サノフィ株式会社

カプラシズマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.4 非臨床試験の概括評価

Total number of pages: 12

目　　次

2.4 非臨床試験の概括評価 1

目　　次 2

表　目　次 3

略号と用語の定義 4

1　　非臨床試験計画概略 5

2　　薬理試験 6

3　　薬物動態試験 7

4　　毒性試験 8

5　　総括及び結論 10

付録 1:　CTD Module 4 におけるデータ欠損の理由 11

表　目　次

表 1 - カプラシズマブについて実施した毒性試験 8

略号と用語の定義

FVIII	凝固第 VIII 因子（Factor VIII）
FVIII:C	凝固第 VIII 因子活性（Factor VIII clotting activity）
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 Practice）
ICH	医薬品規制調和国際会議（International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use）
kDa	キロダルトン（kilodalton）
PK	薬物動態（Pharmacokinetics）
OECD	経済協力開発機構（Organization for Economic Co-operation and Development）
TK	トキシコキネティクス（Toxicokinetics）
TTP	血栓性血小板減少性紫斑病（Thrombotic thrombocytopenic purpura）
vWF	von Willebrand 因子（von Willebrand factor）
vWF:Ag	von Willebrand 因子抗原（von Willebrand factor antigen）

1　非臨床試験計画概略

カプラシズマブ（遺伝子組換え）（開発コード：ALX-0081）（以下、カプラシズマブ）は分子量約 28 kDa の二量体ナノボディである。ナノボディは、ラクダ科の動物で天然に産生される、重鎖のみからなる免疫グロブリンの重鎖可変ドメインから作製される、治療用タンパク質の一種である。ラクダ科の重鎖可変ドメインは、ヒト免疫ブロブリン重鎖可変領域ドメインとの配列及び構造に関する相同性が高い。

カプラシズマブは、同一の 2 つのヒト化した免疫グロブリンの構成タンパク（PMP12A2hum1）が、3 個のアラニンから成るリンカーによって結合されている。カプラシズマブは von Willebrand 因子（vWF）の A1 ドメインに結合する。vWF は止血における重要なタンパク質であり、血管内皮損傷部位への血小板動員に不可欠であるとともに、凝固第 VIII 因子（FVIII）の担体として作用する。カプラシズマブは vWF と相互作用することにより vWF を介した血小板の接着及び凝集を抑制する。

カプラシズマブは、生命を脅かす希少疾患である後天性血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）の治療を目的としている。

製剤の特性に基づき、カプラシズマブの非臨床開発は ICH S6(R1)に従って実施した。カプラシズマブは、本薬の毒性試験で使用した 2 つの動物種であるモルモット及びカニクイザルの vWF と交差反応することが示された。臨床ではカプラシズマブを 30 日以上の連日皮下投与で使用することが予定されている。原疾患が持続する場合は、原疾患が回復したことを示す徴候が得られるまで（例えば、ADAMTS13 活性の持続的な正常化が得られるまで）、カプラシズマブ 10 mg の連日皮下投与を継続することが可能である。

カプラシズマブを用いて実施する毒性試験は、慢性疾患病態における投与の妥当性を裏付けることを目的として計画し、予定されている投与期間及び用法・用量並びにそれを超える条件で評価した。カニクイザルでは最長 6 か月間、モルモットでは最長 3 か月間の試験を実施した。胚・胎児発生に関する試験はモルモットを用いて実施した。

遺伝毒性試験及びがん原性試験は本薬では必要ないと判断した。

2　薬理試験

カプラシズマブの *in vitro* での薬理学的特性を、遺伝子組換え vWF 断片、精製 vWF、血漿、血小板又は全血を用いて評価した。これらのアッセイから、カプラシズマブは vWF の A1 ドメインに強力に結合することにより、vWF 多量体に対する血小板の結合を完全に阻害することが明確に示された。この機能的作用は、健康被験者及び後天性又は先天性 TTP 患者から採取した血漿で認められた。ヒヒの *in vivo* 後天性 TTP モデルにおいて、カプラシズマブは後天性 TTP の急性期症状に特徴的な初期徴候に対して完全な予防効果と治療効果を示した。

