ナノゾラ皮下注
（オゾラリズマブ）

CTD 第 2 部

2.4 非臨床試験の概括評価

大正製薬株式会社

目次

2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画概要 4
2.4.1.1 薬理試験 4
2.4.1.2 薬物動態試験 5
2.4.1.3 毒性試験 6
2.4.2 薬理試験 6
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 6
2.4.2.2 副次的薬理試験 7
2.4.2.3 安全性薬理試験 7
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 8
2.4.3 薬物動態試験 8
2.4.3.1 吸収 8
2.4.3.2 分布 9
2.4.3.3 代謝 9
2.4.3.4 排泄 9
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用 9
2.4.4 毒性試験 10
2.4.4.1 動物種の選択 10
2.4.4.2 単回投与毒性試験 10
2.4.4.3 反復投与毒性試験 10
2.4.4.4 遺伝毒性試験 11
2.4.4.5 がん原性試験 11
2.4.4.6 生殖発生毒性試験 12
2.4.4.7 局所刺激性試験 13
2.4.4.8 その他の毒性試験 13
2.4.5 総括及び結論 13
2.4.5.1 総括 13
2.4.5.2 結論 16
2.4.6 参考文献 16

表

表 2.4-1 効力を裏付ける薬理試験一覧 4
表 2.4-2 薬物動態試験一覧 5
表 2.4-3 主要毒性試験一覧 6

略号一覧

略号	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
AUC	area under the plasma (serum) concentration-time curve	血漿（血清）中濃度－時間曲線下面積
BA	bioavailability	生物学的利用率
CDC	complement dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CL_{total}	total body clearance	全身クリアランス
ECLIA	electro-chemiluminescence immunoassay	電気化学発光免疫測定
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定
Fc	crystallizable fragment	結晶化可能フラグメント
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
K_d	dissociation constant	解離定数
RA	rheumatoid arthritis	関節リウマチ
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
Vd_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態の分布容積

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概要

オゾラリズマブは、アブリンクス社により創製された三量体構造のヒト化融合蛋白質（低分子抗体）であり、二つの抗ヒト TNFα ヒト化単一ドメイン抗体と一つの抗ヒト血清アルブミンヒト化単一ドメイン抗体から構成される。オゾラリズマブは TNFα に高い結合親和性を示し、TNF 受容体への TNFα の結合を阻害することによりその生理活性を中和する。TNFα は RA 病態に関与する炎症性サイトカインの一種であり[1,2]、TNFα の作用を抑制することは RA 症状の軽減、関節破壊の進展抑制、身体機能の改善につながることが知られている[3]。またオゾラリズマブはヒト血清アルブミンにも高い結合親和性を示す。オゾラリズマブのマウスサロゲート抗体は、アルブミン結合によりマウス関節炎モデルの炎症部位への集積性を向上させ優れた薬効を示す[4]ことから、RA の炎症組織への集積性が臨床的な有効性に寄与することが期待される。そこで、オゾラリズマブの薬理、薬物動態及び毒性を評価するために、以下に示す試験を計画した。

2.4.1.1　薬理試験

オゾラリズマブの薬理作用を評価するため、効力を裏付ける試験として *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。*in vitro* 試験では、TNFα 及び血清アルブミンに対する結合親和性、膜結合型 TNFα に対する結合活性、TNFα 誘発細胞傷害抑制作用、ADCC 活性並びに CDC 活性への影響を検討した。*in vivo* 試験では、マウス空気嚢モデルを用いたヒト TNFα による細胞浸潤に対する抑制作用及びヒト TNF 遺伝子導入マウスを用いた関節炎に対する抑制作用を検討した。実施した試験の一覧を以下に示す。

表 2.4-1　効力を裏付ける薬理試験一覧

試験の種類	試験系	投与方法
TNFα に対する結合親和性	表面プラズモン共鳴	*in vitro*
血清アルブミンに対する結合親和性	表面プラズモン共鳴	*in vitro*
膜結合型 TNFα に対する結合活性	TNFα 発現 CHO 細胞	*in vitro*
TNFα 誘発細胞傷害抑制作用	L929 細胞	*in vitro*
マウス空気嚢モデル細胞浸潤に対する抑制作用	マウス	腹腔内
ヒト TNF 遺伝子導入マウスの関節炎に対する抑制作用	Tg197 マウス	腹腔内
膜結合型 TNFα 発現 NS0 細胞に対する ADCC 活性	TNFα 発現 NS0 細胞	*in vitro*
膜結合型 TNFα 発現 CHO 細胞に対する CDC 活性	TNFα 発現 CHO 細胞	*in vitro*

安全性薬理の評価として、中枢神経系、呼吸系及び心血管系に対するオゾラリズマブの影響を検討した。中枢神経系及び呼吸系への影響はカニクイザルの 5 週間皮下及び静脈内反復投与毒性

試験の中で評価し、心血管系への影響は独立した安全性薬理試験にて評価した。これらの試験をいずれも医薬品 GLP 適用下で、各試験に関連するガイドラインに準拠して実施した。

