目次

略号一覧表 2
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 化学構造 4
2.6.1.2 製剤処方 5
2.6.1.3 薬理学的特徴 5
2.6.1.4 効能・効果及び用法・用量 5
2.6.1.5 参考文献一覧 5

表

表 2.6.1.2-1　製剤処方（150 mg/mL） 5

図

図 2.6.1.1-1　Lanadelumab のアミノ酸配列 4

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
APTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC	area under the drug concentration-time curve	濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-last}}$	area under the concentration-time curve from time zero to the last observed concentration	0 時点から最終測定時点までの濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}168}$	area under the concentration-time curve from time zero to 168hr	0 時点から投与後 168 時間までの濃度－時間曲線下面積
C1-INH	C1-inhibitor	C1 インヒビター
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CDR	complementary determining region	相補決定領域
cHMWK	cleaved high molecular weight kininogen	切断型高分子キニノーゲン
C_{max}	maximum concentration	最高濃度
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ECG	electrocardiogram	心電図
ECL	electrochemiluminescent	電気化学発光
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	サンドイッチ酵素免疫測定法
ePPND	enhanced pre- and postnatal development	拡張型出生前及び出生後の発生
Fab	fragment antigen-binding	抗原結合フラグメント
Fc	fragment crystallizable	結晶化可能フラグメント
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価（法）
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
HAE	hereditary angioedema	遺伝性血管性浮腫
hERG	human ether-a-go-go related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HMWK	high molecular weight kininogen	高分子キニノーゲン
HRP	horseradish peroxidase	ホースラディッシュペルオキシダーゼ
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	ヒト臍帯静脈内皮細胞
ICH	International Council for Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
Ind#	individual number	個体番号
IP	intraperitoneal	腹腔内
IV	intravenous	静脈内
IVT	intravitreal	硝子体内（眼内）
K_D	dissociation constant	解離定数
K_i	inhibition constant	阻害定数
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
MSD	Meso Scale Discovery	メソスケールディスカバリー（社名）
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構

略号一覧表（続き）

略号	略していない表現又は説明	
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
pKal	plasma kallikrein	血漿カリクレイン
QTcB	Bazett's corrected QT	Bazett 式による心拍数に対する補正 QT
RLU	relative light unit	平均相対発光量
SC	subcutaneous	皮下
SD	Sprague-Dawley	－
SD	standard deviation	標準偏差
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動
SPEAD	solid phase extraction with acid dissociation	酸解離による固相抽出
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティク（ス）
T_{max}	time to reach C_{max}	最高濃度到達時間

2.6.1 緒言

Lanadelumab（TAK-743、DX-2930 及び SHP643）は、血漿カリクレイン（pKal）を標的とする遺伝子組換え完全ヒト型免疫グロブリン G1 κ 軽鎖モノクローナル抗体であり、チャイニーズハムスター卵巣細胞で産生される。Lanadelumab は、マウス、ラット、カニクイザル及びヒトの活性型 pKal の蛋白分解活性を強力かつ特異的に阻害する。Lanadelumab は、遺伝性血管性浮腫（HAE）における血管性浮腫発作の抑制薬として開発中であり、臨床予定投与経路は皮下投与である。

2.6.1.1 化学構造

アミノ酸配列に基づく lanadelumab の分子量は 145,716 Da である。還元型軽鎖の分子量は 23,424 Da、脱グリコシル化した還元型重鎖の分子量は 49,450 Da である。

Lanadelumab の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を図 2.6.1.1-1 に示す。アミノ酸配列は、発現ベクター内で確認された DNA 配列の翻訳に基づいた。重鎖配列の太字及び下線を引いたアスパラギン残基（N302）は、Asn-X-Thr/Ser コンセンサス配列に基づく N-グリコシル化の予測部位である[1]。

Light Chain（分子量：23,424 Da）
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Heavy Chain（分子量：49,450 Da）
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITV
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWGQGTM
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

国際一般名：Lanadelumab
開発コード：TAK-743
その他の名称：DX-2930、SHP643
CAS 登録番号：1426055-14-2

分子量:145,716 Da。還元型軽鎖の分子量は 23,424 Da である。脱グリコシル化した還元型重鎖の分子量は 49,450 Da である。

図 2.6.1.1-1　Lanadelumab のアミノ酸配列

2.6.1.2 製剤処方

製剤処方を表 2.6.1.2-1 に示す。

表 2.6.1.2-1　製剤処方（150 mg/mL）

有効成分	lanadelumab 原薬（150 ± 15 mg/mL）
原薬用緩衝液	リン酸水素二ナトリウム二水和物〔5.3 mg/mL(a)〕 クエン酸一水和物〔4.1 mg/mL(a)〕 L-ヒスチジン〔7.8 mg/mL(a)〕 塩化ナトリウム〔5.3 mg/mL(a)〕 ポリソルベート 80（0.1 mg/mL） 注射用水（1 mL まで適量）

(a)　数値は原薬製造時の規格値に基づく理論値。

2.6.1.3 薬理学的特徴

Lanadelumab は pKal の阻害薬である。

HAE の発作を引き起こすメカニズムは完全には解明されていないが、HAE の様々な治療法は、カリクレイン・キニン系の重要な構成要素を特定することで進められている。HAE 発作発現の主要な原因として、pKal の制御不全が挙げられている[2]。

C1 インヒビター（C1-INH）は、pKal 活性の他、C1r、C1s、活性型第 XI 因子及び活性型第 XII 因子などさまざまなのプロテアーゼに対しても調節作用を有する[3]。I 型及び II 型の HAE 患者では、C1-INH 欠損により pKal 産生の制御が困難となり[2]、その結果、pKal が高分子キニノーゲン（HMWK）に作用して、強力な血管拡張作用を持つブラジキニンを遊離させる。ブラジキニンが内皮細胞表面のブラジキニン B2 受容体に結合することにより血管漏出が生じ、腫脹が惹起される。したがって、pKal 阻害薬によるブラジキニン産生の阻害は、HAE に対する合理的な治療法である。pKal が HAE の治療における標的として重要であることは、pKal を阻害するアミノ酸 60 残基からなる遺伝子組換えペプチド阻害薬 Kalbitor®（ecallantide）が、急性 HAE 発作の治療薬として米国で承認されていることからも裏付けられている[4]。

