. Factors governing the ability of circulating complexes to localize in blood vessels. J Exp Med. 1968 Jan 1;127(1):137-54.

Curtsinger et al, 2007

Curtsinger JM, Gerner MY, Lins DC, Mescher MF. Signal 3 availability limits the CD8 T cell response to a solid tumor. J Immunol. 2007 Jun 1;178(11):6752-60.

de Weerd et al, 2007

de Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. J Biol Chem. 2007 Jul 13;282(28):20053-7.

Dejucq et al, 1995

Dejucq N, Dugast I, Ruffault A, van der Meide PH, Jegou B. Interferon-alpha and -gamma expression in the rat testis. Endocrinology. 1995 Nov;136(11):4925-31.

Dejucq et al, 1997

Dejucq N, Chousterman S, Jegou B. The testicular antiviral defense system: localization, expression, and regulation of 2'5' oligoadenylate synthetase, double-stranded RNA-activated protein kinase, and Mx proteins in the rat seminiferous tubule. J Cell Biol. 1997 Nov 17;139(4):865-73.

Dejucq et al, 1998

Dejucq N, Lienard MO, Guillaume E, Dorval I, Jegou B. Expression of interferons-alpha and -gamma in testicular interstitial tissue and spermatogonia of the rat. Endocrinology. 1998 Jul;139(7):3081-7.

Dunn et al, 2005

Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, et al. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. Nat Immunol. 2005 Jul;6(7):722-9.

Dunn et al, 2006

Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat Rev Immunol. 2006 Nov;6(11):836-48.

Erpenbach, 1991

Erpenbach KH. Systemic treatment with interferon-alpha 2B: an effective method to prevent sterility after bilateral mumps orchitis. J Urol. 1991 Jul;146(1):54-6.

Ferrantini et al, 2007

Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. Biochimie. 2007 Jun-Jul;89(6-7):884-93.

Fujimoto et al, 1983

Fujimoto K, Terao K, Cho F, Honjo S. Immunoglobulins and measles antibody in sera of newborn cynomolgus monkeys and in milk of their mothers. Jpn J Med Sci Biol. 1983 Aug;36(4):209-14.

Fujisawa et al, 1998

Fujisawa M, Fujioka H, Tatsumi N, Inaba Y, Okada H, Arakawa S, et al. Levels of interferon alpha and gamma in seminal plasma of normozoospermic, oligozoospermic,and azoospermic men. Arch Androl. 1998 May-Jun;40(3):211-4.

Germuth, 1953

Germuth FG, Jr. A comparative histologic and immunologic study in rabbits of induced hypersensitivity of the serum sickness type. J Exp Med. 1953 Feb 1;97(2):257-82.

Gidlund et al, 1978

Gidlund M, Orn A, Wigzell H, Senik A, Gresser I. Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. Nature. 1978 Jun 29;273(5665):759-61.

Gresser et al, 1983

Gresser I, Belardelli F, Maury C, Maunoury MT, Tovey MG. Injection of mice with antibody to interferon enhances the growth of transplantable murine tumors. J Exp Med. 1983 Dec 1;158(6):2095-107.

Gresser et al, 1988

Gresser I, Maury C, Vignaux F, Haller O, Belardelli F, Tovey MG. Antibody to mouse interferon alpha/beta abrogates resistance to the multiplication of Friend erythroleukemia cells in the livers of allogeneic mice. J Exp Med. 1988 Oct 1;168(4):1271-91.

Gutterman, 1994

Gutterman JU. Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 15;91(4):1198-205.

Hekman et al, 1988

Hekman AC, Trapman J, Mulder AH, van Gaalen JL, Zwarthoff EC. Interferon expression in the testes of transgenic mice leads to sterility. J Biol Chem. 1988 Aug 25;263(24):12151-5

Hibi et al, 1997

Hibi H, Yokoi K, Yamamoto M. Effects of alpha-interferon on sperm production, concentration, and motility in the rat. Int J Urol. 1997 Nov;4(6):603-7.

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 U S A. 1995 Nov 21;92(24):11284-8.

Iwakura et al, 1988

Iwakura Y, Asano M, Nishimune Y, Kawade Y. Male sterility of transgenic mice carrying exogenous mouse interferon-beta gene under the control of the metallothionein enhancer-promoter. EMBO J. 1988 Dec 1;7(12):3757-62.

Jarvis et al, 2010

Jarvis P, Srivastav S, Vogelwedde E, Stewart J, Mitchard T, Weinbauer GF. The cynomolgus monkey as a model for developmental toxicity studies: variability of pregnancy losses, statistical power estimates, and group size considerations. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology. 2010;89(3):175-87.

Kniker and Cochrane, 1968

Kniker WT, Cochrane CG. The localization of circulating immune complexes in experimental serum sickness. The role of vasoactive amines and hydrodynamic forces. J Exp Med. 1968 Jan 1;127(1):119-36.

Le Bon et al, 2003

Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, et al. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. Nat Immunol. 2003 Oct;4(10):1009-15.

Le Bon and Tough, 2008

Le Bon A, Tough DF. Type I interferon as a stimulus for cross-priming. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2008 2008/02/01/;19(1):33-40.

Leach et al, 2014

Leach MW, Rottman JB, Hock MB, Finco D, Rojko JL, Beyer JC. Immunogenicity/hypersensitivity of biologics. Toxicol Pathol. 2014 Jan;42(1):293-300.

Melaine et al, 2003

Melaine N, Lienard MO, Guillaume E, Ruffault A, Dejucq-Rainsford N, Jegou B. Production of the antiviral proteins 2'5'oligoadenylate synthetase, PKR and Mx in interstitial cells and spermatogonia. J Reprod Immunol. 2003 Jun;59(1):53-60.

Melero et al, 2006

Melero I, Arina A, Murillo O, Dubrot J, Alfaro C, Perez-Gracia JL, et al. Immunogenic cell death and cross-priming are reaching the clinical immunotherapy arena. Clin Cancer Res. 2006 Apr 15;12(8):2385-9.

Müller et al, 1994

Müller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. Science. 1994 Jun 24;264(5167):1918-21.

Pal, 2013

Pal G. The effects of pegylated interferon--alpha2B on mumps orchitis. J Indian Med Assoc. 2013 Sep;111(9):612-4, 7.

Rojko et al, 2014

Rojko JL, Evans MG, Price SA, Han B, Waine G, et al. Formation, Clearance, Deposition, Pathogenicity, and Identification of Biopharmaceutical-related Immune Complexes: Review and Case Studies. Toxicol Pathol. 2014 Jan;42(4):725-64.

