サノフィ株式会社

スチムリマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.1 緒言

Total number of pages: 8

目　　次

2.6.1 緒言 1

目　　次 2

表　目　次 3

図　目　次 3

略号と用語の定義 4

1　　緒言 5

2　　参考文献 8

表　目　次

表 1 - 名称 7

図　目　次

図 1 - スチムリマブのアミノ酸配列 7

略号と用語の定義

AP：	第 2 経路（alternative pathway）
C1s：	補体第 1 成分 s サブコンポーネント（complement component 1, s subcomponent）
CAD：	寒冷凝集素症（cold agglutinin disease）
CP：	古典的補体経路（classical complement pathway）
Cys：	システイン（Cysteine）
Da：	ダルトン（Dalton）
ePPND：	拡充型出生前及び出生後の発生（enhanced pre-and postnatal development）
Fcγ：	結晶性フラグメント γ（fragment crystallizable gamma）
GLP：	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practices）
HC：	重鎖（heavy chain）
ICH：	医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonization）
IgG2a：	免疫グロブリン G サブクラス 2a（immunoglobulin G, subclass 2a）
IgG4：	免疫グロブリン G サブクラス 4（immunoglobulin G, subclass 4）
INN：	国際一般名称（International Nonproprietary Name）
LC：	軽鎖（light chain）
LP：	レクチン経路（lectin pathway）
MW：	分子量（Molecular weight）

1　緒言

スチムリマブ（遺伝子組換え）（開発コード：TNT009 又は BIVV009）は、古典的補体経路（CP）特異的セリンプロテアーゼである補体第 1 成分 s サブコンポーネント（C1s；EC 3.4.21.42）を標的とするファースト・イン・クラスのヒト化免疫グロブリン G（IgG）サブクラス 4（IgG4）モノクローナル抗体である。スチムリマブは、マウスを天然ヒト活性化 C1s セリンプロテアーゼ（EC 3.4.21.42）で免疫して得られたマウス IgG サブクラス 2a（IgG2a）モノクローナル抗体 TNT003 から作製された。スチムリマブは C1s に特異的に作用するため CP のみを阻害し、免疫監視に利用される第 2 経路（AP）及びレクチン経路（LP）には影響を及ぼさない。さらに、スチムリマブは C1 複合体の段階で阻害するため、CP 介在性疾患の病変を誘発するすべてのアナフィラトキシン及びオプソニンの産生を抑制すると考えられる。希少疾患である寒冷凝集素症（CAD）における溶血に対する治療薬として、50 mg/mL のスチムリマブを含有する無菌液剤が開発されている。スチムリマブの予定される投与レジメンは、6.5g（体重 39kg 以上 75kg 未満の患者）又は 7.5g（体重 75kg 以上の患者）を最初の 2 回は週 1 回（0 日目及び 7 日目）、その後は 2 週間に 1 回、静脈内（IV）投与する。

スチムリマブは 2 つのヘテロダイマーで構成される。それぞれのヘテロダイマーは、445 個のアミノ酸からなる重鎖（HC）及び 216 個のアミノ酸からなる軽鎖（LC）のポリペプチド鎖で構成される。本抗体分子の 4 本のポリペプチド鎖は、LC システイン（Cys）216－HC Cys132、HC Cys224－HC Cys224 及び HC Cys227－HC Cys227 の間でジスルフィド結合により共有結合している。2 本の HC はヒンジ領域で 2 個の鎖間ジスルフィド結合（HC Cys224－HC Cys224 及び HC Cys227－HC Cys227）により結合している。スチムリマブは計 12 個の鎖内ジスルフィド結合を有しており、それらは 2 本の HC にそれぞれ 4 個、及び 2 本の LC にそれぞれ 2 個ずつ位置している。スチムリマブはセリンからプロリンへの変異（Kabat の付番システムに基づくと S241P）を有するため、コアヒンジ領域が安定化されている(1)(2)。また、スチムリマブはロイシンからグルタミン酸への変異（L248E）を有するため、Fcγ 受容体への結合が消失している(3)。HC 及び LC のアミノ酸配列を図 1に示す。

アミノ酸配列に基づくと、グリコシル化などの翻訳後修飾を受けず、ジスルフィド結合しているスチムリマブ分子の分子式は、$C_{6436}H_{9938}N_{1700}O_{2013}S_{46}$ である。HC の分子式は $C_{2171}H_{3353}N_{573}O_{672}S_{17}$、LC の分子式は $C_{1047}H_{1619}N_{277}O_{336}S_{6}$ である。1322 残基のアミノ酸配列に基づく上記の分子式から算出した非グリコシル化スチムリマブ未変化体の推定分子量は約 144,813 Da である。各 HC の推定分子量は約 48,778 Da、各 LC は約 23,655 Da である。

スチムリマブの市販予定製剤は、50 mg/mL のスチムリマブのほか、10 mmol/L のリン酸ナトリウム緩衝液、140 mmol/L の塩化ナトリウム、0.02%のポリソルベート 80（Tween-80）及び注射用水からなる pH 6.1 の無菌かつ非発熱性の等張水溶液として提供される予定である。塩化ブチルゴム栓及びアルミニウムシールで施栓した 25 mL 容タイプ I ガラスバイアルに、バイアル、注射針及びシリンジでの損失量を考慮して十分な量が過量充填されている。

カニクイザル（*Macaca fascicularis*）はヒトと CP 系及びスチムリマブの薬理活性が類似していることから試験に適した動物種であり、カニクイザルを用いた一連の試験でスチムリマブの非臨床薬理、薬物動態（PK）及び毒性を評価した。薬理、PK 及び毒性試験の詳細な結果は、それぞれ Module 2.6.2 薬理試験の概要文、Module 2.6.4 薬物動態試験の概要文及び Module 2.6.6 毒性試験の概要文に示し、考察を行った。非臨床概要資料を通して日本医薬品一般的名称（JAN）のスチムリマブ、国際一般名称（INN）の sutimlimab を使用しているが、試験報告書等では BIVV009 又は TNT009 も用いている。

非臨床毒性試験プログラムは、医薬品規制調和国際会議（ICH）の企業向けガイダンス ICH S6(R1)「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」（2012 年）に準拠しており、必要に応じて、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守して実施した。カニクイザルを用いた最長 26 週間の反復投与毒性試験において、スチムリマブを点滴静注（180 mg/kg/週）したときの忍容性は良好であり、明らかな毒性変化は認められなかった。カニクイザルにスチムリマブを 60 mg/kg/週以上の用量で反復投与したとき、投与期間（最長 6 か月間）を通して測定可能な濃度のスチムリマブが維持された。

拡充型出生前及び出生後の発生に関する（ePPND）試験において、妊娠カニクイザルに 180 mg/kg/週までの用量で点滴静脈内投与したとき、生殖系にスチムリマブに関連した変化は認められなかった。この試験では、妊娠期間において母動物にスチムリマブに関連した毒性変化は認められず、分娩後 3 か月間の観察期間において母動物及びその出生児にいかなる影響も認められなかった。試験期間のいずれの時点においても、評価した胚・胎児の発生及び出生児の行動パラメータに毒性変化は認められなかった。

動物を用いた毒性試験及び CP に関する文献の科学的な重要度に基づく評価から、スチムリマブを長期投与してもがんリスクは増加しないと考えられた。

要約すると、スチムリマブは C1s に結合して CP 活性を阻害する強力なヒト化モノクローナル抗体である。スチムリマブを用いて実施した非臨床試験結果は、臨床試験の実施及びスチムリマブの承認申請を支持するものであった。

図 1 - スチムリマブのアミノ酸配列

HC：

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS NYAMSWVRQA PGKGLEWVAT 50
ISSGGSHTYY LDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TALYYCARLF 100
TGYAMDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY 150
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT 200
CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFEGGPSVFL FPPKPKDTLM 250
ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQF**N**STYRV 300
VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP 350
PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG 400
SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK 445

LC：

QIVLTQSPAT LSLSPGERAT MSCTASSSVS SSYLHWYQQK PGKAPKLWIY 50
STSNLASGVP SRFSGSGSGT DYTLTISSLQ PEDFATYYCH QYYRLPPITF 100
GQGTKLEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW 150
KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH 200
QGLSSPVTKS FNRGEC 216

スチムリマブの相補性決定領域（CDR）を形成する重鎖（HC）及び軽鎖（LC）アミノ酸を下線で示す。HC のグリコシル化部位（HC N295）を太字及び下線で示す。

表 1 - 名称

国際一般名称（r-INN）	Sutimlimab
日本医薬品一般的名称（JAN）	スチムリマブ（遺伝子組換え）
社内又は開発コード	TNT009、BIVV009
化学名	
• **ケミカルアブストラクト索引名**	
• **USAN**	
• **世界保健機関（WHO）**	10757
ケミカルアブストラクトサービス（CAS）登録番号	2049079-64-1

2　参考文献

1. Labrijn AF, Buijsse AO, van den Bremer ET, Verwilligen AY, Bleeker WK, Thorpe SJ, et al. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. Nat. Biotechnol. 2009; 27(8):767-71.
2. Salfeld JG. Isotype selection in antibody engineering. Nat. Biotechnol. 2007; 25(12):1369-72.
3. Reddy MP, Kinney CA, Chaikin MA, Payne A, Fishman-Lobell J, Tsui P, et al. Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. J. Immunol. 2000; 164(4):1925-33.

サノフィ株式会社

スチムリマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 44

目　　次

2.6.2 薬理試験の概要文 1

目　　次 2

表　目　次 4

図　目　次 4

略号と用語の定義 6

1　　まとめ 9

2　　分析法 12

3　　効力を裏付ける試験 14

3.1　*In vitro* 薬理 14

3.1.1　正常ヒト及び動物血清を用いた *in vitro* 試験 14

3.1.1.1　親和性、特異性及び効力 14

3.1.1.2　種交差反応性 15

3.1.1.3　閾値型作用 17

3.1.2　疾患患者の検体を用いた *in vitro* 試験 18

3.1.2.1　CAD 患者由来検体 18

3.1.2.1.1 RBC へのオプソニン沈着に対する抑制作用 18

3.1.2.1.2 RBC 貪食に対する抑制作用 19

3.1.2.1.3 溶血及びアナフィラトキシン産生に対する抑制作用 21

3.1.2.2　ITP 患者由来検体 22

3.1.2.2.1 *Ex vivo* での血小板への C4d 沈着と *in vivo* での ITP 患者の血小板減少との相関性 22

3.1.2.3　水疱性類天疱瘡患者検体を用いた TNT003 の *in vitro* 試験 24

3.1.2.4　抗 HLA 抗体誘発補体活性化 27

3.1.3　*In vitro* 自己免疫試験 29

3.1.3.1 早期及び後期アポトーシス細胞への C1q 沈着に対する抑制作用の欠如 29
3.1.3.2 後期アポトーシス細胞への C3b 沈着に対する抑制作用及び早期アポトーシス細胞への抑制作用の欠如 30
3.1.3.3 後期及び早期アポトーシス細胞のエフェロサイトーシスに対する阻害作用の違い 31
3.1.3.4 早期アポトーシス細胞エフェロサイトーシスによる免疫抑制作用に対する阻害作用の欠如 32
3.1.4 殺菌作用に対する C1s 阻害の影響 33
3.2 *In vivo* 薬理 36
4 副次的薬理試験 37
5 安全性薬理試験 38
5.1.1 中枢神経系 38
5.1.2 心血管系 38
5.1.3 呼吸系 38
6 薬力学的薬物相互作用試験 39
7 考察及び結論 40
8 図表 42
参 考 文 献 43

表　目　次

表 1 - スチムリマブの非臨床薬理試験 11

表 2 - 分析法 12

表 3 - カニクイザル血清を用いる WIESLAB® ELISA Complement System Classical Pathway アッセイのバリデーションの要約 13

表 4 - ヒト補体系におけるスチムリマブ及び TNT003 の薬理学的特性 15

表 5 - スチムリマブの種交差反応性 16

表 6 - ヒト及びサルの古典的補体経路介在性溶血に対する TNT003 の抑制作用の IC_{50} 値 17

表 7 - ヒト血小板における ITP 介在性 C1q、C3d、C4d 及び C5b-9 沈着に対する TNT003 の抑制作用 23

図　目　次

図 1 - ヒト及びサルの古典的補体経路介在性溶血に対する TNT003 の抑制作用 17

図 2 - ヒト赤血球細胞表面への寒冷凝集素介在性 C3 フラグメント沈着に対する TNT003 の抑制作用 19

図 3 - C3 フラグメントオプソニン化ヒト赤血球の貪食に対する TNT003 の抑制作用 20

図 4 - 寒冷凝集素介在性溶血及びアナフィラトキシン産生に対する TNT003 の抑制作用 22

図 5 - *Ex vivo* での血小板への C4d 沈着と *in vivo* での ITP 患者の血小板減少との相関性 24

図 6 - BP 血清で誘発されたヒト皮膚パッチの DEJ における C3c 沈着 25

図 7 - BP 患者血清誘発 C3 フラグメント沈着に対する TNT003 の抑制作用 26

図 8 - 血清中に保存されている補体による BP 血清介在性白血球接着 27

図 9 - 抗 HLA 抗体誘発補体沈着に対するスチムリマブ（TNT009）及び TNT003 の濃度依存的な抑制作用 28

図 10 - 早期及び後期アポトーシス細胞への C1q 沈着に対する TNT003 の影響の欠如 29

図 11 - 後期アポトーシス細胞への C3b 沈着に対する TNT003 の抑制作用及び早期アポトーシス細胞への抑制作用の欠如 30

図 12 - ヒト単球由来マクロファージによる早期アポトーシス細胞のエフェロサイトーシスに対する TNT003 の影響の欠如 31

図 13 - 早期アポトーシス細胞のエフェロサイトーシスによる免疫抑制作用に対する TNT003 の影響の欠如 33

図 14 - 特異的抗髄膜炎菌抗体を含む全血又は高濃度血漿による髄膜炎菌の殺菌に対する古典的補体経路阻害による抑制作用の欠如 35

図 15 - 特異的抗肺炎球菌莢膜抗体を含む全血中の肺炎球菌の殺菌に対する古典的補体経路阻害による抑制作用の欠如 36

略号と用語の定義

AC：	アポトーシス細胞（apoptotic cell）
AIHA：	自己免疫性溶血性貧血（autoimmune hemolytic anemia）
AMR：	抗体関連型拒絶反応（antibody mediated rejection）
AP：	第 2 経路（alternative pathway）
BP：	水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid）
C1q：	補体第 1 成分 q サブコンポーネント（complement component 1, q subcomponent）
C1r：	補体第 1 成分 r サブコンポーネント（complement component 1, r subcomponent）
C1s：	補体第 1 成分 s サブコンポーネント（complement component 1, s subcomponent）
C2：	補体第 2 成分（complement component 2）
C3：	補体第 3 成分（complement component 3）
C3a：	C3 の分解により生じるアナフィラトキシン（anaphylatoxin generated by the cleavage of C3）
C3b：	C3成分の分解により生じる細胞結合性オプソニン(cell-bound opsonin generated by the cleavage of C3）
C3d：	C3 分解の最終的細胞結合性副産物（terminal cell-bound byproduct of C3 cleavage）
C4：	補体第 4 成分（complement component 4）
C4a：	C4 の分解により生じるアナフィラトキシン（anaphylatoxin generated by the cleavage of C4）
C4b：	補体成分 C4b（complement component C4b）
C4d：	C4 分解の最終的細胞結合性副産物（terminal cell-bound byproduct of C4 cleavage）
C5：	補体第 5 成分（complement component 5）
C5a：	C5 の分解により生じるアナフィラトキシン（anaphylatoxin generated by the cleavage of C5）
C5b-9：	膜侵襲複合体（membrane attack complex）
C9：	補体第 9 成分（complement component 9）
CA：	寒冷凝集素（cold agglutinin）
CAD：	寒冷凝集素症（cold agglutinin disease）
CFSE：	カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（carboxyfluorescein succinimidyl ester）
CMFDA：	5-クロロメチルフルオレセイン二酢酸（5-Chloromethylfluorescein diacetate）

CP： 古典的補体経路（classical complement pathway）

CR3： 補体受容体 3（complement receptor 3）

CV： 変動係数（coefficient of variation）

DEJ： 真皮表皮結合部（dermal epidermal junction）

EAC： 早期アポトーシス細胞（early apoptotic cell）

ELISA： 酵素結合免疫吸着測定法（enzyme-linked immunosorbent assay）

EVH： 血管外溶血（extravascular hemolysis）

Fc： 結晶性フラグメント（fragment crystallizable）

FcγR： 結晶性フラグメントγ受容体（fragment crystallizable gamma receptor）

GLP： 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practices）

HI-NHS： 熱非働化正常ヒト血清（heat-inactivated normal human serum）

HLA： ヒト白血病抗原（human leucocyte antigen）

hMΦ： ヒト単球由来マクロファージ（human monocyte-derived macrophages）

iC3b： I 因子による C3b の分解により生じる細胞結合性オプソニン（cell-bound opsonin generated by the cleavage of C3b by factor I）