Lanadelumab は、pKal の蛋白分解活性に対する強力かつ特異的な阻害薬であり、HAE 患者における消失半減期は約 14 日間と長く、pKal の抑制が長期にわたることから、HAE 患者における発作の抑制が期待されている。

2.6.1.4 効能・効果及び用法・用量

Lanadelumab は、海外において、12 歳以上の HAE 患者における血管性浮腫発作の抑制薬として、300 mg を 2 週に 1 回皮下投与（無発作など 6 ヵ月以上良好に管理された患者では 4 週に 1 回皮下投与）で承認されている。

本申請で予定している国内の効能・効果及び用法・用量を 2.2 に記載した。

2.6.1.5 参考文献一覧

[1] Solá RJ, Griebenow K. Glycosylation of therapeutic proteins: An effective strategy to optimize efficacy. BioDrugs. 2010;24(1):9-21.

[2] Zuraw BL, Christiansen SC. HAE pathophysiology and underlying mechanisms. Clinic Rev Allerg Immunol. 2016;51:216-29.

[3] Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-Esterase inhibitor: An anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. Pharmacol Rev. 2000;52(1):91-112.

[4] Martello JL, Woytowish MR, Chambers H. Ecallantide for treatment of acute attacks of hereditary angioedema. Am J Health-Syst Pharm. 2012;69:651-7.

目次

略号一覧表 3
2.6.2 薬理試験の概要文 5
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.2.1 In vitro 薬理試験 7
2.6.2.2.2 In vivo 薬理試験 14
2.6.2.3 副次的薬理試験 17
2.6.2.4 安全性薬理試験 19
2.6.2.4.1 中枢神経系 20
2.6.2.4.2 心血管系及び呼吸系 21
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 24
2.6.2.6 考察及び結論 25
2.6.2.7 参考文献一覧 26

表

表 2.6.2.2-1 異なる動物種の血漿カリクレインに対する lanadelumab の阻害作用 8
表 2.6.2.2-2 ラットカラゲニン誘発足蹠浮腫モデルの試験デザイン 15
表 2.6.2.2-3 カラゲニン処置ラットに lanadelumab を投与後の血清中 lanadelumab 濃度 17
表 2.6.2.3-1 副次的薬理試験の概要 17
表 2.6.2.3-2 Lanadelumab のヒトプロテアーゼ阻害の特異性 18
表 2.6.2.3-3 Fc 受容体及び C1q に対する lanadelumab の解離定数 19
表 2.6.2.4-1 安全性薬理試験の概要 20

図

図 2.6.2.1-1 血漿カリクレイン・キニン系 6
図 2.6.2.2-1 Lanadelumab による血漿カリクレイン阻害の特性評価 7
図 2.6.2.2-2 異なる種類の血漿カリクレインに対する lanadelumab の結合 8
図 2.6.2.2-3 pKal-lanadelumab Fab 複合体の X 線結晶構造 9
図 2.6.2.2-4 Lanadelumab の重鎖 CDR3 と血漿カリクレインの活性部位との結合 10
図 2.6.2.2-5 ヒト血漿における血漿カリクレインの阻害 11
図 2.6.2.2-6 Lanadelumab を投与したラットから採取した血漿における lanadelumab の生物活性 13
図 2.6.2.2-7 Lanadelumab を投与したカニクイザルから採取した血漿中 lanadelumab の生物活性 14

図 2.6.2.2-8 Lanadelumab のカラゲニン誘発足蹠浮腫に及ぼす作用 （腹腔内、カラゲニン処置 30 分前投与） 16
図 2.6.2.2-9 Lanadelumab のカラゲニン誘発足蹠浮腫に及ぼす作用 （皮下、カラゲニン処置 24 時間前投与） 16

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
APTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC	area under the drug concentration-time curve	濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-last}}$	area under the concentration-time curve from time zero to the last observed concentration	0 時点から最終測定時点までの濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}168}$	area under the concentration-time curve from time zero to 168hr	0 時点から投与後 168 時間までの濃度－時間曲線下面積
C1-INH	C1-inhibitor	C1 インヒビター
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CDR	complementary determining region	相補決定領域
cHMWK	cleaved high molecular weight kininogen	切断型高分子キニノーゲン
C_{max}	maximum concentration	最高濃度
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ECG	electrocardiogram	心電図
ECL	electrochemiluminescent	電気化学発光
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	サンドイッチ酵素免疫測定法
ePPND	enhanced pre- and postnatal development	拡張型出生前及び出生後の発生
Fab	fragment antigen-binding	抗原結合フラグメント
Fc	fragment crystallizable	結晶化可能フラグメント
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価（法）
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
HAE	hereditary angioedema	遺伝性血管性浮腫
HMWK	high molecular weight kininogen	高分子キニノーゲン
HRP	horseradish peroxidase	ホースラディッシュペルオキシダーゼ
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	ヒト臍帯静脈内皮細胞
ICH	International Council for Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
Ind#	individual number	個体番号
IP	intraperitoneal	腹腔内
IV	intravenous	静脈内
IVT	intravitreal	硝子体内（眼内）
K_D	dissociation constant	解離定数
K_i	inhibition constant	阻害定数
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MSD	Meso Scale Discovery	メソスケールディスカバリー（社名）
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態

略号一覧表（続き）

略号	略していない表現又は説明	
pKal	plasma kallikrein	血漿カリクレイン
QTcB	Bazett’s corrected QT	Bazett 式による心拍数に対する補正 QT
RLU	relative light unit	平均相対発光量
SC	subcutaneous	皮下
SD	Sprague-Dawley	－
SD	standard deviation	標準偏差
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動
SPEAD	solid phase extraction with acid dissociation	酸解離による固相抽出
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティク（ス）
T_{max}	time to reach C_{max}	最高濃度到達時間