In vivo において、カプラシズマブは 2 つの薬理特性を有することが示された。カプラシズマブは、A1 ドメインの阻害を介して vWF の機能性に影響を及ぼすとともに、vWF の体内動態にも影響を及ぼし、その結果として投与期間中に総 vWF:Ag 及びそれと同時に FVIII:C が一過性に低下した。

カプラシズマブは、本剤の毒性試験で使用した 2 つの動物種であるモルモット及びカニクイザルの vWF と交差反応することが示された。

種々の動物種を用いた組織交差反応性試験でカプラシズマブの特異性が裏付けられた。ヒト、カニクイザル及びモルモットの組織において、本ナノボディは vWF を発現している（標的発現）組織パネル（すなわち巨核球及び内皮細胞）のみと交差反応した。更なる副次的薬理試験から、VI 型コラーゲン、ADAMTS13、線維性コラーゲン及び FVIII に対する vWF の結合を阻害しないことが示された。さらに、カプラシズマブは ADAMTS13 の酵素活性を阻害しなかった。最後に、カプラシズマブはヒト血液細胞に結合しないことが示された。

カプラシズマブ投与に伴う出血リスクの有無を、種々のモデル及び毒性試験の血液凝固検査の解析により評価した。カプラシズマブはヒヒにおいて治療用量で出血時間を延長させ、これに伴って外科的創傷部位からの失血がわずかに増加したが、肉眼検査及び病理組織学的検査で特発性出血及び内出血の徴候は認められなかった。毒性試験でより高用量を投与したとき肉眼検査で出血が散見され、サル 26 週間反復投与毒性試験の高用量群の 1 匹は出血による瀕死状態のため安楽死に至った。

安全性薬理（心電図、心拍数及び血圧）評価は、カニクイザルを用いて、2 つの 2 週間反復投与毒性試験、13 週間反復投与毒性試験及び重要な長期の 26 週間慢性投与毒性試験の一部として行った。

心臓及び血管の病理検査（剖検時の肉眼検査、心臓重量並びに心臓及び血管の病理組織学的検査）を、カニクイザル（2 週間、13 週間及び 26 週間）及びモルモット（13 週間）の反復投与毒性試験に組み込んで実施した。

要約すると、カプラシズマブの薬理作用は十分に評価され、vWF の機能性及び体内動態に対するその意図する薬理作用が、一連の動物種を用いた種々の *in vitro* 及び *in vivo* モデルで確認された。後天性 TTP 患者の治療を目的とした本剤の製造販売承認申請を妨げると考えられる所見は認められなかった。作用機序に基づくと、出血事象は慎重にモニタリングする必要がある。

3　薬物動態試験

カプラシズマブの薬物動態（PK）特性について、カプラシズマブが vWF と交差反応性を示す動物種のモルモット及びヒヒ、並びに交差反応性を示さない動物種のマウスを用いて評価した。カプラシズマブの分布は、放射性標識体（^{125}I 標識体）を用いてマウスで検討した。カプラシズマブはマウス vWF と交差反応しないため、カプラシズマブのみ（遊離形カプラシズマブ）又はヒト vWF に結合させたカプラシズマブ（結合形カプラシズマブ）を投与した。遊離形カプラシズマブと結合形カプラシズマブの間で分布に有意差が認められ、交差反応性を示す動物種で認められた二相性 PK を説明するのに役立つ知見が得られた。

カプラシズマブの標的分子を介した PK は、実施した全ての PK 試験及びトキシコキネティクス（TK）試験で一貫して観察された。カプラシズマブの消失は、動物種ごとに異なる vWF（標的分子）の発現量及びカプラシズマブと vWF の親和性に依存した。vWF 結合形カプラシズマブは、恐らく vWF の主要な移行臓器である肝臓より消失を受け、一方で非結合形カプラシズマブは糸球体濾過により腎臓から排泄されると推定された。このことは、放射性標識カプラシズマブを用いたマウスでの分布試験により、ヒト vWF 結合形カプラシズマブは主に肝臓内で検出されるのに対して、非結合形カプラシズマブは腎臓で速やかにピークに達することが示されたことから裏付けられた。標的分子を介した消失経路を有することからカプラシズマブは非線形性の PK を示す。全ての動物種において、静脈内投与直後又は皮下若しくは筋肉内投与時の最高血漿中濃度到達後の高濃度での PK は、速やかな血漿中濃度の低下を特徴とする初期消失相によって説明することができる。初期における消失は、非結合形カプラシズマブの速やかな分布と腎臓（糸球体濾過）を介した速やかな消失によるものと考えられる。静脈内、皮下又は筋肉内投与後の曝露量は用量比を下回る増加を示した。

