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 ― 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

図　目　次 3

略号と用語の定義 4

1　　緒言 5

2　　参考文献 8

図　目　次

図 1 - カプラシズマブの構造 5
図 2 - 後天性TTPにおけるカプラシズマブの作用機序 7

略号と用語の定義

ADAMTS13	a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13
FVIII	凝固第 VIII 因子（Factor VIII）
FVIII:C	凝固第 VIII 因子活性（Factor VIII clotting activity）
kDa	キロダルトン（kilodalton）
TTP	血栓性血小板減少性紫斑病（Thrombotic thrombocytopenic purpura）
UL-vWF	超高分子量 von Willebrand 因子（ultra-large von Willebrand factor）
vWF	von Willebrand 因子（von Willebrand factor）
vWF:Ag	von Willebrand 因子抗原（von Willebrand factor antigen）

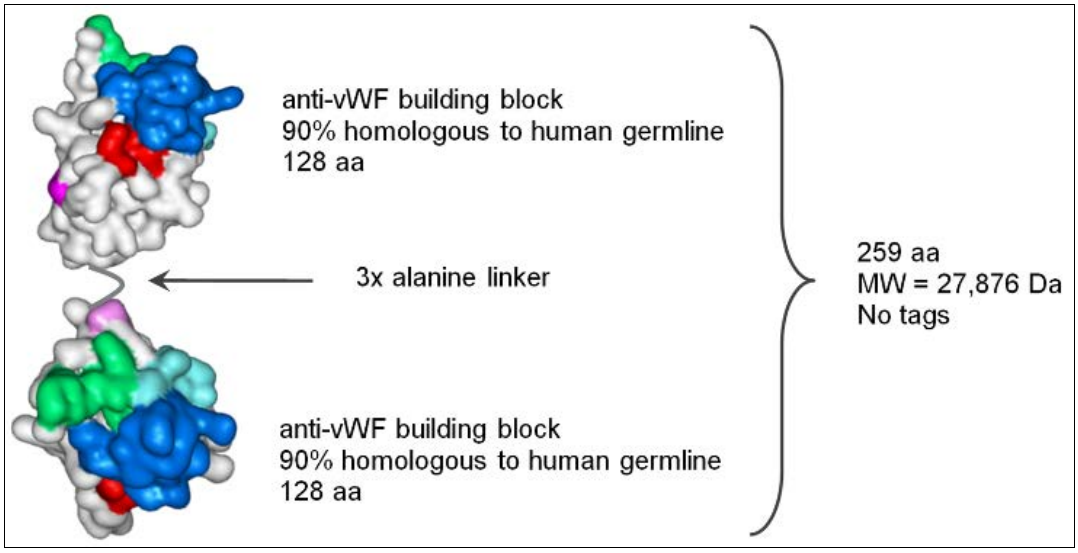
1　緒言

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（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 のナノボディで、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（図 1）。カプラシズマブは、von Willebrand 因子（vWF）の A1 ドメインと結合する。vWF は止血機構における重要なタンパク質であり、凝固第 VIII 因子（FVIII）の担体として不可欠であるとともに、血管内皮損傷部位への血小板動員にも不可欠である。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。

図 1 - カプラシズマブの構造

Complementarity determining region (CDR)-loops are colored as follows: CDR1 in green, CDR2 in cyan and CDR3 in blue. Red and purple residues refer to hallmark residues which are different for a VHH compared to a human VH.
aa = アミノ酸、MW = 分子量



カプラシズマブは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。

後天性 TTP は生命を脅かす可能性のある血栓性微小血管症であり、全身の微小血管に血栓が生じることにより発症し、顕著な血小板減少症、溶血性貧血及び様々な重症度の臓器不全に至る(1)。後天性 TTP は、阻害性自己抗体の存在による ADAMTS13（a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13）の重度の欠乏（<10%）に概して関連している(2)。

ADAMTS13 は vWF の正常なプロセシングに不可欠なメタロプロテアーゼである。ADAMTS13 活性が低下すると、超高分子量 vWF（UL-vWF）多量体が蓄積し、これが血小板に容易に結合して望ましくない血小板の接着及び凝集を引き起こす(3)。その結果生じた全身の微小血栓により急性の組織虚血及び臓器機能不全が起こり、急死に至るか(4)(5)、又は認知障害、うつ病、動脈性高血圧及び平均寿命の短縮といった長期合併症が発現する(6)(7)(8)(9)(10)。

後天性 TTP の現時点の標準治療では、自己抗体、UL-vWF 及び免疫複合体の除去並びに ADAMTS13 の補充を目的とした血漿交換を緊急的に開始するとともに、自己抗体産生の阻害を目的とした免疫抑制療法（コルチコステロイド及びリツキシマブなど(1)(11)）を追加で行う。現時点での患者の生存率は約 80%である(12)。寛解が得られることが多いものの速やかに得られるわけではなく、患者は原疾患が回復するまで微小血栓の合併症や現エピソードの再発のリスクを有し続ける。このような TTP エピソードは概して完全に回復すると考えられているが、特に最初の 1 年間に再発するリスクが著しく高い。

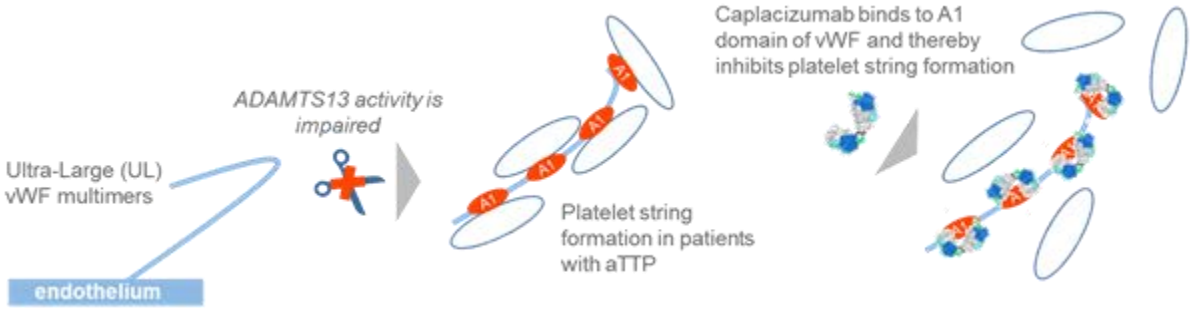
カプラシズマブは UL-vWF と血小板との相互作用を速やかかつ直接的に阻害することにより、微小血栓の更なる形成を予防し、全身の微小血管における血栓症の進行を抑制する（図 2）。原疾患である免疫疾患が回復するまで投与を継続することにより、現 TTP エピソードの再発が予防されると考えられる。投与レジメンは、本剤の投与初日は、血漿交換前に 10 mg を静脈内投与し、血漿交換終了後に 10 mg を皮下投与する。その後の血漿交換期間中は、血漿交換終了後に 1 日 1 回 10 mg を皮下投与する。血漿交換期間後は、1 日 1 回 10 mg を 30 日間皮下投与する。なお、患者の状態に応じて、血漿交換期間後 30 日間を超えて本剤の投与を継続することができる。

カプラシズマブは後天性 TTP の初回エピソード及び本疾患の再発の治療を目的としている。

図 2 - 後天性 TTP におけるカプラシズマブの作用機序

血漿タンパク質 vWF は内皮細胞により超高分子量多量体として合成される。この多量体は放出される際に ADAMTS13 により切断される。この酵素的プロセシングは、UL-vWF 多量体の内皮への固定及びずり応力を介したアンフォールディングによって媒介される。後天性 TTP において、ADAMTS13 に対する阻害抗体は、この酵素的プロセシングを抑制し、その結果、過反応性 UL-vWF が循環血中に保持され、組織虚血を誘発する可能性のある微小血栓が形成される。カプラシズマブは後天性 TTP において UL-vWF と血小板との相互作用を阻害することにより、微小血栓形成プロセスを抑制する。

aTTP：後天性 TTP



カプラシズマブは、単回使用バイアル入り注射溶液用無菌凍結乾燥粉末として提供され、バイアルには 12.5 mg のカプラシズマブ及び以下の添加剤が含まれる：無水クエン酸、クエン酸ナトリウム水和物、精製白糖及びポリソルベート 80（Module 3.2.P.1）。製剤は注射用水に溶解し、10 mg/回の用量の投与液を調製する。

2 参考文献

1. Scully, M., et al., Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. British journal of haematology, 2012. 158(3): p. 323-35.
2. Sadler, J.E., Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood, 2008. 112(1): p. 11-18.
3. Sarig, G., ADAMTS-13 in the Diagnosis and Management of Thrombotic Microangiopathies. Rambam Maimonides medical journal, 2014. 5(4): p. e0026.
4. Patschan, D., et al., Acute myocardial infarction in thrombotic microangiopathies--clinical characteristics, risk factors and outcome. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 2006. 21(6): p. 1549-54.
5. Nichols, L., et al., Cardiac injury is a common postmortem finding in thrombotic thrombocytopenic purpura patients: is empiric cardiac monitoring and protection needed? Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy, 2015. 19(1): p. 87-92.
6. Deford, C.C., et al., Multiple major morbidities and increased mortality during long-term follow-up after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood, 2013. 122(12): p. 2023-9; quiz 2142.
7. Hughes, C., et al., Cardiac involvement in acute thrombotic thrombocytopenic purpura: association with troponin T and IgG antibodies to ADAMTS 13. J.Thromb.Haemost., 2009. 7(4): p. 529-536.
8. Lewis, Q.F., et al., Long-term deficits in health-related quality of life after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. Transfusion, 2009. 49(1): p. 118-124.
9. Han, B., et al., Depression and cognitive impairment following recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. American journal of hematology, 2015. 90(8): p. 709-14.
10. Kennedy, A.S., et al., Cognitive deficits after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. Transfusion, 2009. 49(6): p. 1092-101.
11. Blombery, P. and M. Scully, Management of thrombotic thrombocytopenic purpura: current perspectives. Journal of blood medicine, 2014. 5: 15-23.
12. George, J.N., Corticosteroids and rituximab as adjunctive treatments for thrombotic thrombocytopenic purpura. American journal of hematology, 2012. 87 Suppl 1: p. S88-91.