2.4.1.2　薬物動態試験

オゾラリズマブの薬物動態を評価するため、主に毒性試験及び薬理試験で使用した動物種であるマウス及びカニクイザルを用い、オゾラリズマブ及び[^{125}I]オゾラリズマブの *in vivo* 試験を実施した。投与経路は臨床投与経路である皮下投与のほか、静脈内又は腹腔内投与とした。

吸収に関しては、マウス及びカニクイザルを用いた単回及び反復投与時の血清又は血漿中濃度を検討した。分布に関しては、マウスを用いた組織分布及びカニクイザルを用いた胎児への移行性を検討した。オゾラリズマブは蛋白質であるため、代謝に関する試験は実施しなかった。また、排泄に関して、カニクイザルにおける乳汁移行性を検討した。薬物動態学的薬物相互作用に関して、ヒト血漿中のアルブミンと結合する薬物の蛋白結合率に対するオゾラリズマブの影響を *in vitro* 試験により検討した。実施した試験の一覧を以下に示す。

表 2.4-2　薬物動態試験一覧

試験の種類	試験系	投与方法	被験物質
単回投与後の吸収（標識体）	マウス	静脈内	[^{125}I]オゾラリズマブ
単回投与後の吸収（非標識体）	マウス	皮下、静脈内	オゾラリズマブ
	マウス	腹腔内	オゾラリズマブ
	Tg197 マウス	腹腔内	オゾラリズマブ
	カニクイザル	皮下、静脈内	オゾラリズマブ
反復投与後の吸収（TK）	マウス	皮下、静脈内 5 週間（週 1 回）	オゾラリズマブ
	カニクイザル	皮下、静脈内 5 週間（週 1 回）	オゾラリズマブ
	カニクイザル	皮下、静脈内 39 週間（週 1 回）	オゾラリズマブ
組織分布	マウス	静脈内	[^{125}I]オゾラリズマブ
胎児移行性	カニクイザル	静脈内	オゾラリズマブ
乳汁移行性	カニクイザル	静脈内	オゾラリズマブ
ワルファリンの蛋白結合に対する影響	ヒト血漿	*in vitro*	オゾラリズマブ

2.4.1.3　毒性試験

オゾラリズマブの毒性を評価するため、主要な試験として、マウス皮下及び静脈内反復投与毒性試験（5 週間）、カニクイザル皮下及び静脈内反復投与毒性試験（5 及び 39 週間）、カニクイザル生殖発生毒性試験（胚・胎児発生に関する試験、出生前及び出生後の発生に関する試験）、組織交差反応性試験を実施した。また、局所刺激性の評価は、マウス及びカニクイザルの皮下及び静脈内反復投与毒性試験の中で実施した。いずれの試験も医薬品 GLP に準拠し、試験法は ICH S6 ガイドライン（「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」平成 24 年 3 月 23 日、薬食審査発 0323 第 1 号）又は各試験に関連するガイドラインに準拠して実施した。実施した主要な試験の一覧を以下に示す。

表 2.4-3　主要毒性試験一覧

試験の種類／期間	試験系	投与方法	GLP 適用
反復投与毒性試験／5 週間 （週 1 回投与）	マウス	皮下、静脈内	適
	カニクイザル	皮下、静脈内	適
反復投与毒性試験／39 週間 （週 1 回投与）	カニクイザル	皮下、静脈内	適
生殖発生毒性試験／胚・胎児発生に関する試験 （週 1 回投与）	カニクイザル	静脈内	適
生殖発生毒性試験／出生前及び出生後の発生に関する試験 （週 1 回投与）	カニクイザル	静脈内	適
組織交差反応性試験	マウス、カニクイザル、ヒト	*in vitro*	適

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1　*in vitro* 抗 TNFα 作用

ヒト及び他の動物種の TNFα に対するオゾラリズマブの結合親和性を表面プラズモン共鳴法で解析した結果、オゾラリズマブはヒト及びアカゲザル TNFα に高い親和性で結合し、その K_d 値はそれぞれ 20.2 及び 16.1 pmol/L であった。一方、オゾラリズマブはマウス、ラット及びウサギ TNFα に対して非常に低い結合親和性を示した。

膜結合型 TNFα に対するオゾラリズマブの結合活性をフローサイトメトリー法で検討した結果、オゾラリズマブは、CHO 細胞表面に発現させた膜結合型 TNFα に結合した。

L929 マウス線維芽細胞（L929 細胞）を用いてオゾラリズマブの TNFα 誘発細胞傷害抑制作用を検討した結果、オゾラリズマブはヒト及びアカゲザル TNFα 誘発の細胞死をいずれも低濃度で抑

制し、その IC_{50} 値はそれぞれ 22.5 及び 9.6 pmol/L であった。また、オゾラリズマブの IC_{50} 値は、エタネルセプト、アダリムマブ及びインフリキシマブより低値であった。

これらの結果から、オゾラリズマブはヒト TNFα に高親和性に結合し、その生理活性を中和することが確認された。

2.4.2.1.2　血清アルブミンに対する結合親和性

ヒト及び他の動物種の血清アルブミンに対するオゾラリズマブの結合親和性を表面プラズモン共鳴法で解析した結果、オゾラリズマブはヒト及びアカゲザルの血清アルブミンに対して高い親和性で結合し、その K_d 値はそれぞれ 4.28 及び 4.46 nmol/L であった。一方、オゾラリズマブのマウス及びラットの血清アルブミンに対する結合親和性は低く、その K_d 値はそれぞれ 92.2 及び 1607 nmol/L であった。