臨床で予定されている投与経路は静脈内投与及び皮下投与である。カプラシズマブを皮下投与したときのバイオアベイラビリティは、カニクイザルで 82%以上、モルモットで 79%以上であった。

カプラシズマブの代謝に関する試験は実施していない。カプラシズマブはタンパク質であるため、他のタンパク質と同様に異化経路により小さなペプチド又はアミノ酸に分解されると推察される。カプラシズマブの排泄を評価するための特別な試験は実施していないが、分布試験の結果は上記の消失経路に関する仮説を裏付けるものであった。さらに、カニクイザルを用いた毒性試験で採取した尿試料のウェスタンブロット分析により、遊離形カプラシズマブが定性的に検出された。

カプラシズマブを反復投与したときの PK を主にモルモット及びカニクイザルを用いた毒性試験で評価した。毒性試験より得られた生体試料はバリデーション済みの分析法を用いて測定した。

以上、カプラシズマブの PK に関する詳細な特性評価が行われ、後天性 TTP 患者に使用することの妥当性が裏付けられた。

4　毒性試験

カプラシズマブの毒性を、ICH S6(R1)に従って評価した。カプラシズマブの重要な毒性試験は、2つの非臨床動物種（げっ歯類動物種としてモルモット及び非げっ歯類動物種としてカニクイザル）を用いて実施した。これらの動物種は、各動物種の vWF A1 ドメインに対する親和性、*in vitro* 結合、機能アッセイ及び *in vivo* での薬力学効果の検討に基づいて選択された。

カプラシズマブの毒性試験プログラムを表 1 に要約する。

表 1 - カプラシズマブについて実施した毒性試験

試験の種類	動物種／系統	投与経路	試験番号	GLP 適用の有無 [a]
単回投与毒性試験	モルモット、ダンキン・ハートレイ	静脈内ボーラス	[redacted] 20093/[redacted]	適用
用量漸増試験	カニクイザル	静脈内ボーラス	[redacted] 20094/[redacted]	適用
単回投与毒性試験	カニクイザル	静脈内ボーラス又は皮下	[redacted] 22630/1	適用
13 週間反復投与毒性試験	モルモット、ダンキン・ハートレイ	皮下	[redacted] 24023	適用
2 週間反復投与毒性試験	カニクイザル	静脈内ボーラス	[redacted] 20095/[redacted]	適用
2 週間反復投与毒性試験	カニクイザル	静脈内ボーラス又は皮下	[redacted] 22631	適用
13 週間反復投与毒性試験	カニクイザル	皮下	[redacted] 24024	適用
26 週間反復投与毒性試験	カニクイザル	皮下	AA93337	適用
妊娠モルモットを用いた用量設定及びトキシコキネティクス試験	モルモット、ダンキン・ハートレイ	筋肉内	[redacted] 25265	適用
胚・胎児発生に関する試験（Segment II）	モルモット、ダンキン・ハートレイ	筋肉内	[redacted] 20179/[redacted]	適用
単回投与による局所刺激性試験	ウサギ、ヒマラヤン	静脈内、筋肉内、動脈内、静脈周囲及び皮下	[redacted] 20340/[redacted]	適用

a　すべての GLP 適用試験は OECD 加盟国で実施した。

反復投与により、持続的な最大標的占有（標的飽和）及び最大曝露量が達成されるよう設計した。検討した最高用量は、推奨される投与容量を考慮して設定した。

全体として、非臨床毒性試験で報告された所見（散発的鼻出血、月経過多又は注射部位の皮下組織出血など）は、カプラシズマブの薬理作用の発現によるものと解釈可能であった。これらの所見は重症度が低く、回復性が認められた。カニクイザルを用いたすべての反復投与毒性試験において、投与期間中にベースラインからの vWF 抗原（vWF:Ag）及び凝固第 VIII 因子活性（FVIII:C）の減少が認められた。回復期間内にベースライン値への復帰がみられた。モルモットにおいてカプラシズマブの反復投与でみられた所見は FVIII:C 値減少のみであり、その程度はカニクイザル又はヒトでみられた変化と比較して小さかった。

カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験において、高用量群（40 mg/kg/日）の雄 1 匹で投与 27 日目に貧血の徴候、出血傾向増加（大型のびまん性血腫及び採血部位からの自然出血として発現）並びに血液学的及び血液生化学的パラメータの異常が認められた。阻害性抗 FVIII 抗体が検出されたが、カプラシズマブに対する抗薬物抗体は検出されなかった。この動物は 85 日目に途中安楽死させた。

この動物の所見は、カプラシズマブの薬理作用による二次的な広範囲の血腫及び実験条件（拘束による外傷、採血のような高頻度の実験処置）による増悪並びに／又は阻害性抗 FVIII 抗体の存在に関連する可能性が高いと解釈される。潜在的な炎症状態の可能性は否定できない。

関連する一般状態の変化を伴わない抗 FVIII 抗体の発現が、カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験の投薬群の雄 2 匹及び 13 週間反復投与毒性試験の投薬群の 2 匹にもレトロスペクティブに認められた。この所見の臨床との関連性はまだ不明である。無毒性量（NOAEL）は、高用量群の動物で貧血を呈する上記の病的状態がみられたこと並びに中及び低用量群で毒性所見が認められなかったことに基づき、4 mg/kg/日に設定された。臨床用量での予想ヒト曝露量を上回る適切な安全域（10 倍超）が決定された。

ICH S6(R1)に従い、遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった。

モルモットを用いた胚・胎児発生に関する試験において、生殖毒性及び催奇形性は認められなかった。補助的 TK 試験において、母動物及び胎児への曝露が確認された。機能評価を含む雌雄の受胎能パラメータを、カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験の一環として検討した。雌雄の受胎能パラメータにおいて、カプラシズマブ投与関連の所見は認められなかった。

要約すると、カプラシズマブの毒性は、適切な動物種において薬理活性のみられる用量で十分に特徴づけられており、後天性 TTP の患者を対象とした本薬の使用は支持された。作用機序の結果による出血増加が安全性リスクとして特定されている。これについては臨床条件下での管理が可能である。非臨床試験におけるカプラシズマブの局所刺激性は許容可能なものであった。毒性試験においてカプラシズマブのヒトへの使用の障害となる所見は認められなかった。

5　総括及び結論

カプラシズマブは vWF の A1 ドメインに結合する。vWF は止血機構における重要なタンパク質であり、血管内皮損傷部位への血小板動員に不可欠であるとともに、FVIII の担体として作用する。

その薬理学的作用機序により、カプラシズマブの毒性試験では、出血傾向の増加がモルモット（注射部位の皮下組織出血）及びカニクイザル（注射部位の皮下組織出血、鼻出血、過剰の月経出血、動物取扱い部位又は実験処置部位の血腫、注射部位の出血延長）で認められた。更に、薬理作用に関連した vWF:Ag の減少及びその結果としての FVIII:C 減少がカニクイザルでみられ、モルモットでも軽度ではあるが、FVIII:C 減少が認められた。

モルモットを用いて実施した胚・胎児発生に関する試験において、毒性の徴候は報告されなかった。妊娠モルモットを用いた追跡調査 TK 試験において、母動物及び胎児におけるカプラシズマブの曝露量を評価した。その結果、カプラシズマブへの曝露が母動物で示され、程度ははるかに低いものの胎児でも示されたが、胎児発生への影響は認められなかった。

ナノボディを含む抗体についての変異原性試験は適切ではないため、カプラシズマブの変異原性を検討するための試験は実施しなかった。がん原性リスク評価に基づき、がん原性を評価するための独立した試験は必要ないと考えられた。

雌雄の受胎能に対するカプラシズマブの影響を評価するための独立した試験は実施しなかった。カニクイザルを用いた反復投与毒性試験の枠組みにおいて、雌雄の受胎能パラメータに対するカプラシズマブの影響は認められなかった。