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

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 47

目　　次

2.6.2 薬理試験の概要文 **1**

目　　次 **2**

表 目 次 **5**

図 目 次 **5**

略号と用語の定義 **6**

1　　まとめ **8**

2　　効力を裏付ける試験 **9**

2.1　　*In vitro* 活性 9

2.1.1　　*In vitro* 特性 11

2.1.1.1　von Willebrand 因子 A1 ドメイン及び 12A2h1 複合体の結晶構造（A001-MOB-[redacted]-ANR-001-v1 試験） 11

2.1.1.2　カプラシズマブの vWF 多量体に対する親和性の決定（A068-PHA-[redacted]-ISR-003-V1 試験） 12

2.1.1.3　カプラシズマブの生物活性と特異性（ALX-0081 TR012 V02 試験） 12

2.1.1.4　内皮細胞由来 UL-vWF に対する血小板接着能に及ぼすカプラシズマブの作用（ALX-0081 TR013 試験） 15

2.1.1.5　vWF 値に対するカプラシズマブ の影響（A001-PHA-[redacted]-ANR-002 試験） 16

2.1.1.6　vWF:Ag 増加ヒト血液中の血小板機能に対するカプラシズマブの影響（A001-PHA-[redacted]-ANR-001 試験） 16

2.1.1.7　TTP 血漿及びバイオアッセイにおけるカプラシズマブの *in vitro* 有効性の評価（24-A0068-[redacted]-0016 試験） 18

2.1.1.8　異なる動物種の A1 ドメインに対するカプラシズマブの親和性（ALX-0081 TR043 試験） 18

2.1.1.9　*In vitro* におけるカプラシズマブの標的占有と標的中和の検討（24-A0068-[redacted]-0003 試験） 19

2.1.2　　*In vitro* TTP モデル 20

2.2 種交差反応性 21
2.2.1 カプラシズマブの交差反応性（ALX-0081 TR019 試験） 24
2.2.2 カニクイザル及びモルモット vWF を標的としたカプラシズマブの薬理学的特性とヒトとの比較（A068-PHA-[redacted]-ISR-001-V1 試験） 24
2.3 *In vivo* 薬理作用 25
2.3.1 ヒヒ後天性 TTP モデル（A068-PHA-[redacted]-ANR-001 試験） 25
2.3.2 薬力学マーカー 28
2.3.2.1 標的中和に関連する薬力学マーカー 28
2.3.2.2 標的の体内動態に関連する薬力学マーカー 29
2.3.2.2.1 VWF プロペプチド濃度に対するカプラシズマブの影響（A068-NC-[redacted]-004 試験） 31
2.3.2.3 後天性 TTP の有効性マーカー 31
2.3.2.3.1 ヒヒ後天性 TTP モデルにおけるカプラシズマブの PK/PD モデリング（A068-NC-[redacted]-005 試験） 32
3 副次的薬理試験 34
3.1 結合特異性 34
3.1.1 カプラシズマブの特異性：血液細胞との相互作用（ALX-0081 TR020 試験） 34
3.1.2 カプラシズマブの特異性：vWF と線維性コラーゲンとの相互作用（ALX-0081 TR057 試験） 35
3.1.3 ヒト及び他の動物種におけるカプラシズマブの組織交差反応性 35
3.1.4 カプラシズマブの特異性：vWF と FVIII との相互作用（Analysis report - SPR analysis 試験） 36
3.2 出血リスク 37
3.2.1 ヒヒにおけるカプラシズマブの出血リスク評価試験並びにプラビックス及び ReoPro との比較試験（ALX-0081 TR008 試験） 38
3.2.2 ヒヒ Folts モデルにおけるカプラシズマブの有効性及び薬理作用、並びに Aspegic、ヘパリン、プラビックス及び ReoPro との比較 （ALX-0081 TR009 試験） 38
4 安全性薬理試験 41
4.1 中枢神経系 41

4.2 呼吸系 42

4.3 心血管系 42

4.4 まとめ 43

5 薬力学的薬物相互作用試験 44

6 考察及び結論 45

参 考 文 献 47

表　目　次

表 1 - カプラシズマブの *in vitro* 活性 10

表 2 - ヒト、カニクイザル及びモルモットにおけるカプラシズマブの特性の要約 23

表 3 -各動物種の血漿中 vWF:Ag とカプラシズマブの効果 25

表 4 - 試験デザイン及び投与スケジュール 26

表 5 - 非臨床試験動物種における RICO アッセイ性能の概要 29

表 6 - 反復投与毒性試験のデザインの概要 41

表 7 - サルにおける心電図及び血圧評価の概要 42

図　目　次

図 1 - vWF に対するカプラシズマブと FVIII の同時結合 11

図 2 - UL-vWF への血小板接着に対するカプラシズマブの作用 20

図 3 - リストセチン・コファクター活性アッセイ（RICO） 21

図 4 - ヒヒ後天性 TTP モデル：（A）血小板数、（B）ハプトグロビン値、（C）分裂赤血球数 及び（D）RICO 値の時間曲線の比較 27

図 5 - カニクイザルにおける vWFpp/vWF:Ag 比（A001-PHA-[redacted]-ANR-002 試験） 30

図 6 - 投与及びガーゼ交換（紫の矢印）スケジュール 39

略号と用語の定義

A1-vWF	von Willebrand 因子 A1 ドメイン（von Willebrand factor A1 domain）
ADAMTS13	a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13
aPTT	活性化部分トロンボプラスチン時間（activated partial thromboplastin time）
ASA	アセチルサリチル酸（acetylsalicylic acid）
CFR	循環血流減少（cyclic flow reductions）
CT	コンピュータートモグラフィー（computer tomography）
FVIII	凝固第 VIII 因子（Factor VIII）
FVIII:C	凝固第 VIII 因子活性（Factor VIII clotting activity）
GPIb-IX-V	血小板糖タンパク Ib-IX-V 受容体
hERG	ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子（human *ether-a-go-go* related gene）
HRP	ホースラディッシュペルオキシダーゼ（horse radish peroxidase）
HV	健康ボランティア（healthy volunteer）
i.m.	筋肉内（intramuscular）
i.v.	静脈内（intravenous）
kDa	キロダルトン（kilodalton）
PBS	リン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline）
PCI	経皮的冠動脈形成術（percutaneous coronary intervention）
PD	薬力学（pharmacodynamics）
PK	薬物動態（Pharmacokinetics）
PPP	乏血小板血漿（platelet poor plasma）
PRP	多血小板血漿（platelet rich plasma）
PT	プロトロンビン時間（prothrombin time）
RICO	リストセチン・コファクター活性（ristocetin-induced cofactor activity）
RIPA	リストセチン誘導血小板凝集（ristocetin-induced platelet aggregation）
SPR	表面プラズモン共鳴法（surface plasmon resonance）
TTP	血栓性血小板減少性紫斑病（Thrombotic thrombocytopenic purpura）
UL-vWF	超高分子量 von Willebrand 因子（ultra-large von Willebrand factor）
vWF	von Willebrand 因子（von Willebrand factor）

vWF:Ag	von Willebrand 因子抗原（von Willebrand factor antigen）
vWFpp	von Willebrand 因子プロペプチド（von Willebrand factor propeptide）

1　まとめ

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）の *in vitro* での薬力学的特性を、遺伝子組換え von Willebrand 因子（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 多量体への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血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）患者から採取した血漿で認められた。ヒヒの *in vivo* TTP モデルにおいて、カプラシズマブは TTP の急性初期症状に対して完全な予防及び治療効果を示した。

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を検討した。カプラシズマブはヒヒ、アカゲザル、カニクイザル、ブタ、ミニブタ及びモルモットの vWF 発現組織（標的発現、すなわち巨核球及び血管内皮細胞）と交差反応した。ウサギの胃、精巣及び胸腺組織に対してオフターゲット結合がみられたが、それを除くと毒性試験で使用した動物種及びヒトの組織でオフターゲット結合は認められなかった。更なる副次的薬理試験から、カプラシズマブは VI 型コラーゲン、ADAMTS13（a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13）、線維性コラーゲン及び凝固第 VIII 因子（FVIII）に対する vWF の結合を阻害しないことが示された。カプラシズマブは ADAMTS13 の酵素活性を阻害せず、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で評価した。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ごくわずか増加したが、剖検及び病理組織学的検査で特発性出血や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剖検で出血が散見され、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させた。

安全性薬理評価は反復投与毒性試験に組み込んで実施した。特に心血管系の安全性について、サルの試験で一連の心電図及び血圧測定を行い、広範に検討した。

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、後天性 TTP 患者の治療を目的とした本薬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。

2　効力を裏付ける試験

2.1　*In vitro* 活性

TTP の病態生理における主要なメディエーターは超高分子量 vWF（UL-vWF）の発現である。健康なヒトでみられるような標準分子量の vWF 多量体では、血小板糖タンパク（GP）Ib-IX-V 受容体への結合部位である A1 ドメインが分子内部に隠れている。この結合部位は、固定化時又はずり応力が生じる条件下で露出し活性化状態となる。UL-vWF では、GPIb-IX-V 結合部位が構成的に活性化されている(1)。

カプラシズマブは、活性化状態（すなわち GPIb-IX-V との相互作用に機能的な状態）及び非活性化状態の両方の vWF と相互作用する。カプラシズマブの *in vitro* 特性を標準分子量の vWF 多量体、すなわち健康被験者由来の血液又は血漿（[ALX-0081 TR012 V2 試験] 及び(2)）、経皮的冠動脈形成術（PCI）実施予定患者由来検体（[A001-PHA-[redacted]-ANR-001 試験]）及び UL-vWF が含まれていると予想される後天性 TTP 患者由来血漿（図 3、[24-A0068-[redacted]-0003 試験] 及び[24-A0068-[redacted]-0016 試験]）で検討した。*In vitro* アッセイ（灌流ずり応力試験、血小板凝集試験、及びリガンド中和試験）で得られた結果から、カプラシズマブはその標的である vWF 多量体にアビディティ結合することにより、標準分子量又は超高分子量 vWF 多量体と GPIb-IX-V との相互作用を濃度依存的かつ完全に阻害することが示された（表 1）。*In vitro* 標的中和に必要なカプラシズマブの濃度は標的の濃度と直接相関しており（24-A0068-[redacted]-0003 試験、24-A0068-[redacted]-0016 試験及び[A068-PHA-[redacted]-ISR-001-V1 試験]）、標的占有率が高いと標的中和率は相関して高くなり、RICO は低値を示した。カプラシズマブと vWF との相互作用は高度に特異的であり、カプラシズマブはヒトの血液細胞及び血小板とは相互作用しなかった（[ALX-0081 TR020 試験]）。ヒト組織パネルの免疫組織化学染色では、カプラシズマブは予想されたとおり vWF 発現細胞（巨核球及び内皮細胞）のみに結合した（[2710/001 試験]）。