IC_{50}： 50%阻害濃度（half-maximal inhibitory concentration）

IC_{90}： 90%反応阻害濃度（inhibitory concentration where the response is reduced 90%）

IgG： 免疫グロブリン G（immunoglobulin G）

IgG2a： IgG サブクラス 2a（IgG, subclass 2a）

IgG4： IgG サブクラス 4（IgG, subclass 4）

IgM： 免疫グロブリン M（immunoglobulin M）

IL： インターロイキン（interleukin）

ITP： 免疫性血小板減少性紫斑病（immune thrombocytopenic purpura）

IV： 静脈内（intravenous(ly)）

IVH： 血管内溶血（intravascular hemolysis）

LAC： 後期アポトーシス細胞（late apoptotic cell）

LP： レクチン経路（lectin pathway）

LPS： リポ多糖類（lipopolysaccharide）

mAb： モノクローナル抗体（monoclonal antibody）

M-CSF： マクロファージコロニー刺激因子（macrophage colony-stimulating factor）

NA： 該当せず（not applicable）

NCS： 正常カニクイザル血清（normal cynomolgus monkey serum）

NHS： 正常ヒト血清（normal human serum）

PD： 薬力学（pharmacodynamic(s)）

PK：　薬物動態（pharmacokinetic(s)）

RBC：　赤血球（red blood cell）

TK：　トキシコキネティクス（toxicokinetic(s)）

TLR4：　Toll 様受容体 4（toll-like receptor 4）

TNF-α：　腫瘍壊死因子 α（tumor necrosis factor alpha）

UV：　紫外線（ultraviolet）

1　まとめ

スチムリマブ（遺伝子組換え）は、古典的補体経路（CP）特異的セリンプロテアーゼである補体第1成分 s サブコンポーネント（C1s）に結合してこれを阻害するヒト化免疫グロブリン G（IgG）サブクラス 4（IgG4）モノクローナル抗体（mAb）である。希少疾患である寒冷凝集素症（CAD）における溶血の治療に用いる予定の製剤として、50 mg/mL のスチムリマブを含有する無菌液剤を開発している。スチムリマブの予定される投与レジメンは、6.5g（体重 39kg 以上 75kg 未満の患者）又は 7.5g（体重 75kg 以上の患者）を最初の 2 回は週 1 回（0 日目及び 7 日目）、その後は 2 週間に 1 回、静脈内（IV）投与する。スチムリマブは、患者の病原性自己抗体により誘発される CP 活性化を選択的に阻害することにより、CP 活性化疾患（一種の自己免疫性溶血性貧血［AIHA］、CAD 及び免疫性血小板減少性紫斑病［ITP］を含む）を治療する薬剤として開発されている。本項には薬理開発プログラムの要約を記載する。

スチムリマブ（開発コード：TNT009 又は BIVV009）は、マウス IgG サブクラス 2a（IgG2a）抗ヒト C1s mAb である TNT003 から作製されており、TNT003 と同程度の C1s 結合親和性及び抗 C1s 活性を有している。したがって、スチムリマブの *in vitro* 薬理評価にはスチムリマブ及び TNT003 の両方を使用した。正常ヒト血清（NHS）又はヒト CP タンパク質を用いた *in vitro* 試験において、スチムリマブはヒト C1s に高親和性（10^{-10} mol/L レベル）及び特異性を有し、血清中 CP 活性に対して強力（50%阻害濃度［IC_{50}］は 10^{-9} mol/L レベル）かつ完全（100%）な阻害作用を示すが、第 2 経路（AP）及びレクチン経路（LP）に対しては阻害作用を示さないことが明らかになった。カニクイザル（*Macaca fascicularis*）におけるスチムリマブの C1s への結合親和性（10^{-10} mol/L レベル）及び薬理活性はヒトと同程度であったことから、カニクイザルが薬理学的に適した唯一の動物種と特定された。ヒト及びサルにおけるスチムリマブの 1.34%血清中 CP 活性阻害作用の IC_{50} 値は、いずれも 0.21 µg/mL であった。

スチムリマブ及び TNT003 は *in vitro* で以下を抑制した。

- 寒冷凝集素（CA）によるヒト赤血球（RBC）の補体第 3 成分（C3）フラグメントオプソニン化、それに続くフラグメントオプソニン化 RBC の貪食、CA 介在性 RBC 溶血、並びに C3、補体第 4 成分（C4）及び補体第 5 成分（C5）の分解で生じるアナフィラトキシン（それぞれ C3a、C4a 及び C5a）の CA による産生
- ITP 患者の検体における血小板への補体第 1 成分 q サブコンポーネント（C1q）、C3b、C4 分解の最終的細胞結合性副産物（C4d）及び膜侵襲複合体（C5b-9）の沈着
- 水疱性類天疱瘡（BP）患者由来自己抗体による正常ヒト皮膚の真皮表皮接合部（DEJ）への補体成分 C3d の沈着
- ヒト白血球抗原（HLA）抗体による HLA コートマイクロビーズへの C3d の沈着

これらの結果を総合すると、スチムリマブは CAD における血管外及び血管内溶血（それぞれ EVH 及び IVH）の両方並びに ITP における血小板減少を抑制する可能性を有することが示唆された。さらに、CP 活性化阻害剤は、BP 及び抗体関連型拒絶反応（AMR）のような補体が活性化している自己免疫障害の治療に有用であると考えられる。

In vitro 自己免疫試験において、TNT003 は早期アポトーシス細胞（EAC）への C1q 沈着を抑制しないことが示された。さらに、TNT003 は、EAC のエフェロサイトーシスによる望ましい免疫抑制作用も抑制しなかった。これら TNT003 の結果から、そのヒト化抗体であるスチムリマブでも、CP 介在性疾患を有する患者において C1q 沈着及び EAC のエフェロサイトーシスを抑制せず、CP の遺伝的欠損患者でみられる自己免疫のリスクを低下させる可能性が示唆された。

補体は侵入病原体に対する自然免疫防御において重要な役割を果たしているため、C5 レベルで終末補体を阻害すると感染リスクが上昇する。CP を阻害したときの髄膜炎菌及び肺炎球菌への感染リスクを評価するため、特徴が十分に明らかになっているマウス mAb でスチムリマブや TNT003 同様に C1s を特異的に阻害する TNT005 を用いた試験を実施した。得られたデータから、特異的抗莢膜抗体を含む全血での髄膜炎菌及び肺炎球菌の殺菌作用は CP を阻害しても抑制されないことが示唆された。スチムリマブを含む C1s 阻害剤の投与を受けている患者では、髄膜炎菌及び肺炎球菌の莢膜結合型ワクチンによりこれらの菌への感染リスクを低下させることができる可能性が考えられる。

スチムリマブは *in vitro* において急峻な「閾値型」濃度－反応曲線を示した。その結果、*in vivo* では、血清中スチムリマブ濃度が閾値濃度未満に低下すると CP 阻害作用が速やかに消失した。サル *in vivo* での血清中 CP 活性に対するスチムリマブの 90%阻害濃度（IC_{90}）は 22.3 µg/mL であり（Module [2.6.6] 参照）、ヒトでの *in vivo* IC_{90} は 63.9 µg/mL であった（Module [2.7.2] 参照）。サルを用いた GLP 適用 5 週間反復投与毒性試験において、スチムリマブの AP 活性に関連した副次薬力学（PD）的作用は認められなかった。中枢神経系、心血管系及び呼吸系の安全性薬理評価として GLP 適用 5 及び 26 週間反復投与毒性試験で測定したパラメータに、スチムリマブに関連した影響は認められなかった。

総合すると、スチムリマブ及び TNT003 を用いて実施した *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験から、CAD 患者における溶血の治療及び予防薬としてスチムリマブを評価及び承認申請することが支持された。スチムリマブの開発をサポートするためにこれまでに実施した非臨床試験を表 1 に要約する。

表 1 - スチムリマブの非臨床薬理試験

試験の種類	投与経路／用量	種	試験番号	GLP 適用の有無
水疱性類天疱瘡患者の血漿における抗 C1s 抗体による補体沈着の抑制	NA	ヒト	[TN-[redacted]16]	非 GLP
TNT003 由来ヒト化抗体の C1s 結合能のバイオレイヤー干渉法による測定	NA	ヒト	[TN-[redacted]08]	非 GLP
TNT003 及び TNT009（スチムリマブ）の種交差反応性	NA	様々な種 [a]	[TN-[redacted]09] [TN-[redacted]09 Amendment 2]	非 GLP
TNT003 及び TNT009（スチムリマブ）の種交差反応性（改訂版）	NA	イヌ	[TN-[redacted]09A]	非 GLP
補体系成分への TNT009（スチムリマブ）の結合の評価	NA	NA	[TN-[redacted]12]	非 GLP
補体経路活性化に対する TNT009（スチムリマブ）の作用の酵素結合免疫吸着測定法による評価	NA	ヒト	[TN-[redacted]13]	非 GLP
補体経路活性化に対する TNT009（スチムリマブ）の作用の酵素結合免疫吸着測定法による評価（改訂版）	NA	ヒト	[TN-[redacted]13A]	非 GLP

C1s=補体第 1 成分 s サブコンポーネント、GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、NA=該当せず

a ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ミニブタ、カニクイザル

2　分析法

表 2 - 分析法

分析の種類	種	マトリックス	分析対象物	分析範囲 (µg/mL)	LLOQ (ng/mL)	特記すべき所見（精度及び真度のバリデーション）		試験番号
						分析単位内	分析単位間	
PD 測定法のバリデーション（ELISA；WIESLAB® Complement System Classical Pathway アッセイ）	カニクイザル	血清	スチムリマブ	0.20～99	NA	SC CV：1.0%～4.2% PC CV：1.4% NC CV：2.6%	SC CV：5.2%～15.0% PC CV：5.6% NC CV：16.2%	[TN-[redacted]10]

略号： CV=変動係数、ELISA=酵素結合免疫吸着測定法、GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、LLOQ=定量下限、NA=該当せず、NC=陰性対照、PC=陽性対照、PD=薬力学、SC=標準曲線

カニクイザルにおけるスチムリマブの PD 作用を評価するため、市販の酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）キット（WIESLAB® Complement System Classical Pathway［Eurodiagnostica、スウェーデン］アッセイキット）を用いて *ex vivo* で CP 活性を測定した。この再現性のある正確な半定量的分析法のバリデーションは、Intertek Pharmaceutical Services で実施した（[TN-[redacted]10] 試験参照）。

WIESLAB® Complement System Classical Pathway アッセイは、溶血アッセイにおける補体活性化の原理と、補体活性化により生じるネオアンチゲン（最終補体産物の膜侵襲複合体 C5b-9 上に存在）に特異的な標識抗体の使用を組み合わせたものである。生成するネオアンチゲンの量は、補体経路の機能活性に比例する。カニクイザルの血清を用いるときの本アッセイの性能を表 3 に記載する。

表 3 - カニクイザル血清を用いる WIESLAB® ELISA Complement System Classical Pathway アッセイのバリデーションの要約

パラメータ	バリデーション結果
基準範囲：正常カニクイザル	81.9%～126.2%
希釈倍率	1:101
スチムリマブの標準曲線：分析単位内精度	1.0%～4.2%
スチムリマブの標準曲線：分析単位間精度	5.2%～15.0%
PC：分析単位内精度	CV：1.4%
PC：分析単位間精度	CV：5.6%
NC：分析単位内精度	CV：2.6%
NC：分析単位間精度	CV：16.2%
スチムリマブ IC_{50}（平均値 ± SD）	14.10 ± 1.011 µg/mL
安定性；凍結融解：3 サイクルまで	3 サイクルの間安定
安定性；氷上	1.5 時間まで安定
安定性；2～8ºC	24 時間では不安定

略号：CV=変動係数、ELISA=酵素結合免疫吸着測定法、IC_{50}=50%阻害濃度、NC=陰性対照、PC=陽性対照、SD=標準偏差

出典： TN-[redacted]10、[TN-[redacted]10 Amendment 1]、[TN-[redacted]10 Amendment 2]、[TN-[redacted]10 Addendum 1] 試験報告書

3　効力を裏付ける試験

In vitro 薬理試験において、ヒト（及びその他の動物種）の C1s に対するスチムリマブ及び TNT003 の結合親和性、並びに CP 活性阻害作用の特異性及び効力を評価した。また、CAD、ITP 及び BP 患者由来検体を用いた *in vitro* 試験において、ヒト RBC、血小板及び皮膚への補体フラグメント沈着に対するスチムリマブの抑制能を評価した。スチムリマブが自己免疫を誘発する可能性を評価する *in vitro* 試験も実施した。

In vivo では、カニクイザルを用いた単回及び反復 IV 投与薬物動態（PK）／PD 試験及び反復 IV 投与トキシコキネティクス（TK）／PD 試験においてスチムリマブを評価した。*Ex vivo* での血清中 CP 活性阻害作用を用いてスチムリマブの活性を確認した。

3.1　*In vitro* 薬理

3.1.1　正常ヒト及び動物血清を用いた *in vitro* 試験

3.1.1.1　親和性、特異性及び効力

マウス mAb TNT003 のヒト化によりスチムリマブを作製した後、スチムリマブ及び TNT003 のヒト C1s への結合親和性及び CP 活性阻害能を評価する結合及び機能試験を実施した（Module 2.6.3 薬理試験概要表 [表 2.6.3.2.1]、及び[TN-[redacted]08]、[TN-[redacted]13]、[TN-[redacted]13A] 試験参照）。バイオレイヤー干渉法を用いて結合親和性を測定したところ、ヒト C1s に対しスチムリマブ及び TNT003 は同程度の高い結合親和性を示した（表 4）。スチムリマブ及び TNT003 の CP 活性阻害能の評価は、両抗体を NHS に様々な濃度で添加し、WIESLAB® Complement System Classical Pathway アッセイを用いて行った。スチムリマブ及び TNT003 は、NHS 中 CP 活性を強力かつ完全（100%）に阻害し、阻害作用は同程度であった。NHS 中の AP 又は LP 活性を評価するための同様のアッセイでもスチムリマブ及び TNT003 の評価を行った（TN-[redacted]13 試験、TN-[redacted]13A 試験）。スチムリマブ及び TNT003 は、NHS 中 AP 及び LP 活性を阻害しなかったことから、CP 特異性を有することが示された（表 4）。

表 4 - ヒト補体系におけるスチムリマブ及び TNT003 の薬理学的特性

mAb	活性型 C1s K_D (mol/L)	CP 活性 IC_{50}	最大 CP 阻害率	AP 活性	LP 活性
TNT003	5.898×10^{-10}	1.3×10^{-9} mol/L (0.22 µg/mL)	100%	阻害せず	阻害せず
スチムリマブ	2.624×10^{-10}	1.9×10^{-9} mol/L (0.34 µg/mL)	100%	阻害せず	阻害せず

AP=第 2 経路、C1s=補体第 1 成分 s サブコンポーネント、CP=古典的補体経路、IC_{50}=50%阻害濃度、K_D=平衡解離定数、LP=レクチン経路
出典： TN-[redacted]08、TN-[redacted]13、TN-[redacted]13A 試験報告書

C1s 特異性を更に検討するため、その他の補体成分である C1s 分解プロテアーゼ（補体第 1 成分 r サブコンポーネント［C1r］）、LP の同族セリンプロテアーゼ（MASP-1、MASP-2 及び MASP-3）及び C1s 基質（補体第 2 成分［C2］及び C4）へのスチムリマブの結合能を ELISA で評価した。スチムリマブが結合したのは C1s のみであった（Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]、及び[TN-[redacted]12] 試験参照）。

これらの結果を総合すると、ヒト化 mAb のスチムリマブとその親抗体であるマウス mAb の TNT003 は薬理活性が同程度であることが裏付けられたことから、TNT003 の試験で得られたデータを用いてスチムリマブの薬理作用を評価することが可能と考えられる。また、マウス mAb の TNT003 からヒト化 mAb のスチムリマブへの変換による活性の低下は認められなかった。スチムリマブはヒト C1s に高い親和性及び特異性を有し、血清中 CP 活性を強力かつ完全（100%）に阻害するが、AP 及び LP 活性は阻害しないことが示された。

3.1.1.2 種交差反応性

種交差反応性を評価するため、ヒト、ヒト以外の霊長類（カニクイザル）、ラット及びマウスの C1s に対するスチムリマブの結合親和性をプレートベース結合 ELISA により *in vitro* で測定し、比較した。また機能的交差反応性を *in vitro* 溶血アッセイで評価し、ヒト、カニクイザル、イヌ、ミニブタ、ウサギ、ラット又はモルモットの抗体感作 RBC における CP 介在性溶血に対するスチムリマブ（又は TNT003）の抑制能を比較した。これらの結果を表 5 に示す（Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]、及び[TN-[redacted]09]、[TN-[redacted]09A]、[TN-[redacted]09 Amendment 2] 試験参照）。

表 5 - スチムリマブの種交差反応性

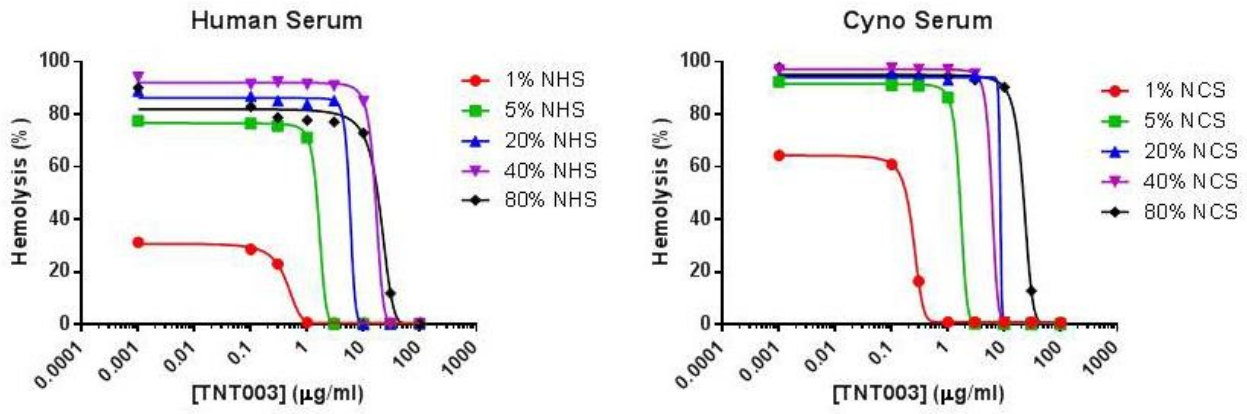
種	C1s への結合 EC_{50} (mol/L)	1.34%血清中溶血 IC_{50} (µg/mL)
ヒト	2.6×10^{-10}	0.21
カニクイザル	1.6×10^{-10}	0.21
イヌ	測定せず	抑制なし [a]
ミニブタ	測定せず	抑制なし
ウサギ	測定せず	抑制なし [a]
ラット	2.2×10^{-9}	試験最高濃度（100 µg/mL）で部分的抑制
マウス	結合なし	測定せず
モルモット	測定せず	抑制なし