2.4.2.1.3　*in vivo* 抗 TNFα 作用

オゾラリズマブは、マウス空気嚢モデルにおいてヒト TNFα で誘発される総細胞数及び好中球数の増加を 0.125 mg/kg 以上の用量で有意に抑制した。さらに、オゾラリズマブは、ヒト TNF 遺伝子導入マウス（Tg197 マウス）の肉眼的関節炎スコア及び病理組織学的関節炎スコアを 0.3 mg/kg 以上の用量で有意に抑制した。

これらの結果から、オゾラリズマブは TNFα で誘導される炎症応答及び関節炎病態を抑制することが確認された。

2.4.2.1.4　その他の薬理作用試験

ADCC 活性の有無を膜結合型 TNFα 発現 NS0 マウス骨髄由来細胞を用いて、CDC 活性の有無を膜結合型 TNFα 発現 CHO 細胞を用いて検討した結果、オゾラリズマブは ADCC 活性及び CDC 活性を誘導しなかった。

これらの結果から、オゾラリズマブは膜結合型 TNFα と結合するが、Fc 領域を介した ADCC 活性及び CDC 活性を誘導しないことが確認された。

2.4.2.2　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。

2.4.2.3　安全性薬理試験

中枢神経系、呼吸系及び心血管系に対するオゾラリズマブの影響を検討した。

独立した中枢神経系及び呼吸系を評価する安全性薬理試験は実施しなかったが、オゾラリズマブを雌雄のカニクイザルに 0（対照）、15、50 及び 150 mg/kg/週の用量で 5 週間皮下及び静脈内

投与した（50 mg/kg/週は静脈内投与のみ）反復投与毒性試験（2.4.4.3.2 項）において、オゾラリズマブ投与に関連した中枢神経系及び呼吸系への影響は認められなかった。

心血管系では、テレメトリー送信器を埋め込んだカニクイザルにオゾラリズマブを 150 mg/kg の用量で単回静脈内投与した結果、心拍数、血圧及び心電図にオゾラリズマブ投与に関連した影響は認められなかった。

2.4.2.4　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なかった。

2.4.3　薬物動態試験

オゾラリズマブの非臨床薬物動態試験は、主に毒性試験及び薬理試験で使用した動物種であるマウス及びカニクイザルで実施した。投与経路は臨床投与経路である皮下投与のほか、静脈内又は腹腔内投与とした。

[^{125}I]オゾラリズマブを投与したときの各種試料中の放射能はガンマカウンターにより測定した。オゾラリズマブを投与したときの血清又は血漿中オゾラリズマブ濃度は ELISA 法により測定し、抗オゾラリズマブ抗体は ECLIA 法により検出した。

2.4.3.1　吸収

オゾラリズマブをマウス（2 mg/kg）及びカニクイザル（3 及び 100 mg/kg）に単回静脈内投与後の CL_{total} は 0.268～1.50 mL/h/kg であり、両動物で小さかった。Vd_{ss} は 76.5～86.6 mL/kg と両動物で小さいことから、オゾラリズマブはそのほとんどが循環血中に留まっていることが示唆された。オゾラリズマブをマウスに単回皮下（2 mg/kg）及び単回静脈内（2 mg/kg）投与後の $t_{1/2}$ は 43.1～44.8 時間（約 1.8～1.9 日）、カニクイザルに単回皮下（3 mg/kg）及び単回静脈内（3 及び 100 mg/kg）投与後の $t_{1/2}$ は 176～227 時間（約 7.3～9.5 日）であり、マウス及びアカゲザルで報告されている血清アルブミンの半減期（それぞれ 1～2 日、7～10 日）と同程度であった[5,6,7]。単回皮下投与後の BA は、マウス（2 mg/kg）で約 65%、カニクイザル（3 mg/kg）で約 70%であった。また、オゾラリズマブをヒト TNF 遺伝子導入（Tg197）マウスに単回腹腔内（0.3 及び 3 mg/kg）投与後の $t_{1/2}$ は 18.6～26.3 時間（約 0.8～1.1 日）であり、バックグラウンド系統のマウスに単回腹腔内（3 及び 30 mg/kg）投与後の $t_{1/2}$（39.7～41.5 時間、約 1.7 日）と比較して短かった。

オゾラリズマブをマウスに 5 週間（週 1 回、10 及び 250 mg/kg 皮下、10、50 及び 250 mg/kg 静脈内）、カニクイザルに 5 週間（週 1 回、15 及び 150 mg/kg 皮下、15、50 及び 150 mg/kg 静脈内）及び 39 週間（週 1 回、150 mg/kg 皮下、15、50 及び 150 mg/kg 静脈内）反復投与した毒性試験において TK を評価した。マウス、カニクイザルともに用量の増加に伴う最終投与後の $AUC_{0\text{-}168h}$ の増加が認められた。反復投与により曝露量の増加が認められ、緩やかな消失による累積と考えら