上記のように、カプラシズマブはその多量体標的にアビディティ結合する。すなわち、2 つのサブユニットが vWF の A1 ドメインに結合する。この高アビディティ結合による技術的な問題のため、カプラシズマブの A1 ドメインに対する見かけの親和性を表面プラズモン共鳴法（SPR）で測定することはできなかったが、カプラシズマブの一価サブユニットである PMP12A2hum1 のヒト vWF A1 ドメインに対する親和性（K_D）は 1 nmol/L と算出された（[ALX-0081 TR043 試験]）。Gyrolab プラットフォームで得られた溶液内での標的親和性定数を用いてカプラシズマブの vWF 多量体に対する見かけの親和性を求めると、K_D は 3.76 pmol/L であった（[A068-PHA-[redacted]-ISR003-v1 試験]）。結合についての更なる検討を、カプラシズマブと vWF A1 ドメインの複合体の結晶構造解析により行った（[A001-MOB-[redacted]-ANR-001-v1 試験]）。この結晶構造解析において、カプラシズマブは A1 ドメインと相互作用し、GPIb-IX-V の結合領域とは重複しないエピトープに結合することが明らかに示されたことから、カプラシズマブはアロステリック阻害剤であると考えられた。

現時点において、*in vitro* で副次的薬理作用は認められていない（2.3.2.3.1 項参照）。*In vitro* でのこの高度の特異性は、モルモット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験でみられた所見が薬理作用によるものと考えられることにより、更に裏付けられた（Module [2.6.6] ）。

表 1 - カプラシズマブの *in vitro* 活性

試験系	vWF（nmol/L、単量体）[a]	IC_{100}（nmol/L）[b]
リストセチン誘導血小板凝集（RIPA）	40 [c]	14
灌流試験－動脈ずり応力速度での線維性コラーゲンに対する血小板の結合	40 [c]	14
標的中和アッセイ	4	1.4

a vWF の濃度は、単量体 1 個当たりの分子量 250 kDa を用いて単量体の濃度で表す。

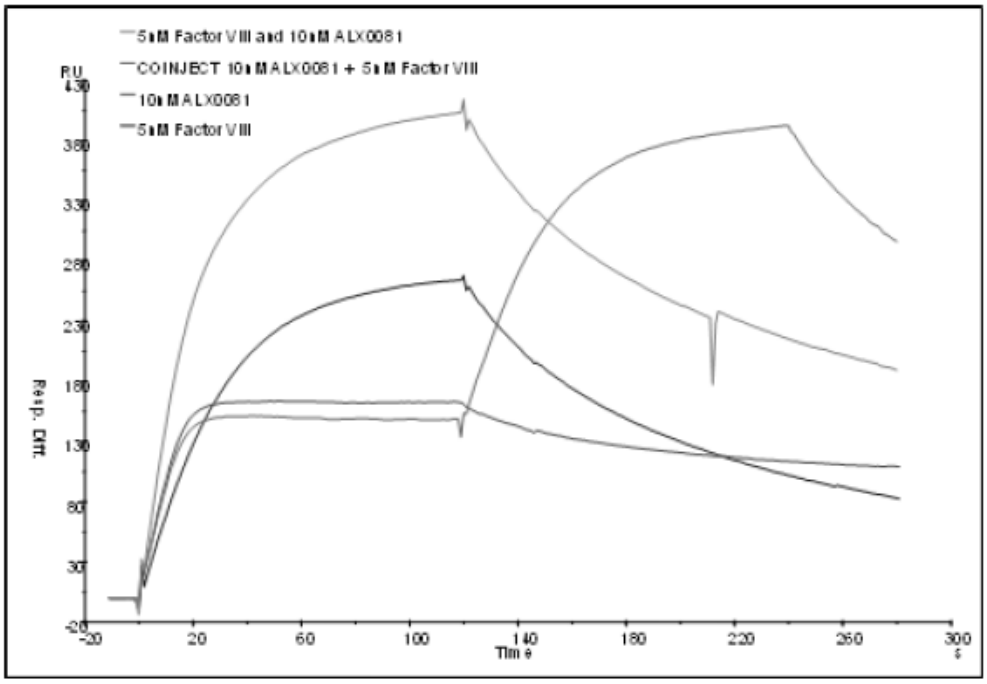
b カプラシズマブ結合単位の 1 モル濃度は、vWF 結合単位の 2 モル濃度に相当する。

c 健康被験者集団での平均濃度

（ALX-0081 TR012 V2 試験、ALX-0081 TR012 V2-Amend）

図 1 - vWF に対するカプラシズマブと FVIII の同時結合

FVIII 不含調製液由来遺伝子組換え vWF を SPR（Biacore）センサーチップに結合させた。次に、10 nmol/L カプラシズマブ（赤色線）、5 nmol/L FVIII（青色線）又は 10 nmol/L カプラシズマブと 5 nmol/L FVIII の混合物（灰色線）をチップ表面に灌流した。桃色線は、10 nmol/L カプラシズマブを灌流し、飽和後に 5 nmol/L FVIII を更に注入したときに得られた曲線を示す。vWF に対するカプラシズマブと FVIII の累積的な結合が示された（[Analysis report - SPR analysis 試験]）。



2.1.1 *In vitro* 特性

2.1.1.1 von Willebrand 因子 A1 ドメイン及び 12A2h1 複合体の結晶構造（A001-MOB-[redacted]-ANR-001-v1 試験）

この試験は、カプラシズマブの一価サブユニットである PMP12A2huml と von Willebrand 因子 A1 ドメイン（A1-vWF）との複合体のエピトープ及び分子相互作用の詳細を決定することを目的として実施した。この複合体の結晶構造を、1.75Å の解像度で解析した[A001-MOB-[redacted]-ANR-001-v1 試験]。

ヒト A1-vWF の組換え発現タンパク質及び PMP12A2huml を用いて、結晶を瞬間凍結し、100K の温度で測定した。この複合体の X 線回折データを極低温条件を用いて SWISS LIGHT SOURCE（SLS、Villigen、スイス）で収集した。この構造は、最終解像度 1.75Å で精密化された。

カプラシズマブは、その 3 つの相補性決定領域（CDR）ループ、並びに CDR4 とも呼ばれるフレームワーク 3 のループ領域の 2 つの残基を介して、A1-vWF と相互作用していた。A1-vWF:GP1b 複合体立体構造の公開情報と A1-vWF:PMP12A2huml 複合体の比較から、カプラシズマブによって認識される抗原決定基が A1-vWF 上の GP1b の結合領域と重ならないことが示された。

A1-vWF 上の PMP12A2hum1 による CDR は、このドメインにおける血小板受容体 GPIb-IX-V の結合領域と重複しない。したがって、カプラシズマブはアロステリック阻害薬であると考えられる。

2.1.1.2 カプラシズマブの vWF 多量体に対する親和性の決定（A068-PHA-[redacted]-ISR-003-V1 試験）

本検討の目的は、Gyrolab アフィニティーアッセイを用いて、二価ナノボディであるカプラシズマブの vWF 多量体に対する K_D をアビディティ結合する性質の影響を受けずに決定することであった（[A068-PHA-[redacted]-ISR-003-v1 試験]）。

このアッセイでは、vWF の希釈系列を AD1 緩衝液（ImmunoChemistry Technologies #622）中で一定量のカプラシズマブ（5 pmol/L）とプレインキュベートし、その後、遊離している非結合型カプラシズマブを vWF 吸着ビーズ上に捕捉して定量した。各濃度の vWF に対する非結合型カプラシズマブの量から、結合親和性を算出した。3 つの独立した実験を元にした vWF に対するカプラシズマブの平均 K_D 値は 3.76 pmol/L であり、vWF 多量体に対するカプラシズマブの強い親和性が確認された。

2.1.1.3 カプラシズマブの生物活性と特異性（ALX-0081 TR012 V02 試験）

灌流下でのコラーゲンへの血小板接着及び種々のモジュレーターを用いた血小板凝集に対するカプラシズマブの作用を検討した。さらに、ELISA を用いて、リストセチン誘導による血小板への vWF の結合及びコラーゲンへの vWF の結合に対するカプラシズマブの干渉を評価した。最後に、vWF に対するカプラシズマブとヘパリンの競合を検討した（[ALX-0081 TR012 V02 試験]）。

- 灌流チャンバーにおけるカプラシズマブによる血小板接着能の抑制

I 型コラーゲン又は III 型コラーゲン、又は vWF などの様々な血管関連物質でコートしたプラスチック製カバースリップを灌流チャンバーに挿入し、健康ボランティア（HV）由来の血液をこの表面上で灌流すると血小板血栓形成がみられる。血小板接着は選択的画像取得とその後の画像処理により定量化した。

カプラシズマブ（0.1～0.6 µg/mL）を添加した全血（抗凝固剤として D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone を使用）を、ヒト I 型又は III 型コラーゲン、又は vWF でコートしたカバースリップ表面上に 1600 s^{-1} で 5 分間灌流した。接着した血小板をグルタルアルデヒドで固定し、May-Grünwald-Giemsa 染色した。表面被覆率とカプラシズマブ濃度の関係を検討した。

カプラシズマブは、I 型コラーゲン、vWF 及び III 型コラーゲンそれぞれについて、0.2、0.6 及び 0.4 µg/mL の濃度で、血小板接着を濃度依存的に阻害した。

次に、カプラシズマブによる III 型コラーゲンへの血小板接着阻害のずり速度依存性を試験した。カプラシズマブ 0.8 µg/mL の存在下又は非存在下で、1 名の HV 由来全血を、異なるずり速度（100、300、500、800、1500、2500 s^{-1}）で III 型コラーゲンをコートしたカバースリップ表面に灌流し、その後表面被覆率を測定した。この結果から、線維性コラーゲンへの血小板接着に対するカプラシズマブの阻害効果がずり速度の増加と共に増加することが示された。ずり速度 500～800 s^{-1} から部分的阻

害が観察され、ずり速度 1500 s^{-1} 以上では完全阻害がみられた。予想通り、500 s^{-1} 以下のずり速度では抑制は観察されなかった。これらの結果は、カプラシズマブによるコラーゲンへの血小板接着の阻害が実際に高ずり速度に特異的であることを示し、また vWF/GPIb-IX-V 系が正常細動脈及び狭窄動脈で観察されるような高ずり速度での血栓形成に必須であることを示す過去の報告が再確認された(3)。

最後に、カプラシズマブが血栓の生成に及ぼす影響を検討した。まず III 型コラーゲンでコートしたカバースリップ表面上に全血を 1 分間灌流した。その後、5 μg/mL カプラシズマブの存在下又は非存在下で、1、3、6 及び 9 分間灌流を継続した。この結果、カプラシズマブの添加が血小板の更なる接着を阻害することが示された。さらに、カプラシズマブの非存在下で最初の 1 分間灌流後にカプラシズマブ存在下で 9 分間の追加灌流した時の凝集体は、カプラシズマブ非存在下の灌流と比較して密度が低かった。