C1s=補体第 1 成分 s サブコンポーネント、EC_{50}=50%有効濃度、IC_{50}=50%阻害濃度
a 10%血清で試験した
出典： TN-[redacted]09、TN-[redacted]09A、TN-[redacted]09 Amendment 2 試験報告書

イヌ、ミニブタ、ウサギ、ラット、マウス及びモルモットでは、スチムリマブ及び TNT003 の C1s 結合能及び血清中 CP 介在性溶血抑制作用のいずれかが認められなかった。一方、サルでは、スチムリマブはヒトと同程度の C1s 結合能（ヒト及びサルのいずれも 10^{-10} mol/L レベル）及び 1.34%血清中 CP 介在性溶血抑制作用（IC_{50} 値はいずれも 0.21 µg/mL）を示した。

NHS 及び正常カニクイザル血清（NCS）を用いた TNT003 の溶血アッセイにおいて、*in vitro* での C1s 阻害及び CP 活性阻害による作用を更に検討した（図 1 及び表 6）。ヒト及びサルの 80%血清における薬理学的溶血抑制作用は同程度であり、IC_{50} 値はそれぞれ 14.7 及び 15.6 µg/mL であった。

図 1 - ヒト及びサルの古典的補体経路介在性溶血に対する TNT003 の抑制作用



Cyno=カニクイザル（*Macaca fascicularis*）、NCS=正常カニクイザル血清、NHS=正常ヒト血清
出典： TN-[redacted]09 試験報告書

表 6 - ヒト及びサルの古典的補体経路介在性溶血に対する TNT003 の抑制作用の IC_{50} 値

血清	ヒト IC_{50} (µg/mL)	カニクイザル IC_{50} (µg/mL)
1%	0.38	0.18
5%	1.2	1.3
20%	4.1	5.1
40%	13.0	5.1
80%	14.7	15.6

IC_{50}=50%阻害濃度
出典： TN-[redacted]09 試験報告書

これらの結果を総合すると、ヒトとカニクイザルにおける補体タンパク質及び経路の保存性、並びに両動物種におけるスチムリマブの薬理活性の類似性は、ヒト補体経路を阻害することを目的とした他の生物学的製剤で報告されているもの(1)と同様であることが示された。

カニクイザルが薬理学的に適した唯一の動物種と特定され、カニクイザルにおけるスチムリマブの薬理活性はヒトにおける活性と同程度であった。

3.1.1.3 閾値型作用

TNT003 の CP 活性阻害作用は急峻な（「閾値型」の）濃度－反応曲線を示し（図 1）、スチムリマブも同様に閾値を超えるスチムリマブ濃度で CP 活性を速やかかつ完全に阻害した([TN-[redacted]09]試験)。この閾値型反応から、*in vivo* では、血清中スチムリマブ濃度が閾値濃度未満に低下すると CP 阻害作用が速やかに消失することが予想された。

3.1.2 疾患患者の検体を用いた *in vitro* 試験

スチムリマブは CAD 又は ITP 患者への使用を目的として開発されている。これらの溶血性疾患は自己抗体の発現を特徴とし、自己抗体が RBC に結合して CP を活性化することにより以下の反応が生じる。

1. RBC 膜への C3 フラグメント（C3b など）の沈着（オプソニン化）、並びにそれに伴う組織マクロファージによるオプソニン化 RBC の除去（貪食）及び破壊（EVH として知られる過程の 1 つ）
2. アナフィラトキシン（C3a、C4a、C5）産生及びそれに伴う EVH を促進する補体受容体のアップレギュレーション
3. 膜侵襲複合体（C5b-9）形成、及びその結果生じる溶血（IVH）

ITP では血小板に対して同様のメカニズムが作用していると考えられる。また BP では抗コラーゲン抗体の発現を特徴とし、それによってこの疾患に特徴的な DEJ への補体 C3 フラグメント沈着が生じる。CP はアロ抗体介在性移植障害にも関与しており、HLA 反応性 IgG の主な成分には CP 活性化作用を有するサブクラスが含まれる。移植組織内 CP 活性化が関与していることを裏付けるものとして、抗体関連型拒絶反応（AMR）では C4 の分解産物 C4d の毛細血管への沈着が認められることが多く、これは移植の転帰不良の予測マーカーとされている。

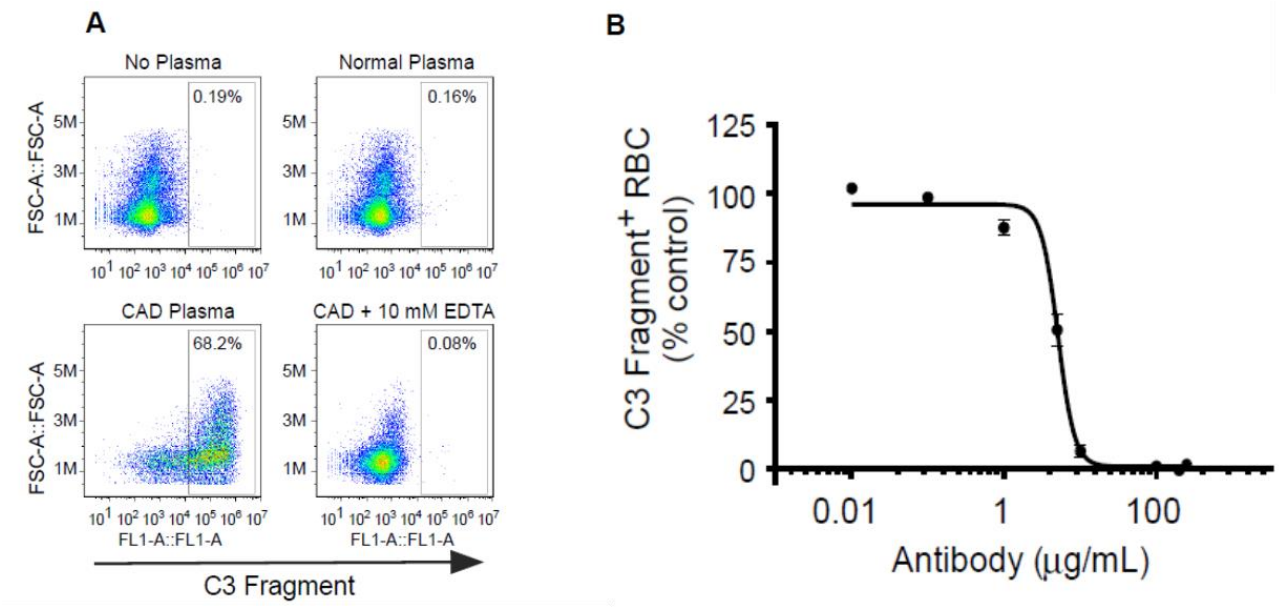
3.1.2.1 CAD 患者由来検体

スチムリマブの C1s 阻害能及びそれによる CP 活性阻害能により、RBC への C3 フラグメント沈着、オプソニン化 RBC の貪食、溶血及びアナフィラトキシン産生が抑制されると考えられる。これらのパラメータに対する抗 C1s 作用を、疾患患者の血清及び血漿検体を用いて *in vitro* で評価した。

3.1.2.1.1 RBC へのオプソニン沈着に対する抑制作用

40 名の CAD 患者から血漿検体を採取し、スチムリマブがヒト RBC への CAD 患者の自己抗体介在性補体沈着を抑制するとの仮説を、TNT003 を用いて検証した(2)。正常ヒト RBC を CAD 患者検体存在下でインキュベートし、感作として CA（一般的には 5 量体である免疫グロブリン M［IgM］）を RBC 表面に結合させた。感作後、CP 活性化を誘発する補体供給源として新鮮 NHS（25%）を添加した。EVH 誘発に関与する CP の分解産物である C3 フラグメントの RBC 表面への沈着をフローサイトメトリーで測定することにより、CP 活性を評価した。NHS に曝露した RBC、又は正常ヒト血漿で感作後 NHS に曝露した RBC では、細胞表面への C3 フラグメント沈着が認められなかった。一方、CAD 血漿で感作した RBC では、NHS により RBC への明らかな C3 フラグメント沈着が認められた（図 2）。

図 2 - ヒト赤血球細胞表面への寒冷凝集素介在性 C3 フラグメント沈着に対する TNT003 の抑制作用



C3=補体第 3 成分、CAD=寒冷凝集素症、FL1=蛍光検出器 1、FSC=前方散乱光、NHS=正常ヒト血清、RBC=赤血球
注：A）血漿非存在下（左上）又は正常ヒト血漿（右上）若しくは CAD 血漿（下の 2 つ）存在下でインキュベートした RBC を NHS に曝露したときの C3 フラグメント沈着（x 軸）を表すフローサイトメトリー散布図。右下のパネルでは、CP 活性化及び C3 フラグメント沈着を抑制する 10 mmol/L EDTA の存在下で NHS 曝露を実施した。C3 フラグメントでコートされた RBC（C3 Fragment+ RBC）の数を百分率で示す。B）すべての CAD 患者検体で平均した TNT003 の C3 フラグメント沈着抑制作用の濃度反応曲線。
IC_{50} = 5.0 ± 1.0 µg/mL（n = 28 検体）。データは、各患者検体について、100%NHS 存在下で生じた C3 フラグメント沈着で補正した。
出典：Shi et al. 2014 (2)

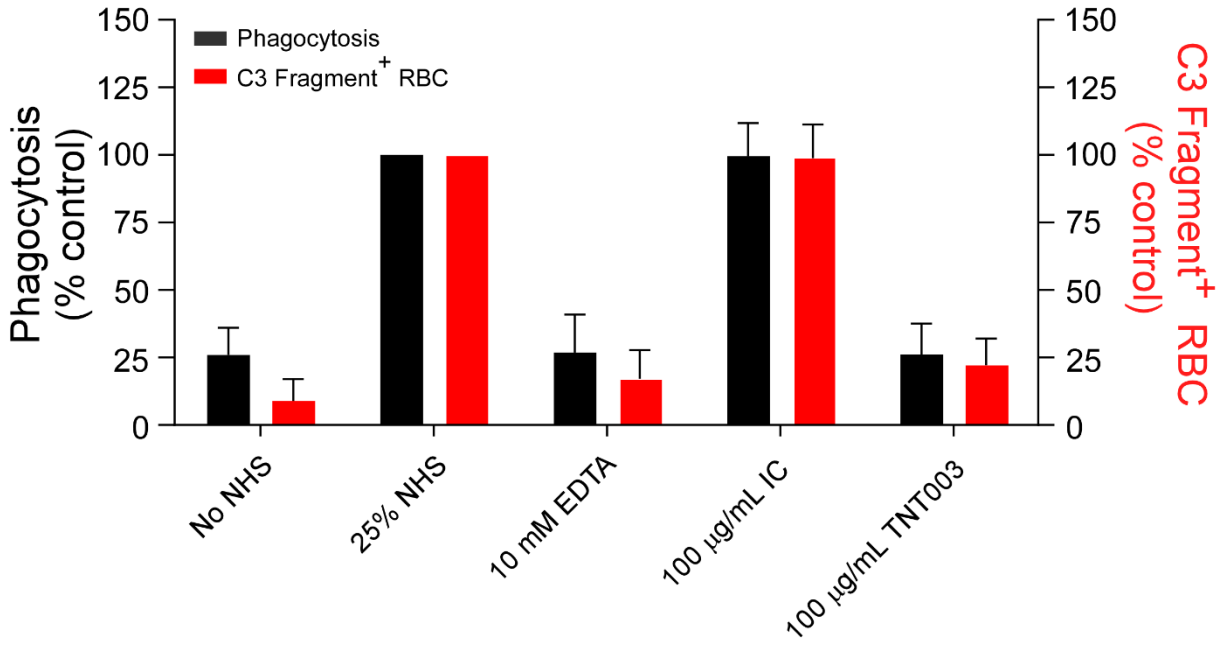
検討した CAD 血漿 40 検体のうち、異系の RBC の表面への C3 フラグメント沈着が誘発されたのは 28 検体（70%）であった(2)。TNT003 は CA 介在性 C3 フラグメント沈着を濃度依存的に抑制し、10 µg/mL の TNT003 で完全な抑制が認められた（IC_{50} = 5.0 ± 1.0 µg/mL；最大阻害率平均値は 10 µg/mL における 97%）（図 2）。これら TNT003 の結果から、そのヒト化抗体であるスチムリマブでも、CAD 患者において RBC の CA 介在性 C3 フラグメントオプソニン化を阻害することにより EVH を抑制すると考えられる。

3.1.2.1.2 RBC 貪食に対する抑制作用

補体オプソニン（C3b、補体成分 C4b［C4b］及び I 因子による C3b の分解により生じる細胞結合性オプソニン［iC3b］など）と食細胞表面の補体受容体との相互作用により、組織マクロファージ（肝臓のクッパー細胞など）によるオプソニン化 RBC の貪食が誘発される。RBC 表面への CA 介在性補体沈着が食細胞による取込みを誘発するとの仮説を検証するため、RBC を CA で感作し、CP 活性化を誘発する補体供給源として NHS を添加し曝露した。その後、RBC 貪食能を有する補体受容体を発現し

ているマクロファージ様細胞株の THP-1 細胞存在下で RBC をインキュベートした(2)。CA に曝露したが NHS に曝露しなかった細胞では、細胞表面への C3 フラグメント沈着がほとんどみられず、THP-1 細胞による効率的な貪食が認められなかった。しかし、細胞を CA 感作後に 25% NHS に曝露すると、補体沈着が 20 倍超に増加し、補体オプソニン化 RBC を含有する THP-1 細胞が約 10 倍に増加した（図 3）。

図 3 - C3 フラグメントオプソニン化ヒト赤血球の貪食に対する TNT003 の抑制作用



C3=補体第 3 成分、NHS=正常ヒト血清、RBC=赤血球、IC=アイソタイプ対照、TNT003=スチムリマブの親抗体であるマウス IgG 抗体、CAD=寒冷凝集素症、CMFDA=5-クロロメチルフルオレセイン二酢酸

注：CAD 血漿中でインキュベートした RBC を、アイソタイプ対照抗体（IgG）、10 mmol/L EDTA 又は TNT003 存在下で NHS に曝露した。C3 フラグメント沈着をフローサイトメトリーで定量した（C3 Fragment+ RBC、赤色棒）。次に、RBC を CMFDA 蛍光色素で染色して洗浄した後、THP-1 食細胞とともにインキュベートした。その後、CMFDA 染色陽性 THP-1 細胞を定量した［貪食率（%）；黒色棒］。図 3 には CAD 患者 5 名の検体を用いた 10 回の実験（患者 1 名につき 2 回の実験）で得られたデータを示す。貪食及び C3 フラグメント沈着の実験データはすべて対照（CAD 血漿+25% NHS）の値で補正したものである。

出典：Shi et al. 2014 (2)

TNT003（100 µg/mL）存在下で NHS 曝露を行うと、補体沈着及び貪食はいずれもベースライン（NHS なし、10 mmol/L EDTA）値まで抑制された。一方、アイソタイプ対照 mAb は C3 フラグメント沈着及び貪食のいずれも抑制しなかった。これら TNT003 の結果から、そのヒト化抗体であるスチムリマブでも、CAD 患者において CA 介在性 C3 フラグメントオプソニン化 RBC の貪食を抑制することにより EVH を抑制すると考えられる。

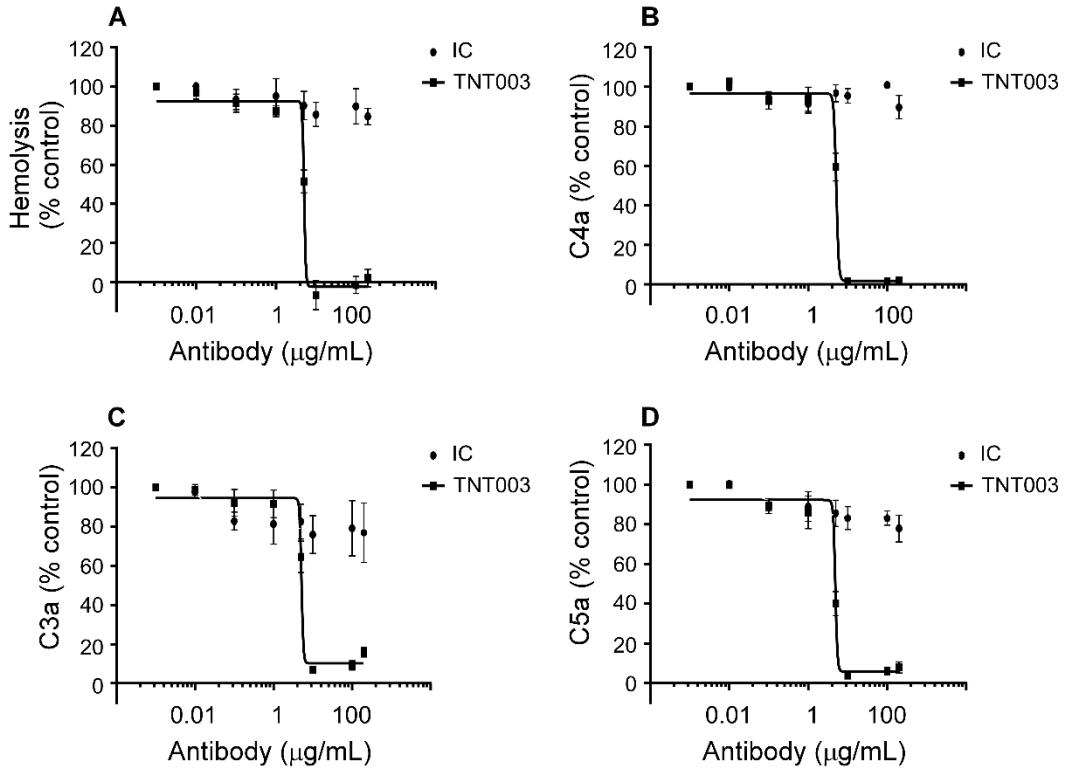
3.1.2.1.3 溶血及びアナフィラトキシン産生に対する抑制作用

検討した CAD 40 検体のうち、患者血漿及び NHS への曝露後に膜侵襲複合体介在性 RBC 溶解が誘発されたのは 1 検体のみであった(2)。この検体を用いて、CA 介在性溶血に対する TNT003 の抑制能を評価した。正常ヒト RBC を患者の血漿検体で感作した後、様々な濃度の TNT003 を含む NHS（CP 活性化を誘発する補体供給源として添加）に曝露した。TNT003 は、NHS に曝露した CA 感作 RBC の直接的な細胞溶解を濃度依存的に抑制した（図 4）。これら TNT003 の結果から、そのヒト化抗体であるスチムリマブでも、CAD 患者において CA 介在性溶血を抑制することにより IVH を抑制すると考えられる。