Satie et al, 2011

Satie AP, Mazaud-Guittot S, Seif I, Mahe D, He Z, Jouve G, et al. Excess type I interferon signaling in the mouse seminiferous tubules leads to germ cell loss and sterility. J Biol Chem. 2011 Jul 1;286(26):23280-95.

Sheehan et al, 2006

Sheehan KC, Lai KS, Dunn GP, Bruce AT, Diamond MS, Heutel JD, et al. Blocking monoclonal antibodies specific for mouse IFN-alpha/beta receptor subunit 1 (IFNAR-1) from mice immunized by in vivo hydrodynamic transfection. J Interferon Cytokine Res. 2006 Nov;26(11):804-19.

Smyth, 2005

Smyth MJ. Type I interferon and cancer immunoediting. Nat Immunol. 2005 Jul;6(7):646-8.

Study Report 7140-135

Study Report 7140-135. 52-Week Intermittent Intravenous Infusion or Subcutaneous Injection Chronic Toxicity and Toxicokinetic Study with MEDI-545 in Cynomolgus Monkeys with a 16-Week Recovery Period. AZ Doc ID-001176621

Starace et al, 2008

Starace D, Galli R, Paone A, De Cesaris P, Filippini A, Ziparo E, et al. Toll-like receptor 3 activation induces antiviral immune responses in mouse sertoli cells. Biol Reprod. 2008 Oct;79(4):766-75.

Stewart, 2009

Stewart J. Developmental toxicity testing of monoclonal antibodies: an enhanced pre- and postnatal study design option. Reprod Toxicol. 2009 Sep;28(2):220-5.

Swann et al, 2007

Swann JB, Hayakawa Y, Zerafa N, Sheehan KC, Scott B, Schreiber RD, et al. Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. J Immunol. 2007 Jun 15;178(12):7540-9.

Takaoka et al, 2003

Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. Nature. 2003 Jul 31;424(6948):516-23.

Takaoka and Taniguchi, 2003

Takaoka A, Taniguchi T. New aspects of IFN-alpha/beta signalling in immunity, oncogenesis and bone metabolism. Cancer Sci. 2003 May;94(5):405-11.

Todd, 2010

Todd M, editor. Characterization of Potential Immune Complexes Observed in Cynomolgus Monkeys and Relationship to Observed Toxicities of Monoclonal Antibody Drug Candidates. Proceedings of the Society of Toxicology Annual Meeting; 2010 March 2010; Salt Lake City, Utah

Ulusoy et al, 2004

Ulusoy E, Cayan S, Yilmaz N, Aktas S, Acar D, Doruk E. Interferon alpha-2b may impair testicular histology including spermatogenesis in a rat model. Arch Androl. 2004 Sep-Oct;50(5):379-85.

Vahle et al, 2010

Vahle JL, Finch GL, Heidel SM, Hovland DN, Jr., Ivens I, Parker S, et al. Carcinogenicity assessments of biotechnology-derived pharmaceuticals: a review of approved molecules and best practice recommendations. Toxicol Pathol. 2010 Jun;38(4):522-53.

Yamamoto and Miyake, 1994

Yamamoto M, Miyake K. Successful use of interferon for male infertility. The Lancet. 1994;344(8922):614.

Yapanoglu et al, 2010

Yapanoglu T, Kocaturk H, Aksoy Y, Alper F, Ozbey I. Long-term efficacy and safety of interferon-alpha-2B in patients with mumps orchitis. Int Urol Nephrol. 2010 Dec;42(4):867-71.

Yeniyol et al, 2000

Yeniyol CO, Sorguc S, Minareci S, Ayder AR. Role of interferon-alpha-2B in prevention of testicular atrophy with unilateral mumps orchitis. Urology. 2000 Jun;55(6):931-3.

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]

2.6.7　毒性試験概要表
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
表目次 2
2.6.7 毒性試験概要表 3
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 5
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 6
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 7
2.6.7.5 単回投与毒性試験 9
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 11
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 12
2.6.7.8 遺伝毒性試験 20
2.6.7.9 がん原性試験 21
2.6.7.10 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 22
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 22
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 22
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 23
2.6.7.14 幼若動物を用いた試験 26
2.6.7.15 局所刺激性試験 26
2.6.7.16 その他の毒性試験：組織交差反応性試験 27
2.6.7.17 参考文献 29

表目次

表 1 アニフロルマブ毒性試験一覧表 3
表 2 毒性試験で用いた被験物質 7
表 3 単回投与毒性試験 9
表 4 カニクイザル 4 週間毒性試験 12
表 5 カニクイザル 39 週間毒性試験 14
表 6 生殖発生毒性試験 – 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 23
表 7 正常ヒト組織におけるアニフロルマブの組織交差反応性試験 27
表 8 正常カニクイザル組織におけるアニフロルマブの組織交差反応性試験 28

2.6.7　毒性試験概要表

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

被験物質：アニフロルマブ

表 1　アニフロルマブ毒性試験一覧表

Type of Study	Study Number	Species	ROA	Number of Doses	Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Study Site	Location in CTD
Single-dose Toxicity	7140-123	Cynomolgus Monkey	IV Infusion	1[b]	5, 30, and 100	No	[redacted], USA	4.2.3.1.1
	7140-142	Cynomolgus Monkey	IV Infusion SC Injection	1	IV: 5 SC: 5	No	[redacted], USA	4.2.3.1.2
	7140-131	Cynomolgus Monkey	IV Infusion	1	0.003, 0.03, 0.3 and 1	Yes	[redacted], USA	4.2.3.1.3
Repeat-dose Toxicity	[redacted].263.01	Cynomolgus Monkey	IV Infusion	4	0.5, 5 and 30	Yes	[redacted], USA	4.2.3.2.1
	7140-129	Cynomolgus Monkey	IV Infusion SC Injection	40	IV: 5 and 50 SC: 15 and 60	Yes	[redacted], USA	4.2.3.2.2
Genotoxicity	In accordance with ICH guidance S6 (R1), 2011, no genotoxicity studies were performed (see Section 2.6.6.4).							
Carcinogenicity	No carcinogenicity studies have been conducted (see Section 2.6.6.5 for more details).							