- リストセチン誘導血小板凝集（RIPA）の阻害

リストセチン誘導血小板凝集（RIPA）に対するカプラシズマブの効果を検討した。血小板凝集は Chrono-log 凝集計（Havertown、PA、米国）を用いて測定した。HV 由来の多血小板血漿（PRP）をカプラシズマブ（最終濃度 0.2、0.3、0.4 μg/mL）の存在下又は非存在下でプレインキュベートした後、2 mg/mL のリストセチンで凝集を誘導した。その結果、カプラシズマブが RIPA を濃度依存的かつ完全に阻害することが実証された。完全阻害が得られた濃度は 0.3～0.4 μg/mL であり、これは高ずり速度でコラーゲンへの血小板接着を阻害するのに必要な濃度に匹敵していた。

次に、カプラシズマブが RIPA を溶解できるかどうかを検証した。凝集は前述と同じくリストセチンで誘導し、カプラシズマブ（1 μg/mL）を異なる時点で添加し、その後凝集過程を継続した。その結果、凝集過程がカプラシズマブの添加により阻害されることが示された。さらには、凝集体形成の初期段階での小さな血栓はカプラシズマブの添加により溶解できることが示された。

- リストセチン誘導による精製 vWF のヒト固定血小板への結合（RICO）の阻害

ホルマリン固定ヒト血小板を、poly-L-リジンでコートしたマイクロタイタープレートに捕捉した。カプラシズマブ（4% ウシ血清アルブミン添加 PBS で希釈）を、リストセチン（1.5 mg/mL）の存在下で一定量の精製 vWF（1 μg/mL）とプレインキュベートし、この混合物をマイクロタイタープレートに加えた。ELISA で血小板に結合した vWF を検出した。

この結果、カプラシズマブが血小板へのリストセチン誘発 vWF 結合を阻害できることが明らかに示された。この阻害の IC_{50} は約 0.006 μg/mL、又はカプラシズマブの MW を 27.88 kDa とすると 0.23 nmol/L であった。このアッセイにおける vWF 結合の完全な阻害は、vWF 濃度 4 nmol/L（1 μg/mL）の約 30%である 1.43 nmol/L 又は 0.04 μg/mL のカプラシズマブ濃度で達成された。これは、ずり速度 1600 s^{-1} で III 型コラーゲンへの血小板接着を完全に遮断するために必要なカプラシズマブの濃度と一致した。

- コラーゲン、ADP、エピネフリン誘導血小板凝集の抑制

異なるアゴニストにより誘導される血小板凝集に対するカプラシズマブの効果を検討した。PRPを、過剰量のカプラシズマブ（10 μg/mL）の存在下又は非存在下でプレインキュベートし、その後、ADP（10 μmol/L）、エピネフリン（10 μmol/L）、コラーゲン（2.5 μg/mL）又はリストセチン（1.5 mg/mL、陽性対照として）で凝集を誘導した。同様に、洗浄した血小板をカプラシズマブ（10 μg/mL）の存在下又は非存在下でプレインキュベートし、その後、トロンビン（1 U/mL）で凝集を誘導した。血小板凝集はChrono-log凝集計で測定した。その結果、試験した過剰量でもカプラシズマブはADP、エピネフリン、コラーゲン又はトロンビン誘導血小板凝集に影響を及ぼさなかったが、リストセチン誘導凝集は完全に阻害した。これらの結果は予想された通りであり、カプラシズマブがvWFとGPIb-IX-V系との相互作用を特異的に遮断するが、他のアゴニストとそれらの受容体との相互作用には影響しないことが確認された。

- VI型コラーゲンのvWF結合に対するカプラシズマブの効果

カプラシズマブ及びVI型コラーゲンはいずれもA1-vWFと相互作用するため、カプラシズマブがvWF/VI型コラーゲン結合に影響を及ぼすかどうかを検討した。マイクロタイタープレートをヒトVI型コラーゲンでコーティングし、PBS中の一定量の精製vWF（1 μg/mL、このアッセイのEC_{50}に相当）を、カプラシズマブの希釈列又は抗vWFポリクローナル抗体と共にプレインキュベートした。アッセイでは、後者を陽性対照として用いた。残留する結合vWFを検出した。

その結果、抗vWFポリクローナル抗体はvWFとVI型コラーゲンの結合を濃度依存的に遮断した一方、カプラシズマブは影響を及ぼさないことが示された。この結果から、カプラシズマブがA1-vWFのGPIb-IX-V結合を特異的に標的とするが、VI型コラーゲン相互作用部位には影響しないことが確認された。

- ヘパリンのvWF結合に対するカプラシズマブの効果

2 μg/mLのvWFを、10 μg/mLカプラシズマブの存在下又は非存在下でヘパリン結合セファロースビーズと1時間インキュベートした後、上清中の残留vWFをELISAにより測定する結合アッセイを実施した（3%ウシ血清アルブミン及び0.1%Tween 20添加PBS）。

カプラシズマブの代わりに高濃度の可溶性ヘパリン（500 μg/mL）を添加したとき、部分的にvWFとヘパリン結合ビーズの結合を阻害したが、この高濃度でも完全阻害には至らなかった。ヘパリンによるこの部分的阻害は、ビーズあたりの複数のヘパリン群とvWFマルチマーあたりの複数のA1ドメインとの間のアビディティ結合による可能性が高い。カプラシズマブ（10 μg/mL）は、ヘパリンとvWFの結合を部分的に阻害することができたが、この高濃度でもそれ以上の阻害は認められなかった。このことから、A1ドメインにおけるヘパリンとカプラシズマブの結合部位が重複していることが示唆される。

- ADAMTS-13とvWFの結合に対するカプラシズマブの効果

組換えヒトADAMTS-13（3.65 μg/mL）と固定化精製ヒトvWFの結合を、異なる濃度のカプラシズマブ（50000 nmol/Lから3倍希釈配列）又は陽性対照となるADAMTS-13中和モノクローナル抗体Mab4245（1500 nmol/Lから3倍希釈配列）の存在下で評価する結合アッセイを実施した。その結

果、カプラシズマブは ADAMTS-13 の vWF への結合を阻害しないが、陽性対照の Mab4245 は濃度依存的に阻害することが示された。

要約すると、異なる方法を用いて、カプラシズマブは vWF と GPIb-IX-V との相互作用を強く阻害することが実証された：（i）高ずり速度でのコラーゲンへの血小板接着、並びに RIPA は、カプラシズマブにより完全かつ濃度依存的に阻害された。（ii）リストセチン誘導 vWF 血小板結合は完全かつ濃度依存的に阻害され、さらに、カプラシズマブは接着及び凝集アッセイにおいて測定されたように、さらなる血栓成長を阻害することができた。vWF/GPIb-IX-V 系を遮断するためのカプラシズマブの特異性は、このカプラシズマブがエピネフリン、ADP、コラーゲン又はトロンビンによって誘導される血小板凝集に影響せず、またカプラシズマブが vWF と VI 型コラーゲンとの相互作用に影響しないことによっても示された。最後に、A1-vWF におけるカプラシズマブとヘパリンの結合領域の重複が観察された。

結論として、これらの *in vitro* データから、カプラシズマブが GPIb-IX-V と vWF との相互作用を強力かつ特異的に阻害することが示された。

2.1.1.4 内皮細胞由来 UL-vWF に対する血小板接着能に及ぼすカプラシズマブの作用（ALX-0081 TR013 試験）

この試験では、フローチャンバーを用いて、カプラシズマブによる UL-vWF への血小板接着阻害の有無を、また ADAMTS-13 の作用に対する影響を検討した[ALX-0081 TR013 試験]。

ヒト臍帯静脈から得た内皮細胞をカバーグラス上で培養し、ヒスタミン刺激により UL-vWF を分泌させた。HV 由来の血小板を HEPES 緩衝液（pH 7.4）又は後天性 TTP 患者由来血漿に添加し、2.5 dyn/cm^2（100～300 s^{-1}）のずり応力で 4 分間、細胞上で灌流した。UL-vWF に付着した血小板ストリングをリアルタイムビデオ顕微鏡で可視化し、少なくとも 20 の顕微鏡視野を調べた。カプラシズマブ 0.2、2.0 及び 10.0 µg/mL の存在下で実験を繰り返した。

ADAMTS-13 による UL-vWF の開裂に対するカプラシズマブの効果を検討するために、2 種類の実験を行った。最初の実験では、ADAMTS-13 による血小板ストリングの切断を、過剰量のカプラシズマブの存在下又は非存在下で評価した。後天性 TTP 患者血漿と HV 由来血小板をヒスタミン刺激内皮細胞上に灌流すると、血小板ストリングが形成された。その後、ADAMTS-13 の供給源として HV 由来血漿を灌流した。第 2 の実験では、組換え vWF A1-A2-A3 ドメインからなる断片を用いて、ADAMTS-13 による A1-A2-A3 ドメイン切断に対するカプラシズマブ（10.0 µg/mL）の阻害効果を評価した。正常プール血漿を ADAMTS-13 の供給源とした。混合液は 37°C で一晩インキュベートし、ウエスタンブロット法にて分析した。

カプラシズマブは試験した全ての濃度で血小板ストリング形成を阻害したが、すでに形成された血小板ストリング上にカプラシズマブを灌流しても血小板塊を溶解することはなかった。カプラシズマブ は ADAMTS-13 による血小板ストリングの切断に影響を及ぼさなかった。また、ADAMTS-13 による組換え vWF A1-A2-A3 ドメイン断片の切断にも影響を及ぼさなかった。

結論として、本検討からカプラシズマブが後天性 TTP 患者の治療に使用できるという概念が裏付けられた。また、カプラシズマブが ADAMTS-13 の活性を阻害しないことも示された。

2.1.1.5 vWF 値に対するカプラシズマブ の影響（A001-PHA-[redacted]-ANR-002 試験）

本試験では、反復投与時の血漿中 vWF レベル低下の原因となる可能性のある機序を検討した[A001-PHA-[redacted]-ANR-002 試験]。

第一に、カプラシズマブは vWF:Ag 量を測定するために使用されるアッセイに干渉することが示された。ブランク血漿にカプラシズマブを添加していくと、濃度依存的かつ統計的に有意な vWF:Ag の減少が見いだされた。しかしながら、この効果は投与前値と比較してカプラシズマブ 3 µg/mL でも 12%であり限定的であった。次に、内皮細胞による vWF 分泌に対するカプラシズマブの影響を測定した。3 例のドナーから得られた HUVEC を、カプラシズマブ（10.0 µg/mL）の存在下又は非存在下で培養した。4、6、24、48 及び 72 時間時点での培養液上清を採取し、分泌された vWF 量を ELISA で定量した。カプラシズマブは vWF の自発的放出に影響を及ぼさなかった。加えて、ヒスタミン刺激による vWF 放出に対するカプラシズマブの顕著な効果は、15 分並びに 1、3、4 又は 24 時間後の時点で観察されなかった。次に、カプラシズマブを投与した被験者における vWF レベルの低下に対処するため、薬物動態学的原理を適応した。カプラシズマブ – vWF 複合体の半減期が遊離 vWF より短い場合、総 vWF 血漿中濃度は必然的に低下すると考えられる。

