# 目次

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 ..... 3
2.6.1 緒言 ..... 3
2.6.1.1 新生血管を伴う加齢黄斑変性及び糖尿病黄斑浮腫における VEGF-A 及び Ang-2 の機能 ..... 3
2.6.1.1.1 新生血管を伴う加齢黄斑変性及び糖尿病黄斑浮腫の病態 ..... 3
2.6.1.1.2 抗 VEGF-A 療法 ..... 3
2.6.1.1.3 抗 VEGF-A 療法と抗 Ang-2 療法の併用 ..... 3
2.6.1.2 CrossMAb 技術による二重特異性抗体ファリシマブの創製 ..... 4
2.6.1.3 承認申請の概要 ..... 5
2.6.1.4 参考文献 ..... 5

# 図一覧

図 2.6.1.2-1 CrossMAb 技術による二重特異性抗体ファリシマブの創製 ..... 5

## 略語一覧

| 略語 | 英名 | 和名 |
|---|---|---|
| AMD | age-related macular degeneration | 加齢黄斑変性 |
| Ang-1 | angiopoietin-1 | アンジオポエチン-1 |
| Ang-2 | angiopoietin-2 | アンジオポエチン-2 |
| BRB | blood-retinal barrier | 血液網膜関門 |
| CNV | choroidal neovascularization | 脈絡膜新生血管 |
| DME | diabetic macular edema | 糖尿病黄斑浮腫 |
| DR | diabetic retinopathy | 糖尿病網膜症 |
| Fab | fragment antigen binding | 抗原結合フラグメント |
| FcRn | neonatal Fc receptor | 胎児性 Fc 受容体 |
| HUVEC | human umbilical vein endothelial cells | ヒト臍帯静脈内皮細胞 |
| IgG | immunoglobulin G | 免疫グロブリン G |
| MAb | monoclonal antibody | モノクローナル抗体 |
| nAMD | neovascular age-related macular degeneration | 新生血管を伴う加齢黄斑変性 |
| SPR | surface plasmon resonance | 表面プラズモン共鳴 |
| Tie-2 | tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2 | tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2 |
| VEGF | vascular endothelial growth factor | 血管内皮増殖因子 |

# 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

## 2.6.1 緒言

### 2.6.1.1 新生血管を伴う加齢黄斑変性及び糖尿病黄斑浮腫における VEGF-A 及び Ang-2の機能

#### 2.6.1.1.1 新生血管を伴う加齢黄斑変性及び糖尿病黄斑浮腫の病態

新生血管を伴う加齢黄斑変性（nAMD）は，進行した加齢黄斑変性（AMD）の一病態であり，患者の多くが重度な視力障害を呈する。nAMD では，異常な脈絡膜毛細血管が増殖し，脈絡膜新生血管（CNV）が形成されることで，滲出液や血液成分が網膜外層及び網膜内に滲出するという特徴的な病変がみられる。この滲出のプロセスは，正常な網膜構造の破綻を引き起こし，未治療では不可逆的な中心視力の喪失に至ることが知られている[1)]。

また，糖尿病網膜症（DR）は，糖尿病患者で多くみられる毛細血管合併症であり，その内，糖尿病黄斑浮腫（DME）は，DR 患者における重度視力障害の主要因である。DR 患者における網膜毛細血管の障害は，血液網膜関門（BRB）の破綻を引き起こし，血管閉塞による虚血に伴って増殖した異常な網膜新生血管が形成されることで，滲出液や血液成分が網膜内及び網膜周辺組織へ滲出する病態に繋がる。黄斑領域におけるこの滲出液蓄積による浮腫が，DME に特徴的な病変であり，未治療では不可逆的な中心視力の喪失をもたらす[2)]。

nAMD，DME ともに，血管透過性の亢進とそれに伴う血管漏出が重要な病因と考えられている。

#### 2.6.1.1.2 抗 VEGF-A 療法

血管内皮増殖因子（VEGF）-A とその受容体は，血管新生及び血管漏出を誘導する重要なメディエーターとして最初に同定された因子のひとつであり，非臨床の疾患モデル及び臨床の抗 VEGF-A 療法の治験によって，nAMD 及び DME の治療標的としての妥当性が示されている[1)–4)]。VEGF-A は，低酸素状態に対する生理反応として産生される拡散性の糖蛋白であり，生理的及び病的な血管新生の重要な促進制御因子である[5)]。VEGF-A は，新たな血管形成を誘導する一方，これが反面では血管透過性の亢進として現れることが知られている[6)]。

VEGF-A を標的とした抗 VEGF-A 療法は，現在 nAMD 及び DME における標準治療となっている。ラニビズマブ及びアフリベルセプトは，両適応症に対して承認された治療薬であり，世界各国で広く使用されている[7),8)]。これらの臨床的ベネフィットが確立されたことが，二重特異性抗体であるファリシマブ（遺伝子組換え）（以下，ファリシマブ）の標的分子のひとつを VEGF-A とした科学的根拠となっている。

#### 2.6.1.1.3 抗 VEGF-A 療法と抗 Ang-2療法の併用

アンジオポエチン-1（Ang-1）とアンジオポエチン-2（Ang-2）は，血管コンパートメントの恒常性維持に重要な役割を果たしており，血管内皮細胞上に発現する受容体型チロシンキナーゼである tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2（Tie-2）のリガンドとして機能する。Ang-1は，周皮細胞及び平滑筋細胞の動員を促進することによって成熟血管を安定化させる恒常性維持因子である。Ang-2は対照的に，Ang-1を介した Tie-2の活性化を阻害することにより，血管不安定化因子として作用する。Ang-2は，既存の血管からの周皮細胞の解離を誘導し，血管の可塑性を高め，血管内皮バリア機能の崩壊，滲出液の漏出，及び新生血管の出芽を誘導すると考えられている[9)–11)]。