Type of Study	Study Number	Species	ROA	Number of Doses	Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Study Site	Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity	[redacted].263.11	Cynomolgus Monkey	IV Infusion	varied	30 and 60	Yes	[redacted], [redacted], [redacted], USA	4.2.3.5.3
Studies in Juvenile Animals	Studies in juvenile animals were not conducted.							
Local Tolerance	A Component of the Toxicity Studies: 7140-142, [redacted].263.01 and 7140-129.							4.2.3.1.1 4.2.3.2.1 4.2.3.2.2
Other Toxicity Studies	IM1596	Cynomolgus Monkey	Tissue Cross-reactivity	NA	2 and 10 µg/mL	Yes	[redacted], [redacted], [redacted], USA	4.2.3.7.7.1
	IM1595	Human	Tissue Cross-reactivity	NA	2 and 10 µg/mL	Yes	[redacted], [redacted], [redacted], USA	4.2.3.7.7.2

GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; MEDI-546 = anifrolumab; NA = not applicable; ROA = route of administration; SC = subcutaneous.

[a] Unless otherwise specified. For Single and Repeat-Dose Toxicity Studies, the no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) is underlined if applicable.

[b] Two males and one female received 2 additional 5 mg/kg/dose anifrolumab IV infusions on Days 37 and 50.

2.6.7.2　　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

The toxicokinetics data for anifrolumab are summarized and tabulated in Modules 2.6.4 and 2.6.5, respectively.

2.6.7.3　　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

The toxicokinetics data for anifrolumab are summarized and tabulated in Modules 2.6.4 and 2.6.5, respectively.

2.6.7.4　　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

被験物質：アニフロルマブ

表 2　　毒性試験で用いた被験物質

Title of Study	Batch Number(s)	Purity (%)	Specified Impurities	Study Number
Non-GLP Single-Dose Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Immunotoxicology Study of MEDI-546 in Cynomolgus Monkeys	[redacted]	99.1 to 99.9% Monomer	0.0 to 0.7% Aggregate	7140-123
Non-GLP Study to Evaluate the Toxicity, Toxicokinetics, Pharmacodynamics, and Immunogenicity of MEDI-546 in Male Cynomolgus Monkeys Following Single Intravenous or Subcutaneous Administration	[redacted]	98.1 to 98.4% 98.0 to 98.6% Monomer	0.8 to 1.2% 0.7 to 0.8% Aggregate	7140-142
Single IV Dose Toxicity Study of MEDI-546 in Cynomolgus Monkeys with Toxicokinetics and Immunogenicity Evaluation	[redacted]	99.6% Monomer	0.4% Aggregate	7140-131
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	[redacted]	99.7 to 100% Monomer	0.0 to 0.3% Aggregate	[redacted].263.01
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	[redacted]	99.3 to 100% Monomer	0.2 to 0.6% Aggregate	7140-129
Assessment of Effects of MEDI-546 on Pre- and Postnatal Development when Administered by Intravenous Infusion Once Every Two Weeks to Pregnant Cynomolgus Monkeys Starting on Gestation Day 20 to Early Lactation Period	[redacted]	99.6% Monomer	0.3 to 0.4% Aggregate	[redacted].263.11

Title of Study	Batch Number(s)	Purity (%)	Specified Impurities	Study Number
Cross-reactivity Study of MEDI-546-Alexa Fluor 488 with Normal Human Tissues	[redacted]	99.6% Monomer	0.4% Aggregate	IM1595
Tissues Cross-reactivity Study of MEDI-546-Alexa Fluor 488 with Normal Cynomolgus Monkey Tissues	[redacted]	99.6% Monomer	0.4% Aggregate	IM1596

In this table, anifrolumab is referred to as MEDI-546.

2.6.7.5　単回投与毒性試験

被験物質：アニフロルマブ

表 3　単回投与毒性試験

Title of Study	Species and Other Information	ROA (Vehicle Formulation)	Doses [a] (mg/kg)	Noteworthy Findings (Location in CTD)
Single-Dose Intravenous Infusion Toxicity, Toxicokinetic, and Immunotoxicology Study with MEDI-546 in Cynomolgus Monkeys (Study No. 7140-123; non-GLP)	Cynomolgus Monkey (5/gender/group) 2/ gender/group necropsied on Day 3 [c]	IV Infusion (10 mM histidine buffer, pH 6.0)	0, 5 [b], 30, and 100	One male from a cohort of three animals that received additional 5 mg/kg anifrolumab IV infusions on Days 37 and 50, had signs consistent with a hypersensitivity response that worsened with each re-dose but were alleviated by administration of intravenous anti-histamine ([redacted]). Investigative analyses (cytokine analyses and isotyping and specificity characterization of the anti-drug antibody [ADA] response) did not identify the underlying mechanism of the apparent hypersensitivity response beyond the association with the development of an ADA response. This isolated case of a hypersensitivity-like reaction was not reproducible in the subsequent four week or 39-week repeated-dose studies (Study No. [redacted].263.01 and Study No. 7140-129, respectively). The single dose NOAEL was 100 mg/kg, the highest dose tested, which resulted in a mean area under the concentration curve (AUC0-inf) of 40,700 µg·d/mL and in a mean maximum concentrations (Cmax) of 3,020 µg/mL. (4.2.3.1.1)
Non-GLP Study to Evaluate the Toxicity, Toxicokinetics, Pharmacodynamics, and Immunogenicity of MEDI-546 in Male Cynomolgus Monkeys Following Single Intravenous or Subcutaneous Administration (Study No. 7140-142; non-GLP)	Male cynomolgus monkeys (3 males/group) All animals transferred into the stock colony without necropsy on Day 28	IV Infusion SC Injection (10 mM histidine buffer, pH 6.0)	IV: 5 SC:5	There was no control group comparator in this study. A single 5 mg/kg anifrolumab administration given by IV infusion or SC injection resulted in no signs of systemic or dermal toxicity or remarkable differences between the two routes of exposure (IV infusion mean AUC0-t 723 µg·d/mL, mean Cmax 129 µg/mL; SC injection mean AUC0-t 1,110 µg·d/mL, mean Cmax 188 µg/mL). (4.2.3.1.2)

Title of Study	Species and Other Information	ROA (Vehicle Formulation)	Doses [a] (mg/kg)	Noteworthy Findings (Location in CTD)
Single IV Dose Toxicity Study of MEDI-546 in Cynomolgus Monkeys with Toxicokinetics and Immunogenicity Evaluation (Study No.7140-131; GLP)	Cynomolgus Monkey (3/gender/group) All animals necropsied on Day 29	IV infusion (10 mM histidine buffer containing 2.35% Lysine and 0.02% Polysorbate 80, pH 6.0)	0, 0.003, 0.03, 0.3 or <u>1</u>	There were no anifrolumab-related adverse findings. Receptor occupancy analysis and pharmacodynamics analysis by in vitro genomic assay suggest the anifrolumab doses administered in this study were in a pharmacologically active range. (4.2.3.1.3)

GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; MEDI-546 = anifrolumab; ROA = route of administration; SC = subcutaneous.
Anifrolumab is referred to as MEDI-546.