れた。また、明らかな性差は認められなかった。反復投与試験における抗オゾラリズマブ抗体の検出は限定的であり、曝露量への明らかな影響は認められなかった。

2.4.3.2　分布

[^{125}I]オゾラリズマブをマウスに単回静脈内投与（0.3 mg/kg）した結果、投与 408 時間後までの全ての測定時点において、測定した組織の中で血清中の放射能濃度が最も高かった。血清以外で比較的放射能濃度が高い組織は、肺、腎臓、心臓、脾臓及び皮膚であった。[^{125}I]オゾラリズマブ投与後 24 時間以内に全ての組織で放射能は最高濃度に達し、その後最終測定時点まで概ね経時的に減少した。投与 408 時間後までの全ての測定時点において、組織／血清中放射能濃度比は多くの組織で 0.2 未満であった。

オゾラリズマブを妊娠カニクイザルに妊娠 20 から 48 日まで週 1 回静脈内投与（15 及び 150 mg/kg）した結果、妊娠 100 日の全ての胎児の血漿中にオゾラリズマブが検出された。母動物に対する胎児の血漿中オゾラリズマブ濃度は約 3.2 及び 3.3%であった。

2.4.3.3　代謝

オゾラリズマブはバイオ医薬品（蛋白質）であるため、代謝に関する試験は実施しなかった。分解により小さなペプチドやアミノ酸に代謝されると考えられる。

2.4.3.4　排泄

オゾラリズマブをカニクイザルに妊娠期間中は妊娠 20 日から自然分娩まで、授乳期間中は授乳 7 から 28 日まで週 1 回静脈内投与（15 及び 150 mg/kg）した結果、授乳 14、28 及び 90 日に採取した乳汁中にオゾラリズマブが検出され、血漿に対する乳汁中オゾラリズマブ濃度は約 0.1～0.4%であった。

2.4.3.5　薬物動態学的薬物相互作用

ヒト血漿中のアルブミンと結合する薬物の蛋白結合率がオゾラリズマブの存在により変化するか否か、[^{3}H]ワルファリンを用いて *in vitro* 試験により評価した結果、[^{3}H]ワルファリンの蛋白結合率への影響は認められなかった。

オゾラリズマブはバイオ医薬品であるため、代謝酵素やトランスポーターとの相互作用の検討は実施しなかった。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 動物種の選択

オゾラリズマブの毒性試験は、マウス及びカニクイザルを用いて実施した。マウスを用いた毒性試験は、オゾラリズマブがマウス血清アルブミンに対し弱いながらも結合親和性を示したことから、生体内アルブミンとの結合に関連する毒性を評価するために実施した。また、カニクイザルを用いた毒性試験は以下の理由により実施した。カニクイザルの TNFα 及び血清アルブミンに対するオゾラリズマブの結合親和性の検討は実施していないが、TNFα 及び血清アルブミンのアミノ酸配列は、アカゲザルとカニクイザルで同一であり[8]、ヒトとアカゲザルの TNFα 及び血清アルブミンに対するオゾラリズマブの結合親和性は同等であったこと（2.4.2.1.1 及び 2.4.2.1.2 項）、一般的に毒性試験にはカニクイザルが広く用いられていることから、主要な毒性試験はカニクイザルを用いて実施した。

2.4.4.2 単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施しなかったが、オゾラリズマブを雌雄のカニクイザルに 0（対照）、15、50 及び 150 mg/kg/週の用量（50 mg/kg/週は静脈内投与のみ）で 5 週間皮下及び静脈内投与した反復投与毒性試験（2.4.4.3.2 項）で、急性毒性を評価した。その結果、オゾラリズマブ投与に関連した死亡や毒性変化は認められず、概略の致死量は、皮下投与、静脈内投与ともに 150 mg/kg を超える量であると考えられた。

2.4.4.3 反復投与毒性試験

マウス及びカニクイザルの 5 週間反復投与毒性試験並びにカニクイザルの 39 週間反復投与毒性試験を実施した。5 週間反復投与毒性試験ではマウスは 4 週間、カニクイザルは 8 週間の休薬期間を設け、回復性を検討した。

2.4.4.3.1 マウス

オゾラリズマブを雌雄 CD-1 マウスに 0（対照）、10、50 及び 250 mg/kg/週の用量（50 mg/kg/週は静脈内投与のみ）で 5 週間皮下及び静脈内投与した結果、いずれの投与経路においても、最高用量である 250 mg/kg/週までオゾラリズマブ投与に関連した死亡や毒性変化は認められなかった。4 週間の休薬後において、最高用量である 250 mg/kg/週までオゾラリズマブ投与に関連した変化は認められなかった。以上の結果から、皮下及び静脈内投与における無毒性量は、いずれも雌雄ともに 250 mg/kg/週と考えられた。臨床投与経路である皮下投与における、無毒性量の最終投与後の $AUC_{0\text{-}168h}$ は雄で 191116 h*μg/mL、雌で 116195 h*μg/mL であり、RA 患者に 30 mg を 4 週に 1 回投与時の曝露量と比較すると、雄で 233 倍、雌で 142 倍であった。