非臨床試験において，Ang-2が，VEGF-A とともに，眼疾患モデルの血管新生の病態を促進する重要な因子であることが示唆されている[12)]。Ang-2濃度は，VEGF-A を含む他の血管新生の促進因子によってアップレギュレーションを受け，低酸素状態又は高血糖により誘発される血管新生ストレス時に上昇する[11),13)]。VEGF-A と Ang-2は協働して網膜血管内皮細胞の透過性を亢進させることも示されている[14)]。更に，ラット及びマウスの糖尿病モデルの網膜で

Ang-2発現が増加しており[15),16)]，眼内 Ang-2の増加はラット網膜での血管透過性亢進[15)]，及びマウス網膜での血管周皮細胞の喪失[16)]を誘導する。また，Ang-2を標的とするモノクローナル抗体は，マウスにおいてレーザーにより誘発される CNV 及び高酸素負荷により誘導される網膜血管新生を有意に抑制する[17)]。

Ang-2は，VEGF-A と同様に，CNV を含む血管新生が促進する疾患，すなわち nAMD，DR 及び網膜静脈閉塞症患者の房水中や硝子体内で増加することも知られている[18)–20)]。

これらの科学的背景から，VEGF-A と Ang-2の両方を同時に中和することにより，更なる有効性の改善や持続的な血管漏出抑制効果が期待されるとともに，結果として投与頻度を少なくできるという利便性の向上が期待された。

### 2.6.1.2 CrossMAb 技術による二重特異性抗体ファリシマブの創製

ファリシマブは，CrossMAb 技術を用いて創製されたヒト化二重特異性免疫グロブリン G（IgG）1抗体であり，VEGF-A と Ang-2に対して選択的かつ独立して同時に結合することで，その薬効薬理作用を発揮すると考えられる[21)]。ファリシマブは，VEGF-A と Ang-2に対して高親和性の結合を示したが，Ang-1には結合しなかったことから，標的である VEGF-A と Ang-2へ特異的に結合することが確認された（資料番号4.2.1.1-1）。

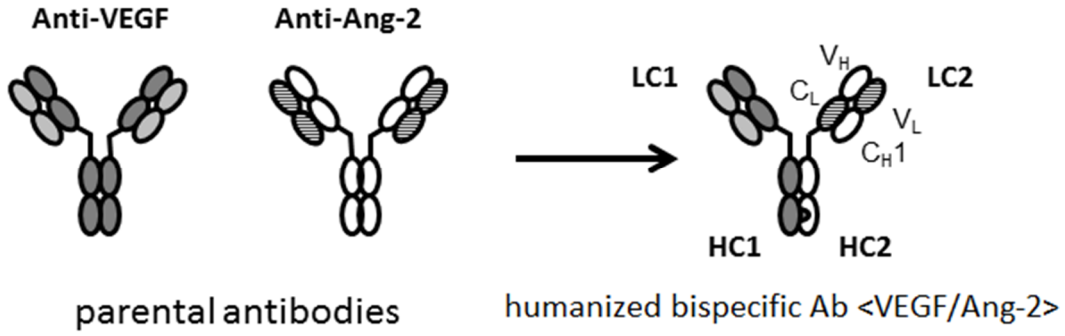
ファリシマブの Fc 領域は，エフェクター細胞上に発現している Fcγ 受容体及び胎児性 Fc 受容体（FcRn）への結合が起こらないよう特定アミノ酸の点変異導入により改変されている[21)]。ファリシマブは，表面プラズモン共鳴（SPR）測定において Fcγ 受容体及び FcRn と結合しないことが確認された（資料番号4.2.1.1-1）。

ファリシマブは，細胞アッセイにおいて，組換えヒト VEGF-165によるヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）増殖及び Ang-2による Tie-2受容体リン酸化を，それぞれ濃度依存的に抑制したことから，標的である VEGF-A 及び Ang-2の活性を中和することが確認された（資料番号4.2.1.1-4，4.2.1.1-5）。

ファリシマブは，カニクイザルのレーザー誘発 CNV モデルを用いた *in vivo* 試験において，抗 VEGF-A 抗体単独投与の場合と比べて血管新生及び血管漏出の重症度を有意に低減した[21),22)]（資料番号4.2.1.1-2，4.2.1.1-3）。

以上の非臨床薬理試験の結果から，ファリシマブは，眼疾患における病的血管新生や血管漏出に重要な役割を果たす VEGF-A 及び Ang-2を同時に阻害することで，nAMD 及び DME に対して治療効果を発揮すると考えられた。

図 2.6.1.2-1　CrossMAb 技術による二重特異性抗体ファリシマブの創製




ファリシマブは CrossMAb 技術を用いて創製されたヒト化二重特異性 IgG1 抗体であり，VEGF-A へ結合する Fab と Ang-2 へ結合する Fab が同一分子内に存在する。
Ab：抗体，Ang-2：アンジオポエチン-2，Fab：抗原結合フラグメント，HC：重鎖，IgG：免疫グロブリン G，LC：軽鎖，VEGF：血管内皮増殖因子