[a] The NOAEL for each study is underlined if applicable.

[b] Two males and one female received two additional 5 mg/kg/dose anifrolumab IV infusions on Days 37 and 50.

[c] Additional animals that remained on study until Day 70 were returned to the stock colony without necropsy.

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

被験物質：アニフロルマブ

No nonpivotal repeat-dose toxicity studies were conducted with anifrolumab.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

被験物質：アニフロルマブ

Location in CTD：4.2.3.2.1

表 4 カニクイザル 4 週間毒性試験

Species: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing:** 4 weeks (weekly for a total of 4 total doses)	**Study Number:** [redacted].263.01
Initial Age: 3.7 to 5.5 years	**Duration of Post dose:** 42 days	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] (males) and [redacted] (females) [redacted] 20[redacted]	**Necropsy Dates:** 3/gender/group each on Days 29 and 71	
No-Observed-Adverse-Effect-Level: 30 mg/kg/dose	**Method of Administration:** IV infusion	**Vehicle/Formulation:** 10 mM histidine buffer containing 2.35% lysine and 0.02% polysorbate 80, pH 6.0

Parameters Evaluated: Clinical signs (including dermal Draize scoring of infusion sites), qualitative food consumption, changes in body weights, blood pressure, electrocardiographic and ophthalmologic examinations, clinical pathology (hematology, coagulation, clinical chemistry, and urinalysis), and organ weight data, macroscopic and microscopic pathology. Samples of blood were collected for TK and ADA analyses at various intervals throughout the study (refer to Section 2.6.4.8.1 for toxicokinetic results).

Noteworthy Findings: All study animals survived until their scheduled necropsy. A test article-related increase in the occurrence of dry feces was noted for animals in the 5 and 30 mg/kg dose groups during the first 9 days of study (Day 10) compared to controls and 0.5 mg/kg animals. Because this change was transient, not associated with any additional clinical signs, and resolved without treatment prior to completion of dosing, it was not considered to be adverse. Additionally, similar dry feces findings were not noted in subsequent repeat dose anifrolumab studies.

Dose (mg/kg)	0	0.5	5	30
Number of Animals (M/F)	**6/6**	**6/6**	**6/6**	**6/6**
Dose 1 C_{max} (Mean µg/mL±SD)	NA	20.3 ± 3.2	165 ± 42	1470 ± 490
Dose 1 $AUC_{(0\text{-}7d)}$ (Mean µg·d/mL±SD)	NA	50.3 ± 11.5	630 ± 65	5470 ± 1180
Dose 4 C_{max} (Mean µg/mL±SD)	NA	ND	237 ±163	2640 ± 920

Dose (mg/kg)	**0**	**0.5**	**5**	**30**
Number of Animals (M/F)	**6/6**	**6/6**	**6/6**	**6/6**
Dose 4 AUC$_{(0\text{-}7d)}$ (Mean µg·d/mL±SD)	NA	ND	903 ± 751[a]	11100 ± 5310[a]
Dry Feces Clinical Observations				
Males				
Number of Days Observed/Number of Animals with Finding	1/1	0/0	5/4	12/5
Study Day Range of Findings	8	NA	4-9	8-10
Females				
Number of Days Observed/Number of Animals with Finding	0/0	0/0	3/2	15/5
Study Day Range of Findings	NA	NA	8-9	8-11, 23

NA = Not Applicable; ND = Noncompartmental analysis not performed because nearly all TK observations were BLQ; ADA = anti-drug antibodies; $AUC_{(0\text{-}7d)}$ = area under the curve for from start of dosing through following 7 days; C_{max} = maximum observed concentration; IV = intravenous: F = Females; M = males; MEDI-546 = anifrolumab; NA = not applicable; PD = pharmacodynamic(s); ROA = route of administration; TK = toxicokinetic(s).
Mean toxicokinetic values represent the average of male and female values.

[a] Calculated for recovery group animals only (3/gender/group)

被験物質：アニフロルマブ
Location in CTD：4.2.3.2.2

表 5　　カニクイザル 39 週間毒性試験

Species: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing:** 39 weeks (weekly for a total of 40 doses)		**Study Number:** 7140-129
Initial Age: 3 to 7 years	**Duration of Post dose:** 12 weeks		**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] (males) [redacted] (females) [redacted] 20[redacted]	**Necropsy Dates:** 3/gender/group each on Study Days 277 and 360		
No-Observed-Adverse-Effect-Level: Males – 50 (IV) or 60 (SC) mg/kg/dose[a]; females - 50 (IV) or 60 (SC) mg/kg/dose	**Method of Administration:** IV infusion and/or SC injection	**Vehicle/Formulation:** IV vehicle control: 10 mM histidine buffer containing 2.35% lysine and 0.02% polysorbate 80, pH 6.0; SC vehicle control: 10 mM histidine buffer containing 8% trehalose and 0.02% polysorbate 80, pH 6.0	

Parameters Evaluated: Clinical signs (including dermal scoring of injection sites and qualitative food consumption), physical examination, body weights, ophthalmic, electrocardiographic, blood pressure, spermatogenesis staging, semen analysis (ejaculate or necropsy), menses cycle, third component of complement (C3) and component Bb, immunophenotyping, hematology, coagulation, clinical chemistry, urinalysis, organ weight, macroscopic, and microscopic (including spermatogenesis staging) data. Blood samples were collected for toxicokinetics, immunogenicity, cytokine, and in vitro genomic PD assessments at various intervals throughout the study.

Noteworthy Findings: An anifrolumab-related minimal increase in lymphoid follicle size in the spleen was present in 2 males and 1 female given 60 mg/kg SC and 3 males and 1 female given 50 mg/kg IV that correlated with increased mean spleen-to-brain weight ratios noted in females given 60 mg/kg SC or 50 mg/kg IV. At the end of the recovery phase, a minimal increase in lymphoid follicle size was present in the spleen of 1 male given 60 mg/kg SC, 1 female given 50 mg/kg IV, and 1 female given 5 mg/kg IV, with no correlating changes in mean spleen-to-brain weight ratios.

An anifrolumab-related minimal increase in lymphoid follicle size and/or number was present in some lymph nodes of dosed males and females at the end of the dosing and/or recovery phase. At the end of the dosing phase, the minimal decrease in lymphocytes in the cortex and medulla of the thymus of dosed males is attributed to anifrolumab. A similar pattern of decreased cortical lymphocytes was present in dosed males at the end of the recovery phase.