溶血過程の一部として、最終経路（C5～補体第 9 成分［C9］）を含む CP 酵素カスケード全体が活性化されるため、これらの実験では CP により生成するすべてのアナフィラトキシンの産生（及び抑制）を測定することが可能である。したがって、これらの実験で得られた上清を採取し、C3a、C4a 及び C5a 濃度を ELISA で測定したところ、TNT003 は C3a、C4a 及び C5a の産生を濃度依存的に抑制した（図 4）。

アナフィラトキシンである C3a、C4a 及び C5a の遊離は EVH に寄与すると考えられる。C5a と C5a 受容体との相互作用により補体受容体 3（CR3）がアップレギュレートされ、これが白血球のオプソニン C3b、iC3b 及び C4b に結合することにより、オプソニン化 RBC の貪食が誘発される(3)(4)。また、C5a はクッパー細胞（肝臓の食細胞）の結晶性フラグメント（Fc）γ 受容体（FcγRs）をアップレギュレートし、マウスモデルにおいて本格的な AIHA の発症に必要であることが示されている(5)。したがって、理論的には、AIHA において、アナフィラトキシン産生の抑制により補体受容体依存性 EVH が抑制されると考えられる。

図 4 - 寒冷凝集素介在性溶血及びアナフィラトキシン産生に対する TNT003 の抑制作用



C3a=C3 の分解により生じるアナフィラトキシン、C4a=C4 の分解により生じるアナフィラトキシン、C5a=C5 の分解により生じるアナフィラトキシン、CA=寒冷凝集素、CAD=寒冷凝集素症、ELISA=酵素結合免疫吸着測定法、IC=アイソタイプ対照、IgG2a=免疫グロブリン G サブクラス 2a、NHS=正常ヒト血清、RBC=赤血球、TNT003=スチムリマブの親抗体であるマウス IgG 抗体

注：ヒト RBC を CAD 患者血漿に曝露した後、様々な量の TNT003 又は IgG2a IC 抗体を含む NHS に曝露した。（A）CA 感作 RBC の NHS 曝露による溶解は TNT003 により抑制されたが、IC では抑制されなかった。これらの実験で得られた上清中の（B）C4a、（C）C3a 及び（D）C5a を ELISA で測定したところ、TNT003 は CA 介在性アナフィラトキシン産生を抑制することが示された。

出典：Shi et al. 2014 (2)

3.1.2.2 ITP 患者由来検体

3.1.2.2.1 *Ex vivo* での血小板への C4d 沈着と *in vivo* での ITP 患者の血小板減少との相関性

最近の *in vitro* 試験において、ITP 患者の自己抗体が固定化血小板表面への補体沈着を誘発することが示されている(6)(7)。この条件下での補体活性化は、CP 活性により生じると考えられている。この仮説を検証するため、ITP 患者 55 名の血漿検体及び臨床データを収集し、補体活性化が疾患重症度と関連しているか否かを検討した(8)。96 ウェルプレートのウェルに固定化した血小板を ITP 患者血漿（患者の自己抗体及び補体の両方を含む）に曝露し、血小板への C1q、C3b、C4d 又は C5b-9 の沈着を ELISA で評価した。活性化又は固定化した血小板では補体活性化が自然に起こることから、患者血漿による CP フラグメント沈着の促進を、プールした正常対照血漿に対する比として表した。補体活性化の増強

は、正常ヒト検体に対する比が 1.5 倍以上である場合と定義し、これは基準範囲（97.5%信頼区間）より 3 標準偏差超高い値であった。ITP 患者 55 名中 26 名（約 47%）で、補体フラグメント沈着を示すエビデンスの増加が認められた。患者血漿 55 検体中 23 検体（42%）及び 7 検体（約 13%）でそれぞれ C1q 及び C4d 沈着の増加が認められた。次に、ITP 血漿に曝露した血小板における CP 活性化及び CP タンパク質フラグメント沈着に対する TNT003 の抑制作用を評価した。アイソタイプ対照抗体の添加時と比較して、TNT003（100 μg/mL）は C1q、C4d、C3b 及び C5b-9 の沈着をそれぞれ 13%、44%、72%及び 82%抑制した（表 7）。

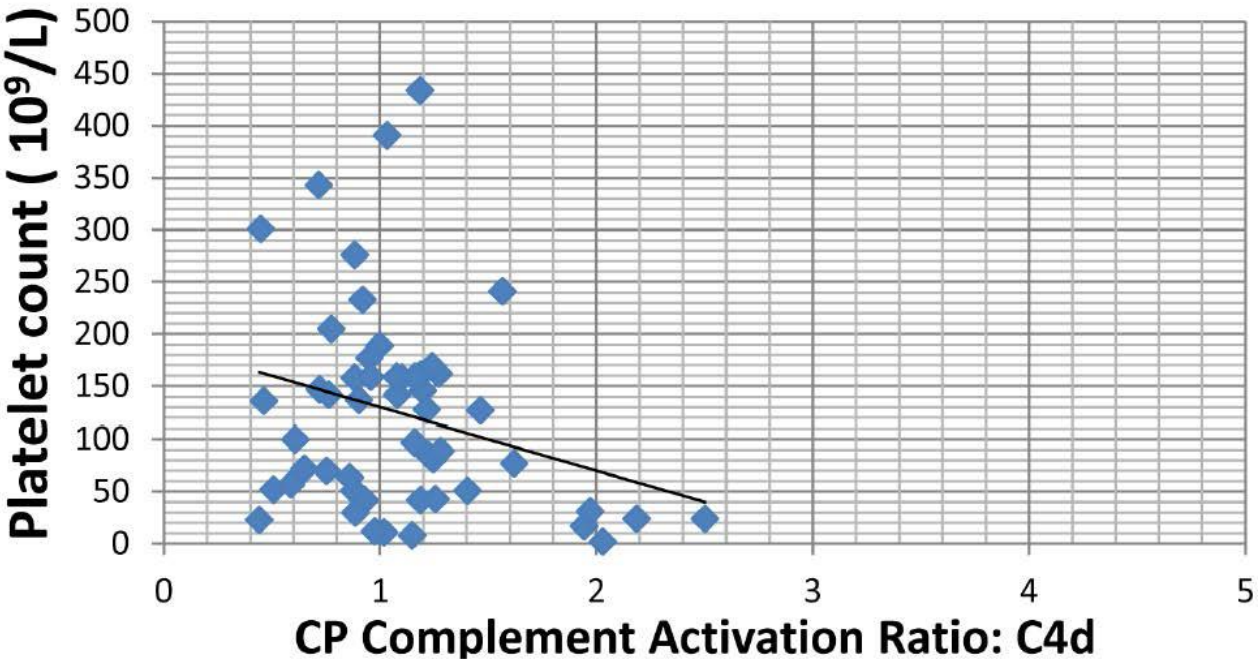
表 7 - ヒト血小板における ITP 介在性 C1q、C3d、C4d 及び C5b-9 沈着に対する TNT003 の抑制作用

補体沈着	TNT003 による抑制率（%）
C1q	12.81 ± 13.23（p < 0.001）
C4d	44 ± 43（p < 0.001）
C3b	72 ± 17（p < 0.001）
C5b-9	82 ± 14（p < 0.001）

C1q=補体第 1 成分 q サブコンポーネント、C3b=補体第 3 成分の分解により生じる細胞結合性オプソニン、C4d=補体第 4 成分分解の最終的細胞結合性副産物、C5b-9=膜侵襲複合体、ITP=免疫性血小板減少性紫斑病
出典：Peerschke et al. 2016 (8)

興味深いことに、*ex vivo* での検体への C4d 沈着能は *in vivo* での血小板数と逆相関した（p = 0.042）（図 5）。実際、C4d 沈着が増加した 7 名のうち 6 名の患者の循環全血中血小板数は 100×10^9/L 未満であり、このうち 5 名は 50×10^9/L 未満であった。したがって、ITP 患者由来検体において、*ex vivo* での C4d 沈着誘発能は、*in vivo* での患者の血小板減少の程度と相関することが示された。

図 5 - *Ex vivo* での血小板への C4d 沈着と *in vivo* での ITP 患者の血小板減少との相関性



C4d=C4 分解の最終的細胞結合性副産物、CP=古典的補体経路、ELISA=酵素結合免疫吸着測定法、ITP=免疫性血小板減少性紫斑病
注：96 ウェルプレートにコートしたヒト血小板を ITP 患者血漿検体（n = 55 患者）に曝露し、プレートベース ELISA で測定したところ、7 検体で C4d 沈着が認められた。C4d 沈着の程度は、患者の血小板数測定値と逆相関したことから、*in vivo* での血小板破壊の誘発に CP が関与していることが示唆された。
出典：Peerschke et al. 2016 (8)

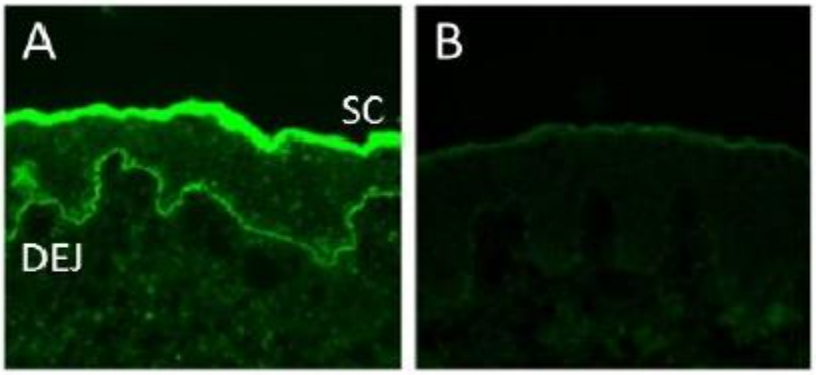
これらの結果を総合すると、ITP 患者の血小板特異的抗原に対する自己抗体が血小板表面における補体沈着を誘発することを示す過去の試験結果が裏付けられた。重要なこととして、*ex vivo* での C4d 沈着能と *in vivo* での血小板減少との間に相関がみられたことから、CP 活性が ITP 患者における血小板破壊に寄与している可能性を示すエビデンスが得られた。これらの TNT003 による結果から、そのヒト化抗体であるスチムリマブでも、ITP 患者の血小板への C4d フラグメントの沈着を抑制することにより、血小板減少を抑制する可能性もあることが示唆された。

3.1.2.3　水疱性類天疱瘡患者検体を用いた TNT003 の *in vitro* 試験

BP 自己抗体介在性補体沈着誘発における CP の役割を評価するため、BP 患者血清及びヒト皮膚を用いた *in vitro* アッセイを実施した（Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]、[TN-[redacted]16] 試験参照）。本試験ではヒト包皮パッチに BP 患者血清を曝露し BP 自己抗体で感作した。補体活性化を予防するため、感作は EDTA 存在下で行った。その後、洗浄して BP 血清を除去し、補体供給源として 1 対 5 希釈した NHS を添加した。ヒト皮膚パッチの DEJ における補体沈着を FITC 標識抗 C3 抗体で検出したところ、BP

血清で感作し希釈 NHS を添加した皮膚パッチでは補体沈着が認められたが（図 6、パネル A）、希釈 NHS 添加時に 10 mmol/L EDTA（補体活性化抑制の陽性対照）を加えた皮膚パッチ（図 6、パネル B）では認められなかった。

図 6 - BP 血清で誘発されたヒト皮膚パッチの DEJ における C3c 沈着



DEJ=真皮表皮接合部、C3c=補体第 3 成分の分解により生じる細胞結合性オプソニン、BP=水疱性類天疱瘡、SC=角質層

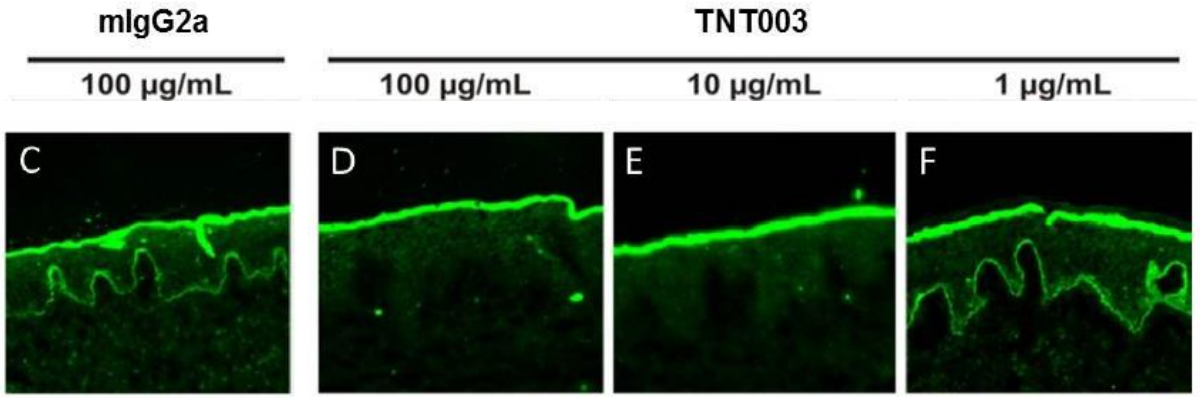
注：新生児包皮の凍結切片を、PBS で希釈した BP 患者血清とともに室温で 30 分間インキュベートした。この段階で補体活性化が起こらないようにするために 10 mmol/L EDTA を添加した。洗浄後に正常ヒト血清（パネル A）又は正常ヒト血清＋EDTA（パネル B）を添加し、切片を更に 30 分間インキュベートした。DEJ における補体沈着を抗 C3c 抗体で検出した。

出典： TN-[redacted]16 試験報告書

BP 患者血清 91 検体で C3 フラグメント染色を行ったところ、32 検体で補体沈着が認められた。TNT003 は、補体沈着がみられた BP 血清 32 検体のうち 18 検体を用いて試験し、そのすべてにおいて補体沈着を抑制した。さらに、TNT003 による補体沈着抑制作用は濃度依存的であり、100 及び 10 µg/mL の TNT003 では DEJ（皮膚の自己抗体結合部位）における BP 血清介在性 C3 フラグメント沈着が完全に抑制されたが、1 µg/mL では抑制されなかった（図 7）。一方、アイソタイプ対照（マウス IgG2a）抗体は BP 血清介在性補体沈着を抑制しなかった。

これらのデータから、BP 患者の血清中に存在する自己抗体が、正常ヒト皮膚の DEJ において、BP 患者の皮膚検体でみられるものと病理組織学的に類似した補体沈着を誘発することを示すエビデンスが得られた。さらに、TNT003 存在下で BP 自己抗体介在性補体沈着が抑制されたことから、BP 患者皮膚生検の DEJ でみられた補体沈着に CP が関与していることが示唆された。

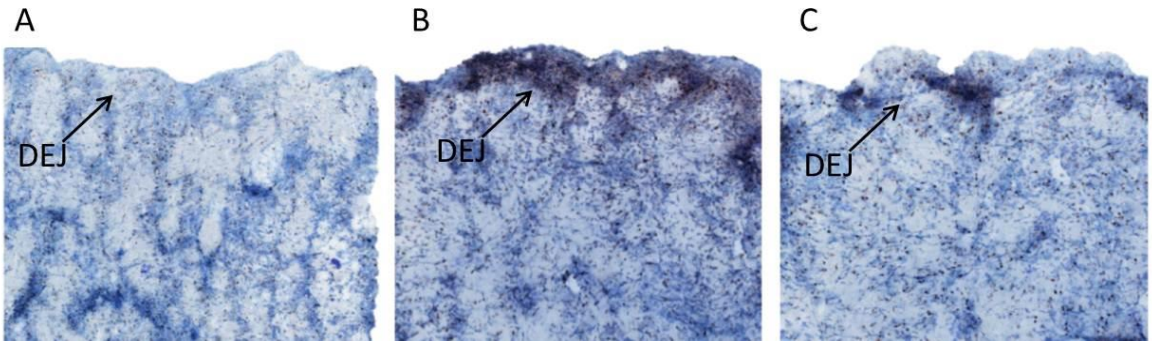
図 7 - BP 患者血清誘発 C3 フラグメント沈着に対する TNT003 の抑制作用