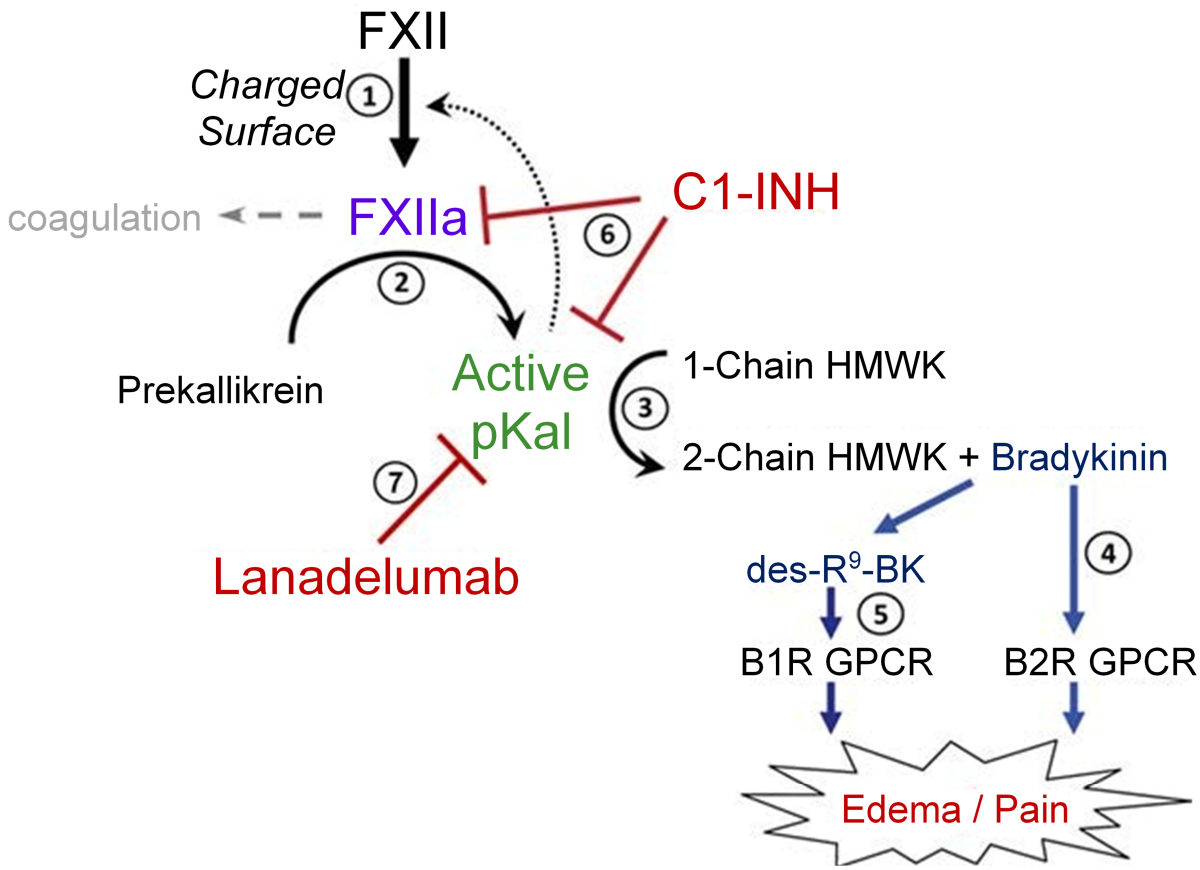
2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

Lanadelumab（TAK-743、DX-2930 及び SHP643）は、血漿カリクレイン（pKal）を標的とする遺伝子組換え完全ヒト型免疫グロブリン G（IgG）1 κ 軽鎖モノクローナル抗体（mAb）であり、チャイニーズハムスター卵巣細胞で産生される。Lanadelumab は、マウス、ラット、カニクイザル及びヒトの活性型 pKal の蛋白分解活性を強力かつ特異的に阻害する。Lanadelumab は、遺伝性血管性浮腫（HAE）における血管性浮腫発作の抑制薬として開発中であり、臨床予定投与経路は皮下（SC）投与である。

pKal は、主として可溶性酵素前駆体（プレカリクレイン）として血漿中を循環し、接触相が活性化すると内皮細胞と可逆的に結合するセリンプロテアーゼである[1]。pKal は、重要な接触因子であり、内因系経路を介して凝固を誘発し、血管作動性ペプチドであるブラジキニンを産生させる循環血漿蛋白質である（図 2.6.2.1-1）[2]。接触相の活性化は、外因性物質のカオリンやデキストラン硫酸など負に帯電した物質の表面上に第 XII 因子（ハーゲマン因子）、高分子キニノーゲン（HMWK）及びプレカリクレインが集合することにより起こる。この経路における内因性の接触相活性化物質は十分に解明されていない[3]。接触相の活性化は、第 XII 因子が活性型へ変換することにより惹起される。第 XII 因子は負に荷電した表面に結合した後、ゆっくりと自己活性化し、生じた活性型第 XII 因子がプレカリクレインを活性型 pKal に変換する。活性型 pKal は第 XII 因子の活性型への変換を促進し、接触相活性化の速度及び程度を増幅し、最終的に強力な炎症誘発性ノナペプチドであるブラジキニンの産生及び切断型高分子キニノーゲン（cHMWK）の増加を誘発する。ブラジキニン B1 受容体及びブラジキニン B2 受容体の活性化は、pKal のキニノゲナーゼ活性の下流で起こり、炎症、疼痛及び浮腫などの病態生理学的事象と関連している[4]。また、活性型第 XII 因子は第 XI 因子を活性型に変換するが、その結果として内因系経路を介した凝固が始まる。この反応は活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）を指標に ex vivo でモニターできる凝固経路である[5]。第 XII 因子、HMWK 又はプレカリクレインの遺伝的欠損がある場合、APTT 値の延長がみられるが、出血、血栓症又はその他の臨床症状のリスクは増大しない[6][7][8]。したがって、接触相の活性低下による APTT 延長は臨床的に重要ではないと考えられる[9]。

接触相の活性化及び同時に生じる pKal 介在性のブラジキニン産生が、pKal 活性を負に調節する血漿中のプロテアーゼである C1 インヒビター（C1-INH）の欠損又は機能低下を伴う HAE 患者だけでなく、C1-INH が正常な HAE 患者の病態に関与することが報告されている[10][11][12][13])。ブラジキニンは in vivo では半減期が 30 秒未満と短く、生体試料中での検出が困難であることから、接触相活性化のバイオマーカーとしては、pKal 活性により産生される cHMWK が使用されている[11][12][14]。