Focal inflammation of arteries (arteritis) in small- and medium-sized arteries of several organs in 5 of the 24 males (21%), that received anifrolumab, but it was not evident in control males or in females regardless of treatment group (0/24, 0%). Vasculitis background incidence of 6% has been noted in the literature for this species (Chamanza et al 2006), and the Testing Facility had a historical incidence of 2/167 (1.2%) for a diagnosis of “inflammation, vascular.” in studies of ≥ 26 weeks in duration. The arteritis observed in this study was characterized as focal/segmental, with both normal and affected arteries within each tissue section. It was manifest primarily by intramural and perivascular infiltrates of lymphocytes and macrophages, without necrosis, giant cells, eosinophils, or granulomas. Several tissue types/organs were affected. At the end of the dosing phase, 2 males given 50 mg/kg IV had anifrolumab-related arteritis in multiple organs. At the end of the recovery phase, 3 males had anifrolumab-related arteries: 1 each given 5 mg/kg IV, 50 mg/kg IV, and 60

mg/kg SC. The severity grades of the arteritis ranged from Grade 1 to Grade 3 on a 5-point scale (Grade 5 being the most severe), with Grade 2 findings reported as the most frequent. While evident in more animals, the focal arteritis at the end of the recovery phase males was less pronounced and generally less widespread than in those of dosing phase males.

ADA = anti-drug antibodies; $AUC_{(0\text{-}7d)}$ = area under the curve from start of dosing through following 7 days; C_{max} = maximum observed concentration; F = female; M = male; MEDI-546 = anifrolumab; NA = not applicable: PD = pharmacodynamic(s); ROA = route of administration; SC = subcutaneous; SD = standard deviation; TK = toxicokinetic(s).

[a] The observed arteritis was not factored into the NOAEL (see Section 2.6.6.3.1 for more details).

[b] N=4. Eight of 12 animals in this group were excluded from summary statistics due to formation of ADA.

[c] N=9. Three of 12 animals in this group were excluded from summary statistics due to formation of ADA.

[d] Mean toxicokinetic values represent the average of male and female values.

* : p≤0.05

Microscopic severity scale: 1 = minimal; 2 = slight; 3 = moderate; 4 = marked; 5 = severe.
Bkg = Background, expected level of stainin, Pos = Immunopositive

Parameters[d]											
Dose (mg/kg) and ROA		**0**		**5 (IV)**		**50 (IV)**		**15 (SC)**		**60 (SC)**	
Number of Animals (M/F)		**6/6**		**6/6**		**6/6**		**6/6**		**6/6**	
Dose 1 C_{max} (Mean µg/mL±SD)		NA		144 ± 27[b]		1370 ± 324		171 ± 35.1[c]		730 ± 175	
Dose 1 $AUC_{0\text{-}7d}$ (Mean µg·d/mL±SD)		NA		557 ± 107[b]		4960 ± 1460		935 ± 237[c]		3990 ± 975	
Dose 39 Cmax (Mean µg/mL±SD)		NA		432 ± 20.6[b]		4510 ± 1200		909 ± 247[c]		3230 ± 1120	
Dose 39 $AUC_{0\text{-}7d}$ (Mean µg·d/mL±SD)		NA		2040 ± 436[b]		21600 ± 5780		5250 ± 1230[c]		19500 ± 5620	
Blood Pressure (mg Hg, mean), Predose, Day 3 and Day 276 :n=6/sex/group, Recovery Day 83: n=3/sex/group											
		Male	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Predose	**Systolic Pressure**	117	121	134	116	122	115	133	120	128	123
	Diastolic Pressure	77	59	78	57	75	63	81	71	76	75

	Arterial Pressure	90	80	97	76	91	80	98	87	94	91
Day 3	**Systolic Pressure**	121	129	120	146	138	130	108	122	105	113
	Diastolic Pressure	92	84	66	105	81	92	64	87	76	65
	Arterial Pressure	102	99	84	119	100	105	79	98	86	81
Day 276	**Systolic Pressure**	135	148	132	119	132	142	129	121	118	112
	Diastolic Pressure	99	83	75	54	78	86	72	62	61	50
	Arterial Pressure	111	104	94	104	96	105	91	82	80	70
Recovery Day 83	**Systolic Pressure**	140	114	134	118	144	126	95	118	101	120
	Diastolic Pressure	64	70	66	70	80	66	46	58	49	61
	Arterial Pressure	89	84	89	86	102	86	62	78	66	81

C3 Concentration (mg/dL, mean, Male only) , Day 1, Day 85, Day 267 and Day 274 :n=6/group, Recovery Day 82: n=3/group					
Dose (mg/kg) and ROA	**0**	**5 (IV)**	**50 (IV)**	**15 (SC)**	**60 (SC)**
Day 1	140	125	141	NA	126
Day 85	135	125	166*	NA	156
Day 267	138	129	176*	NA	172
Day 274	140	125	175*	NA	176*
Recovery Day 82	132	122	150	NA	140

Spleen : Organ Weight (g) and Organ/Brain Weight Ratio (%), mean										
Dose (mg/kg) and ROA	**0**		**5 (IV)**		**50 (IV)**		**15 (SC)**		**60 (SC)**	
Dosing Phase: n=3/sex/group	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Spleen Weight (g)	8.287	2.906	8.180	4.314	4.649	4.636	5.302	3.181	6.556	3.794

Spleen/Brain Weight Ratio (%)	11.299	4.800	12.569	6.954*	6.640	6.674*	7.898	4.843	9.898	6.247*
Recovery Phase: n=3/sex/group										
Spleen Weight (g)	5.569	2.923	8.515	4.420	5.497	4.236	7.107	2.993	5.666	2.130
Spleen/Brain Weight Ratio (%)	8.259	4.278	11.925	7.262	8.209	7.058	11.008	5.069	8.200	3.353

Microscopic Pathology Finding, Spleen, Increased Follicle Size - Incidence (Mean Severity)					
Dose (mg/kg) and ROA	**0**	**5 (IV)**	**50 (IV)**	**15 (SC)**	**60 (SC)**
Number of Animals (M/F) per Necropsy Timepoint	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Terminal (Study Day 277) Necropsy					
Spleen	- / -	- / -	3 (1.0) / 1 (0.3)	- / -	2 (0.7) / 1 (0.3)
Recovery (Study Day 360) Necropsy					
Spleen	- / -	- / 1 (0.3)	- / 1 (0.3)	- / -	1 (0.3) / -