DEJ=真皮表皮接合部、C3c=補体第 3 成分の分解により生じる細胞結合性オプソニン、mIgG2a=マウス免疫グロブリン G サブクラス 2a アイソタイプ対照、TNT003=スチムリマブの親抗体であるマウス IgG 抗体、BP=水疱性類天疱瘡
注：新生児包皮の凍結切片を、PBS で希釈した BP 患者血清とともに室温で 30 分間インキュベートした。この段階で補体活性化が起こらないようにするために 10 mmol/L EDTA を添加した。洗浄後に漸増濃度の TNT003（それぞれ 100、10、1 µg/mL；図 D、E、F）又はマウス IgG2a アイソタイプ対照抗体（図 C）存在下で正常ヒト血清を添加し、切片を更に 30 分間インキュベートした。DEJ における補体沈着を抗 C3c 抗体で検出した。
出典： TN-[redacted]16 試験報告書

CP が活性化すると、エフェクター免疫細胞の活性化及び補体活性化部位への遊走に関与すると考えられているアナフィラトキシンが産生される。BP 自己抗体介在性細胞遊走の役割を検討するため、正常ヒト皮膚パッチを用いた *in vitro* 白血球接着アッセイを実施した。補体沈着の評価（図 7）と同様の方法を用いて、正常ヒト皮膚パッチを EDTA 含有 BP 血清又は NHS（対照）存在下で感作した。その後、血清を洗浄で除去し、末梢血から単離した白血球を補体含有又は補体欠乏 NHS（熱非働化 NHS［HI-NHS］）の存在下で添加した。NHS で感作した後、十分な補体を含有する血清に曝露したヒト皮膚パッチでは、DEJ に抗 CD45 染色が認められなかったことから示されるように、白血球接着が誘発されなかった（図 8、パネル A）。一方、BP 血清で感作した後、補体に曝露した皮膚パッチでは、DEJ に強い抗 CD45 染色が認められた（図 8、パネル B）。最後に、BP 血清で感作した後、熱非働化補体に曝露した皮膚パッチでは、白血球接着に対する作用が認められなかった（図 8、パネル C）。これらのデータを総合すると、DEJ への自己抗体の結合により白血球の接着が補体依存的に誘発されることが示唆された。

図 8 - 血清中に保存されている補体による BP 血清介在性白血球接着



DEJ=真皮表皮接合部、PBMC=末梢血単核細胞、CD45=白血球共通抗原、BP=水疱性類天疱瘡
注：新生児包皮の凍結切片を BP 患者血清で感作した。その後、補体供給源としての正常ヒト血清又は熱非働化正常ヒト血清の存在下で PBMC を添加した。皮膚パッチへの白血球の接着を抗 CD45 抗体で検出した。
出典： TN-[redacted]16 試験報告書

これらの *in vitro* データから、BP 患者の血清中 BP 自己抗体により CP が活性化し、その結果、DEJ に補体フラグメントが沈着することを示すエビデンスが得られた。さらに、この経路が活性化すると、白血球の遊走及び接着を誘発するアナフィラトキシンが産生され、補体活性化部位で催炎症性メディエーターが放出される。これら TNT003 の結果から、そのヒト化抗体であるスチムリマブにおいても、BP 患者に臨床効果を示す可能性があることが示唆された。

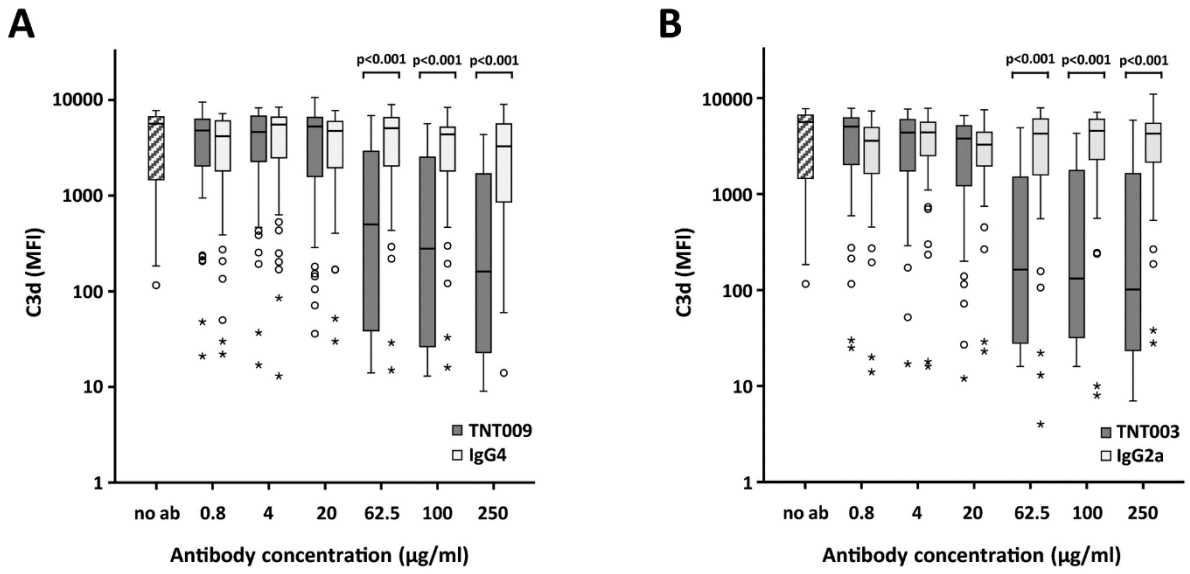
3.1.2.4　抗 HLA 抗体誘発補体活性化

補体の CP はアロ抗体介在性移植障害に大きく寄与していると考えられており、現在、補体阻害を標的とするアプローチが拒絶反応の抑制に有望とされている(9)(10)。HLA 反応性 IgG の主要な成分には、C1 複合体に結合して CP を活性化するサブクラスが含まれる。CP 活性化によりアナフィラトキシン（C3a 及び C5a）の遊離及び膜オプソニンの沈着が引き起こされ、最終的には膜侵襲複合体（C5b-9）が形成される。移植組織内 CP 活性化が関与していることを裏付けるものとして、抗体関連型拒絶反応（AMR）では C4 の分解産物 C4d の毛細血管への沈着が認められることが多く、これは移植の転帰不良の予測マーカーとされている(9)(11)。

ヒト化抗 C1s mAb のスチムリマブ及びその親抗体であるマウス mAb の TNT003 の作用機序及び有効性を非臨床 *in vitro* HLA 抗体誘発 CP 活性化モデルで検討した(12)。抗 HLA 抗体による補体活性化の役割を、改変型単一抗原ビーズアッセイで検討した。単一抗原ビーズアッセイ系は、各ビーズが単一 HLA の多数のコピーでコートされている固相 Luminex ベースプラットフォームである。まず、このビーズを用いて、移植を検討中のレシピエントにおける循環血中抗 HLA 抗体の抗体価及び抗原特異性を確認した。そして、抗 HLA 抗体の補体沈着誘発能を評価するため、先の結果を基に抗 HLA 抗体価の高い血清（対照血清）を用いて HLA コートビーズを EDTA の存在下で感作した。対照血清を除去した後、スチムリマブ又は TNT003 の存在下又は非存在下で、補体供給源として NHS（25%）を

添加した。抗 C3d 染色を行ったところ、クラス I 及びクラス II HLA 抗原に対する抗 HLA 抗体を含有し高度に感作された血清は、HLA コートビーズ表面への補体沈着を誘発することが示された（図 9）。

図 9 - 抗 HLA 抗体誘発補体沈着に対するスチムリマブ（TNT009）及び TNT003 の濃度依存的な抑制作用



C3d=C3 分解の最終的細胞結合性副産物、MFI=平均蛍光強度、IgG2a=免疫グロブリン G サブクラス 2a アイソタイプ対照、TNT003=スチムリマブの親抗体であるマウス IgG 抗体、TNT009=スチムリマブ、IgG4=免疫グロブリン G サブクラス 4 アイソタイプ対照、HLA=ヒト白血球抗原、MFI=平均蛍光強度

注：漸増濃度のスチムリマブ（TNT009；A）又は TNT003（B）の作用を、HLA クラス I 単一抗原フロービーズ（SAFB）を用いて評価し、対応するアイソタイプ対照（それぞれヒト IgG4 及びマウス IgG2a）と比較した。箱ひげ図は、ベースライン（PBS）C3d 結果が陽性（MFI>100）の SAFB 47 検体で得られた MFI の中央値及び四分位範囲（外れ値：白丸、極端な外れ値：アスタリスク）を示す。

出典：Wahrmann et al. 2017 (12)

図 9 に示すように、スチムリマブ又は TNT003 は C3 分解産物の沈着を顕著に抑制し、20～62.5 µg/mL の間で急峻な濃度－反応関係を示した。20 µg/mL を超える濃度で C3d 沈着の最大抑制が得られた。これらのデータから、単一抗原ビーズアッセイにおいて、HLA クラス I 及びクラス II 抗原に対する抗 HLA 抗体により補体沈着が誘発され、これらはスチムリマブ及び TNT003 で抑制されることを示すエビデンスが得られた。また、この試験から、C1 の下流で抗 HLA 抗体誘発性補体活性化を阻害するには、抗 C1s 抗体が非常に効果的であることが示唆された。これらの結果から、感作された移植レシピエントにおける補体介在性組織障害の治療又は予防にスチムリマブを使用できるか否かを検討することを目的として臨床試験を計画する根拠が得られた。

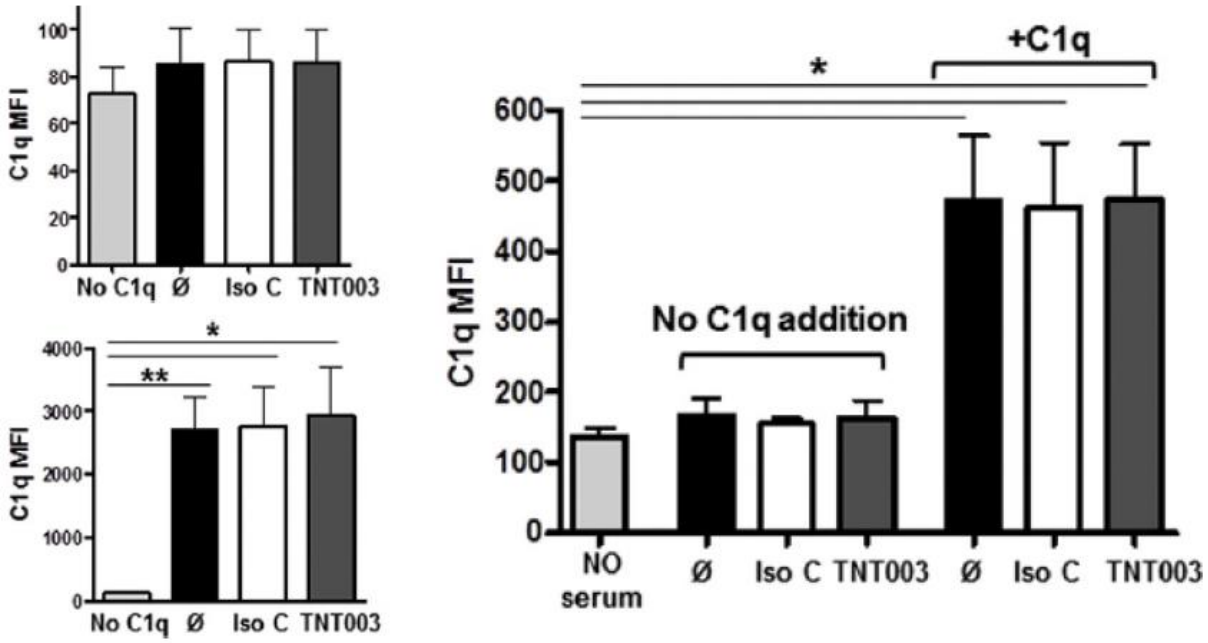
3.1.3 *In vitro* 自己免疫試験

正常な CP 活性は、「自己」抗原に対して免疫反応が起こる自己免疫疾患の予防に関与していると考えられている。自己抗原への異常な曝露が生じる原因の 1 つはアポトーシス細胞（AC）残屑と考えられる。CP は、C1q を含む補体フラグメントによるオプソニン化（エフェロサイトーシスとして知られる過程である EAC の貪食クリアランスを促進する）を介した AC のクリアランスに関与している。CP 成分が遺伝的に欠損している患者は、ループス様自己免疫症候群を発症する傾向がある。CP 活性の遺伝的欠損によりエフェロサイトーシス機能が低下し、それによって自己抗原への異常な曝露が生じて免疫寛容が破綻し、自己免疫が生じると考えられる。このことから、TNT003 を用いてエフェロサイトーシスに対する抑制能を評価する *in vitro* 試験を実施した。

3.1.3.1 早期及び後期アポトーシス細胞への C1q 沈着に対する抑制作用の欠如

スチムリマブによる C1s 活性の阻害には、AC への C1q 沈着が抑制されることによりエフェロサイトーシスが抑制される理論的リスクがある。Ramos 細胞（不死化ヒト B 細胞株）に紫外（UV）光を照射し、EAC 又は「二次的ネクローシス」後期アポトーシス細胞（LAC）を誘発した。EAC 又は LAC を C1q 添加の存在下又は非存在下で無血清培地又は NHS とともにインキュベートした後、AC への C1q 沈着を定量することにより、C1s 活性阻害による C1q 沈着への影響を評価した(13)。TNT003 で C1s 活性を阻害したとき、EAC 及び LAC への C1q フラグメント沈着に対する影響は認められなかった（図 10）。

図 10 - 早期及び後期アポトーシス細胞への C1q 沈着に対する TNT003 の影響の欠如



AC=アポトーシス細胞、C1q=補体第 1 成分 q サブコンポーネント、Iso C=アイソタイプ対照、mAb=モノクローナル抗体、MFI=平均蛍光強度、NHS=正常ヒト血清、SEM=平均値の標準誤差、Ø=抗体非添加対照

注：早期（左上）及び後期（左下）AC を精製 C1q（15 µg/mL）添加又は非添加無血清培地とともに Iso C mAb 若しくは TNT003 の存在下又は非存在下でインキュベートした。C1q 結合をフローサイトメトリーでモニターし、結果を MFI で表した。3 回の独立した実験で得られたデータをプールした（早期 AC については 1 条件あたり n = 6〜7；後期 AC については 1 条件あたり n = 4〜5）。

NHS 又は NHS + C1q（15 µg/mL）を含む培地を Iso C mAb 又は TNT003 とともにプレインキュベートした後、後期 AC を添加してインキュベートした（右）。その後洗浄し、AC をマウス抗ヒト C1q mAb で染色してフローサイトメトリーで分析した。3 回の独立した実験で得られたデータをプールした（1 条件あたり n = 4〜5 ウェル）。

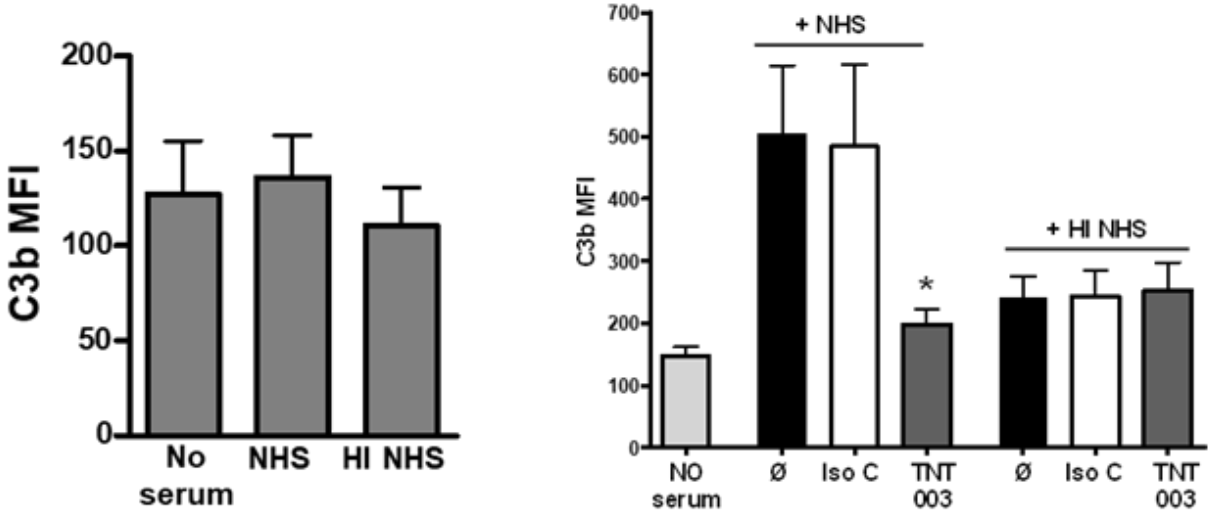
棒グラフは平均値+SEM を表す；*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001。

出典：Colonna et al. 2016 (13)

3.1.3.2 後期アポトーシス細胞への C3b 沈着に対する抑制作用及び早期アポトーシス細胞への抑制作用の欠如

TNT003 で C1s を阻害したときの EAC 及び LAC への C3b フラグメント沈着に対する影響を評価するため、無血清培地、NHS 又は HI-NHS を用いて同様の一連の実験を実施した。TNT003 は LAC への C3b 沈着を抑制したが、EAC への C3b 沈着は抑制しなかった（図 11）。

図 11 - 後期アポトーシス細胞への C3b 沈着に対する TNT003 の抑制作用及び早期アポトーシス細胞への抑制作用の欠如



AC=アポトーシス細胞、C3b=補体第 3 成分の分解により生じる細胞結合性オプソニン、HI-NHS=熱非働化 NHS、Iso C=アイソタイプ対照、mAb=モノクローナル抗体、MFI=平均蛍光強度、NHS=正常ヒト血清、Ø=抗体非添加対照