出典：Kenniston JA et al. J Biol Chem, 2014;289:23596[15]を改変
BK：ブラジキニン、B1R：ブラジキニン B1 受容体、B2R：ブラジキニン B2 受容体、C1-INH：C1 インヒビター、FXII：第 XII 因子、GPCR：G 蛋白質共役受容体、HAE：遺伝性血管性浮腫、HMWK：高分子キニノーゲン、pKal：血漿カリクレイン、R：アルギニン
備考：血漿カリクレイン・キニン系（又は接触相）の反応は、（1）負に荷電した表面と接触する。（2）酵素前駆体である FXII の自己活性化で開始され、プレカリクレインが活性型 pKal に変換される。（3）この活性型 pKal により HWMK が切断され、切断型 HMWK（2 本鎖 HMWK）及びブラジキニンが産成される。また、pKal はさらに FXII を活性化し（点線矢印）、活性型 FXII は内因系経路を介して凝固反応を惹起する（破線矢印）。（4）ブラジキニンは B2R に結合して活性化する。（5）続いて血漿エキソプロテアーゼによる B1R の des-R^9-ブラジキニンが生成される。（6）活性型 pKal 及び活性型 FXII の内因性阻害因子である C1-INH が欠損した HAE 患者では、カリクレイン・キニン系の調節不全がみられる。（7）Lanadelumab は、プレカリクレインには結合せず、C1-INH の活性低下による HAE における pKal 制御を正常に回復させるように設計された、強力かつ特異的に pKal を阻害する完全ヒト型抗体であり、可逆的な阻害を受ける前に pKal の活性レベルを低下させると考えられる。

図 2.6.2.1-1　血漿カリクレイン・キニン系

Lanadelumab の生物活性を、ヒトの血漿並びに lanadelumab を投与したラット及びカニクイザルの血漿を用いた ex vivo アッセイで確認した。ラットでは、カラゲニン誘発足蹠浮腫の軽減により、lanadelumab の in vivo 生物活性が確認されている。Lanadelumab を最大 50 mg/kg の用量で週 1 回投与した場合、ラットの中枢神経系（4 週間）、カニクイザルの呼吸系（4 週間）及び心血管系（最長 6 ヵ月間）に対する有害な作用は認められなかった。以上より、lanadelumab は、頻回投与を必要としない SC 投与による発作抑制薬として、血管性浮腫患者に大きなベネフィットをもたらす可能性がある。

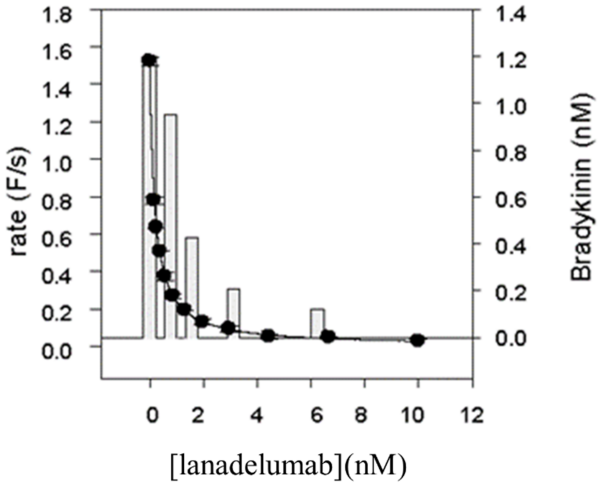
2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 In vitro 薬理試験

2.6.2.2.1.1 ヒト活性型血漿カリクレインに対する lanadelumab の阻害定数

：添付資料番号 4.2.1.1-1（評価）

Lanadelumab は pKal の蛋白質分解活性を強力かつ特異的に阻害する。In vitro では、lanadelumab による pKal 阻害により、ブラジキニン産生（棒グラフ）及び合成ペプチド基質の加水分解（黒丸）がいずれも低下した（図 2.6.2.2-1）。合成ペプチド基質である Pro-Phe-Arg-AMC のヒト pKal 介在性の加水分解に対する阻害定数（Ki）は 0.125 nM であった（ロット [redacted]）。



出典：4.2.1.1-1
ELISA：サンドイッチ酵素免疫測定法、HMWK：高分子キニノーゲン、Ki：阻害定数、pKal：血漿カリクレイン
備考：合成ペプチド基質（黒丸）の pKal 介在性の加水分解に対する Ki は 0.125 nM であった（ロット [redacted]）。阻害率は 1 秒あたりの蛍光単位（F/s）で表わす。棒グラフは、製造元（Peninsula Laboratories）の使用説明書に従って市販の ELISA を用いて測定した活性型 pKal による HMWK の切断で生じるブラジキニン産生の阻害を示す。

図 2.6.2.2-1　Lanadelumab による血漿カリクレイン阻害の特性評価

2.6.2.2.1.2 血漿カリクレイン阻害に関する lanadelumab の種間交差反応性

：添付資料番号 4.2.1.1-1（評価）

マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザルの血漿より調整した pKal の Ki を求めた（表 2.6.2.2-1）。マウスの pKal は市販の組換え酵素を使用し（R&D Systems）、ラット、ウサギ及びカニクイザルの pKal はそれぞれの血漿から精製した。Lanadelumab はマウス、ラット及びカニクイザルの血漿由来の pKal をナノモル以下で強力に阻害したが（表 2.6.2.2-1）、ウサギの血漿から精製した pKal に対する阻害作用は弱かった（Ki：14.1 nM）。ウサギの pKal に対する Ki は他の相同分子種の Ki と顕著に異なるため、その同一性を触媒ドメインの N 末端アミノ酸配列解析により確認した。得られた N 末端配列は、ウサギの pKal の予測アミノ酸配列と一致した。ウサギの肝臓の cDNA を用いてウサギの pKal の DNA 配列を確認した（4.2.1.1-1）。