2.4.4.3.2　カニクイザル

オゾラリズマブを雌雄カニクイザルに 0（対照）、15、50 及び 150 mg/kg/週の用量（50 mg/kg/週は静脈内投与のみ）で 5 週間皮下及び静脈内投与した結果、いずれの投与経路においても、最高用量である 150 mg/kg/週までオゾラリズマブ投与に関連した死亡や毒性変化は認められなかった。8 週間の休薬後において、最高用量である 150 mg/kg/週までオゾラリズマブ投与に関連した毒性変化は認められなかった。以上の結果から、皮下及び静脈内投与における無毒性量は、いずれも雌雄ともに 150 mg/kg/週と考えられた。

オゾラリズマブを雌雄カニクイザルに 0（対照）、15、50 及び 150 mg/kg/週の用量（15 及び 50 mg/kg/週は静脈内投与のみ）で 39 週間皮下及び静脈内投与した結果、150 mg/kg/週皮下投与群の雄 1 例が試験 34 日に死亡した。死亡例ではグラム陰性球桿菌による敗血症を伴う腸管の壊死性炎が認められ、オゾラリズマブの薬理作用である免疫調節作用に続発した変化であると考えられた。生存例では、150 mg/kg/週皮下投与群及び 50 mg/kg/週以上の静脈内投与群の雌で一般状態観察において腫脹（口）、皮膚の乾燥（口、鼻、鼻口部又は顔周辺）、皮膚の発赤（口）又は蜂巣炎が認められたほか、病理組織学的検査において表皮／真皮の炎症又は皮膚潰瘍が認められた。
150 mg/kg/週皮下投与群及び 15 mg/kg/週以上の静脈内投与群で一般状態変化として便性状（主に液状便）の変化が認められ、これらの動物の多くは病理組織学的検査において腸粘膜上皮の変化（杯細胞増加及び上皮細胞分裂像増加）の発現頻度の増加を伴っていた。また、150 mg/kg/週皮下投与群及び 15 mg/kg/週以上の静脈内投与群で脾臓の細胞減少（主に胚中心）が認められた。これらの所見はいずれもオゾラリズマブの薬理作用である免疫調節作用への影響並びに薬理作用に続発して生じた細菌感染に関連した変化と考えられた。以上の結果から、皮下及び静脈内投与における無毒性量は、雌雄ともに 150 mg/kg/週と考えられた。臨床投与経路である皮下投与における無毒性量の最終投与後の $AUC_{0\text{-}168h}$ は雄で 618537 h*μg/mL、雌で 610588 h*μg/mL であり、RA 患者に 30 mg を 4 週に 1 回投与時の曝露量と比較すると、雄で 754 倍、雌で 745 倍であった。

2.4.4.4　遺伝毒性試験

オゾラリズマブは、三つのラマ抗体由来抗原結合領域が融合した三量体構造のヒト化融合蛋白質である。ICH S6 ガイドラインでは、蛋白質成分が DNA やその他の染色体物質に直接相互作用するとは考えにくい旨の記載があるほか、医薬品について実施される標準的な遺伝毒性試験の実施はバイオテクノロジー応用医薬品には適切ではないとの記載があることから、遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.4.4.5　がん原性試験

オゾラリズマブはマウス及びラットの TNFα に対して交差反応性を示さないこと（2.4.2.1.1 及び 2.4.2.1.2 項）からがん原性試験は実施しなかった。マウス及びラットに対するオゾラリズマブの相同蛋白質を用いたがん原性試験についても、2 年間の皮下並び静脈内投与試験の実施が技術的に困難であることに加え、相同蛋白質を用いたがん原性試験は ICH S6 ガイドラインにおいて推奨

されていないことから実施しなかった。なお、カニクイザルの 39 週間皮下及び静脈内反復投与毒性試験の病理組織学的検査において、前がん病変を示唆する所見は認められなかった。

2.4.4.6 生殖発生毒性試験

カニクイザルにおける母動物及び胚・胎児の発生に及ぼす影響、並びに出生前及び出生後の発生並びに母体の機能への影響について評価するため、生殖発生毒性試験を実施した。

2.4.4.6.1 受胎能に関する試験

ICH S6 ガイドラインにおいて、ヒト以外の霊長類の交配試験は実際的でないと記載されていることから、カニクイザルを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。

2.4.4.6.2 胚・胎児発生に関する試験

オゾラリズマブを妊娠カニクイザルの器官形成期（妊娠 20～48 日、交配期間の中間日を妊娠 0 日と起算）に 0（対照）、15 及び 150 mg/kg/週の用量で静脈内投与した。その結果、母動物及び胚・胎児においてオゾラリズマブ投与に関連した死亡や毒性変化は認められなかった。母動物及び胚・胎児発生に関する無毒性量は、いずれも 150 mg/kg/週と考えられた。なお、胎児血漿中への移行が認められ、母動物血漿中オゾラリズマブ濃度に対する割合は、胎児の血漿中で 3.2～3.3%であった。