高用量カプラシズマブを投与したカニクイザル血漿中の vWF プロペプチド（vWFpp）と vWF:Ag の比を測定することにより、vWF クリアランスに対するカプラシズマブの効果を検討した。実際、カプラシズマブ処置群は vWF の血漿中濃度が低下する一方で vWFpp 血漿中濃度は正常であったため、vWFpp/vWF:Ag 比が増加した。したがって、カプラシズマブは vWF のクリアランス率を上昇させ、これにより第 I 相臨床試験で認められた vWF の低下を説明することができると考えられた。

vWF 多量体サイズは vWF クリアランスに影響し、カプラシズマブの影響を受ける可能性がある。実際、サル 2 週間投与毒性試験（[redacted] 20095/[redacted] 試験）でカプラシズマブをカニクイザルに投与した際に高分子量マルチマーの減少をウエスタンブロット法で観察することができた。

結論として、これらのデータから、第 I 相臨床試験で観察された血漿 vWF レベルの低下（Module [2.7.2]）は、カプラシズマブによる vWF:Ag レベル測定への干渉又は vWF 分泌阻害によって完全には説明できないことが示唆される。一方でカプラシズマブが vWF のクリアランス速度を増加させ、それによって vWF 血漿中濃度に影響することが実証された。この仮説の確認には、更なる検討が必要である。

2.1.1.6 vWF:Ag 増加ヒト血液中の血小板機能に対するカプラシズマブの影響（A001-PHA-[redacted]-ANR-001 試験）

本研究では、経皮的冠動脈形成術（PCI）処置を受ける患者（n=9）から、処置 24 時間前（ベースライン）と PCI 開始の 1 時間後に採血を行った。ベースライン時には、全ての患者に抗血小板薬としてアセチルサリチル酸（ASA）が既に投与されていた。2 回目の血液試料は、全ての患者がプラビッ

クス（クロピドグレル）、ヘパリン及び ASA の投与を受けた状態であった。その後、PCI 処置前及び処置中に採取した血液へカプラシズマブ又は緩衝液を異なる濃度で添加し、その後 *in vitro* で分析して、カプラシズマブが血小板機能に及ぼす影響を評価し、標準的な抗血栓薬の投与がカプラシズマブの効果及び有効性へ影響するか否かを、フローチャンバー実験における原線維コラーゲンへの接着により測定した。さらに、血液試料を用いて PRP を調製し、その後、異なる濃度のカプラシズマブ又は緩衝液を添加し、RIPA 実験に用いた。次に、乏血小板血漿（PPP）を調製し、vWF 濃度を測定した。

ELISA で vWF:Ag を検出することにより、血漿中総 vWF 濃度を測定した。HV 由来血漿の分析では平均 vWF:Ag レベルは 0.92±0.06 U/mL であった（n=11）。PCI 患者（n=9）での平均 vWF:Ag は、PCI 処置前（1.37±0.14 U/mL； p = 0.0126、Welch 補正による対応のない t 検定）と PCI 処置中（1.29±0.17 U/mL； p = 0.0591、Welch 補正による対応のない t 検定）の両方で正常より増加していた。

HV 由来試料を対象としたこれまでの試験では、カプラシズマブは 1600 s^{-1} の高いずり速度でコラーゲンへの血小板接着を完全にかつ濃度依存的に阻害することが示された。これらの検討におけるカプラシズマブの有効濃度は 0.2～0.4 µg/mL であった（2.1.1.3 項、ALX-0081 TR012 V02 試験）。本試験では、PCI 処置を受ける患者の血液において、カプラシズマブの有効性が同程度であるかどうかを検討した。この目的のために、PCI 処置の前及び間に 9 名の患者からの血液をカプラシズマブ又は緩衝液と共にインキュベートし、コラーゲン被覆表面上で灌流した。カプラシズマブは血流条件下（1600 s^{-1}）でコラーゲンに対する血小板接着を完全に消失させることが明らかに示された。全ての患者の試料において、カプラシズマブの 0.8 µg/mL による完全な阻害が観察され、有効濃度の患者間変動は 0.2～0.8 µg/mL であった。加えて、0.8 µg/mL のカプラシズマブは全ての患者試料の RIPA を完全に阻害し、有効濃度の変動範囲は 0.4～0.8 µg/mL であった。

これらの結果から、以下の点が結論として得られた。

1. PCI 患者では HV と比較して vWF:Ag レベルが相対的に高いため、より高用量のカプラシズマブが必要である
2. vWF:Ag レベルとカプラシズマブの有効量との間には直線的な関係が認められた
3. RIPA はバイオマーカーとして用いることができると示唆された
4. 併用薬はカプラシズマブの有効量やバイオマーカーとしての RIPA のリードアウトに影響を及ぼさない

2.1.1.7 TTP 血漿及びバイオアッセイにおけるカプラシズマブの *in vitro* 有効性の評価（24-A0068-[redacted]-0016 試験）

本報告では、TTP 患者 12 例の血漿中カプラシズマブの生物学的活性の評価について述べる。さらに、生体分析及び免疫原性アッセイに対する TTP 血漿のマトリックス効果を評価した[24-A0068-[redacted]-0016 試験]。

まず、血漿検体の広範な特性評価を行った。TTP 患者集団における vWF:Ag レベル（ELISA）は大きく変動したが、急性発症を伴う後天性 TTP 患者で高レベルの vWF:Ag が観察されたことを除いて、HV 血漿におけるレベルの濃度範囲内に収まった。先天性 TTP 患者由来の血漿中の ADAMTS-13 レベルと活性の予想される欠如に加えて、後天性 TTP 患者における ADAMTS-13 レベルと活性も同様であり、正常から大きく減少し、UL-vWF 多量体の存在と相関していた。次に、阻害 ELISA 及び RICO 測定により、カプラシズマブの生物学的活性を評価した。阻害 ELISA は、系列希釈したカプラシズマブと血漿検体又は vWF（0.2 µg/mL）、並びにリストセチン（1.5 mg/mL）をプレインキュベートし、poly-L-リジンでコートしたマイクロプレートでヒト血小板をインキュベートしたものへ加えた。洗浄後にプレート上に残った vWF をホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）標識抗 vWF ポリクローナル抗体で検出した。RICO アッセイは、凍結乾燥血小板を再懸濁し、リストセチン（10 mg/mL）とともにプレインキュベートし、それに対照用凝固血漿、又は血漿試料で系列希釈したカプラシズマブを加え、凝集パターンを Chrono-log 凝集計で 5 分間測定した。

HV 血漿におけるこれまでのデータと一致して、カプラシズマブは TTP 患者由来の血漿中 vWF 活性を濃度依存的に完全に遮断することができた。加えて、二価ナノボディであるカプラシズマブは TTP 血漿中において一価の PMP12A2h1 よりも強く vWF とヒト血小板の結合を阻害したことから、カプラシズマブのアビディティ結合は TTP 血漿中でも維持され、vWF 活性を遮断するのに必要なカプラシズマブの量と vWF:Ag のレベルとの間に線形性の相関がみられた。さらに、薬物動態（PK）及び免疫原性アッセイにおいて、TTP 血漿のマトリックス効果は認められなかった。

総合すると、これらの結果は、カプラシズマブの生物学的活性が TTP 血漿及び HV 血漿において同等であることを示した。カプラシズマブは両マトリックスにおいて vWF を完全にかつ標的濃度依存的に中和することができ、TTP 血漿はバイオアッセイに干渉しなかった。

2.1.1.8 異なる動物種の A1 ドメインに対するカプラシズマブの親和性（ALX-0081 TR043 試験）

本検討の目的は、異種の A1-vWF に対するカプラシズマブの相対的親和性を、ヒト A1-vWF と比較して決定することであった（[ALX-0081 TR043 試験]）。

ヒト、モルモット、カニクイザル及びマウスの A1-vWF の C 末端にヒスチジンタグを融合したタンパク質を、酵母を宿主系として発現させた。カプラシズマブの一価サブユニットである PMP12A2hum1 と各動物種 A1-vWF の相互作用を、SPR 法を用いて評価した。

まずフローサイトメトリーを用い、ボトロセチン誘導による各動物種の A1-vWF とヒト血小板の結合を評価した。0.01～2.5 µg/mL の各 A1-vWF を、1%ウシ血清アルブミン添加 PBS 中でホルマリン

固定ヒト血小板及びボトロセチン（1 μg/mL）と 37℃ で 45 分間インキュベートし、A1-vWF の結合を抗ヒスチジン抗体で検出した。全ての組換え A1-vWF はボトロセチン添加によりヒト血小板と濃度依存的に相互作用し、その活性を確認した。続いて、各動物種 A1 に対する PMP12A2hum1 の親和性を、SPR 測定法により、2 種類の結合、すなわち固定化 A1-vWF に対する結合と、溶液中 A1-vWF に対する結合について評価した。

固定化ヒト A1-vWF に対する PMP12A2hum1 の K_D は 1.05 nmol/L で、親和性はカニクイザルの A1 ドメインに対する K_D（0.87～1.11 nmol/L）と同等であったが、モルモット又はマウスの A1-vWF に対する K_D（それぞれ 14.5 nmol/L 及び 160 nmol/L）と比較して 10 倍及び 100 倍低かった。最後に PMP12A2hum1 の EC_{50} は、ヒト又はカニクイザルの A1-vWF との相互作用では約 5～7 nmol/L であり同等であったが、モルモットの A1-vWF との相互作用 EC_{50}（40～50 nmol/L）に対しては 1/6～1/10 であった。マウス A1-vWF へは結合がみられなかった。

これらの結果から、カプラシズマブの一価サブユニットである PMP12A2hum1 がカニクイザル及びヒトの A1-vWF と同じ親和性、及びモルモットの A1-vWF と 1/6～1/10 の親和性で相互作用することが示された。

2.1.1.9 *In vitro* におけるカプラシズマブの標的占有と標的中和の検討（24-A0068-[redacted]-0003 試験）

本検討の目的は、発症急性期の後天性 TTP 患者由来の血漿検体を用いて、十分な標的中和に相当するカプラシズマブによる標的占有の閾値を推定することであった[24-A0068-[redacted]-0003 試験]。