注：（左）無血清培地、NHS 又は HI-NHS を早期 AC とともにインキュベートした後、マウス抗ヒト C3b mAb で染色し、フローサイトメトリーで分析した。4 回の独立した実験で得られた C3b MFI 値をプールした（1 条件あたり n = 4〜6）。（右）無血清培地、NHS 又は HI-NHS を Iso C mAb 又は TNT003 とともにプレインキュベートした後、後期 AC を添加してインキュベートし、C3b 染色及びフローサイトメトリー分析を行った。8 回の独立した実験で得られた C3b MFI 値をプールした（1 条件あたり n = 8〜11 検体）。

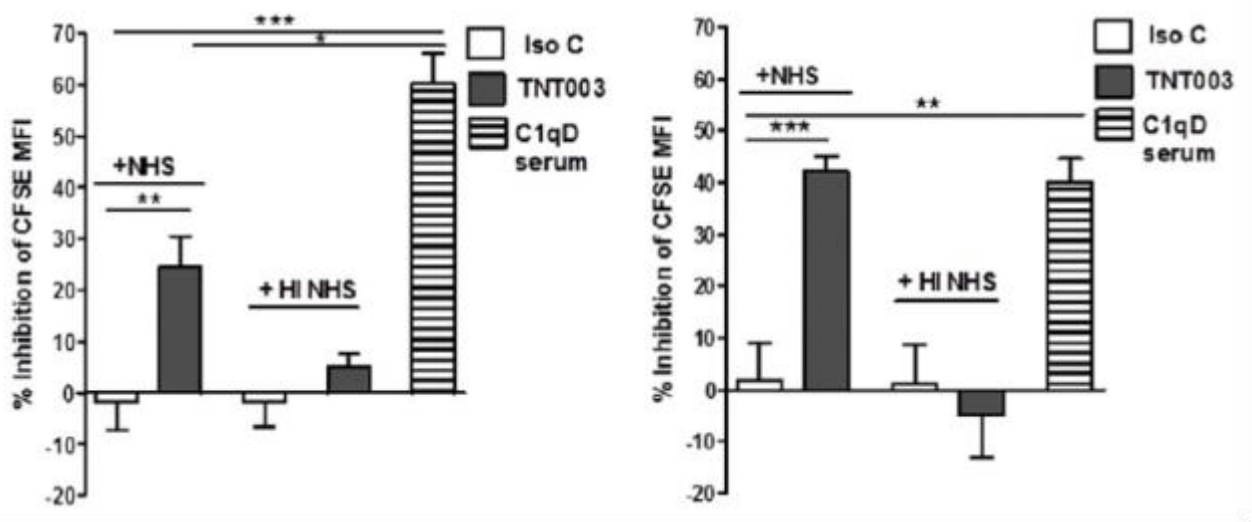
*p < 0.05

出典：Colonna et al. 2016 (13)

3.1.3.3 後期及び早期アポトーシス細胞のエフェロサイトーシスに対する阻害作用の違い

慢性的な CP 阻害による理論的な自己免疫の安全性上の懸念を検討するため、AC クリアランス（エフェロサイトーシス）に対する TNT003 の影響を *in vitro* セルベース貪食アッセイで評価した(13)。Ramos 細胞に UV を照射して EAC 又は LAC を誘発し、TNT003 又はアイソタイプ対照 mAb の存在下で NHS（補体活性化及び補体フラグメント沈着を誘発）、HI-NHS 又は C1q 欠乏血清に曝露した。その後、細胞をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE）蛍光色素で染色し、*in vitro* で初代ヒト単球をマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）で刺激して得られたヒト単球由来マクロファージ（hMΦ）に貪食させた。CFSE 陽性 hMΦ 数をフローサイトメトリーで測定することにより、オプソニン化 EAC 又は LAC の貪食を定量した。LAC のエフェロサイトーシスは中等度であり、その抑制率は C1q 欠乏血清（約 40%）及び TNT003（約 42%）で同程度であった。一方、EAC のエフェロサイトーシスは C1q 欠乏血清により顕著に（約 60%）抑制されたが、TNT003 による抑制はわずか（約 24%）であった（図 12）。

図 12 - ヒト単球由来マクロファージによる早期アポトーシス細胞のエフェロサイトーシスに対する TNT003 の影響の欠如



AC=アポトーシス細胞、C1q=補体第 1 成分 q サブコンポーネント、C1qD=C1q 欠乏、CD=白血球分化抗原、CFSE=カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル、EAC=早期アポトーシス細胞、HI-NHS=熱非働化 NHS、hMΦ=ヒト単球由来マクロファージ、Iso C=アイソタイプ対照、LAC=後期アポトーシス細胞、mAb=モノクローナル抗体、M-CSF=マクロファージコロニー刺激因子、MFI=平均蛍光強度、NHS=正常ヒト血清

注：（左）Iso C mAb 又は TNT003 を含有する NHS 又は HI-NHS を EAC とともにインキュベートした。M-CSF で誘発した hMΦ を EAC とともに（AC:hMΦ 比 2:1）37°C で 20 分間インキュベートし、EAC を hMΦ に貪食させた。CD14 陽性 hMΦ 集団の CFSE MFI を非処理ウェルと比較したときの Iso C mAb、TNT003 又は C1qD 血清による抑制率を算出することにより、EAC のエフェロサイトーシスを定量した。NHS 又は HI-NHS については 6 回の独立した実験で得られたデータをプールし（1 条件あたり n = 12；**p < 0.01［TNT003 と Iso C の比較］）、C1qD 血清については 3 回の独立した実験で得られたデータをプールした（1 条件あたり n = 6；*p < 0.05［TNT003 と C1qD 血清による阻害作用の比較］）。（右）LAC のエフェロサイトーシスを左パネルと同様の方法で分析した。5 回の独立した実験で得られたデータをプールした（1 条件あたり n = 6；***p < 0.001［TNT003 と Iso C の比較］）。
出典：Colonna et al. 2016 (13)

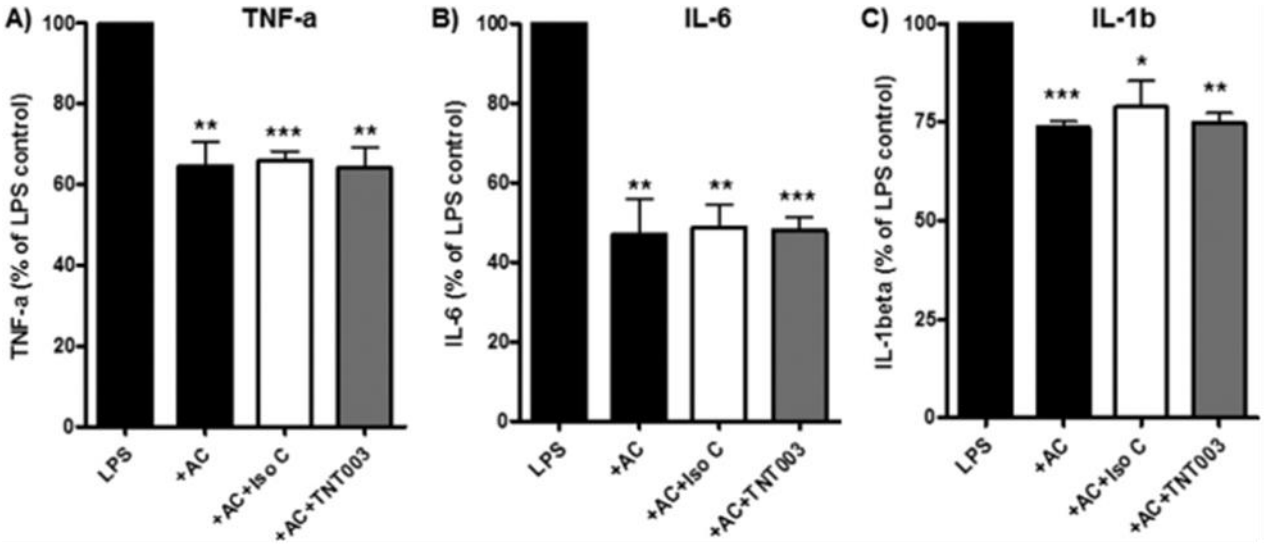
これらの結果は、EAC 残屑のクリアランスが主に C1q のオプソニンとしての働きによるものであり、CP における酵素カスケードの誘発因子としての働きによるものではないとの解釈と一致している。さらに、これら TNT003 の結果から、そのヒト化抗体であるスチムリマブで C1s 活性を阻害したとき、LAC の C3b 介在性エフェロサイトーシスは抑制されるが EAC の C1q 介在性エフェロサイトーシスへの影響はみられない可能性が示唆された。

3.1.3.4 早期アポトーシス細胞エフェロサイトーシスによる免疫抑制作用に対する阻害作用の欠如

EAC のエフェロサイトーシスは、マクロファージによる催炎症性サイトカインの産生を抑制し、結果として自己免疫反応を抑制することが示されている。一方、LAC はマクロファージによる催炎症性サイトカインの産生に対して抑制及び促進作用を示さない。CP 阻害がエフェロサイトーシスによる免疫抑制作用に影響を及ぼすか否かを検討するため、EAC を TNT003 又はアイソタイプ対照抗体の存在下で NHS に曝露した後、Toll 様受容体 4（TLR4）アゴニストであるリポ多糖類（LPS）の存在下でヒト単球由来マクロファージとともにインキュベートした。このモデル系において、マクロファージによる EAC のエフェロサイトーシスは、同じマクロファージによる LPS 誘発サイトカイン産生を抑制すると考えられる。

翌日に上清を採取し、催炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 α（TNF-α）、インターロイキン（IL）-6 及び IL-1β を測定したところ、EAC のエフェロサイトーシスにより催炎症性サイトカインの放出が有意に抑制されたが、この抑制に対する TNT003 の影響は認められなかった（図 13）。

図 13 - 早期アポトーシス細胞のエフェロサイトーシスによる免疫抑制作用に対するTNT003の影響の欠如



AC=アポトーシス細胞、EAC=早期アポトーシス細胞、ELISA=酵素結合免疫吸着測定法、NHS=正常ヒト血清、hMΦ=ヒト単球由来マクロファージ、IL=インターロイキン、Iso C=アイソタイプ対照、LPS=リポ多糖類、TNF-α=腫瘍壊死因子 α

注：NHS及びIso C mAb又はTNT003とともにプレインキュベートしたEACにhMϕs（AC:hMΦ比4:1）及びLPS（1 ng/mL）を同時に添加した。一晩培養後に上清を採取し、TNF-α（A）、IL-6（B）及びIL-1β（C）をELISAアッセイで定量した。データはLPSのみを添加した対照ウェルと比較したときのTNF-a、IL-6又はIL-1βの百分率で表し、4回の独立した実験で得られたデータをプールした（1条件あたりn = 4）。

*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001

出典：Colonna et al. 2016 (13)

これらの *in vitro* 自己免疫試験の結果、TNT003はEAC又はLACへのC1q沈着を抑制しないため、これらの細胞のエフェロサイトーシスの誘発におけるC1qのオプソニンとしての重要な働きに影響を及ぼさないことが示された。TNT003はLACへのC3b沈着を抑制したが、EACのエフェロサイトーシスにほとんど影響を及ぼさなかったことから、EACのクリアランスにはCP酵素活性ではなくC1qオプソニン化が重要であることが示唆された。最後に、TNT003は、EACのエフェロサイトーシスによる望ましい免疫抑制作用を抑制しなかった。これらTNT003の結果から、そのヒト化抗体であるスチムリマブでも、CP介在性疾患を有する患者においてC1q沈着及びEACのエフェロサイトーシスに影響を及ぼさず、CPの遺伝的欠損患者でみられる自己免疫反応発現リスクの上昇を軽減する可能性が示唆された。

3.1.4 殺菌作用に対するC1s阻害の影響

補体は侵入病原体に対する自然免疫防御において重要な役割を果たしているため、C5段階の終末補体を阻害すると感染リスクが上昇する。補体成分の先天性欠損を有する患者から、宿主防御における補体及び（一部の症例から）特定の補体経路の役割についての知見が得られている(14)。AP及び最終経路の成分の欠損では、ほぼ例外なく侵襲性髄膜炎菌感染症リスクの上昇がみられる(15)。補体阻害

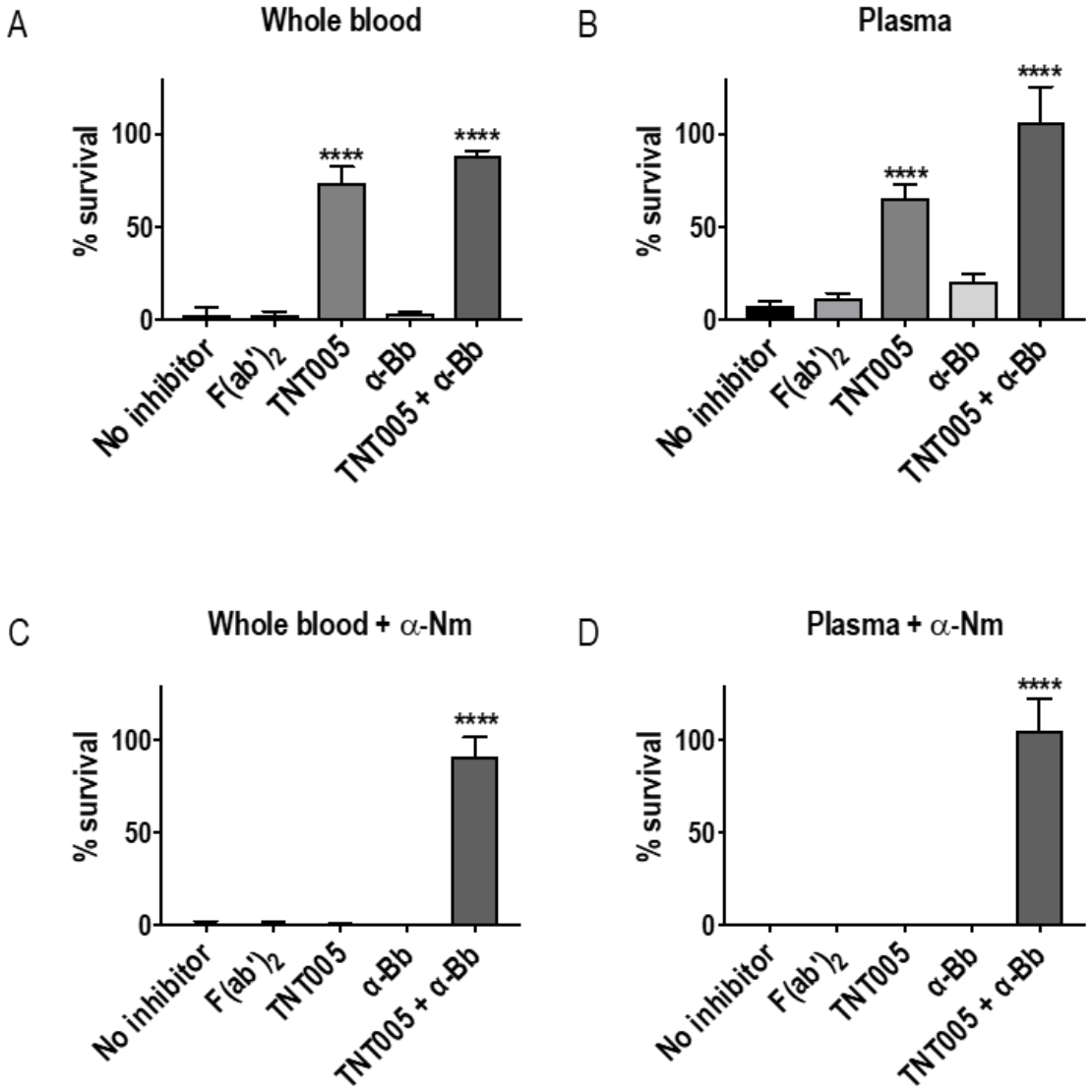
剤の投与を受けている患者は感染リスクが上昇していると考えられる。したがって、これらの患者では、感染リスクを低下させるため、髄膜炎菌、肺炎球菌及びインフルエンザ菌に対する予防接種が行われている。しかし、エクリズマブによる C5 阻害では、髄膜炎菌ワクチンを接種しても侵襲性髄膜炎菌感染症のリスクが約 1000～2000 倍上昇する(16)。C5 の上流の特定の補体経路を治療標的とすることは、理論的に他の経路（最終経路を含む）の免疫監視に影響を及ぼさないという点で有益である。

CP を阻害したときの髄膜炎菌及び肺炎球菌への感染リスクを評価するため、特徴が十分に明らかで C1s を特異的に阻害する別のマウス mAb の TNT005 を用いた試験を実施した(17)。

髄膜炎菌の殺菌作用に対する CP 阻害の影響を検討するため、抗髄膜炎菌莢膜抗体の存在下及び非存在下で全血殺菌アッセイを実施した（図 14）。抗莢膜抗体非存在下において、TNT005 は 20%ヒト血清による補体沈着を抑制する濃度において全血中での細菌の生存を促進した（パネル A）。血漿中での所見（パネル B）は全血中と同様であったことから、殺菌作用は膜侵襲複合体によるものであることが示唆された。パネル C に示すように、細菌を全血+抗 C 群莢膜抗体とともにインキュベートしたときの殺菌率は 100%であった。抗莢膜抗体存在下において、TNT005 又は抗 Bb 因子（FBb）抗体の添加により CP 又は AP をそれぞれ単独で阻害したときの殺菌率も 100%であった。しかし、TNT005 と抗 FBb 抗体を併用すると 100%を超える細菌の生存が認められた（パネル C）。特記すべきこととして、78%血漿中でも全血中と同様の結果が得られたことから（パネル D）、血中の髄膜炎菌に対する殺菌作用は、貪食ではなく膜侵襲複合体によるものであることが示唆された。