2.4.4.6.3 出生前及び出生後の発生に関する試験

オゾラリズマブを妊娠カニクイザルの妊娠 20 日（交配期間の中間日を妊娠 0 日と起算）から授乳 28 日（自然分娩日を授乳/生後 0 日と起算）に 0（対照）、15 及び 150 mg/kg/週の用量で静脈内投与した。その結果、150 mg/kg/週投与群で妊娠 50 日以降の流産又は子宮内胎児死亡の増加が認められた。その他、15 mg/kg/週投与群の母動物 2 例と 150 mg/kg/週投与群の母動物 1 例が流産又は分娩後にまもなく瀕死又は死亡し、これらの母動物には皮膚所見（皮膚の鱗屑、発赤）、フィブリノゲン値の高値、多臓器への好中球浸潤、脾臓の細胞減少、子宮を原発とした細菌感染（敗血症）が認められた。また、出生児では妊娠 166 日に自然分娩された 15 mg/kg/週投与群の 1 例が生後 42 日に死亡発見されたが、死因は腎臓における細菌感染と考えられた。これらの母動物及び出生児で認められた死亡又は所見は、オゾラリズマブを投与した動物のみで認められたこと、ヒトにおいて TNF 阻害により日和見感染が報告されていることから[9,10,11,12,13]、オゾラリズマブの薬理作用である免疫調節作用による影響並びに薬理作用に続発して生じた細菌感染に関連した変化であると考えられた。なお、乳汁中への移行が認められ、母動物血漿中オゾラリズマブ濃度に対する割合は、乳汁中で 0.1～0.4%であった。以上の結果より、150 mg/kg/週投与群で、流産並びに

子宮内胎児死亡の増加が認められたことから、母動物及び胎児・出生児の無毒性量は 15 mg/kg/週と考えられた。

2.4.4.7 局所刺激性試験

独立した局所刺激性試験は実施しなかったが、マウス及びカニクイザルの皮下及び静脈内反復投与毒性試験において、一般状態観察、剖検及び病理組織学検査により投与部位の刺激性を評価した。肉眼観察及び組織学的検査のいずれの検査においても投与部位にオゾラリズマブ投与の影響は認められなかったことから、オゾラリズマブが血管及び皮下刺激性が発現する可能性は低いと考えられた。

2.4.4.8 その他の毒性試験

2.4.4.8.1 組織交差反応性試験

マウス、カニクイザル及びヒトの正常組織を用いてオゾラリズマブの組織交差反応性を検討した。各組織の凍結切片についてビオチン標識オゾラリズマブを用いて、直接免疫ペルオキシダーゼ法による免疫組織化学染色を実施した。その結果、カニクイザル及びヒトの各組織において、TNFα 結合領域への結合に関連した染色が認められ、カニクイザルの組織におけるオゾラリズマブの染色パターンは、ヒトの組織で認められたものと類似していた。また、マウス、カニクイザル及びヒトの全ての組織の間質及び基質の細胞外蛋白質において、内因性アルブミンへの結合に関連した染色が認められた。したがって、オゾラリズマブは、ヒトと同様にカニクイザルの TNFα 及び血清アルブミンに対し結合する可能性が示唆されたことから、カニクイザルはオゾラリズマブの *in vivo* 毒性試験に適した動物種であると考えられた。オゾラリズマブはマウスの血清アルブミンに対し結合する可能性が示唆されたことから、マウスはオゾラリズマブの内因性アルブミン結合に関連した毒性の評価に適した動物種であると考えられた。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 総括

2.4.5.1.1 薬理試験の総括

オゾラリズマブはヒト及びアカゲザル TNFα に対して高親和性に結合し、その K_d 値はそれぞれ 20.2 及び 16.1 pmol/L であった。一方、マウス、ラット及びウサギの TNFα に対する結合親和性は非常に低かった。また、オゾラリズマブはヒト及びアカゲザルの血清アルブミンに対してほぼ同程度の結合親和性を示し、K_d 値はそれぞれ 4.28 及び 4.46 nmol/L であった。マウス及びラット血清アルブミンに対するオゾラリズマブの親和性はヒト血清アルブミンと比較して低かった。さらに、オゾラリズマブは膜結合型 TNFα にも結合した。オゾラリズマブは、ヒト及びアカゲザル TNFα

で誘導される L929 細胞の細胞死を濃度依存的に抑制し、IC_{50} 値はそれぞれ 22.5 及び 9.6 pmol/L であった。オゾラリズマブの IC_{50} 値は、エタネルセプト、アダリムマブ及びインフリキシマブより低値であった。

マウス空気嚢モデルを用いて TNFα で誘発される細胞浸潤に対する抑制作用を検討した結果、オゾラリズマブは、ヒト TNFα で誘発される総細胞数及び好中球数の増加を 0.125 mg/kg 以上の用量で有意に抑制した。またオゾラリズマブは、ヒト TNF 遺伝子導入マウスの肉眼的関節炎スコア及び病理組織学的関節炎スコアを 0.3 mg/kg 以上の用量で有意に抑制した。

ADCC 活性の有無を膜結合型 TNFα 発現 NS0 マウス骨髄由来細胞を用いて、CDC 活性の有無を膜結合型 TNFα 発現 CHO 細胞を用いて検討した結果、オゾラリズマブは Fc 領域を持たないため ADCC 活性及び CDC 活性を誘導しなかった。