第 II 相 ALX-0681-2.1/10 試験（n=11）から選択されたベースラインサンプルにカプラシズマブを添加し、標的中和と並行して標的占有について *in vitro* で検討した。標的占有の測定は、まず血漿とカプラシズマブとの混合物を 37℃ で 15 分間プレインキュベートし、0.1%カゼイン添加 PBS で 20 倍に希釈してから抗ヒト vWF ポリクローナル抗体でコーティングされたウェル上に移した。1 時間後に、vWF - カプラシズマブ複合体を、抗カプラシズマブモノクローナル抗体（clone 114）と HRP 標識抗マウス抗体により検出した。標的中和の測定は、まず系列希釈した vWF 含有血漿検体とカプラシズマブをプレインキュベートしてから 4%ウシ血清アルブミン添加 PBS で 20 倍に希釈し、続いてリストセチン（1.5 mg/mL）を加え 30 分インキュベートした。これらの検体を市販のホルマリン固定ヒト血小板でコーティングされたプレートに移し、1.5 時間後、捕捉された vWF を HRP 標識抗 vWF ポリクローナル抗体で検出した。カプラシズマブが vWF に結合すると、血小板への結合がみられなくなるため、このアッセイでカプラシズマブ非結合 vWF 量が得られる。標的中和 ELISA は、vWF とヒト血小板とのリストセチン誘導相互作用を測定するものである。

その結果、発症急性期の後天性 TTP 患者の血漿において、平均 85%（95%信頼区間：78%～90%）の標的占有率が 80%の標的中和と相関していたことが示された。また、vWF:Ag レベルが 45～117 nmol/L とばらついたにもかかわらず、試験した全ての TTP 患者について同様の標的占有 - 中和相関が観察され、カプラシズマブの有効濃度の主要決定因子は vWF:Ag レベルであることが示唆された。

2.1.2 *In vitro* TTP モデル

カプラシズマブは標準分子量又は超高分子量の vWF 多量体を中和することが示された（図 3、[24-A0068-[redacted]-0016 試験]）。また、*in vivo* での状態により近い流動条件下で、GPIb-IX-V 結合部位が構成的に活性化されている UL-vWF の血小板結合能をカプラシズマブが阻害するか否かを確認した（[ALX-0081 TR013 試験]）。フローチャンバー内で内皮細胞を刺激して、その表面に紐状の UL-vWF ストリングを分泌させた。UL-vWF ストリングは、静的状態及び低ずり応力条件下でも血小板の接着をサポートした（図 2）。正常血漿の存在下では、UL-vWF ストリングは ADAMTS13 のプロテアーゼ活性により速やかに切断されたが、TTP 患者由来血漿の存在下では、vWF への血小板の沈着が持続した（図 2B）。重要なこととして、カプラシズマブを TTP 患者由来血漿に添加すると血小板の接着が完全に阻害されたことから（図 2C）、カプラシズマブは内皮細胞により放出された UL-vWF の血小板結合能を阻害することが示された(4)。しかし、カプラシズマブ添加前に血小板がストリング（血小板が UL-vWF ストリングに結合したもの）を形成していた場合は、カプラシズマブがその血小板を分離させることはできなかった。

図 2 - UL-vWF への血小板接着に対するカプラシズマブの作用

リアルタイムビデオ顕微鏡で撮影した画像。刺激した内皮細胞表面を低ずり応力（300 s^{-1}）条件下で灌流したときの血小板の捕捉。緩衝液（A）又は TTP 患者由来血漿（B）に再懸濁した血小板が UL-vWF に接着することにより、内皮細胞表面に血小板ストリング（赤色矢印）が形成された。TTP 患者由来血漿の存在下で、カプラシズマブは血小板と UL-vWF との相互作用を完全に阻害した（C）。

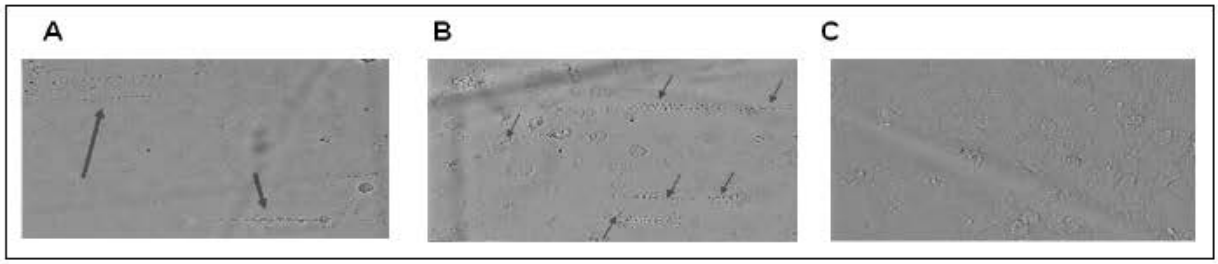
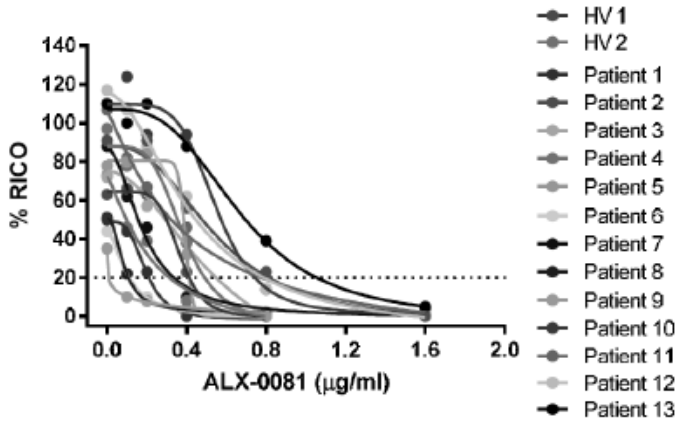


図 3 - リストセチン・コファクター活性アッセイ（RICO）

健康被験者（n =2）又は TTP 患者（n = 13）の血漿にカプラシズマブを添加し、リストセチン・コファクター活性アッセイで残存 vWF 活性を測定した。完全中和とみなす閾値（20%）を破線で示す（24-A0068-[redacted]-0016 試験）。



2.2 種交差反応性

カプラシズマブの種交差反応性は、ヒヒ、カニクイザル、ブタ及びモルモットの vWF に対して認められ、マウス、ウサギ、ラット及びイヌの vWF に対しては認められなかった。

第一段階として標的結合を評価したところ、カプラシズマブは交差反応する動物種の血漿中 vWF と結合アッセイ又は競合アッセイにおいて相互作用することが示され（[ALX-0081 TR019 試験]）、その相互作用はアビディティ結合であることが示された（[A068-PHA-[redacted]-ISR-001-V1 試験]）。異なる動物種の vWF に対するカプラシズマブの親和性の差を定量するため、遺伝子組換え vWF A1 ドメインを用いた SPR 試験を実施した。しかしカプラシズマブは固定化したヒト vWF の A1 ドメインに対して不可逆的な結合を示し、この方法を用いた親和性定数の算出が不可能であったことから、カプラシズマブのそれら標的に対する親和性を評価することはできなかった。そのため、アビディティ結合を回避するためにカプラシズマブの一価構成タンパクである PMP12A2hum1 を用いて試験を行った（2.1 項参照）。PMP12A2hum1 の親和性は、カニクイザルとヒト vWF の A1 ドメインに対して同程度であり、モルモット vWF の A1 ドメインに対しては 1/10 に低下した（[ALX-0081 TR043 試験]）。カプラシズマブの一価サブユニット（PMP12A2hum1）の親和性定数は、ヒト循環血中 vWF 濃度（40 nmol/L）と同じ、nmol/L レベルであった。カプラシズマブのヒト vWF 標的に対する親和性は数 pmol/L の範囲であったことから、*in vivo* では化学量論的に結合すると考えられた。また、モルモッ

トvWFに対するカプラシズマブの親和性は、アビディティ結合が影響して、差が小さくなることが期待される。

第二段階では、様々な動物種由来のvWFに対するカプラシズマブの*in vitro*中和作用を確認した（表2）。結合アッセイ及び中和アッセイのいずれにおいても、カニクイザル又はモルモットの血漿とヒトの血漿とを比較したとき、カプラシズマブによる用量反応曲線は類似していたことから、カプラシズマブが活性を示す濃度は3つの動物種のすべてにおいて同程度であることが示唆された（ALX-0081 TR019試験）。実際には、ヒトにおけるカプラシズマブのリストセチン誘導血小板凝集（RIPA）抑制作用のIC_{100}は0.4 µg/mLであり、これに対して非臨床試験動物種におけるIC_{100}は1～2 µg/mLであった。わずかながらみられたこの差は、これら3つの動物種の間で循環血中vWF:Ag量に差があることに起因すると考えられた。

モルモット、カニクイザル及びヒトにおいて*in vitro*でのvWF活性の中和と標的占有率に相関がみられたことから、vWF多量体に対する本化合物の結合様式はこれらすべての動物種で類似していることが裏付けられた（A068-PHA-[redacted]-ISR-001-V1試験）。これらの結果から、標的の量と効果がみられる薬物濃度との間の関連性、すなわち、vWF:Ag量とこれを中和するのに必要なカプラシズマブ濃度との間の相関が認められた。

表 2 - ヒト、カニクイザル及びモルモットにおけるカプラシズマブの特性の要約

	試験系	ヒト	カニクイザル	モルモット
一価構成タンパクの標的親和性	表面プラズモン共鳴法	1 nmol/L	1 nmol/L	10 nmol/L
カプラシズマブの標的親和性	表面プラズモン共鳴法 [a]	アッセイ限界に到達	アッセイ限界に到達	アッセイ限界に到達
カプラシズマブの標的親和性（K_D）	Gyrolab プラットフォーム	3.67 pmol/L	検討せず	検討せず
カプラシズマブと vWF との相互作用	*In vitro* RICO、表面プラズモン共鳴法	Avid	Avid	Avid
In vitro 標的中和作用（IC_{100}）	*In vitro* RIPA	0.4 µg/mL	1～2 µg/mL	1～2 µg/mL
薬力学的作用（IC_{100}）	*Ex vivo* RIPA/RICO	0.4 µg/mL	1～2 µg/mL	1～2 µg/mL
標的占有作用（EC_{100}）	*In vitro* ELISA	1～3 µg/mL	2～4 µg/mL	3～5 µg/mL
作用機序	ELISA、RICO	完全な標的占有に必要な濃度は *in vitro* 及び *in vivo* での標的中和に必要な濃度と同程度	完全な標的占有に必要な濃度は *in vitro* 及び *in vivo* での標的中和に必要な濃度と同程度	完全な標的占有に必要な濃度は *in vitro* での標的中和に必要な濃度と同程度
組織交差反応性	免疫組織化学法	vWF 発現に一致する染色	vWF 発現に一致する染色	vWF 発現に一致する染色。染色はヒトより弱い。

a 不可逆的な結合により感度の限界に到達したため、カプラシズマブの親和性を正確に測定することは技術的に不可能であった。

次に、カプラシズマブの *in vivo/ex vivo* における vWF:Ag 中和作用を、薬力学（PD）マーカーであるリストセチン・コファクター活性（RICO）アッセイを用いて評価した（2.3.2 項）。得られた結果は *in vitro* 試験と同様で、ヒトにおけるカプラシズマブの PD マーカー抑制作用の IC_{100} は 0.4 µg/mL であり、これに対して非臨床試験動物種における IC_{100} は 1～2 µg/mL であった（A068-PHA-[redacted]-ISR-001-V1 試験及び[ALX-0081 TR012 試験]）。