Microscopic Pathology Finding, Lymph Node, Increased Follicle Size/Number - Incidence (Mean Severity)					
Dose (mg/kg) and ROA	**0**	**5 (IV)**	**50 (IV)**	**15 (SC)**	**60 (SC)**
Number of Animals (M/F) per Necropsy Timepoint	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Terminal (Study Day 277) Necropsy					
Dose (mg/kg) and ROA	**0**	**5 (IV)**	**50 (IV)**	**15 (SC)**	**60 (SC)**
Mandibular Lymph Node	- / -	1 (0.3) / 1 (0.3)	- / -	- / 1 (0.3)	- / 1 (0.3)
Axillary Lymph Node	- / -	- / 1 (0.3)	- / -	- / -	- / -
Recovery (Study Day 360) Necropsy					
Mandibular Lymph Node	- / -	- / 2 (0.7)	1 (0.3) / 1 (0.3)	- / -	- / 1 (0.3)
Axillary Lymph Node	- / -	- / 1 (0.3)	- / -	- / -	- / 1 (0.3)
Inguinal Lymph Node	- / -	- / 1 (0.3)	- / -	- / -	- / 1 (0.3)

Microscopic Pathology Finding, Thymus, Decreased Lymphocytes, Cortex and Medulla - Incidence (Mean Severity)					
Dose (mg/kg) and ROA	**0**	**5 (IV)**	**50 (IV)**	**15 (SC)**	**60 (SC)**
Number of Animals (M/F) per Necropsy Timepoint	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

Terminal (Day 277) Necropsy	2 (1.0) / 1 (0.3)	2 (3.0) / 2 (0.7)	3 (3.3) / 1 (0.3)	2 (1.7) / 0 (0.0)	2 (2.0) / 1 (0.7)
Recovery (Day 360) Necropsy	2 (1.0) / 1 (0.3)	2 (2.0) / 1 (0.3)	3 (2.0) / 1 (0.3)	3 (2.3) / 1 (0.3)	2 (2.0) / 1 (0.3)
Microscopic Pathology Finding, Testicular Stage-Dependent Spermatogenesis /Number – Incidence (Mean Severity)					
Dose (mg/kg) and ROA	**0**	**5 (IV)**	**50 (IV)**	**15 (SC)**	**60 (SC)**
Number of Animals (Male) Terminal (Day 277) Necropsy	3	3	3	3	3
Number of Normal	3	3	2	2	2
Degeneration, Germinal Epithelium, Marked	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.3)
Hypospermatogenesis, Minimal, focal	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
Hypospermatogenesis, Minimal, multifocal	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)
Number of Animals (Male) Recovery (Day 360) Necropsy	3	3	3	3	3
Number of Normal	3	3	2	3	3
Germ Cell Depletion, Mild	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)

ICH analysis of IgM and C3b depositions in the kidney Note: Only 3 males in each of the control group (0), the 50 mg/kg IV group, and the 60 mg/kg SC group.									
Dose (mg/kg) and ROA	**0**			**50 (IV)**			**60 (SC)**		
Number of Animals (Male)	3			3			3		
IgM	Bkg	Bkg	Bkg	Pos	Bkg	Bkg	Bkg	Bkg	BKG
C3b	Neg	Neg	Neg	Pos	Bkg	Pos	Bkg	Bkg	BKG

Microscopic Pathology Finding, Multiple Organs, Inflammation, Arterial (Organ, Severity)	
Terminal (Study Day 277) Necropsy	
Animal I64939 (50 mg/kg IV)	Nerve, sciatic, left, minimal Adrenal, cortex, minimal Thyroid, minimal Liver, minimal Gallbladder, minimal Kidney, moderate

	Stomach, GI, minimal Duodenum, minimal Ileum, minimal Colon, minimal Jejunum, minimal Cecum, minimal Pancreas, slight Tongue, minimal Prostate, minimal Seminal Vesicle, minimal Epididymis, minimal GI, lacrimal, minimal Heart, slight Spleen, minimal Lymph Node, Mesenteric, minimal Lymph Node, Axillary, minimal Thymus, minimal
Animal I64941 (50 mg/kg IV)	Kidney, slight Pancreas, minimal Heart, minimal
Recovery (Study Day 360) Necropsy	
Animal I64936 (5 mg/kg IV)	Eye, minimal
Animal I64944 (50 mg/kg IV)	Kidney, minimal Duodenum, minimal Jejunum, minimal Cecum, minimal Pancreas, minimal
Animal I64955 (60 mg/kg SC)	Liver, minimal Kidney, minimal Cecum, minimal Heart, slight Artery, other, minimal

2.6.7.8　遺伝毒性試験

In accordance with ICH S6 (R1; 2011), genotoxicity testing of anifrolumab has not been conducted as it is not applicable to biotechnology derived large protein products. Anifrolumab is a large protein molecule that is not expected to cross the nuclear or mitochondrial membrane and to interact directly with DNA or other chromosomal material inside the nucleus. Anifrolumab is a monoclonal antibody composed entirely of naturally occurring amino acids and contains no inorganic or synthetic organic linkers or other non-protein portions. Thus, it is highly unlikely that anifrolumab would react directly with DNA or other chromosomal material, and since anifrolumab is a large protein molecule, it is not expected to cross the nuclear or mitochondrial membranes. According to the current guidelines on the preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals (ICH S6 R1, 2011), the range and type of standard studies evaluating genotoxicity routinely conducted for pharmaceuticals are not applicable for biotechnology-derived pharmaceuticals such as anifrolumab. Therefore, no studies evaluating the genotoxic or mutagenic potential of anifrolumab have been conducted.

2.6.7.9　　がん原性試験

In the repeat IV or SC dose nonclinical studies of up to 39 weeks dose length, anifrolumab showed no evidence of proliferative or pre-neoplastic effects in cynomolgus monkeys. For a detailed carcinogenicity assessment see Section 2.6.6.5. In summary, AstraZeneca considers the existing literature from studies with IFNAR1- and IFNAR2-deficient mice and mice administered IFN α/β and anti-IFN-α/β antibodies, including the MAR1-5A3 antibody (representing the available models to AstraZeneca for anifrolumab carcinogenicity risk assessment) to characterize carcinogenic potential of IFNAR1 blockade in rodents (these models generally demonstrated that IFNAR blockade increased carcinogenic potential in rodents). Performance of additional in vivo studies with these reagents were considered unlikely to significantly impact the conclusions of current experimental results. In this case potential hazard can best be addressed by monitoring for development of malignancies in clinical studies, product labelling, and risk management practices without performing additional in vivo studies in animal models (ICH S6 (R1), 2011).

2.6.7.10　　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

No nonpivotal reproductive and development toxicity studies were conducted with anifrolumab.