表 2.6.2.2-1　異なる動物種の血漿カリクレインに対する lanadelumab の阻害作用

プロテアーゼ	Ki apparent（nM）
マウス血漿カリクレイン	0.30±0.02
ラット血漿カリクレイン	0.17±0.01
ウサギ血漿カリクレイン	14.1±2.1
カニクイザル血漿カリクレイン	0.069±0.005

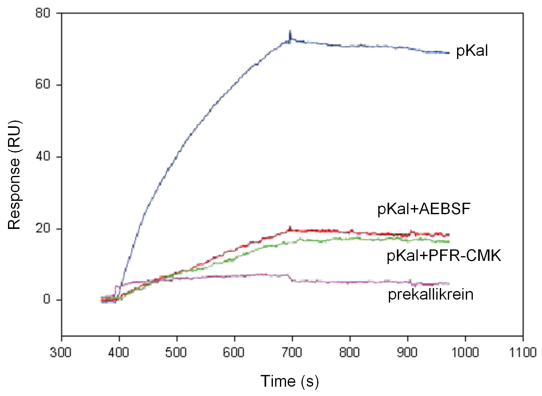
出典：4.2.1.1-1
Ki apparent　：見かけの阻害定数

2.6.2.2.1.3 血漿カリクレインに対する lanadelumab の結合部位の決定

：添付資料番号 4.2.1.1-1（評価）

表面プラズモン共鳴（SPR、Biacore）を用いて、pKal 上の lanadelumab 結合部位を検討した。共有結合で固定化した抗結晶化可能フラグメント（Fc）抗体で lanadelumab を固定し、異なる種類の pKal 又はプレカリクレインを表面に流した。図 2.6.2.2-2 に示すように、lanadelumab は活性型 pKal に結合するが、不活性な酵素前駆体であるプレカリクレインには結合しない。Lanadelumab は活性型 pKal のみに結合することから、HAE 患者の急性血管性浮腫の発作時に生じる活性型 pKal を阻害するために必要な血漿中 lanadelumab 濃度は、循環血中のプレカリクレインの総量（約 500 nM、[16]）を超えない。治療に必要な lanadelumab の血漿中濃度は約 30～110 nM と報告されている[17]。

Lanadelumab-Biacore に注入する前に、pKal を 4-（2-アミノエチル）ベンゼンスルホニルフルオリドや Pro-Phe-Arg-クロロメチルケトンなどの低分子の活性部位特異的共有結合阻害物質で不活性化すると、lanadelumab の pKal への結合は低下する（図 2.6.2.2-2）。これらの自殺型阻害物質はいずれも、pKal の活性部位セリンと共有結合複合体を形成する。このことから、lanadelumab のエピトープの重要な決定因子は pKal の活性部位を含むことが示唆される。

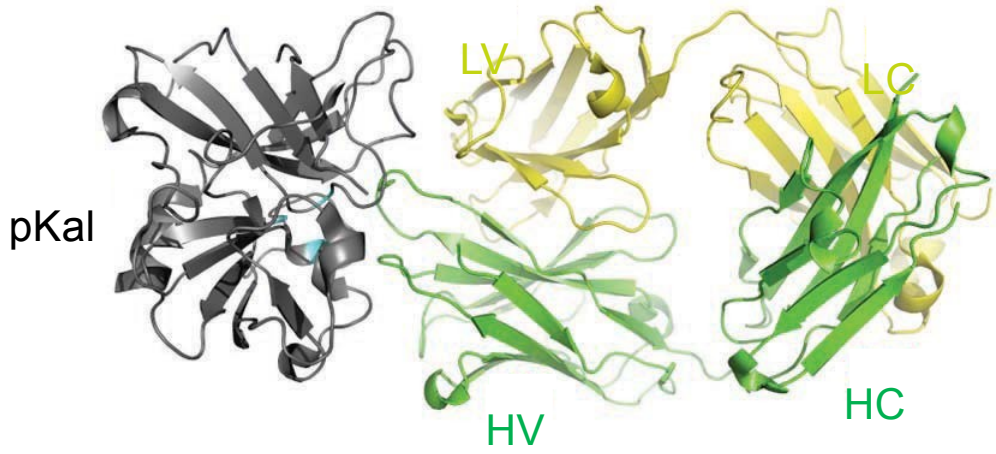


出典：4.2.1.1-1
AEBSF：4-（2-アミノエチル）ベンゼンスルホニルフルオリド、PFR-CMK：Pro-Phe-Arg-クロロメチルケトン、pKal：血漿カリクレイン、RU：表面プラズモン共鳴反応単位
備考：固定化抗 Fc 抗体を介して Biacore センサーチップ上に lanadelumab を固定した。表面上を流した以下の試料の表面プラズモン共鳴反応単位（RU）を示す、青：500 nM pKal、ピンク：500 nM プレカリクレイン、赤：AEBSF で不活化した 500 nM pKal、緑：PFR-CMK で不活化した 500 nM pKal。

図 2.6.2.2-2　異なる種類の血漿カリクレインに対する lanadelumab の結合

pKal 触媒ドメインと lanadelumab の遺伝子組換え抗原結合フラグメント（Fab）との間で形成される複合体の X 線結晶構造を図 2.6.2.2-3 に示す[18]。この構造解析には、lanadelumab の

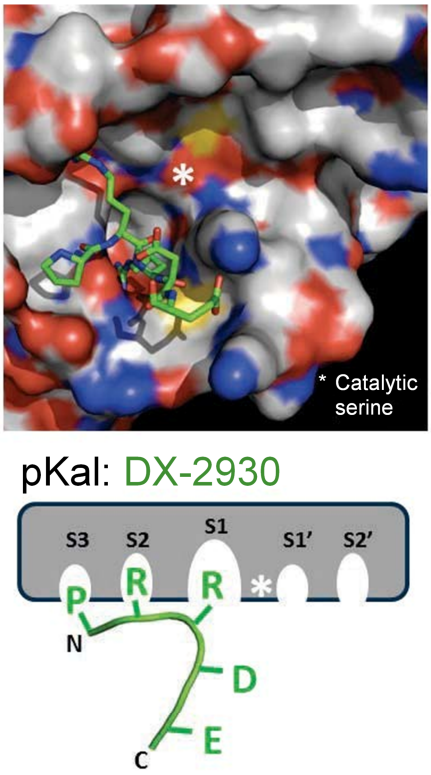
Fab と同じアミノ酸配列を含む Fab を使用した。この複合体の構造から、lanadelumab のエピトープには活性部位のアミノ酸及び活性部位近傍の残基が含まれることが示された。構造解析から、重鎖の相補決定領域（CDR）1 と CDR3 及び軽鎖の CDR2 の間で相互作用が認められた。図 2.6.2.2-4 に示すように、重鎖 CDR3 は、基質として lanadelumab の蛋白分解ができない向きで活性部位の S1 から S3 基質結合部位と相互作用する。この重鎖 CDR3 の pKal 活性部位への結合の方向が、lanadelumab が蛋白分解されずに活性酵素に対する特異的阻害活性を示す要因であると考えられた。ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）分析により、当量の lanadelumab と活性型 pKal をインキュベーションしても lanadelumab の蛋白分解が生じないことが示された。