最後に、GLP 適用の組織交差反応性試験を実施したところ、ヒト、カニクイザル及びモルモット由来の血管内皮細胞及び骨髄巨核球の細胞質から細胞膜に、カプラシズマブによる同程度の染色が認められた（[2710/001 試験]、[2710/002 試験]及び[2710/003 試験]）。モルモット及びカニクイザルの組織において、オフターゲット結合は認められなかった。

これらの結果から、モルモット及びカニクイザルはカプラシズマブの毒性評価に適した動物種であることが裏付けられた。モルモット及びサルの *in vivo* において、カプラシズマブはヒトと量的及び質的に類似した薬理作用を示したが、モルモットの方が感受性がわずかに低かった。

2.2.1 カプラシズマブの交差反応性（ALX-0081 TR019 試験）

本検討の目的は、カプラシズマブの非臨床試験、特に毒性試験に適した動物種を同定するために、異動物種間のカプラシズマブの交差反応性を決定することであった[ALX-0081 TR019 試験]。

方法：（i）カプラシズマブ（最終濃度 0、0.5、1.2、0.4、0.6、0.8、10 又は 20 nmol/L）を種々の動物種の血漿検体（6～9 倍希釈したもの）と混合し、続いて、A1-vWF 固定化センサーチップ上に流すことにより非結合型カプラシズマブを定量した。（ii）ELISA 法で、各動物種の血漿検体を固定化カプラシズマブとインキュベートし、続いて、ペルオキシダーゼ標識抗 vWF 抗血清で結合 vWF を検出した。（iii）ELISA 法で、各動物種の血漿検体とカプラシズマブをインキュベートした後に、固定化ヒト vWF へのカプラシズマブの残留結合を測定した。（iv）血小板凝集及び接着アッセイで、カプラシズマブの vWF/GPIb-IX-V 系の阻害機能性を検証した。

結果：カプラシズマブはヒヒ、アカゲザル、カニクイザル、ブタ、ミニブタ及びモルモットの血漿 vWF と相互作用した：（i）これら動物種の血漿中 vWF は、SPR におけるヒト A1-vWF へのカプラシズマブの結合を妨げた。（ii）固定化カプラシズマブへのこれら動物種の血漿 vWF の濃度依存的相互作用を ELISA アッセイで実証できた。（iii）これら動物種の血漿中 vWF は、固定化ヒト vWF とカプラシズマブの相互作用を妨げた。対照的に、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ及びイヌの血漿中 vWF は、上記のアッセイにおいてカプラシズマブによって認識されないことが示された。さらに、カプラシズマブは、カニクイザル又はモルモット由来の RIPA を濃度依存的に完全に阻害した。各動物種で RIPA の完全阻害をもたらす濃度は同様の範囲内であり、vWF/GPIb-IX-V 系を機能的に阻害する必要濃度はヒト、カニクイザル及びモルモットの各 PRP に対してそれぞれ 0.4 µg/mL、1 µg/mL 及び 1～10 µg/mL であった。

結論として、カプラシズマブはヒヒ、アカゲザル、カニクイザル、ブタ、ミニブタ及びモルモットの血漿 vWF と交差反応し、これらの動物の vWF/GPIb-IX-V 系を機能的に遮断した。これらの結果を踏まえ、カプラシズマブの毒性試験に最も適した動物種としてカニクイザル及びモルモットが選択された。

2.2.2 カニクイザル及びモルモット vWF を標的としたカプラシズマブの薬理学的特性とヒトとの比較（A068-PHA-[redacted]-ISR-001-V1 試験）

異種 vWF に対するカプラシズマブの結合様式を、リストセチン誘導性の vWF と血小板との相互作用の完全な中和に必要なカプラシズマブの濃度と、vWF を完全に占有するのに必要なカプラシズマブの濃度とを比較することによってさらに評価した（[A068-PHA-[redacted]-ISR-001-V1 試験]）。この目的のために、標的中和アッセイ、RICO アッセイ及び占有アッセイを用いた。最初に、ヒト血漿検体

（24-A0068-[redacted]-0003 試験）のために開発された標的中和アッセイ及び占有アッセイは、カニクイザル及びモルモット血漿検体に適用できることを確認した。次に、これらのアッセイを用いて、カニクイザル及びモルモット vWF の完全な阻害に必要なカプラシズマブ濃度と占有率との間には、ヒト vWF と同様に相関があることが示された。さらに、*in vitro* で観察されたリストセチン誘導性の vWF の血小板への結合のためのカプラシズマブの濃度は、カニクイザル及びモルモット vWF の *ex vivo* での中和に必要なカプラシズマブの濃度と一致していた（表 3）。最後に、これらの結果はまた、カプラシズマブがカニクイザル及びモルモット由来の vWF とアビディティ結合し得ることを示した。

結論として、これらの結果は、カプラシズマブがヒト、カニクイザル及びモルモット vWF に対して同様の結合様式を示すことを示唆した。すなわち、（i）標的との相互作用はアビディティ結合であり、そして（ii）標的中和のために完全な標的占有を必要とする。

表 3 -各動物種の血漿中 vWF:Ag とカプラシズマブの効果

Species	Number of samples	vWF:Ag (IU/mL)	Occupancy EC_{50} (µg/mL)	Neutralization IC_{50} (µg/mL)	RICO IC_{50} (µg/mL)
Human	6	1.52	0.38	0.31	0.24
Cynomolgus monkey	6	2.78	0.52	0.73	-
Guinea pig	6	0.70	0.83	-	0.43

2.3 *In vivo* 薬理作用

2.3.1 ヒヒ後天性 TTP モデル（A068-PHA-[redacted]-ANR-001 試験）

ヒヒ TTP モデルでカプラシズマブの薬理活性及び安全性を評価した（[A068-PHA-[redacted]-ANR-001 試験]及び(5)）。本モデルは後天性 TTP の発症早期を模倣したものであり、阻害性モノクローナル抗体 3H9 を投与して ADAMTS13 を機能的に阻害することにより、重度の血小板減少症及び分裂赤血球を伴う溶血性貧血が引き起こされ、疾患が誘導される(6)。

本試験は予防的デザインと治療的デザインを組み合わせて行った。試験の予防的投与群では、ヒヒに TTP 誘導抗体 3H9（0.6 mg/kg、静脈内ボーラス投与）を 48 時間間隔で 3 日間（2 回）投与し、同時にカプラシズマブ（2.5 mg/kg、連日皮下投与）を 5 日間投与した（表 4）。治療的投与群では、3H9 を 48 時間間隔で 9 日間（5 回）投与することにより TTP を誘発した。TTP 発症は血小板数及びハプトグロビン値の重度の減少により確認し、試験 5 日目からカプラシズマブの連日投与を開始した（表 4）。

表 4 - 試験デザイン及び投与スケジュール

群	動物数	用量			スケジュール		
		3H9-TTP 誘発	媒体	カプラシズマブ	3H9-TTP 誘発	媒体	カプラシズマブ
対照群	4	0.6 mg/kg i.v.	媒体 s.c.	-	D1、D3、D5、D7、D9	D1～D11	-
予防的カプラシズマブ投与群	4	0.6 mg/kg i.v.	-	2.5 mg/kg s.c.	D1、D3	-	D1～D5
治療的カプラシズマブ投与群	4	0.6 mg/kg i.v.	媒体 s.c.	2.5 mg/kg s.c.	D1、D3、D5、D7、D9	D1～D4	D5～D11

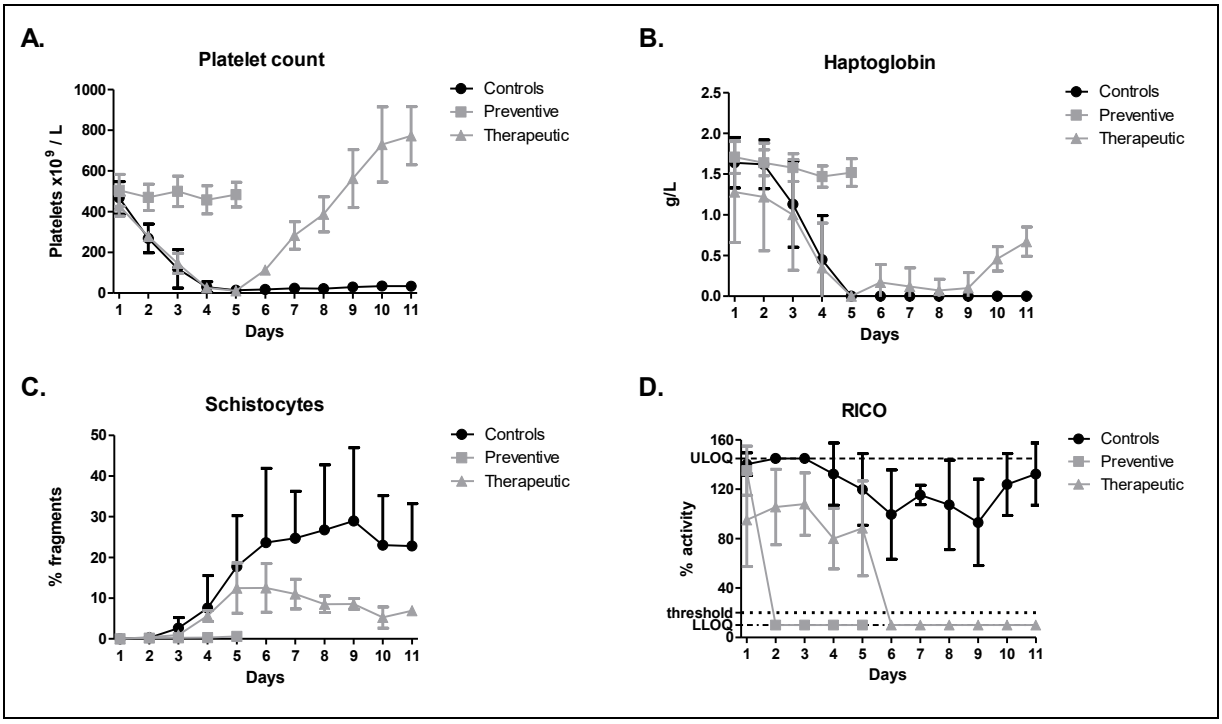
略号：i.v.: 静脈内投与、s.c.: 皮下投与
媒体及びカプラシズマブは連日投与、3H9 は 48 時間間隔で投与した。
媒体の成分： [redacted] mol/L [redacted]% Tween 80, pH [redacted]