2.6.7.11　　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

No development toxicity studies with anifrolumab were conducted to evaluate early embryonic development to implantation as it is not practical to do via mating studies in cynomolgus monkeys (Chellman et al 2009; Martin et al 2009). Instead, indirect measurements of fertility in sexually mature cynomolgus monkeys were included as a component of the 9-month (39-week) IV and SC toxicity study (see Report 7140-129). The female indirect fertility assessments included menses cycle, organ weights (pituitary, ovaries and uterus), macroscopic and histopathology (pituitary, ovaries, uterus, cervix, vagina, and mammary gland). No adverse anifrolumab-related findings were noted in fertility assessment parameters.

The male indirect fertility assessments included endpoints (semen analysis, spermatogenesis staging, organ weights (pituitary, prostate, seminal vesicles, epididymis), macroscopic and histopathology (prostate, seminal vesicles, epididymis, testes, and mammary gland). No statistically significant or biologically meaningful differences were noted for any sperm evaluation parameter at any time point (ejaculate or necropsy). There were microscopic pathology testicular findings noted for 2 anifrolumab-treated males (a single 60 mg/kg male at the terminal necropsy, and a single 50 mg/kg male at the recovery necropsy). Associated data for these two males argues against these testicular findings being attributed to anifrolumab.

2.6.7.12　　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

No stand-alone embryofetal development studies were conducted with anifrolumab. The potential for anifrolumab embryofetal effects were evaluated as a component of the pre- and postnatal development study.

2.6.7.13　　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Assessment of pre- and post-natal development was conducted (see Report [redacted].263.11) following every other week IV anifrolumab infusion (30 or 60 mg/kg) to pregnant cynomolgus monkeys from Gestation Day 20 through approximately Lactation Day 28 (3 doses during the lactation period). There were no adverse anifrolumab-related effects in maternal animals or infants. The NOAEL was considered to be 60 mg/kg.

被験物質：アニフロルマブ

Location in CTD：4.2.3.5.3.

表 6　　生殖発生毒性試験 – 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Species: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing:** Every 2 weeks from GD20 through approximately LD 5-41 (3 doses during the lactation period) for total 1 to 14 doses.		**Study Number:** [redacted].263.11
Initial Age: 3.7 to 10.6 years on GD 1.	**Duration of Post dose:** Approximately 6 months.		**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Necropsy Dates:** Infants on BD 209-214		
No-Observed-Adverse-Effect-Level: 60 mg/kg/dose	**Method of Administration:** IV infusion	**Vehicle/Formulation:** 10 mM histidine, 2.35% lysine and 0.02% polysorbate 80, pH 6.0.	

Parameters Evaluated: Maternal toxicity assessment was based on clinical signs, changes in qualitative food consumption and body weights, viability, growth and fetal heart rate measurements (via ultrasound), and gestation length. Maternal blood samples were collected for TK, ADA, hematology coagulation and serum chemistry, and peripheral lymphocyte immunophenotyping. The pregnant females delivered their infants by natural birth. Breast milk samples were also collected for TK analysis. For approximately 6 months postpartum, the adult females and infants were evaluated for changes in clinical signs, body weight, and/or other parameters. Infants were maintained with their mothers for the entire postnatal period, and the mothers were released from the study once their infant was no longer on study.

Infant evaluations included: clinical condition at birth (viability, gender, and external formation), clinical signs, body weights, external linear measurements (head width, head circumference, distance between the eyes, crown-rump length, tail length, chest circumference, paw and foot length, and ano-genital distance), behavioural assessment, heart rate, functional development (pupil reflex, Preyer reflex, pain response, and grip strength), ophthalmology, and skeletal development by radiographs. Blood samples from the infants were collected at various time points for clinical pathology (hematology, coagulation and serum chemistry) parameters, TK and ADA formation analyses. Postnatal immunological assessments were conducted, including T cell dependent antibody (IgM and IgG) response (TDAR) to KLH and peripheral lymphocyte immunophenotyping (flow cytometry). Infants were sacrificed on Birth Day (BD) 211 ± 2, organ weights were measured, and macroscopic and histopathology (including lymphoid organs spleen, thymus, and lymph nodes)

examinations were conducted. Infants were sacrificed on BD 211 ± 2, organ weights were measured, and macroscopic and histopathology (including lymphoid organs spleen, thymus, and lymph nodes) examinations were conducted.

Noteworthy Findings: There were no anifrolumab-related adverse maternal, fetal, or infant effects. Two maternal animals in the 60 mg/kg group were euthanized on the day of emergency caesarean section due to dystocia (breech deliveries) but there were no macroscopic changes observed for these maternal animals and their foetuses. These events were considered incidental and unrelated to anifrolumab.

Exposure to anifrolumab had no abortifacient effect. Overall fetal loss (in utero fetal death and abortion before/on GD135) was 1 of 66 (6.3%), 5 of 17 (29.4%), and 3 of 16 (18.8%) females in the control, 30 and 60 mg/kg/week groups, respectively. Eight of the nine fetal losses occurred before GD50, the period where the incidence of spontaneous embryo-fetal loss is the highest (Fujimoto et al 1983) and the timeframe where anifrolumab exposure to the fetus is anticipated to be the lowest. Although the fetal loss in the 30 mg/kg group was higher than in the controls and in the 60 mg/kg group, it was within the historical average or range for the Testing Facility (mean ±SD for overall historical control incidence 14.2 ± 10.2%, historical control range minimum to maximum range 0.0 to 33.3%).

There were no anifrolumab-related effects on gestation length or pregnancy/postpartum outcomes that were considered related to maternal administration. Combined fetal/infant losses for the anifrolumab-treated groups were comparable to the historical control range for the Testing Facility and within expected outcomes for live-birth studies of this type in cynomolgus monkeys.

In infants, there were no anifrolumab-related changes in clinical observations, body weights, survival, or in parameters of functional and morphological development including skeletal findings, behavioral assessment, anti-KLH antibody assay, hematology, serum chemistry, or flow cytometry analysis parameters. The performed immune assessments were within normal limits for infant cynomolgus monkeys (KLH immunization IgM and IgG titer values, peripheral blood immunophenotyping, hematology analyses, and lymphoid organ histopathology [spleen, thymus, and lymph nodes]). One infant in the control group was euthanized on DB16, and 2 infants in the 60 mg/kg group died on DB1, but there were no test article-related macroscopic changes observed for these infants. All these post-birth events were considered incidental and unrelated to test article administration.