## 2.6.1.3　承認申請の概要

本申請で予定している効能・効果及び用量・用法については，2.2に記載した。

## 2.6.1.4　参考文献

1） Holekamp NM. Review of neovascular age-related macular degeneration treatment options. Am J Manag Care 2019;25:S172-81.
2） Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. Diabetes Care 2003;26:2653-64.
3） Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. Am J Pathol 1994;145:574-84.
4） Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME. Vascular endothelial growth factor in eye disease. Prog Retin Eye Res 2008;27:331-71.
5） Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, et al. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. Mol Med 1995;1:182-93.
6） Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. Cell 2019;176:1248-64.
7） Schmidt-Erfurth U, Chong V, Loewenstein A, Larsen M, Souied E, Schlingemann R, et al. Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). Br J Ophthalmol 2014;98:1144-67.
8） Schmidt-Erfurth U, Garcia-Arumi J, Bandello F, Berg K, Chakravarthy U, Gerendas BS, et al. Guidelines for the management of diabetic macular edema by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). Ophthalmologica 2017;237:185-222.
9） Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 2000;407:242-8.
10） Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:165-77.
11） Saharinen P, Eklund L, Alitalo K. Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway. Nat Rev

Drug Discov 2017;16:635-61.
12) Campochiaro PA. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. Prog Retin Eye Res 2015;49:67-81.
13) Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. J Biol Chem 1999;274:15732-9.
14) Peters S, Cree IA, Alexander R, Turowski P, Ockrim Z, Patel J, et al. Angiopoietin modulation of vascular endothelial growth factor: effects on retinal endothelial cell permeability. Cytokine 2007;40:144-50.
15) Rangasamy S, Srinivasan R, Maestas J, McGuire PG, Das A. A potential role for angiopoietin 2 in the regulation of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52:3784-91.
16) Park SW, Yun JH, Kim JH, Kim KW, Cho CH, Kim JH. Angiopoietin 2 induces pericyte apoptosis via α3β1 integrin signaling in diabetic retinopathy. Diabetes 2014;63:3057-68.
17) Rennel ES, Regula JT, Harper SJ, Thomas M, Klein C, Bates DO. A human neutralizing antibody specific to Ang-2 inhibits ocular angiogenesis. Microcirculation 2011;18:598-607.
18) Kinnunen K, Puustjärvi T, Teräsvirta M, Nurmenniemi P, Heikura T, Laidinen S, et al. Differences in retinal neovascular tissue and vitreous humour in patients with type 1 and type 2 diabetes. Br J Ophthalmol 2009;93:1109-15.
19) Tuuminen R, Loukovaara S. Increased intravitreal angiopoietin-2 levels in patients with retinal vein occlusion. Acta Ophthalmol 2014;92:e164-5.
20) Ng DS, Yip YW, Bakthavatsalam M, Chen LJ, Ng TK, Lai TY, et al. Elevated angiopoietin 2 in aqueous of patients with neovascular age related macular degeneration correlates with disease severity at presentation. Sci Rep 2017;7:45081.
21) Regula JT, von Leithner PL, Foxton R, Barathi VA, Cheung CMG, Tun SBB, et al. Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAb optimized for neovascular eye diseases. EMBO Mol Med 2016;8:1265-88.
22) Regula JT, von Leithner PL, Foxton R, Barathi VA, Cheung CMG, Tun SBB, et al. Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAb optimized for neovascular eye diseases. EMBO Mol Med 2019;11:e10666 Corrigendum.

# 目次

2.6.2 非臨床試験の概要文 ..... 3
2.6.2.1 まとめ ..... 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 ..... 3
2.6.2.2.1 *In vitro* 試験 ..... 3
2.6.2.2.1.1 ファリシマブの標的に対する結合親和性 ..... 3
2.6.2.2.1.2 Fc 領域の結合相互作用 ..... 4
2.6.2.2.1.3 細胞アッセイによる標的に対する中和活性 ..... 4
2.6.2.2.2 *In vivo* 試験 ..... 5
2.6.2.2.2.1 レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルにおけるファリシマブの効果 ..... 5
2.6.2.3 副次的薬理試験 ..... 6
2.6.2.4 安全性薬理試験 ..... 6
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 7
2.6.2.6 考察及び結論 ..... 7
2.6.2.7 図表 ..... 8
2.6.2.8 参考文献 ..... 8

# 表一覧

表 2.6.2.2.1.1-1 VEGF-A 及び Ang-2に対するファリシマブの結合親和性 ..... 4
表 2.6.2.2.1.2-1 Fc 受容体に対するファリシマブの結合相互作用 ..... 4

# 図一覧

図 2.6.2.1-1 CrossMAb 技術による二重特異性抗体ファリシマブの創製 ..... 3
図 2.6.2.2.2.1-1 レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルにおけるファリシマブの効果 ..... 6