安全性薬理の評価では、オゾラリズマブは中枢神経系、呼吸系及び心血管系に影響を及ぼさなかった。

2.4.5.1.2　薬物動態試験の総括

オゾラリズマブをマウス及びカニクイザルに単回静脈内投与後の CL_{total} は、0.268～1.50 mL/h/kg と両動物ともに小さかった。Vd_{ss} は 76.5～86.6 mL/kg と小さく、オゾラリズマブはそのほとんどが循環血中に留まっていることが示唆された。オゾラリズマブを単回皮下及び単回静脈内投与後の $t_{1/2}$ は、マウスで約 1.8～1.9 日、カニクイザルで約 7.3～9.5 日であり、それぞれマウス及びアカゲザルで報告されている血清アルブミンの半減期と同程度であった。オゾラリズマブを単回皮下投与後の BA は、マウスで約 65%、カニクイザルで約 70%であった。

ヒト TNF 遺伝子導入 Tg197 マウスにオゾラリズマブを単回腹腔内投与後の $t_{1/2}$ は約 0.8～1.1 日であり、バックグラウンド系統である B6CBAF1/J マウスでの $t_{1/2}$（約 1.7 日）と比較して短かった。この要因としては、Tg197 マウスで過剰発現しているヒト TNF への結合を介した消失（標的介在性消失）が関与していると考えられた。

オゾラリズマブの反復投与毒性試験（マウスに 5 週間、カニクイザルに 5 週間及び 39 週間反復投与、いずれも皮下及び静脈内）における TK を評価した結果、いずれの種においても用量の増加に伴う曝露量の増加が認められた。反復投与により曝露量の増加が認められ、これは緩やかな消失による累積と考えられた。また、明らかな性差は認められなかった。反復投与毒性試験における抗オゾラリズマブ抗体の検出は限定的で、曝露量への明らかな影響は認められなかった。

[^{125}I]オゾラリズマブを B6CBAF1/J マウスに単回静脈内投与後、多くの組織で組織／血清中放射能濃度比が 0.2 未満であり、血清以外で比較的放射能濃度が高かった組織は肺、腎臓、心臓、脾臓及び皮膚であった。

オゾラリズマブを妊娠カニクイザルの器官形成期に週 1 回静脈内投与した結果、妊娠 100 日の全ての胎児の血漿にオゾラリズマブが検出され、胎児への移行が認められた。母動物に対する胎児の血漿中オゾラリズマブ濃度は約 3.2～3.3%であった。また、オゾラリズマブを妊娠から授乳

期までのカニクイザルに週 1 回静脈内投与したとき、授乳 14、28 及び 90 日に採取した乳汁中への移行が認められ、血漿に対する乳汁中オゾラリズマブ濃度は約 0.1～0.4%であった。

ヒト血漿中のアルブミンと結合する薬物の蛋白結合率がオゾラリズマブの存在により変化するか否か、ワルファリンを代表薬物として *in vitro* 試験により評価した結果、オゾラリズマブの併用がワルファリンの血漿蛋白結合率に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

2.4.5.1.3 毒性試験の総括

150 mg/kg/週までの用量で 5 週間皮下及び静脈内投与したカニクイザル反復投与毒性試験で急性毒性を評価した結果、オゾラリズマブ投与に関連した死亡や毒性変化は認められず、概略の致死量は、皮下投与、静脈内投与ともに 150 mg/kg を超える量と考えられた。

反復投与毒性試験において、無毒性量は雌雄ともにマウスの 5 週間皮下及び静脈内反復投与毒性試験で 250 mg/kg/週、カニクイザルの 39 週間皮下及び静脈内反復投与毒性試験で 150 mg/kg/週であった。臨床投与経路である皮下投与において、無毒性量におけるオゾラリズマブの曝露量を RA 患者に 30 mg を 4 週に 1 回投与時の曝露量と比較すると、マウス 5 週間反復皮下投与毒性試験の雄で 233 倍、雌で 142 倍、カニクイザル 39 週間反復皮下投与毒性試験の雄で 754 倍、雌で 745 倍であった。マウスに 250 mg/kg/週までの用量を 5 週間皮下及び静脈内投与した結果、オゾラリズマブ投与の影響は認められなかった。カニクイザルに 150 mg/kg/週までの用量を 39 週間皮下及び静脈内投与した結果、オゾラリズマブの薬理作用である免疫調節作用への影響並びに免疫調節作用に続発した細菌感染に関連した所見が認められた。他の TNF 阻害薬においても、ヒトへの投与時に感染症の危険性が警告されていることから、オゾラリズマブ投与で認められたこれらの変化は、TNF 阻害薬のクラスエフェクトであると考えられた。

生殖発生毒性試験において、カニクイザル胚・胎児発生に関する試験では、母動物及び胚・胎児の無毒性量は 150 mg/kg/週、カニクイザル出生前及び出生後の発生に関する試験では、母動物及び胎児・出生児の無毒性量は 15 mg/kg/週であった。これらの試験で母動物にオゾラリズマブを投与した結果、胎児血漿中並びに乳汁中へのオゾラリズマブの移行が認められた。カニクイザル出生前及び出生後の発生に関する試験において、150 mg/kg/週投与群で流産又は子宮内胎児死亡の頻度の増加が認められたが、流産又は子宮内胎児死亡の増加は母動物の毒性用量においてのみ認められたこと、胎児並びに出生児における形態異常及び成長に影響は認められていないこと、発生頻度がカニクイザルで自然発生的に認められる程度の範囲内であったことから[14,15]、オゾラリズマブがヒトの胎児・出生児に影響を与える可能性は低いと考えられた。また、カニクイザル出生前及び出生後の発生に関する試験の 150 mg/kg/週までの用量において、オゾラリズマブの薬理作用である免疫調節作用への影響並びに薬理作用を介して生じた細菌感染に関連した所見が出生児並びに母動物に認められ、本所見もオゾラリズマブを含めた TNF 阻害薬のクラスエフェクトであると考えられた。