肺炎球菌でも同様の全血殺菌アッセイを実施した（図 15）。抗莢膜抗体でコートした肺炎球菌への C3 沈着は AP の単独阻害で抑制されたが、TNT005 単独では部分的にしか（約 40%）抑制されなかった。特異的抗体を含む全血中で CP 又は AP を単独で阻害しても肺炎球菌の殺菌作用は抑制されなかったが（3 時間の時点の殺菌率：>90%）、両経路を阻害したときには約 35%の細菌が生存した。

図 14 - 特異的抗髄膜炎菌抗体を含む全血又は高濃度血漿による髄膜炎菌の殺菌に対する古典的補体経路阻害による抑制作用の欠如

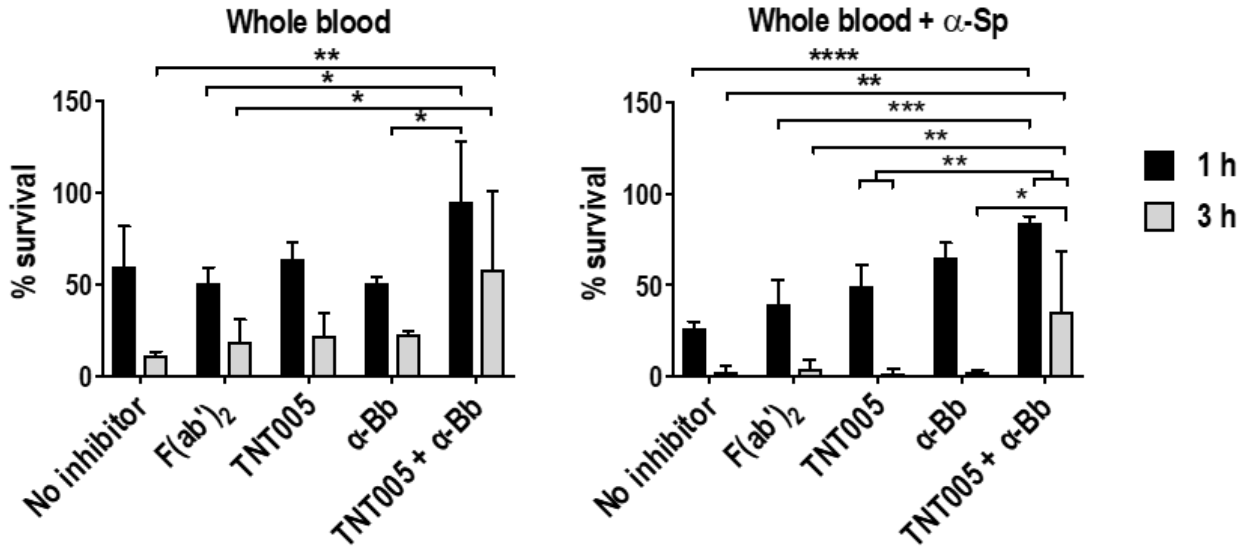


F(ab')2=アイソタイプ対照、TNT005=古典的補体経路を特異的に阻害する抗 C1s 抗体、α-Bb=第 2 経路を特異的に阻害する抗 Bb 因子抗体、α-Nm=抗髄膜炎菌抗体

注：髄膜炎菌 4243 を、X 軸に示すようにアイソタイプ対照 F(ab')2、TNT005、α-Bb 又は TNT005+α-Bb の存在下又は非存在下で、抗莢膜抗体不含（A 及び B）又は抗莢膜抗体（α-Nm）含有（C 及び D）全血（A 及び C）又は血漿（B 及び D）とともにインキュベートした。60 分の時点における細菌の生存を、0 分の時点と比較した生存率として Y 軸に示す。「Whole blood」と「Plasma」のグラフで群間比較を行ったところ、有意差が得られた（$p < 0.0001$［一元配置 ANOVA による比較］）。****$p < 0.0001$（Tukey の事後検定による TNT005 非添加時の反応との比較）。「Whole blood + α-Nm」と「Plasma + α-Nm」の一元配置 ANOVA による群間比較で有意差が得られた（$p < 0.0001$）。****$p < 0.0001$（Tukey の事後検定による他の群との比較）。3 回以上の実験で得られた平均値（範囲）を示すが、例外として「Whole blood」及び「Whole blood + α-Nm」グラフの α-Bb 添加群は 2 回の実験で得られた値である。

出典：Lewis et al. 2019 (17)

図 15 - 特異的抗肺炎球菌莢膜抗体を含む全血中の肺炎球菌の殺菌に対する古典的補体経路阻害による抑制作用の欠如



F(ab')2=アイソタイプ対照、TNT005=古典的補体経路を特異的に阻害する抗 C1s 抗体、α-Bb=第 2 経路を特異的に阻害する抗 Bb 因子抗体、α-Sp=抗肺炎球菌抗体

注：肺炎球菌 TIGR4 を、X 軸に示すように対照 F(ab')2、TNT005、α-Bb 又は TNT005+α-Bb の存在下又は非存在下で、全血（左パネル）又は抗肺炎球菌タイプ 4 莢膜抗体含有全血（右パネル）とともにインキュベートした。反応混合物を 37°C で 1 時間（黒色棒）又は 3 時間（灰色棒）インキュベートしたときの生存を 0 時間と比較した生存率として Y 軸に示す。2 回以上の実験で得られた平均値（範囲）を示す。*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、****p < 0.0001（二元配置 ANOVA 後 Tukey の多重比較検定による比較）。

出典：Lewis et al. 2019 (17)

これらのデータから、特異的抗莢膜抗体を含む全血での髄膜炎菌及び肺炎球菌の殺菌作用はTNT005により抑制されないことが示唆された。スチムリマブを含むC1s阻害剤の投与を受けている患者では、髄膜炎菌及び肺炎球菌の莢膜結合型ワクチンによりこれらの菌への感染リスクを低下させることができる可能性が考えられる。

3.2 *In vivo* 薬理

スチムリマブの *in vivo* 薬理試験は、カニクイザルにおいてスチムリマブの PK、PD 及び毒性を評価した試験の一部として実施した。結果は [TN-[redacted]01-PK] 試験、[TN-[redacted]02-PK] 試験及び[TN-[redacted]03-PK] 試験、並びに Module 2.6.6 毒性試験の概要文、[TN-[redacted]05] 試験及び[TN-[redacted]16] 試験参照。

4　副次的薬理試験

カニクイザルにスチムリマブを CP 活性の最大阻害が得られる用量で反復投与したとき、補体 AP 活性への影響は認められなかった。スチムリマブの投与による血清中 AP 活性への影響を、5 週間試験において *ex vivo* で評価した（Module 2.6.3 [表 2.6.3.3.1]及び[TN-[redacted]05] 試験参照）。回復期間の Day 57 までの投与前及び投与後に採取した血清検体を用いて検討を行った。いずれの投与群においてもスチムリマブによる AP 活性の阻害は認められず（TN-[redacted]05 試験）、*in vitro* 試験（[TN-[redacted]13] 試験）の結果と一致していた。

5　安全性薬理試験

スチムリマブの安全性薬理評価に特化した試験は実施しなかった。代わりに、サルを用いた 5 及び 26 週間反復投与毒性試験に安全性薬理評価項目を組み込んだ（[TN-[redacted]05] 試験、[TN-[redacted]16] 試験）。サルにはスチムリマブを 180 mg/kg/週までの用量で最長 6 か月間反復 IV 投与した。

5.1.1　中枢神経系

サルを用いた反復投与毒性試験においてスチムリマブを投与したとき、被験物質に関連した CNS に関する一般状態の変化や体温に対する影響は認められなかった（Module 2.6.6 毒性試験の概要文参照）。サルの一般状態観察は、投与期間を通して 1 日 1 回以上実施した。詳細な理学的検査を週 1 回以上実施した。5 週間試験において、神経行動検査を投与前期間に 1 回、投与期間の Day 29 に 1 回実施した。26 週間試験では、神経行動検査を投与前期間に 1 回、投与期間の Day 87 及び 177 に実施した。

5.1.2　心血管系

サルを用いたいずれの反復投与毒性試験においても、スチムリマブに関連した心拍数及び心電図パラメータの変化は認められなかった（Module 2.6.6 毒性試験の概要文参照）。5 週間試験において、心電図の評価は投与前期間に 2 回、投与期間の Day 1 及び 29 の投与約 1 時間後並びに Day 28 に 1 回実施した。測定はケタミン麻酔した動物で実施し、8 誘導心電図を 30 秒間以上持続的に記録した。26 週間試験での心電図の評価は、投与前期間、並びに投与期間の Week 1、13 及び 25 に実施した。測定はケタミン麻酔した動物で実施し、8 誘導心電図を 30 秒間以上持続的に記録した。

5.1.3　呼吸系

サルを用いた反復投与毒性試験において、被験物質に関連した呼吸系に関する一般状態の変化及び呼吸数の変化は認められなかった。Module 2.6.6 毒性試験の概要文に述べるように、評価は一般状態観察と同時に行った。

6　薬力学的薬物相互作用試験

スチムリマブの薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

7　考察及び結論

スチムリマブは、CP 特異的セリンプロテアーゼである C1s に結合し、C1s の活性を阻害することにより CP 活性を特異的に阻害するヒト化 IgG4 mAb である。CP を特異的に阻害するため AP 及び LP の補体活性には影響を及ぼさないことから、下流のすべての補体活性を阻害すること（補体 C3 の阻害時など）又はすべての終末補体を阻害することに伴う安全性上の懸念は低いと考えられる。スチムリマブは、CAD 及び ITP といった AIHA を含む CP 活性化疾患に使用する治療薬として開発された。スチムリマブ（開発コード：TNT009 又は BIVV009）は、マウス IgG2a 抗ヒト C1s mAb である TNT003 から作製されており、TNT003 と同程度の C1s 結合親和性及び抗 C1s 活性を有している。したがって、スチムリマブの *in vitro* 薬理評価にはスチムリマブ及び TNT003 の両方を使用した。

NHS 又はヒト CP タンパク質を用いた *in vitro* 試験において、スチムリマブはヒト C1s に高い結合親和性（10^{-10} mol/L レベル）及び特異性を有し、血清中 CP 活性に対して強力（$IC_{50} = 10^{-9}$ mol/L レベル）かつ完全（100%）な阻害作用を示したが、AP 及び LP 活性に対しては阻害作用を示さなかった。カニクイザルにおけるスチムリマブの C1s への結合親和性（10^{-10} mol/L レベル）及び薬理活性はヒトと同程度であったことから、カニクイザルが薬理学的に適した唯一の動物種と特定された。ヒト及びサルにおけるスチムリマブの 1.34%血清中 CP 活性阻害作用の IC_{50} 値は、いずれも 0.21 µg/mL であった。

スチムリマブ及び TNT003 は *in vitro* で以下を抑制した：CA によるヒト RBC の C3 フラグメントオプソニン化 ; C3 フラグメントオプソニン化 RBC の貪食 ; CA 介在性溶血 ; CAD 患者検体における CA 介在性アナフィラトキシン（C3a、C4a 及び C5a）産生 ; 並びに ITP 患者検体における血小板への C1q、C3b、C4d 及び C5b-9 の沈着。これらの結果を総合すると、スチムリマブは CAD における EVH 及び IVH の両方並びに ITP における血小板減少を抑制する可能性を有することが示唆された。

また、TNT003 は BP 患者由来自己抗体により誘発したヒト皮膚 DEJ への補体 C3 フラグメントの沈着を抑制することが示された。感作された移植レシピエントの検体を用いた単一抗原ビーズアッセイにおいて、HLA クラス I 及びクラス II 抗原に対する抗 HLA 抗体により補体沈着が誘発され、これらはスチムリマブ及び TNT003 で抑制されることも示された。これらの結果から、感作された移植レシピエント及び BP における補体介在性組織障害の治療又は予防にスチムリマブを使用できるか否かを検討することを目的として臨床試験を計画する根拠が得られた。

In vitro 自己免疫試験において、TNT003 は EAC への C1q 沈着を抑制せず、EAC のエフェロサイトーシスにほとんど影響を及ぼさないことが示された。さらに TNT003 は、EAC のエフェロサイトーシスによる望ましい免疫抑制作用も抑制しなかった。これらの結果から、そのヒト化抗体であるスチムリマブでも、CP 介在性疾患を有する患者において C1q 沈着及び EAC のエフェロサイトーシスに影響を及ぼさず、CP の遺伝的欠損患者でみられる自己免疫のリスクを低下させる可能性が示唆された。

補体は侵入病原体に対する自然免疫防御において重要な役割を果たしているため、C5 段階の終末補体を阻害すると感染リスクが上昇する。CP を阻害したときの髄膜炎菌及び肺炎球菌への感染リスクを

評価するため、特徴が十分に明らかで C1s を特異的に阻害するマウス mAb の TNT005 を用いた試験を実施した。得られたデータから、特異的抗莢膜抗体を含む全血での髄膜炎菌及び肺炎球菌の殺菌作用は CP を阻害しても抑制されないことが示唆された。スチムリマブを含む C1s 阻害剤の投与を受けている患者では、髄膜炎菌及び肺炎球菌の莢膜結合型ワクチンによりこれらの菌への感染リスクを低下させることができると考えられる。

スチムリマブは *in vitro* において急峻な閾値型濃度－反応曲線を示した。その結果、*in vivo* では、血清中スチムリマブ濃度が閾値濃度未満に低下すると CP 阻害作用が速やかに消失した。スチムリマブの *in vivo* での血清中 CP 活性に対する阻害作用の IC_{90} は 22.3 µg/mL であり（Module [2.6.6]参照）、ヒトでの *in vivo* IC_{90} は 63.9 µg/mL であった（Module [2.7.2]参照）。サルを用いた GLP 適用 5 週間反復投与毒性試験において、スチムリマブの AP 活性に関連した副次的 PD 作用は認められなかった。中枢神経系、心血管系及び呼吸系の安全性薬理評価として GLP 適用 5 及び 26 週間反復投与毒性試験で測定したパラメータに、スチムリマブに関連した影響は認められなかった。

総合すると、スチムリマブ及び TNT003 を用いて実施した *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験から、CAD 患者における溶血の治療及び予防薬としてスチムリマブを評価及び承認申請することが支持された。

8　図表

図表は本文中に示した。

参 考 文 献

1. Qu H, Ricklin D, Bai H, Chen H, Reis ES, Maciejewski M, et al. New analogs of the clinical complement inhibitor compstatin with subnanomolar affinity and enhanced pharmacokinetic properties. Immunobiology. 2013; 218(4):496-505.
2. Shi J, Rose EL, Singh A, Hussain S, Stagliano NE, Parry GC, et al. TNT003, an inhibitor of the serine protease C1s, prevents complement activation induced by cold agglutinins. Blood. 2014; 123(26):4015-22.
3. Mollnes TE, Brekke OL, Fung M, Fure H, Christiansen D, Bergseth G, et al. Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. Blood. 2002; 100(5):1869-77.
4. Brekke OL, Christiansen D, Fure H, Fung M, Mollnes TE. The role of complement C3 opsonization, C5a receptor, and CD14 in E. coli-induced up-regulation of granulocyte and monocyte CD11b/CD18 (CR3), phagocytosis, and oxidative burst in human whole blood. J. Leukoc. Biol. 2007; 81(6):1404-13.
5. Kumar V, Ali SR, Konrad S, Zwirner J, Verbeek JS, Schmidt RE, et al. Cell-derived anaphylatoxins as key mediators of antibody-dependent type II autoimmunity in mice. J. Clin Invest. 2006; 116(2):512-20.
6. Peerschke EI, Andemariam B, Yin W, Bussel JB. Complement activation on platelets correlates with a decrease in circulating immature platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. Br. J. Haematol. 2010; 148(4):638-45.
7. Najaoui A, Bakchoul T, Stoy J, Bein G, Rummel MJ, Santoso S, et al. Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). Eur. J. Haematol. 2012; 88(2):167-74.
8. Peerschke EI, Panicker S, Bussel J. Classical complement pathway activation in immune thrombocytopenia purpura: inhibition by a novel C1s inhibitor. Br. J. Haematol. 2016; 173(6):942-5.
9. Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The role of complement in antibody‐mediated rejection in kidney transplantation. Nat. Rev. Nephrol. 2012; 8:670-8.
10. Montero RM, Sacks SH, Smith RA. Complement‐here, there and everywhere, but what about the transplanted organ? Semin. Immunol. 2016; 28:250-9.
11. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor‐specific anti‐HLA antibodies on late kidney allograft failure. Nat. Rev. Nephrol. 2012; 8:348-57.
12. Wahrmann M, Mühlbacher J, Marinova L, Regele H, Huttary N, Eskandary F, et al. Effect of the Anti-C1s Humanized Antibody TNT009 and Its Parental Mouse Variant TNT003 on HLA Antibody-Induced Complement Activation - A Preclinical In Vitro Study. Am. J. Transplant. 2017; 17:2300-11.
13. Colonna L, Parry GC, Panicker S, Elkon KB. Uncoupling complement C1s activation from C1q binding in apoptotic cell phagocytosis and immunosuppressive capacity. Clin. Immunol. 2016; 163:84-90.

14. Figueroa JE, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. Clin. Microbiol. Rev. 1991; 4(3):359-95.
15. Ram S, Lewis LA, Rice PA. Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. Clin. Microbiol. Rev. 2010; 23(4):740-80.
16. Bouts A, Monnens L, Davin JC, Struijk G, Spanjaard L. Insufficient protection by Neisseria meningitidis vaccination alone during eculizumab therapy. Pediatr. Nephrol. 2011; 26(10):1919-20.
17. Lewis LA, Panicker S, DeOliveira RB, Parry GC, Ram S. Effect of a C1s inhibitor on the efficacy of anti-capsular antibodies against Neisseria meningitidis and Streptococcus pneumoniae. ImmunoHorizons. 2019; 3(11): 519-30.