## 略語一覧

| 略語 | 英名 | 和名 |
|---|---|---|
| AMD | age-related macular degeneration | 加齢黄斑変性 |
| Ang-1 | angiopoietin-1 | アンジオポエチン-1 |
| Ang-2 | angiopoietin-2 | アンジオポエチン-2 |
| ANOVA | analysis of variance | 分散分析 |
| CNV | choroidal neovascularization | 脈絡膜新生血管 |
| DME | diabetic macular edema | 糖尿病黄斑浮腫 |
| Fab | fragment antigen binding | 抗原結合フラグメント |
| FcRn | neonatal Fc receptor | 胎児性 Fc 受容体 |
| FFA | fundus fluorescein angiography | フルオレセイン蛍光眼底造影 |
| [redacted] | [redacted] | [redacted] |
| HUVEC | human umbilical vein endothelial cells | ヒト臍帯静脈内皮細胞 |
| $IC_{50}$ | half maximal inhibitory concentration | 50%阻害濃度 |
| ICH | International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use | 医薬品規制調和国際会議 |
| IgG | immunoglobulin G | 免疫グロブリン G |
| ITC | isothermal microcalorimetry | 等温マイクロカロリメトリー |
| IVT | intravitreal | 硝子体内 |
| $K_D$ | dissociation constant | 解離定数 |
| Mab | monoclonal antibody | モノクローナル抗体 |
| nAMD | neovascular age-related macular degeneration | 新生血管を伴う加齢黄斑変性 |
| QTc | corrected QT interval | 補正 QT 間隔 |
| rhVEGF-165 | recombinant human VEGF-165 | 組換えヒト VEGF-165 |
| SPR | surface plasmon resonance | 表面プラズモン共鳴 |
| Tie-2 | tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2 | tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2 |
| VEGF | vascular endothelial growth factor | 血管内皮増殖因子 |

## 2.6.2　非臨床試験の概要文

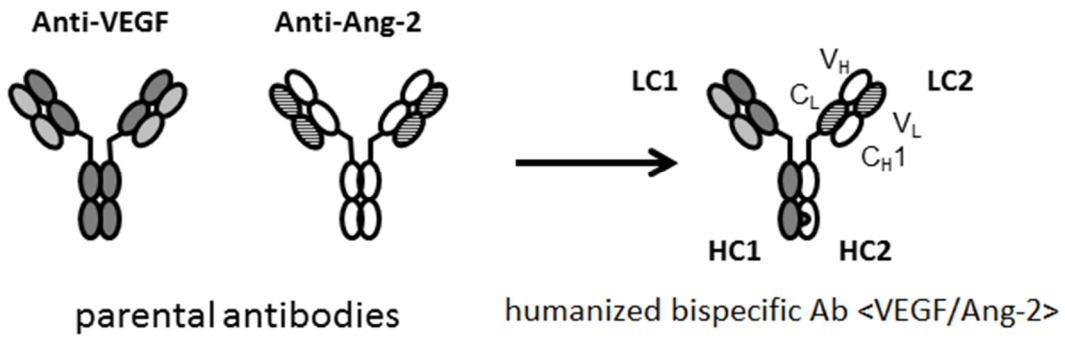
### 2.6.2.1　まとめ

ファリシマブ（遺伝子組換え）（以下，ファリシマブ）は，CrossMAb 技術を用いて創製された新規のヒト化二重特異性免疫グロブリン G（IgG）1抗体であり[1)]，血管内皮増殖因子（VEGF）-A とアンジオポエチン-2（Ang-2）に対して選択的かつ独立して同時に結合することで，その薬効薬理作用を発揮すると考えられる（図 2.6.2.1-1）。ファリシマブの標的に対する結合親和性，特異性及び生物活性を検討するため，*in vitro* 及び *in vivo* の薬理試験を実施した。

ファリシマブは，VEGF-A と Ang-2に対して高親和性の結合を示したが，アンジオポエチン-1（Ang-1）には結合しなかったことから，標的である VEGF-A と Ang-2へ特異的に結合することが確認された（2.6.2.2.1.1）。ファリシマブの Fc 領域は，エフェクター細胞上に発現している Fcγ 受容体及び胎児性 Fc 受容体（FcRn）への結合が起こらないよう特定アミノ酸の点変異導入により改変されている[1)]。ファリシマブは，表面プラズモン共鳴（SPR）測定において Fcγ 受容体及び FcRn と結合しないことが確認された（2.6.2.2.1.2）。ファリシマブは，細胞アッセイにおいて，組換えヒト VEGF-165（rhVEGF-165）によるヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）増殖及び Ang-2による tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2（Tie-2）受容体リン酸化を，それぞれ濃度依存的に抑制したことから，VEGF-A 及び Ang-2の活性を中和することが確認された（2.6.2.2.1.3）。ファリシマブは，カニクイザルのレーザー誘発脈絡膜新生血管（CNV）モデルを用いた *in vivo* 試験において，抗 VEGF-A 抗体単独投与の場合と比べて血管新生及び血管漏出の重症度を有意に低減した[1),2)]（2.6.2.2.2.1）。

これらの非臨床薬理試験の結果から，ファリシマブは，眼疾患における病的血管新生や血管漏出に重要な役割を果たす VEGF-A 及び Ang-2を同時に阻害することで，新生血管を伴う加齢黄斑変性（nAMD）及び糖尿病黄斑浮腫（DME）に対して治療効果を発揮すると考えられた。

図 2.6.2.1-1　CrossMAb 技術による二重特異性抗体ファリシマブの創製




ファリシマブは CrossMAb 技術を用いて創製されたヒト化二重特異性 IgG1 抗体であり，VEGF-A へ結合する Fab と Ang-2 へ結合する Fab が同一分子内に存在する。
Ab：抗体，Ang-2：アンジオポエチン-2，Fab：抗原結合フラグメント，HC：重鎖，IgG：免疫グロブリン G，LC：軽鎖，VEGF：血管内皮増殖因子