Dose (mg/kg)/ROA	**0/IV**	**30/IV**	**60/IV**
Maternal Animals			
Number of Animals (F)	17(16)[a]	17	16
TK Parameters[b]			
Dose 1 (GD 20) C_{max} (Mean µg/mL±SD)	NA	886 ± 206	1820 ± 350
Dose 1 (GD 20) AUC_{0-14d} (Mean µg·d/mL±SD)	NA	5410 ± 1030	11300 ± 1920

Dose (mg/kg)/ROA	0/IV	30/IV	60/IV
Dose 9 (GD 132) Cmax (Mean µg/mL±SD)	NA	1180 ± 255	2230 ± 276
Dose 9 (GD 132) AUC_{0-14d} (Mean µg·d/mL±SD)	NA	9570 ± 2550	19000 ± 2820
Last dose (lactation period) Cmax (Mean µg/mL±SD)	NA	1270 ± 368	2380 ± 3270
Last dose (lactation period) AUC0-14d (Mean µg·d/mL±SD)	NA	9420±2370	20900±3270
Adult Female Milk			
LD25-30 Mean (Mean µg·d/mL±SD)	NA	1.65 ± 0.89	4.50 ± 1.35
Adult Female Serum			
LD28-30 Mean (Mean µg·d/mL±SD)	NA	447 ± 116	1020 ± 270
Infant Serum			
DB30 Mean (Mean µg·d/mL±SD)	NA	18.9 ± 12.3	98.6 ± 60.4
Embryo-fetal losses			
Ratio (Percent)	1/16 (6.3%)	5/17 (29.4%)	3/16 (18.8%)
Test Facility Historical Control Percent Data (Mean µg·d/mL±SD and Range	14.2 ± 10.2 (0.0-33.3%)		
Gestation Length			
Mean (Range)	158 (148-166)	158 (146-164)	159 (146-177)
Stillbirth			
Ratio (Percent)	3/15 (20.0%)	2/12 (16.7%)	3/13 (23.1%)

2.6.7.14　　幼若動物を用いた試験

Studies in juvenile animals were not conducted.

2.6.7.15　　局所刺激性試験

Local Tolerance was assessed by clinical (dermal Draize scoring), macroscopic and histological evaluation of anifrolumab infusion/injection sites during the single (see Report 7140-142) and repeat (see Reports [redacted].263.01 and 7140-129) dose toxicity studies (see Sections 2.6.6.2 and 2.6.6.3). No anifrolumab-related adverse changes were observed at the sites of infusion/injection.

2.6.7.16　その他の毒性試験：組織交差反応性試験

被験物質：アニフロルマブ

Location in CTD：4.2.3.7.7.2

表 7　正常ヒト組織におけるアニフロルマブの組織交差反応性試験

Report Title: Cross-Reactivity Study of MEDI-546-Alexa Fluor488 with Normal Human Tissues		
Study Number: IM1595	**Test Article:** Anifrolumab	**Species:** In vitro/human tissue
Number of Doses: NA	**Route of Administration:** NA	**GLP Compliance:** Yes
Study Objectives: To evaluate the potential cross-reactivity of anifrolumab with cryosections of normal human tissues		
Number of Donors per Tissue: 3	**Concentration of anifrolumab:** 2 and 10 μg/mL	
Noteworthy findings: Anifrolumab-specific staining on human tissues was present in epithelium, endothelium, mesothelium, mononuclear cells, spindloid/dendritic cells, and intravascular and leaked proteinic material (serum) throughout the tissue panels examined. Anifrolumab also stained myenteric plexi in the gastrointestinal tract, glomerular tuft cells in the kidney, granulosa cells in the ovary, beta cells in the pancreas, chief cells of the parathyroid, endocrine cells and pituicytes in the pituitary, decidual cells in the placenta, and spermatogenic cells in the testis. The distribution of anifrolumab-specific staining on the panel of human tissues was consistent with published reports of broad expression of IFNAR in tissues.		

GLP = Good Laboratory Practice; NA = not applicable; MEDI-546 = anifrolumab.

被験物質：アニフロルマブ

Location in CTD：4.2.3.7.7.1

表 8　　正常カニクイザル組織におけるアニフロルマブの組織交差反応性試験

Report Title: Cross-Reactivity Study of MEDI-546-Alexa Fluor488 with Normal Cynomolgus Monkey Tissues		
Study Number: IM1596	**Test Article:** Anifrolumab	**Species:** In vitro/cynomolgus monkey tissue
Number of Doses: NA	**Route of Administration:** NA	**GLP Compliance:** Yes
Study Objectives: To evaluate the potential cross-reactivity of anifrolumab with cryosections of normal cynomolgus monkey tissues		
Number of Donors per Tissue: 3	**Concentration of anifrolumab:** 2 and 10 μg/mL	
Noteworthy findings: Anifrolumab-specific staining was present in epithelium, endothelium, mesothelium, mononuclear cells, spindloid/dendritic cells, and intravascular and leaked proteinic material (serum) throughout the cynomolgus monkey tissue panel examined. Anifrolumab also stained myenteric plexi in the gastrointestinal tract, Meissner's plexi in the esophagus, glomerular tuft cells in the kidney, granulosa cells in the ovary, beta cells in the pancreas, chief cells of the parathyroid, endocrine cells and pituicytes in the pituitary, decidual cells in the placenta, and spermatogenic cells in the testis. The observed anifrolumab staining of cynomolgus monkey tissues is consistent with published reports of broad expression of IFNAR in tissues, and further supported the cynomolgus monkey as a relevant toxicology model.		

GLP = Good Laboratory Practice; NA = not applicable, MEDI-546 = Anifrolumab.

2.6.7.17　参考文献

Chamanza et al 2006
Chamanza R, Parry NM, Rogerson P, Nicol JR, Bradley AE. Spontaneous lesions of the cardiovascular system in purpose-bred laboratory nonhuman primates. Toxicologic pathology. 2006;34(4):357-63.

Chellman et al 2009
Chellman GJ, Bussiere JL, Makori N, Martin PL, Ooshima Y, Weinbauer GF. Developmental and reproductive toxicology studies in nonhuman primates. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2009 Dec;86(6):446-62.

Fujimoto et al 1983
Fujimoto K, Terao K, Cho F, Honjo S. Immunoglobulins and measles antibody in sera of newborn cynomolgus monkeys and in milk of their mothers. Jpn J Med Sci Biol. 1983 Aug;36(4):209-14.

Martin et al 2009
Martin PL, Breslin W, Rocca M, Wright D, Cavagnaro J. Considerations in assessing the developmental and reproductive toxicity potential of biopharmaceuticals. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2009 Jun;86(3):176-203.