出典：Kenniston JA et al. PEGS Meeting, 2013;[poster].[18]
Fab：抗原結合フラグメント、HC：重鎖定常領域、HV：重鎖可変領域、LC：軽鎖定常領域、LV：軽鎖可変領域、pKal：血漿カリクレイン
左：暗灰色の pKal リボン構造で青緑色の三環構造の触媒残基を有する。
中央及び右：lanadelumab の Fab 領域の HV 及び HC 領域のリボン構造を緑色で示し、LV 及び LC 領域を黄色で示す。
備考：X 線結晶構造解析で構造を決定した。

図 2.6.2.2-3　pKal-lanadelumab Fab 複合体の X 線結晶構造

Lanadelumab の Fab 領域を大腸菌に発現させ精製し、バキュロウイルスで産生したグリコシル化を防ぐための点突然変異を含むヒト pKal 触媒ドメイン変異体と複合体を形成した。得られた pKal:Fab 複合体をゲルろ過で精製し、ハンギング・ドロップ蒸気拡散法で結晶化した。回折データは Rigaku FR-E + SuperBright/Saturn 944+ CCD システムで収集した。図 2.6.2.2-3 に示す構造は、「ループレス」Fab モデルと pKal 触媒ドメインを用いた初期分子置換により 2.1 オングストロームの解像度で表している（蛋白質構造データバンク ID：2ANY）[15]。



出典：Kenniston JA et al. PEGS Meeting, 2013;[poster][18]
* ：触媒セリンの位置、青：窒素、緑：阻害薬の炭素、グレー：セリンプロテアーゼ、赤：酸素、黄：硫黄
DX-2930：lanadelumab、pKal：血漿カリクレイン
備考：lanadelumab の重鎖 CDR3 のスティックモデルと複合体を形成する pKal の 3 次元化描写（上パネル）。下の図は、pKal の S1 から S3 部位に結合し、その後触媒セリンから急激に離れる lanadelumab の重鎖 CDR3 の一部を示す。「N」及び「C」は結合したペプチドの N 末端及び C 末端を表す。

図 2.6.2.2-4　Lanadelumab の重鎖 CDR3 と血漿カリクレインの活性部位との結合

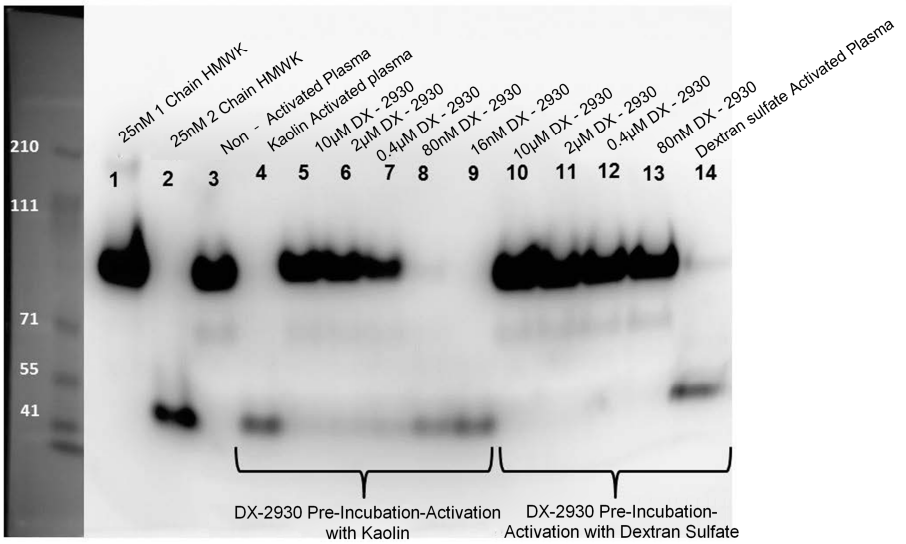
2.6.2.2.1.4 ヒト血漿中の lanadelumab の in vitro 生物活性

：添付資料番号 4.2.1.1-1（評価）

HAE 患者では、HAE 発作発現時に血漿 cHMWK レベルが上昇する[14]。cHMWK は接触相活性化のマーカーであり、HAE の有無にかかわらず、患者の血漿を in vitro でカオリンやデキストラン硫酸などの試薬で活性化させると上昇する[19][20]。カオリン及びデキストラン硫酸は、第 XII 因子の活性型への自己活性化を誘発し、活性型第 XII 因子がプレカリクレインを活性型 pKal に変換する。活性型 pKal は、インタクトな HMWK 蛋白質のドメイン 4 の 2 ヵ所で HMWK を切断し、生体活性ペプチドのブラジキニンと N 末端重鎖（64 kDa）及び C 末端軽鎖（46 kDa）間のジスルフィド結合からなる cHMWK の双方を遊離する[2]。

pKal による HMWK の切断を介した接触相の活性化を確認するために使用されているウェスタンブロット法を用いて、lanadelumab の pKal 阻害作用をクエン酸添加ヒト血漿中で検討した[10][11][21]。図 2.6.2.2-5 に示すように、SDS-PAGE ゲル上でウェスタンブロット法により検出したインタクトの HMWK は 71 kDa と 111 kDa の分子量マーカー間に移動する（レーン 1）。cHMWK の軽鎖は 41 kDa と 55 kDa の分子量マーカー間に移動する（レーン 2）。インタクトのキニノーゲンに相当するバンド（レーン 3）は、血漿にカオリン又はデキストラン硫酸を添加すると HMWK は切断され軽鎖 cHMWK が出現する（レーン 4 及び 14）。