## 2.6.2.2　効力を裏付ける試験

### 2.6.2.2.1　*In vitro* 試験

#### 2.6.2.2.1.1　ファリシマブの標的に対する結合親和性

（資料番号4.2.1.1-1）

ファリシマブの一方の抗原結合フラグメント（Fab）は VEGF-A に結合し，もう一方の Fab

は独立して Ang-2に結合するよう分子設計されている[1)]。等温マイクロカロリメトリー（ITC）測定において，VEGF-121，VEGF-165及び Ang-2に対するファリシマブの結合親和性（解離定数［$K_D$］値）は，それぞれ3，3及び22 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1.1-1）。一方，SPR 測定において，ファリシマブは Ang-1に結合しなかった。以上より，ファリシマブは，標的である VEGF-A と Ang-2へ特異的に結合することが確認された。ファリシマブは VEGF-A 及び Ang-2に対し独立してかつ同時に結合することが SPR 試験においても示され[1)]，ファリシマブはいずれの標的に対しても同時に結合することができると考えられる。

表 2.6.2.2.1.1-1　VEGF-A 及び Ang-2に対するファリシマブの結合親和性

| 標的分子 | 測定方法 | ファリシマブの結合親和性（$K_D$ 値） |
|---|---|---|
| VEGF-121 | ITC | 3 nmol/L |
| VEGF-165 | ITC | 3 nmol/L |
| Ang-2-RBD-Fc-二量体 | ITC | 22 nmol/L |
| Ang-1（全長） | SPR | 結合せず |

Ang-1：アンジオポエチン-1，Ang-2：アンジオポエチン-2，ITC：等温マイクロカロリメトリー，$K_D$：解離定数，RBD：受容体結合ドメイン，SPR：表面プラズモン共鳴，VEGF：血管内皮増殖因子

（資料番号4.2.1.1-1 Table 1，Table 2及び Table 3より改変）

## 2.6.2.2.1.2　Fc 領域の結合相互作用

（資料番号4.2.1.1-1）

ファリシマブの Fc 領域は，IgG1のアミノ酸配列に基づいているが，特定の点変異の導入により Fcγ 受容体及び FcRn との結合相互作用が起こらないよう改変されている[1)]。これにより，ファリシマブの Fc 領域によるエフェクター機能が抑制されること，及び全身曝露量を減少させることで，安全性プロファイルの改善へ寄与するよう分子設計されている。

SPR 測定において，ファリシマブは各種 Fcγ 受容体及び FcRn と結合しないことが示された（表 2.6.2.2.1.2-1）。本測定系において，対照抗体（CrossMAb 技術で作製した天然型 IgG1領域を持つ抗 VEGF-A/Ang-2二重特異性抗体）は，各種 Fcγ 受容体と結合することが確認されている[1)]。

表 2.6.2.2.1.2-1　Fc 受容体に対するファリシマブの結合相互作用

| Fc 受容体 | 測定方法 | ファリシマブの結合 |
|---|---|---|
| Fcγ RI | SPR | 結合せず |
| Fcγ RII | SPR | 結合せず |
| Fcγ RIIIa V158 | SPR | 結合せず |
| FcRn | SPR | 結合せず |

FcγR：Fcγ 受容体，FcRn：胎児性 Fc 受容体，SPR：表面プラズモン共鳴

（資料番号4.2.1.1-1 Table 4及び Table 5より改変）

## 2.6.2.2.1.3　細胞アッセイによる標的に対する中和活性

（資料番号4.2.1.1-4，4.2.1.1-5）

標的である VEGF-A 及び Ang-2に対するファリシマブの中和活性を評価するため，2種類の細胞アッセイを実施した。

HUVEC を用いて，rhVEGF-165による増殖に対するファリシマブの作用を検討した。ファリシマブ0.5 - 10,000 ng/mL を rhVEGF-165 15 ng/mL と共にプレインキュベーションした後，ファリシマブ/rhVEGF-165混合液を HUVEC に添加し，37°C で3日間インキュベーションした。その結果，ファリシマブは濃度依存的に rhVEGF-165による HUVEC 増殖を抑制し，その50%阻害濃度（$IC_{50}$）は116 ± 12 ng/mL であることが判明した。

また，ヒト Tie-2受容体を安定的に発現させた[redacted]を用いて，Ang-2による Tie-2受容体のリン酸化に対するファリシマブの作用を検討した。ファリシマブ0.3 - 500 µg/mL を Ang-2 [redacted] µg/mL と共にプレインキュベーションした後，ファリシマブ/Ang-2混合液を Tie-2受容体を発現させた [redacted]に添加し，インキュベーションした。その結果，ファリシマブは濃度依存的に Ang-2による Tie-2受容体リン酸化を抑制し，その $IC_{50}$は10.8 ± 1.7 µg/mL であることが判明した。