薬理学的作用機序による出血増加が安全性リスクとして特定された。これについては臨床条件下でモニタリング及び管理が可能である。

以上のように、後天性 TTP の治療を目的とした製造販売承認申請をサポートするための非臨床試験において、本薬は十分に特徴づけられている。その結果、非臨床試験において、予定患者集団を対象とした本薬の使用の障害となる所見は認められなかった。

付録 1:　CTD Module 4 におけるデータ欠損の理由

本申請に含まれていない非臨床試験の項の詳細を下表に示す。

CTD の項	表題	資料に含めなかった理由
4.2.1	薬理試験	
4.2.1.3	安全性薬理試験	安全性薬理評価に関しては反復投与毒性試験で評価したため、独立した試験は実施しなかった。カプラシズマブの非臨床心血管系安全性評価については、カニクイザルを用いた 4 つの毒性試験（[redacted]20095、[redacted]22631、[redacted]24024、[redacted] AA93337）及びモルモットを用いた 1 つの毒性試験（[redacted]24023）のデータに基づき評価した。 カプラシズマブは高度な選択性を有するバイオテクノロジー医薬品であり、そのためイオンチャネルを直接遮断するものではないことから、本薬の hERG チャネルに対する効果を評価する試験は実施していない。
4.2.1.4	薬力学的薬物相互作用試験	カプラシズマブは von Willebrand 因子と特異的に相互作用する抗体／ナノボディであるため、薬力学的薬物相互作用試験は必要ないと判断した。
4.2.2	薬物動態試験	
4.2.2.4	代謝	ICH S6(R1)に示されているように、抗体の代謝経路については詳細に解明されており、小さなペプチド及び各アミノ酸へと分解される。抗体医薬と同様の生物学的製剤であるナノボディは全く同じ代謝経路をたどると推定される。したがって、カプラシズマブの代謝試験は実施していない。
4.2.2.5	排泄	タンパク質であるカプラシズマブはタンパク分解異化過程により消失すると予想されるため、特別な排泄試験は実施しなかった。排泄試験を実施しなかったものの、放射性標識（^{125}I-）カプラシズマブを用いたマウス分布試験で得られたデータから、遊離形カプラシズマブが腎臓より糸球体濾過で排泄される一方、vWF 結合形カプラシズマブは標的分子を介した過程により肝臓に取り込まれ、異化される可能性があることが示唆された。また、カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験で得られたデータからもカプラシズマブが尿中に排泄されることが示唆されている。
4.2.2.6	薬物動態学的薬物相互作用（非臨床）	ナノボディであるカプラシズマブでは、シトクロム P450 及びトランスポーターとの直接的な薬物相互作用は予想されないため、特別な薬物動態学的薬物相互作用試験を実施する必要はないと考え、実施していない。
4.2.2.7	その他の薬物動態試験	追加の薬物動態試験は不要であると判断した。
4.2.3	毒性試験	
4.2.3.3	遺伝毒性試験	ICH S6(R1)に従い、遺伝毒性／変異原性試験は実施していない。製剤には新規添加剤は含まれていない。

CTD の項	表題	資料に含めなかった理由
4.2.3.4	がん原性試験	ICH S6(R1)に従い、がん原性試験は実施していない。薬理学的作用機序、カニクイザルを用いた最長 26 週間の反復投与毒性試験の結果及びその他の特性に基づき、がん原性リスクは特定されなかった。
4.2.3.7	その他の毒性試験	
4.2.3.7.1	抗原性試験	抗原性については標準的な毒性試験の一環として評価した。
4.2.3.7.2	免疫毒性試験	免疫毒性については標準的な毒性試験の一環として評価した。
4.2.3.7.3	毒性発現の機序に関する試験	非臨床試験において特別の懸念は特定されなかったことから不要であると考えられた。
4.2.3.7.4	依存性試験	非臨床／臨床試験において依存性は認められなかったことから不要であると考えられた。
4.2.3.7.5	代謝物の毒性試験	ICH S6(R1)に基づき不要であると考えられた。
4.2.3.7.6	不純物の毒性試験	すべての関連ある不純物は標準的な毒性試験でカバーされたことから不要であると考えられた。