Lanadelumab は、血漿中のカオリン又はデキストラン硫酸による HMWK の切断を用量依存的に阻害した。カオリンは、デキストラン硫酸よりも強力な接触相活性化物質である[21]。したがって、血漿を lanadelumab で前処理する場合、硫酸デキストランで活性化した血漿では、カオリンで活性化した血漿に比べて低用量で pKal 介在性の HMWK 切断が抑制される（図 2.6.2.2-5）。インタクトの 1 本鎖 HMWK の存在から明らかなように、カオリンが介在する HMWK の切断を抑制するには 0.4 µM 以上の lanadelumab が必要である。これに対し、デキストラン硫酸で活性化した血漿中の HMWK の切断は評価した最低濃度（80 nM）により阻害された。



出典：4.2.1.1-1
DX-2930：lanadelumab、HMWK：高分子キニノーゲン、PBS：リン酸緩衝生理食塩水、PVDF：ポリビニリデンジフルオライド、SDS-PAGE：ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動
備考：精製した 1 本鎖 HMWK（インタクト HMWK、レーン 1）又は 2 本鎖 HMWK（切断型 HMWK、レーン 2）をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で 25 nM（2.75 µg /mL）に希釈して分析した。レーン 3 は活性化処理を施していないクエン酸添加血漿。レーン 4 はカオリン処理（2 mg/mL、37°C で 10 分間）したクエン酸添加血漿。レーン 5～9 は、レーン 4 と同じカオリン処理の前に種々濃度の lanadelumab で 10 分間前処理した血漿。レーン 14 はデキストラン硫酸処理した血漿（15 µg /mL、37°C で 10 分間）。レーン 10～13 は、レーン 14 と同じデキストラン硫酸処理の前に種々濃度の lanadelumab で 10 分間前処理した血漿。クエン酸添加ヒト血漿試料はすべて、電気泳動前に PBS で 40 倍希釈した。すべての試料について、15 µL の試料と 5 µL の 4 倍希釈ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ローディングバッファー（Invitrogen）を混合し、その 10 µL について 3%～8%のアクリルアミド SDS-PAGE 上で電気泳動を行い、製造元の使用説明書（Invitrogen）にしたがってポリビニリデンジフルオライド（PVDF）膜に転写した。PVDF ブロットは、2%ウシ血清アルブミンでブロックし、1 µg /mL のマウスモノクローナル抗キニノーゲン軽鎖抗体（クローン 11H05）を適用して可視化した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗マウス二次抗体で検出した。

図 2.6.2.2-5　ヒト血漿における血漿カリクレインの阻害

2.6.2.2.1.5 ラット及びカニクイザルの血漿中における lanadelumab の ex vivo 生物活性
：添付資料番号 4.2.1.1-3（評価）

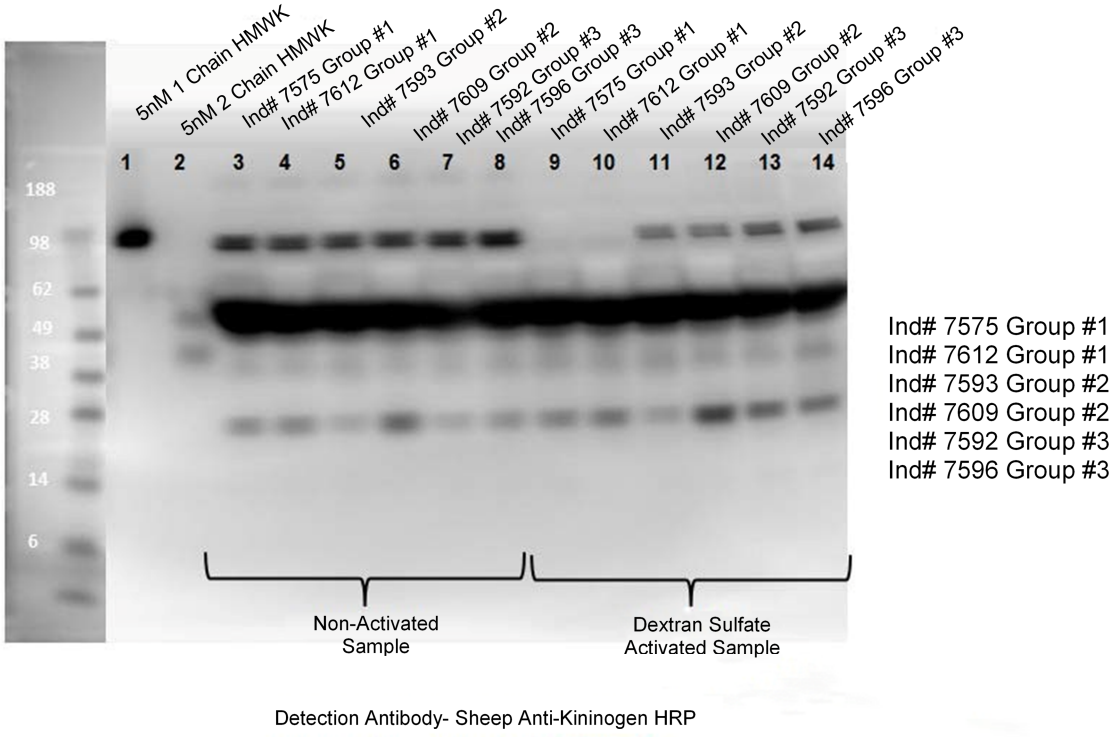
ウェスタンブロット法を用いて、ラット及びカニクイザルの血漿における pKal を介した HMWK の蛋白分解を測定した。このアッセイにより、lanadelumab を投与した動物の血漿における薬力学的生物活性を検出することができる。Sprague-Dawley（SD）ラット（4.2.3.1-1）及びカニクイザル（4.2.3.1-2）に lanadelumab を単回 SC 投与して得られた血漿試料中の生物活性を図 2.6.2.2-6 及び図 2.6.2.2-7 に示す。SD ラット（4.2.3.2-1）及びカニクイザル（4.2.3.2-2）