以上の結果から，ファリシマブが標的である VEGF-A と Ang-2の活性を中和することが確認された。

### 2.6.2.2.2 *In vivo* 試験

#### 2.6.2.2.2.1 レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルにおけるファリシマブの効果

（資料番号4.2.1.1-2，4.2.1.1-3）

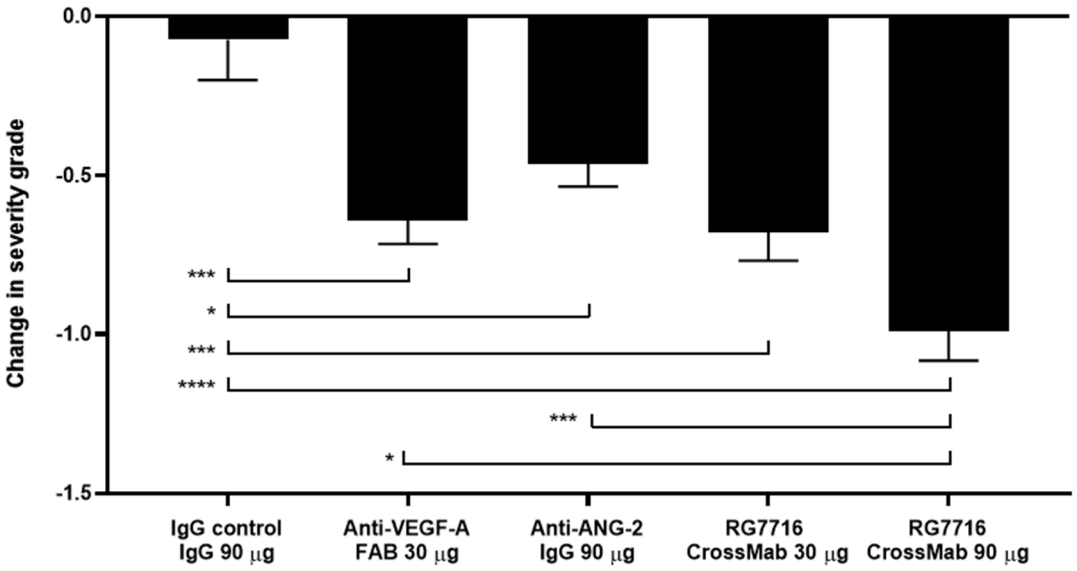
カニクイザルのレーザー誘発 CNV モデルを用いて，ファリシマブの効果を検討した。フルオレセイン蛍光眼底造影（FFA）により活動性 CNV 病変（血管新生及び血管透過性の亢進）の発生を評価した。レーザー照射後14日目に，ベースラインとなる血管新生及び血管漏出の重症度を測定した。15日目に被験物質（アイソタイプ対照抗体90 µg/眼，抗 VEGF-A Fab 抗体［ラニビズマブ］30 µg/眼，抗 Ang-2抗体90 µg/眼，ファリシマブ30及び90 µg/眼）を単回硝子体内（IVT）投与し，28日目に最終 FFA を実施して遮蔽下の観察者による評価を行った。重症度の測定は，以下の蛍光強度によるグレード分類に従い，レーザー照射後14日目のベースラインから28日目のグレード変化を評価した。各群6例で試験を開始し，両眼において各眼9スポットを評価した。ただし，アイソタイプ対照抗体投与群の2例3眼，ファリシマブ30 µg/眼投与群の2例2眼は，眼内炎によりグレード変化の評価ができなかった。

＜グレード分類＞
グレード1：過蛍光がみられない
グレード2：漏出を伴わない過蛍光がみられる
グレード3：漏出を伴う過蛍光がみられる
グレード4：レーザースポットの辺縁以上に広がる漏出を伴う明るい過蛍光がみられる

アイソタイプ対照抗体投与では病変の重症度に変化はみられなかったが，それ以外の抗体投与ではいずれも重症度の低減がみられ，アイソタイプ対照抗体投与の場合と比べて統計学的な有意差が認められた（図 2.6.2.2.2.1-1）。抗 VEGF-A Fab 抗体及び抗 Ang-2抗体の投与では，レーザー誘発病変の重症度グレードが，ベースラインからそれぞれ−0.64及び−0.46まで低減し，改善が認められた。ファリシマブ30及び90 µg/眼の投与では，重症度グレードが，ベースラインからそれぞれ−0.68及び−0.99まで低減し，改善が認められた。VEGF-A に対する結合部位のモル数が同等となる用量で比較した場合，ファリシマブ90 µg/眼の投与は，抗 VEGF-A Fab 抗体30 µg/眼の投与よりも有意に病変の重症度を低減させた（分散分析［ANOVA］後の Tukey の多重比較，抗 VEGF-A Fab 抗体に対して $P = 0.0319$）。

以上，ファリシマブは，カニクイザルのレーザー誘発 CNV モデルを用いた *in vivo* 試験において，抗 VEGF-A Fab 抗体単独投与の場合と比べて血管新生及び血管漏出の重症度を有意に低減することが示された。

図 2.6.2.2.2.1-1　レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルにおけるファリシマブの効果




CNV 病変（血管新生及び血管漏出）の抑制を重症度グレードで評価し，ベースラインからの変化を投与群ごとに示した。いずれの被験物質投与群も IgG 対照群に比べて重症度グレードを有意に低減させた。また，ファリシマブ（分子量 150-kDa で 90 μg/50 μL/眼，IVT 投与）は，結合部位数が同等になるモル濃度で，抗 VEGF-A Fab 抗体群（ラニビズマブ，分子量 50-kDa で 30 μg/50 μL/眼，IVT 投与）及び抗 Ang-2 抗体群よりも効果が有意に優れていた。エラーバーは，各眼 9 スポットの平均値の標準誤差（SEM）を示し，各群のデータ解析を行った例数は以下の通りである；抗 VEGF-A Fab 抗体群，抗 Ang-2 抗体群及びファリシマブ（faricimab）90 μg/眼群は 6 例いずれも両眼，ファリシマブ（faricimab）30 μg/眼群は 6 例（4 例両眼，2 例片眼），IgG 対照群は 5 例（4 例両眼，1 例片眼）。