局所刺激性について、マウス及びカニクイザルの皮下及び静脈内反復投与毒性試験において投与部位を評価した結果、オゾラリズマブ投与の影響は認められなかった。

組織交差反応性試験では、カニクイザル及びヒトの各組織において TNFα 結合領域への結合に関連した染色が認められ、カニクイザルの組織におけるオゾラリズマブの染色パターンは、ヒトの組織で認められたものと類似していた。また、マウス、カニクイザル及びヒトの全ての組織の間質及び基質の細胞外蛋白質において、内因性アルブミンへの結合に関連した染色が認められた。したがって、ヒトと同様に TNFα 及び内因性アルブミン結合能を有するカニクイザルはオゾラリズマブの *in vivo* 毒性試験、内因性アルブミンに結合能を有するマウスはオゾラリズマブの内因性アルブミン結合に関連した毒性の評価に適した動物種であると考えられた。

2.4.5.2　結論

オゾラリズマブは ADCC 活性及び CDC 活性を介した細胞傷害を生じることなく分泌型及び膜結合型 TNFα と結合し、その中和作用により炎症応答及び関節炎病態を抑制することが確認された。

オゾラリズマブを投与後の CL_{total} 及び Vd_{ss} の値は小さく、そのほとんどが循環血中に留まっていることが示唆された。消失半減期は血清アルブミンの半減期と同程度であった。また、オゾラリズマブが他の薬物のヒト血漿蛋白結合率に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

オゾラリズマブの反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験において、薬理作用である免疫調節作用への影響並びに免疫調節作用に続発した細菌感染に関連した所見が認められたことから、感染症等の発現には留意する必要があると考えられた。

2.4.6　参考文献

1 Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 1996;14:397-440.

2 Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. Immunol Today. 1997;18:487-92.

3 Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. Pharmacol Ther. 2008;117:244-79.

4 Coppieters K, Dreier T, Silence K, de Haard H, Lauwereys M. Formatted anti-tumor necrosis factor α VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum.. 2006;54:1856-66.

5 Nguyen HT. Transport proteins. In: Loeb WF, Quimby FW, editors. The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. 2nd ed. London, UK: Taylor and Francis; 1999. 309-35.

6 Leong D, Coe JE. Metabolism of homologous and heterologous serum proteins in garter snakes (Thamnophis ordinoides). Immunology. 1978;34:931-7.

7 Deo MG, Bhan AK, Ramalingaswami V. Metabolism of albumin and body fluid compartments in protein deficiency - an experimental study in the rhesus monkey. J Nutr. 1974;104:858-64.

[8] Whitters M. Predicted amino acid sequence alignments of TNF and albumin from human, rhesus monkey, and cynomolgus monkeys. Wyeth RPT-75192, 2008.

[9] ヒュミラ皮下注20 mgシリンジ0.2 mL／ヒュミラ皮下注40 mgシリンジ0.4 mL／ヒュミラ皮下注80 mgシリンジ0.8 mL／ヒュミラ皮下注40 mgペン0.4mL／ヒュミラ皮下注80 mgペン0.8 mL　医薬品インタビューフォーム、アッヴィ合同会社、2020年11月改訂（第28版）

[10] レミケード点滴静注用100　医薬品インタビューフォーム、田辺三菱製薬株式会社、2018年8月改訂（第28版）

[11] エンブレル皮下注50 mgペン1.0 mL／エンブレル皮下注25 mgペン0.5 mL／エンブレル皮下注50 mgシリンジ1.0 mL／エンブレル皮下注25 mgシリンジ0.5 mL／エンブレル皮下注用25 mg／エンブレル皮下注用10 mg　医薬品インタビューフォーム、ファイザー株式会社、2020年3月改訂（第29版）

[12] シンポニー皮下注50 mgシリンジ／シンポニー皮下注50 mgオートインジェクター　医薬品インタビューフォーム、ヤンセンファーマ株式会社、2020年4月改訂（第16版）

[13] シムジア皮下注200 mgシリンジ／シムジア皮下注200 mgオートクリックス　医薬品インタビューフォーム、ユーシービージャパン株式会社、2020年7月改訂（第14版）

[14] Weinbauer GF, Fuchs A, Niehaus M, Luetjens CM. The enhanced pre- and postnatal study for nonhuman primates: update and perspectives. Birth Defects Res C Embryo Today. 2011;93:324-33.

[15] Jarvis P, Srivastav S, Vogelwedde E, Stewart J, Mitchard T, Weinbauer GF. The cynomolgus monkey as a model for developmental toxicity studies: variability of pregnancy losses, statistical power estimates, and group size considerations. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2010;89:175-87.