サノフィ株式会社

スチムリマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.3 薬理試験概要表

Total number of pages: 17

目　　次

2.6.3 薬理試験概要表 1

目　　次 2

表　目　次 3

1　　薬理試験一覧表 4

2　　効力を裏付ける試験 9

3　　副次的薬理試験 15

4　　安全性薬理試験 16

5　　薬力学的薬物相互作用試験 17

表　目　次

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program 4
表 2.6.3.2.1 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings 9
表 2.6.3.3.1 - Secondary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings 15

1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program

Test Article: Sutimlimab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Primary pharmacodynamics					
Inhibition of bullous pemphigoid patient plasma mediated complement deposition by anti-C1s antibodies	Immunohistochemical detection of complement deposition on sections of human foreskin mediated by patient samples containing auto-antibodies. Leukocyte binding assays and detection of bound cells using immunohistochemical detection of CD45.	NA	[redacted], Germany and [redacted], Austria.	[TN-[redacted]16]	4.2.1.1-1
Measurement of TNT003 humanized variants binding to C1s by biolayer interferometry	Real-time binding assays by biolayer interferometry using an Octet Red system to measure binding between humanized variants of TNT003, including sutimlimab, and active and inactive forms of human C1s	NA	[redacted], [redacted], USA	[TN-[redacted]08]	4.2.1.1-2
Species cross-reactivity of TNT003 and TNT009 (sutimlimab): mouse, rat, and cynomolgus monkey	Plate-based ELISAs to determine the ability of sutimlimab or TNT003 to bind to purified C1s from mouse, rat, or cynomolgus monkey	NA	True North Therapeutics, Inc. South San Francisco, CA, USA	[TN-[redacted]09]	4.2.1.1-3

Abbreviations: C1s=complement component 1, s subcomponent; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; NA=not applicable.

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: Sutimlimab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Species cross-reactivity of TNT003 and TNT009 (sutimlimab): cynomolgus monkey, rhesus monkey, mini pig, guinea pig, rabbit, and rat	Hemolysis assays to determine the cross-reactivity of sutimlimab or TNT003 with the classical complement pathway of cynomolgus monkey, rhesus monkey, minipig, guinea pig, rabbit, or rat	NA	True North Therapeutics, Inc. South San Francisco, CA, USA	[TN-[redacted]09] [TN-[redacted]09 Amendment 2]	4.2.1.1-3 4.2.1.1-4
Amendment to “Species cross-reactivity of TNT003 and TNT009” (sutimlimab): cross-reactivity of sutimlimab to dog	Hemolysis assays to determine the cross-reactivity of sutimlimab with the classical complement pathway of dog	NA	True North Therapeutics, Inc. South San Francisco, CA, USA	[TN-[redacted]09A]	4.2.1.1-5
Evaluation of TNT009 (sutimlimab) binding to components of the complement system	Plate-based direct binding assays to determine the specificity of sutimlimab binding to the active and inactive forms of C1s, compared to other proteins in the complement system	NA	True North Therapeutics, Inc. South San Francisco, CA, USA	[TN-[redacted]12]	4.2.1.1-6
Effect of TNT009 (sutimlimab) on complement pathway activation via enzyme-linked immunosorbent assays	Plate-based ELISAs to determine the ability of sutimlimab to inhibit the activation of classical, alternative, or lectin pathways of complement	NA	True North Therapeutics, Inc. South San Francisco, CA, USA	[TN-[redacted]13]	4.2.1.1-7
Amendment to “Effect of TNT009 (sutimlimab) on complement pathway activation via enzyme-linked immunosorbent assays”: effect of TNT003	Plate-based ELISAs to determine the ability of TNT003 to inhibit the activation of classical, alternative, or lectin pathways of complement	NA	True North Therapeutics, Inc. South San Francisco, CA, USA	[TN-[redacted]13A]	4.2.1.1-8

Abbreviations: C1s=complement component 1, s subcomponent; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; NA=not applicable.

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: Sutimlimab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Single-dose PK/PD study (non-GLP)	Cynomolgus monkey	IV 5, 10, 30 mg/kg	[redacted], [redacted]. [redacted], [redacted], [redacted]USA	[TN-[redacted]01-PK] [TN-[redacted]01-PK-AD1]	4.2.2.2
Single-dose PK/PD study (non-GLP)	Cynomolgus monkey	IV 30, 45, 60 mg/kg	[redacted], [redacted]. [redacted], [redacted], USA	[TN-[redacted]02-PK] [TN-[redacted]02-PK-AD1]	4.2.2.2
Multi-dose PK/PD study (non-GLP)	Cynomolgus monkey	IV 100 mg/kg followed by 60 mg/kg	[redacted], [redacted]. [redacted], [redacted], USA	[TN-[redacted]03-PK] [TN-[redacted]03-PK-AD1]	4.2.2.2

Abbreviations: GLP=Good Laboratory Practices; IV=intravenous; PD=pharmacodynamics; PK=pharmacokinetics.

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: Sutimlimab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Secondary Pharmacodynamics					
5-Week infusion toxicity study with an 8-week recovery phase (GLP)	Ex vivo (cynomolgus monkey) Plate-based ELISAs to determine the sutimlimab-mediated inhibition of alternative complement pathway activity in serum samples taken during the recovery period of the study	IV 30, 60, 100 mg/kg/week	[redacted], [redacted]. [redacted], [redacted], USA	[TN-[redacted]05]	4.2.3.2-1

Abbreviations: ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; GLP=Good Laboratory Practices; IV=intravenous.

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: Sutimlimab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Safety pharmacology					
Central nervous system					
Not applicable. No dedicated safety pharmacology studies were performed with sutimlimab. Safety pharmacology parameters were assessed in repeat-dose toxicity studies. See Module [2.6.6], Nonclinical Toxicology Written Summary.					
Cardiovascular in vivo					
Not applicable. No dedicated safety pharmacology studies were performed with sutimlimab. Safety pharmacology parameters were assessed in repeat-dose toxicity studies. See Module 2.6.6, Nonclinical Toxicology Written Summary.					
Respiratory system					
Not applicable. No dedicated safety pharmacology studies were performed with sutimlimab. Safety pharmacology parameters were assessed in repeat-dose toxicity studies. See Module 2.6.6, Nonclinical Toxicology Written Summary.					

2　効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2.1 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings

Test Article: Sutimlimab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	Number per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Inhibition of bullous pemphigoid patient plasma mediated complement deposition by anti-C1s antibodies	Immunohistochemical detection of complement deposition on sections of human foreskin mediated by patient samples containing auto-antibodies. Leukocyte binding assays and detection of bound cells using immunohistochemical detection of CD45.	In vitro	NA	NA	TNT003 inhibited complement deposition at the dermal-epidermal junction mediated by BP sera.	[TN-[redacted]16]	4.2.1.1-1

Abbreviations: AP=alternative complement pathway; BP=bullous pemphigoid; C1r=complement component 1, r subcomponent; C1s=complement component 1, s subcomponent; C2=complement component 2; C4=complement component 4; C4a=anaphylatoxin generated by the cleavage of C4; CP=classical complement pathway; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; F=female; GLP=Good Laboratory Practices; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; IgG2a= IgG2a=immunoglobulin G, subclass 2a; IV=intravenous; LP=lectin complement pathway; M=male; MASP=MBL-associated serine protease; MBL=mannose-binding lectin; NA=not applicable; PD=pharmacodynamics; PK=pharmacokinetics.

表 2.6.3.2.1 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Test Article: Sutimlimab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	Number per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Real time binding assays between humanized variants of TNT003, including sutimlimab, and active and inactive forms of human C1s	Biolayer interferometry using an Octet Red system, followed by calculation of binding kinetics with the Forte bio data analysis software v6.4	In vitro	NA	NA	All humanized variants of TNT003, including sutimlimab, bound human C1s with higher affinity than the parental mouse antibody. Sutimlimab bound active and inactive human C1s with an affinity of 2.624×10^{-10} mol/L and 2.616×10^{-10} mol/L, respectively.	[TN-[redacted]08]	4.2.1.1-2
Species cross reactivity assays between sutimlimab or TNT003 and purified C1s from cynomolgus monkey, rat, or mouse	Plate-based ELISAs to determine the ability of sutimlimab or TNT003 to bind to purified C1s from cynomolgus monkey, rat, or mouse	In vitro	NA	NA	Sutimlimab and TNT003 both bound cynomolgus monkey C1s with similar affinity as to human C1s, and displayed affinity towards rat C1s, albeit 5 to 10 fold less than what is observed with human and non human primate C1s. No significant binding to mouse C1s was observed with either sutimlimab or TNT003.	[TN-[redacted]09]	4.2.1.1-3

Abbreviations: AP=alternative complement pathway; C1r=complement component 1, r subcomponent; C1s=complement component 1, s subcomponent; C2=complement component 2; C4=complement component 4; C4a=anaphylatoxin generated by the cleavage of C4; CP=classical complement pathway; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; F=female; GLP=Good Laboratory Practices; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; IgG2a= IgG2a=immunoglobulin G, subclass 2a; IV=intravenous; LP=lectin complement pathway; M=male; MASP=MBL-associated serine protease; MBL=mannose-binding lectin; NA=not applicable; PD=pharmacodynamics; PK=pharmacokinetics.

表 2.6.3.2.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Test Article: Sutimlimab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	Number per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Species cross reactivity assays testing the ability of sutimlimab or TNT003 to activate the classical complement pathway of cynomolgus monkey, rhesus monkey, mini pig, guinea pig, rabbit, or rat	Hemolysis assays to determine the ability of sutimlimab or TNT003 to inhibit hemolysis of antibody-coated red blood cells using complement competent serum from cynomolgus monkey, rhesus monkey, mini pig, guinea pig, rabbit, or rat	In vitro	0.01 - 100 µg/mL	NA	Sutimlimab and TNT003 both prevented antibody-mediated complement activation in non-human primate serum. Sutimlimab exhibited partial efficacy in rat serum and was unable to prevent mini pig, guinea pig, or rabbit serum mediated hemolysis.	[TN-[redacted]09] [TN-[redacted]09 Amendment 2]	4.2.1.1-3 4.2.1.1-4
Species cross reactivity assay testing the ability of sutimlimab to activate the classical complement pathway of dog	Hemolysis assays to determine the ability of sutimlimab to inhibit hemolysis of antibody-coated red blood cells using complement competent serum from dog	In vitro	0.1 - 100 µg/mL	NA	Sutimlimab does not prevent antibody-mediated complement activation in dog serum, strongly suggesting that it does not inhibit dog C1s activity.	[TN-[redacted]09A]	4.2.1.1-5

Abbreviations: AP=alternative complement pathway; C1r=complement component 1, r subcomponent; C1s=complement component 1, s subcomponent; C2=complement component 2; C4=complement component 4; C4a=anaphylatoxin generated by the cleavage of C4; CP=classical complement pathway; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; F=female; GLP=Good Laboratory Practices; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; IgG2a= IgG2a=immunoglobulin G, subclass 2a; IV=intravenous; LP=lectin complement pathway; M=male; MASP=MBL-associated serine protease; MBL=mannose-binding lectin; NA=not applicable; PD=pharmacodynamics; PK=pharmacokinetics.

表 2.6.3.2.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Test Article: Sutimlimab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	Number per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Binding assays to determine the specificity of sutimlimab binding to the active and inactive forms of C1s to assess the potential for off-target binding	Plate-based direct binding assays to determine the specificity of sutimlimab binding to the active and inactive forms of C1s, compared to the binding of other proteins in the complement system	In vitro	0.2 ng/mL-30 µg/mL	NA	Sutimlimab bound to active and inactive C1s with high specificity and showed no affinity towards C1r, C2, C4, MASP-1, MASP-2, or MASP-3.	[TN-[redacted]12]	4.2.1.1-6
Activity assays to measure the effect of sutimlimab on the activation of the classical, alternative, and lectin pathways of complement	Plate-based ELISAs, one for each complement pathway and in the presence of normal human serum, to measure the effect of sutimlimab on the formation of activated membrane attack complex	In vitro	CP and AP ELISAs: 0.02-5 µg/mL LP ELISA: 0.1-100 µg/mL	NA	Inhibition of functional complement activity by sutimlimab was only observed for the classical pathway (IC50 = 0.34 µg/mL in 1% human serum), and not for the alternative or lectin pathways of complement.	[TN-[redacted]13]	4.2.1.1-7

Abbreviations: AP=alternative complement pathway; C1r=complement component 1, r subcomponent; C1s=complement component 1, s subcomponent; C2=complement component 2; C4=complement component 4; C4a=anaphylatoxin generated by the cleavage of C4; CP=classical complement pathway; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; F=female; GLP=Good Laboratory Practices; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; IgG2a= IgG2a=immunoglobulin G, subclass 2a; IV=intravenous; LP=lectin complement pathway; M=male; MASP=MBL-associated serine protease; MBL=mannose-binding lectin; NA=not applicable; PD=pharmacodynamics; PK=pharmacokinetics.

表 2.6.3.2.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Test Article: Sutimlimab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	Number per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Activity assays to measure the effect of sutimlimab's parental antibody, TNT003, on the activation of the classical, alternative, and lectin pathways of complement	Plate-based ELISAs, one for each complement pathway and in the presence of normal human serum, to measure the effect of TNT003 on the formation of activated membrane attack complex	In vitro	CP and AP ELISAs: 0.02-5 µg/mL LP ELISA: 0.1-100 µg/mL	NA	Inhibition of functional complement activity by TNT003 was only observed for the classical pathway (IC_{50} = 0.215 µg/mL in 1% human serum), and not for the alternative or lectin pathways of complement.	[TN-[redacted]13A]	4.2.1.1-8
Single-dose PK/PD study (non-GLP)	Cynomolgus monkey Naïve animals, weighting 3-4 kg, and 3-5 years old. Serum/plasma samples were drawn for up to 14 days post-dosing to assess sutimlimab levels (PK) and its effects on CP by evaluating both C4a and serum CP activity (PD).	IV	5, 10, 30 mg/kg	3 (M)	Following administration of sutimlimab, free plasma sutimlimab concentrations correlated with the inhibition of its target, C1s, as seen in C4a and CP activity results. Sutimlimab inhibited CP activity at all doses, with higher doses resulting in longer duration of inhibition (50-100 hours with the 2 higher doses; 12-24 hours with the lower dose).	[TN-[redacted]01-PK] [TN-[redacted]01-PK-AD1]	4.2.2.2

Abbreviations: AP=alternative complement pathway; BP=bullous pemphigoid; C1r=complement component 1, r subcomponent; C1s=complement component 1, s subcomponent; C2=complement component 2; C4=complement component 4; C4a=anaphylatoxin generated by the cleavage of C4; CP=classical complement pathway; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; F=female; GLP=Good Laboratory Practices; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; IgG2a= IgG2a=immunoglobulin G, subclass 2a; IV=intravenous; LP=lectin complement pathway; M=male; MASP=MBL-associated serine protease; MBL=mannose-binding lectin; NA=not applicable; PD=pharmacodynamics; PK=pharmacokinetics.

表 2.6.3.2.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Test Article: Sutimlimab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	Number per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Single-dose PK/PD study (non-GLP)	Cynomolgus monkey Naïve animals, weighting 3-4 kg, and 3-5 years old. Serum/plasma samples were drawn for up to 14 days post-dosing to assess sutimlimab levels (PK) and effects on CP activity (PD).	IV	30, 45, 60 mg/kg	2 (M)	Sutimlimab inhibited CP activity at all doses initially, with higher doses resulting in longer duration of inhibition (≥7 days with the 2 higher doses; 4-5 hours with the lower dose).	[TN-[redacted]02-PK] [TN-[redacted]02-PK-AD1]	4.2.2.2
Multi-dose PK/PD study (non-GLP)	Cynomolgus monkey Naïve animals, weighting 2.5-2.6 kg, and 3-4 years old. Serum samples were drawn at different time points during the 14 days between the first and second dose, and then for 14 days following the second dose to assess sutimlimab levels (PK) and effects on CP activity (PD).	IV	100mg/kg followed by 60 mg/kg	3 (M)	A single 100 mg/kg IV dose of sutimlimab, followed after 14 days by a lower 60 mg/kg IV dose, was sufficient to maintain complete CP activity inhibition for up to 7 days post second dose.	[TN-[redacted]03-PK] [TN-[redacted]03-PK-AD1]	4.2.2.2

Abbreviations: AP=alternative complement pathway; BP=bullous pemphigoid; C1r=complement component 1, r subcomponent; C1s=complement component 1, s subcomponent; C2=complement component 2; C4=complement component 4; C4a=anaphylatoxin generated by the cleavage of C4; CP=classical complement pathway; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; F=female; GLP=Good Laboratory Practices; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; IgG2a= IgG2a=immunoglobulin G, subclass 2a; IV=intravenous; LP=lectin complement pathway; M=male; MASP=MBL-associated serine protease; MBL=mannose-binding lectin; NA=not applicable; PD=pharmacodynamics; PK=pharmacokinetics.

3 副次的薬理試験

表 2.6.3.3.1 - Secondary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings

Test Article: Sutimlimab

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	Number per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
5-Week infusion toxicity study with an 8-week recovery phase (GLP)	Naïve animals, 28-36 months old, and weighting 2.1-2.8 kg (M) or 2.4-3.2 kg (F). Serum samples were drawn at different time points during the recovery phase to assess sutimlimab levels and effects on alternative complement pathway activity.	IV	30, 60, 100 mg/kg/dose once-weekly	5 (M), 5 (F)	No sutimlimab-mediated inhibition of alternative complement pathway activity was observed in any of the dose groups.	[TN-[redacted]05]	4.2.3.2-1

Abbreviations: ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; F=female; GLP=Good Laboratory Practices; IV=intravenous; M=male.

4　安全性薬理試験

Safety pharmacology end points were included in the general toxicology studies (see Module [2.6.6], Nonclinical Toxicology Written Summary).

5　薬力学的薬物相互作用試験

No pharmacodynamic drug interaction studies were conducted with sutimlimab.