*は，一元配置の ANOVA 及び Tukey の多重比較検定で有意差ありを表す。IgG 対照群と抗 VEGF-A Fab 抗体群（***，P = 0.0002），抗 Ang-2 抗体群（*，P = 0.0262），ファリシマブ（Faricimab）30 μg/眼群（***，P = 0.0001）及びファリシマブ（Faricimab）90 μg/眼群（****，P < 0.0001）との間に有意差が認められた。更に，ファリシマブ（Faricimab）90 μg/眼群と抗 Ang-2 抗体群（***，P = 0.0002）及び抗 VEGF-A Fab 抗体群（*，P = 0.0319）の間にも有意差が認められた。

ANG-2（Ang-2）：アンジオポエチン-2，ANOVA：分散分析，CNV：脈絡膜新生血管，FAB（Fab）：抗原結合フラグメント，IgG：免疫グロブリン G，IVT：硝子体内，Mab（MAb）：モノクローナル抗体，VEGF：血管内皮増殖因子

（資料番号4.2.1.1-2 Figure 1より改変）

## 2.6.2.3　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

## 2.6.2.4　安全性薬理試験

（資料番号4.2.3.2-3，4.2.3.2-4）

ファリシマブはバイオテクノロジー応用医薬品であることから，医薬品規制調和国際会議（ICH）S6（R1）（平成24年3月23日　薬食審査発0323第1号「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」）及び ICH M3（R2）（平成22年2月19日　薬食審査発0219第4号「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」）を参考に，また，動物実験の3R（代替法の利用／使用動物数の削減／苦痛の軽減）の原則に従い，独立した安全性薬理試験は実施せず，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において，安全性薬理の項目を評価した。カニクイザルを用いた6カ月間（4週ごと，計7回）反復 IVT 投与又は2カ月間（4週ごと，計3回）反復 IVT 又は静脈内投与において，一般状態観察，呼吸数及び体温測定，神経学的検査，心拍数及び心電図検査（QT 及び補正 QT 間隔［QTc］を含む）並びに病理組織学的検査により，中枢神経系，心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を評価した。これらの試験において，ファリシマブに関連した中枢神経系，心血管系及び呼吸系に関する有害作用は認められなかった（2.6.6.3, 2.6.7.7参照）。

### 2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

### 2.6.2.6　考察及び結論

ファリシマブは，CrossMAb 技術を用いて創製されたヒト化二重特異性 IgG1抗体である[1)]。また，その Fc 領域は，エフェクター細胞上に発現している Fcγ 受容体及び FcRn への結合が起こらないよう改変されている。ファリシマブの標的に対する結合親和性，特異性及び生物活性を検討するため，*in vitro* 及び *in vivo* の薬理試験を実施した。

ファリシマブは，VEGF-A と Ang-2に対して高親和性の結合を示したが，Ang-1には結合しなかったことから，標的である VEGF-A と Ang-2へ特異的に結合することが確認された。ファリシマブの VEGF-A を標的とする Fab は，他の抗 VEGF-A 治療抗体[1)] と同等の高い親和性で VEGF-A に結合し，Ang-2を標的とする Fab もまた高い親和性で Ang-2に結合することが示唆された。また，ファリシマブは，SPR 測定において Fcγ 受容体及び FcRn と結合しないことが確認された。ファリシマブは，細胞アッセイにおいて，rhVEGF-165による HUVEC 増殖及び Ang-2による Tie-2受容体リン酸化を，それぞれ濃度依存的に抑制したことから，VEGF-A 及び Ang-2の活性を中和することが確認された。

ヒトとカニクイザルの VEGF-121のアミノ酸配列が同一であることから，ファリシマブは両種の VEGF-A へ同等な結合性を示すと考えられ，また，SPR 測定による Ang-2への結合における $K_D$ 値がヒトで20 nmol/L，カニクイザルで13 nmol/L であることが判明した（資料番号4.2.1.1-1）。これらのことから，ファリシマブの VEGF-A 及び Ang-2への結合能は，ヒトとカニクイザルでほぼ同等であると推測された。ヒトとカニクイザルにおいて標的に対する交差結合性が同等であることに加え，眼の解剖学的形態及び機能的特徴が類似していることに基づき，カニクイザルを *in vivo* 薬効薬理試験及び毒性試験の動物種として選択した。

ファリシマブは，カニクイザルのレーザー誘発 CNV モデルにおいて，抗 VEGF-A Fab 抗体単独投与の場合と比べて血管新生及び血管漏出の重症度を有意に低減した。VEGF-A に対する結合部位のモル数が同等となる用量で比較した場合，ファリシマブ90 μg/眼の投与は，抗 VEGF-A Fab 抗体30 μg/眼の投与よりも有意に病変の重症度を低減させたことから，抗 Ang-2作用の付加が効果増強へ寄与する可能性が示された。

安全性薬理については，ファリシマブが中枢神経系，心血管系及び呼吸系に及ぼす影響は，カニクイザルを用いた反復 IVT 又は静脈内投与毒性試験の結果から，低いと考えられた。

これらの非臨床薬理試験の結果から，ファリシマブは，眼疾患における病的血管新生や血管漏出に重要な役割を果たす VEGF-A 及び Ang-2を同時に阻害することで，nAMD 及び DME に対して治療効果を発揮すると考えられた。

### 2.6.2.7 図表

図表は本文中に挿入した。

### 2.6.2.8 参考文献

1） Regula JT, von Leithner PL, Foxton R, Barathi VA, Cheung CMG, Tun SBB, et al. Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAb optimized for neovascular eye diseases. EMBO Mol Med 2016;8:1265-88.