を用いた反復投与毒性試験でも、同様に採取した血漿試料で lanadelumab の生物活性が示された。

ウェスタンブロット法では、クエン酸添加血漿における接触相活性化後のインタクトの 1 本鎖 HMWK の残存量が lanadelumab の pKal 阻害活性と相関していた。ラット及びカニクイザルの血漿を用いた lanadelumab の阻害活性のアッセイは、検出にポリクローナル抗 HMWK 抗体を用いたことを除き、ヒト血漿を用いた pKal 活性の in vitro 阻害活性のアッセイと同様である。ヒト血漿で使用されるモノクローナル抗体はラットやカニクイザルの血漿と交差反応性を示さないため、ラット及びカニクイザルの血漿中の HMWK の分析にはポリクローナル抗 HMWK 抗体を使用した。

単回 SC 投与試験では、ラットに溶媒（第 1 群）、lanadelumab 25 mg/kg（第 2 群）又は 50 mg/kg（第 3 群）を投与し、接触相活性化物質であるデキストラン硫酸の存在／非存在下でウェスタンブロット法を使用して血漿試料中の HMWK の残存量を分析した（4.2.3.1-1）。インタクトの HMWK はラット血漿中で 98 kDa の分子量マーカー付近で検出された。使用したポリクローナル抗 HMWK 抗体はインタクトの HMWK に親和性が高いため、本アッセイでは切断された 2 本鎖 HMWK の出現よりも残存するインタクトの 1 本鎖 HMWK を測定した。例えば、5 nM の精製ヒト 1 本鎖 HMWK の方が 5 nM の精製ヒト 2 本鎖 HMWK（cHMWK）よりも強いバンドを示した（図 2.6.2.2-6 のレーン 1 及び 2）。使用したポリクローナル抗 HMWK 抗体は、49 kDa と 62 kDa の分子量マーカー（レーン 3～14 の強いバンド）間で検出されるラット血漿中の蛋白質と交差反応するため、切断された 2 本鎖 HMWK の特異的検出ができなかった。ポリクローナル抗 HMWK 抗体と交差反応した蛋白質の分子量は、低分子キニノーゲンや t-キニノーゲンなど別の形態のキニノーゲンの分子量に相当する。

図 2.6.2.2-6 に示すように、溶媒を投与したラット〔個体番号（Ind#）7575 及び Ind# 7612〕では、デキストラン硫酸による接触相活性化後の pKal を介した HMWK の蛋白分解が抑制されなかった（レーン 3 及び 4 の 98 kDa 分子量マーカー付近に移動するバンドの強度をレーン 9 及び 10 のバンドの強度と比較）。Lanadelumab 25 mg/kg を投与した第 2 群のラット（Ind#7593 及び Ind# 7609）では、デキストラン硫酸による接触相活性化後の pKal を介した HMWK の蛋白分解が一部抑制された（レーン 5 及び 6 の 98 kDa 分子量マーカー付近に移動するバンドの強度をレーン 11 及び 12 のバンドの強度と比較）。また、lanadelumab 50 mg/kg を投与した第 3 群のラット（Ind# 7592 及び Ind# 7596）では、デキストラン硫酸による接触相活性化後の pKal を介した HMWK の蛋白分解が一部抑制された（レーン 7 及び 8 の 98 kDa 分子量マーカー付近に移動するバンドの強度をレーン 13 及び 14 のバンドの強度と比較）。



出典：4.2.1.1-1、4.2.1.1-2、4.2.1.1-3
HMWK：高分子キニノーゲン、HRP：ホースラディッシュペルオキシダーゼ、Ind#：個体番号
備考：4.2.3.1-1 では、ラットに溶媒（第 1 群）、lanadelumab 25 mg/kg（第 2 群）又は 50 mg/kg（第 3 群）を単回 SC 投与した。このウェスタンブロットでは、以下の 6 例のラットの結果を示す：第 1 群（溶媒）の Ind# 7575 及び Ind# 7612、第 2 群（25 mg/kg）の Ind# 7593 及び Ind# 7609、及び第 3 群（50 mg/kg）の Ind# 7592 及び Ind# 7596。溶媒又は lanadelumab を単回投与し、4 日後にラットから血漿試料を採取した。各ラットから採取した試料に関して、接触相の活性化物質であるデキストラン硫酸で活性化した試料と処理しない試料を泳動した。ウェスタンブロット法は、HRP を結合したヒツジ抗ヒトキニノーゲンポリクローナル抗体を用いて確立した。分子量マーカーは、ブロットの左側に kDa 単位で表示する。

図 2.6.2.2-6　Lanadelumab を投与したラットから採取した血漿における lanadelumab の生物活性

単回 SC 投与試験において、カニクイザルに lanadelumab 25 mg/kg（第 1 群）又は 50 mg/kg（第 2 群）を投与した（4.2.3.1-2）。溶媒投与群を設定しない場合は、lanadelumab の投与前に血漿を採取した。図 2.6.2.2-7 に示すように、lanadelumab の投与前に採取したカニクイザルの血漿試料では、カオリンによる接触相活性化後の pKal を介した HMWK の蛋白分解は抑制されなかった（第 1 群のカニクイザル Ind# 6019 について、レーン 1 の 98 kDa 分子量マーカー付近のバンドの強度とレーン 7 のバンドの強度を比較）。カニクイザルに lanadelumab を単回投与後、2 及び 28 日に採取した血漿試料では、カオリンによる接触相活性化後の pKal を介した HMWK の蛋白分解が一部抑制された。第 1 群（Ind# 6019）では、lanadelumab 25 mg/kg を投与後 2 日に採取した血漿で pKal を介した HMWK の蛋白分解が一部抑制され、投与後 28 日に採取した血漿で HMWK に相当するバンドの強度が低下した。第 2 群（Ind# 6006）では、lanadelumab 50 mg/kg を投与後 2 日及び 28 日のいずれの時点の血漿でも、より強い HMWK に相当するバンドが認められた。