2） Regula JT, von Leithner PL, Foxton R, Barathi VA, Cheung CMG, Tun SBB, et al. Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAb optimized for neovascular eye diseases. EMBO Mol Med 2019;11:e10666 Corrigendum.

# 目次

2.6.3 薬理試験概要表 ..... 2
2.6.3.1 薬理試験一覧表 ..... 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 ..... 3
2.6.3.3 副次的薬理試験 ..... 4
2.6.3.4 安全性薬理試験 ..... 4
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 4

# 表一覧

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表 ..... 2
表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験 ..... 3
表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験 ..... 4

# 2.6.3 薬理試験概要表

## 2.6.3.1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表

Test Article: Faricimab

| Type of Study | Test System / Species | Method of Administration | Testing Facility | Report No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| **Primary Pharmacodynamics** | | | | | |
| Target binding, Fc interaction, and Cross reactivity | ITC and SPR assay | *In vitro* | Roche Innovation Center Penzberg, Biochemical and Analytical Research, PRLAC, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Germany | 1056781 | 4.2.1.1-1 |
| Anti-proliferation assay and Cell-based assay | HUVEC and [redacted] | *In vitro* | Roche Pharma Research and Early Development, Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland | 1105990<br>1105991 | 4.2.1.1-4<br>4.2.1.1-5 |
| Laser-induced CNV model | Cynomolgus monkey | IVT | [redacted]<br>Singapore | 1103767<br>1056925 | 4.2.1.1-2<br>4.2.1.1-3 |
| **Secondary Pharmacodynamics** | | | | | |
| No secondary pharmacodynamic studies have been conducted. | | | | | |
| **Safety Pharmacology** | | | | | |
| No dedicated safety pharmacology studies have been conducted. | | | | | |
| **Pharmacodynamic Drug Interactions** | | | | | |
| No pharmacodynamic drug interaction studies have been conducted. | | | | | |

CNV=choroidal neovascularization; [redacted] HUVEC=human umbilical vein endothelial cells; ITC=isothermal microcalorimetry; IVT=intravitreal; SPR=surface plasmon resonance.

## 2.6.3.2 効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験

Test Article: Faricimab

| Study Type | Test System | Test Method | Key Results | Report No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Target binding | *In vitro* | ITC assay | Faricimab demonstrates high affinity to VEGF-121, VEGF-165, and Ang-2-RBD. | 1056781 | 4.2.1.1-1 |
| Fc interaction | *In vitro* | SPR assay | Mutations in Fc region of faricimab abrogate binding to Fcγ receptors and FcRn. | | |
| Cross reactivity | *In vitro* | ITC and SPR assay | Faricimab is cross reactive to cynomolgus monkey, murine and rabbit Ang-2. The derived $K_D$-values do not show significant differences between species, antigen format or applied technology.<br>Human and cynomolgus monkey VEGF-121 share 100% sequence identity.<br>Faricimab does not bind to human, cynomolgus monkey or murine FcRn. | | |
| Anti-proliferation assay | HUVEC | *In vitro* (0.5 - 10,000 ng/mL) | Faricimab inhibits VEGF-A-induced HUVEC proliferation with $IC_{50}$ of 116 ± 12 ng/mL. | 1105990 | 4.2.1.1-4 |
| Cell-based assay | [redacted] stably transfected with human Tie-2 receptor | *In vitro* (0.3 - 500 µg/mL) | Faricimab inhibits Ang-2-induced Tie-2 receptor phosphorylation with $IC_{50}$ of 10.8 ± 1.7 µg/mL. | 1105991 | 4.2.1.1-5 |
| Laser-induced CNV model | Cynomolgus monkey | *In vivo* (IVT: 30 or 90 µg/eye) | Significant better reduction of CNV area after FFA compared to anti-VEGF-A alone. | 1103767<br>1056925 | 4.2.1.1-2<br>4.2.1.1-3 |

Ang-2=angiopoietin-2; CNV=choroidal neovascularization; FcRn=neonatal Fc receptor; FFA=fundus fluorescein angiography; [redacted]; HUVEC=human umbilical vein endothelial cells; $IC_{50}$=half maximal inhibitory concentration; ITC=isothermal microcalorimetry; IVT=intravitreal; $K_D$=dissociation constant; RBD=receptor binding domain; SPR=surface plasmon resonance; Tie-2=tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2; VEGF=vascular endothelial growth factor.

### 2.6.3.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

### 2.6.3.4 安全性薬理試験

表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験

Test Article: Faricimab

| Study Type | Test System | Test Method | Key Results | Report No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Cardiovascular, central nervous, and respiratory system (GLP) | Cynomolgus monkey | *In vivo* (IVT: 0, 1.5, 3, 6 mg/eye/dose, IV: 0, 5 mg/kg, Q4W [3 doses], following by a 4-week recovery periods) | No toxicologically significant changes in cardiovascular, respiratory or neurologic safety pharmacology parameters. | 1053361 | 4.2.3.2-3 |
| Cardiovascular and central nervous system (GLP) | Cynomolgus monkey | *In vivo* (IVT: 0, 0.5, 1.5, 1.5/3 [a] mg/eye/dose, Q4W [7 doses], following by a 13-week recovery periods) | No toxicologically significant changes in cardiovascular or neurologic safety pharmacology parameters. | 1057630 | 4.2.3.2-4 |

GLP=Good Laboratory Practice; IV=intravenous; IVT=intravitreal; Q4W=once every 4 weeks.

a: Right eyes of animals were given 1.5 mg/eye/dose on Day 1 and 3 mg/eye/dose from Day 29 onward.

### 2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。