このヒヒ TTP 試験で、カプラシズマブは後天性 TTP の初期急性症状の予防及び治療における安全性及び有効性を示した。

- 3H9 投与後にみられる血小板減少症の速やかな発現が、カプラシズマブにより完全に予防された（図 4 A）。また、血管内溶血（ハプトグロビン値）及び赤血球断片化（分裂赤血球数）も完全に予防された（図 4 B～C）。TTP 発症が予防されたことに関連して、PD マーカーである RICO 値の抑制が認められた（図 4 D）。
- 試験の治療的投与群では、血小板数及びハプトグロビン値の急激な低下並びに分裂赤血球数の増加で示される TTP の発症が 5 日目に確認された（図 4 A～C）。カプラシズマブ投与期間中に、血小板数はベースライン値を上回る値まで速やかに回復した（図 4 A）。この治療効果を裏付けるものとして、PD マーカーである RICO 値の完全な中和が 6 日目から認められた（図 4 D）。ハプトグロビン値の回復が 9 日目からみられ、分裂赤血球数の正常化及び部分的な回復が認められたことから示されるように、分裂赤血球を伴う溶血性貧血からの回復が認められた（図 4 B～C）。

図 4 - ヒヒ後天性 TTP モデル：（A）血小板数、（B）ハプトグロビン値、（C）分裂赤血球数及び（D）RICO 値の時間曲線の比較

（●）対照群（n = 4）：急性 TTP 発症を誘発した動物。（■）予防的投与群（n = 4）：急性 TTP を誘発前にカプラシズマブの予防的投与を行った動物。（▲）治療的投与群（n = 4）：急性 TTP を誘発し、発症後にカプラシズマブの治療的投与を行った動物。RICO について：ULOQ（破線）= 145%、LLOQ（一点鎖線）= 10%、薬理学的閾値（点線）= 20%。データは平均値 ± 標準偏差（SD）を表す。



- 治療的投与群で 4 日目（カプラシズマブ投与前）、7 日目及び 11 日目に行った脳の CT スキャンにおいて、頭蓋内出血の徴候は認められなかった。様々な器官の剖検検査及び病理組織学的評価を行ったところ、出血のないことが更に裏付けられた。このことから、本モデルにおいて血小板数低値の条件下で vWF を中和しても過剰な出血リスクは生じないことが示唆された。
- 凝固第 VIII 因子活性（FVIII:C）値及び vWF:Ag は、カプラシズマブの反復投与により低下した。FVIII:C 及び vWF:Ag に対するカプラシズマブのこの作用は予想されるものであり（2.3.2 項参照）、出血及び凝固の点で十分にコントロールされた。すなわち、本試験で出血の徴候は認められず、その他の凝固マーカー（PT、aPTT、TT 及びフィブリノゲン）は正常範囲内であった。

本非臨床疾患モデルで得られた結果から、カプラシズマブは後天性 TTP の最も重要な特徴である血小板減少、赤血球断片化及び血管内溶血を十分に治療及び予防することが示された。脳 CT スキャ

ン及び病理検査で出血リスクの増加を示すエビデンスは認められなかったことから、本試験条件下でのカプラシズマブの安全性が示された。

2.3.2 薬力学マーカー

カプラシズマブの薬理作用は2つの機序に分けられる。1つ目として、カプラシズマブはvWFの機能性に影響を及ぼし、それによってvWFが血小板に結合できなくなる。2つ目として、カプラシズマブはvWFの体内動態に影響を及ぼし、その結果として投与時に総vWF:Agが一過性に低下する。

2.3.2.1 標的中和に関連する薬力学マーカー

リストセチンを制御因子としてvWFを介した血小板凝集を測定するRIPA、及びそれと同様のRICOを、カプラシズマブによる標的中和のPDマーカーとして特定した。抗生物質のリストセチンは、ずり応力により誘発される変化に類似したvWF内立体構造の変化を引き起こす(7)。いずれの手法もvon Willebrand病患者の特定のサブセットを診断するために一般的に使用される検査法である(8)。RICO検査は毒性試験においてvWF中和を測定する方法としての適格性が確認されている（表5）。

ヒヒ後天性TTPモデルにおいて、カプラシズマブの有効性はRICOの完全抑制とよく相関した（2.3項参照）。

カプラシズマブの非臨床毒性試験においてRICO検査を行ったところ、血漿中vWF活性の用量及び濃度依存的な阻害が認められた。モルモット及びカニクイザルを用いた13週間反復投与毒性試験並びにカニクイザルを用いた26週間反復投与慢性毒性試験において、このPDマーカーの持続的な抑制が投与期間を通して認められたことから、カプラシズマブの薬理活性の持続が示された。先述の*in vitro*試験（2.1項参照）に一致して、ヒヒ又はカニクイザルの*in vivo*試験でもvWF:AgとRICOの完全中和に必要な血漿中カプラシズマブ濃度との間に良好な相関が認められた（[A068-PHA-[redacted]-ISR-001-V1試験]及び[ALX-0081 TR009試験]）。これらのデータは、カプラシズマブの臨床試験で得られた結果（Module[2.7.4]）と一致していた。

カニクイザルに単回皮下投与した試験（[[redacted]22630/1試験]）では、同じ用量を静脈内投与したときよりも長くRICO反応が抑制された。これは、投与経路（皮下又は静脈内）によって薬物動態（PK）プロファイルが異なる挙動を示す、すなわち血管外経路では吸収相が比較的長い（t_{max}の範囲：6～16時間）ことによって説明できる。その結果、最大効果に到達するのに必要な時間（t_{onset}）は皮下投与では0.5時間超と算出されたのに対し、静脈内投与では非常に短かった（2つの高用量群で5分未満）。同様に、この試験の皮下投与群でPD効果が消失し始める時間（t_{offset}）は遅延し、27

時間以上であった。したがって、異なる投与経路を用いることで、臨床での異なるニーズを満たすことができると考えられる。

表 5 - 非臨床試験動物種における RICO アッセイ性能の概要

マトリクス	検量線試料の最低値（%）	バリデーション試料の精度（CV%）	冷凍保存時の長期安定性	ベンチトップでの安定性（室温で 4 時間放置後の RE%）	凍結融解時の安定性（3 サイクル後の RE%）	方法バリデーション報告書の参照番号	方法を採用した試験
カニクイザル血漿	25	< 25%		<|25|%	約-80°C で <|25|%	[redacted]、29910	[redacted]22631（2 週間反復投与毒性試験、カニクイザル）
カニクイザル血漿	12.5	< 25%	-70°C で 90 日間保存後に < 25%	<|25|%	-70°C で <|25|%	[redacted]、AYX215EL-092153-A	[redacted]24024（13 週間反復投与毒性試験、カニクイザル）
モルモット[a] 血漿		< 30%	-70°C で 201 日間保存後に < 30%	<|30|%	-70°C で <|30|%	[redacted]、AYX216EL-092163-A	[redacted]24023（13 週間反復投与毒性試験、モルモット）
カニクイザル血漿	25	< 25%	-70°C で 259 日間以上（実試料の再分析）	<|25|%	-70°C で <|25|%	[redacted]、VAL-0116-02-VR-2.0 及び結合試験 E35	[redacted]AA93337（26 週間反復投与毒性試験、カニクイザル）

a アッセイがキメラ型の性質を有し、固有の反応性が低いため、活性をリストセチン・コファクター活性の百分率ではなく、最大凝集の百分率で表す。

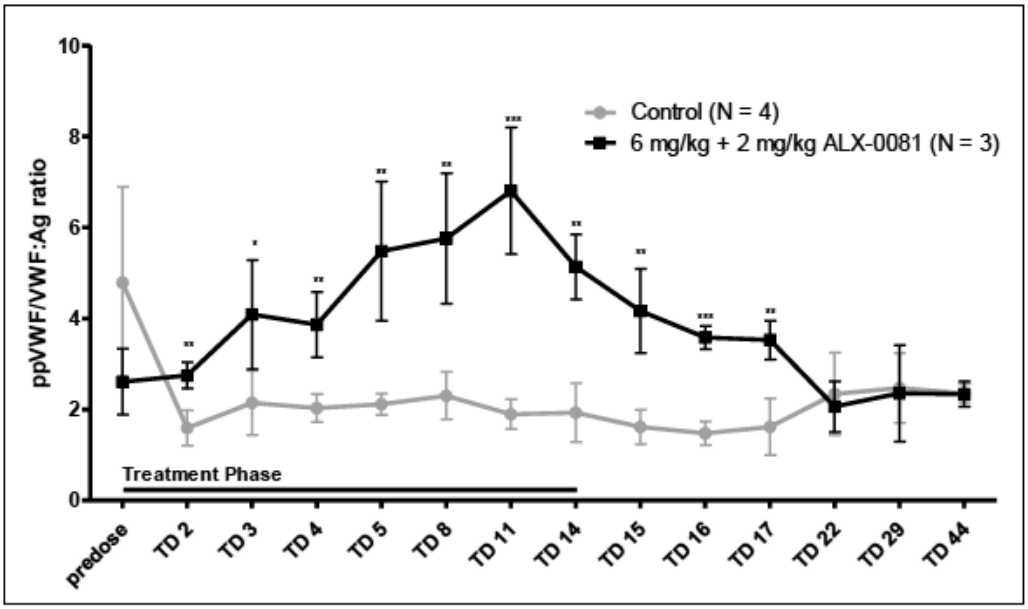
2.3.2.2 標的の体内動態に関連する薬力学マーカー

カニクイザルを用いた毒性試験において、カプラシズマブの反復静脈内又は皮下投与により vWF:Ag 及び FVIII:C が低下した。vWF は FVIII の担体であり、FVIII をタンパク質分解から保護しているため、両因子が同時に減少することは予想されることである。実験的エビデンス（[A001-PHA-[redacted]-ANR-002 試験]）及び PK シミュレーションから、カプラシズマブ - vWF - FVIII 複合体の消失速度が変化する傾向が示された。カニクイザルでは vWF:Ag 及び FVIII:C の両方の低下がみられたが、モルモットでは FVIII:C の低下がカニクイザルよりも小さく、また vWF:Ag の明らかな低下は認められなかった。

臨床試験において、カプラシズマブ投与時に観察された vWF:Ag 値及び FVIII:C 値の個々のベースラインからの変化（Module[2.7.4] 参照）は、カニクイザルを用いた毒性試験でみられた低下（Module [2.6.6] 参照）と同程度か又はそれよりも軽度であった。これらの vWF:Ag 値及び FVIII:C 値の変化は、1 型又は 2 型の von Willebrand 病患者における vWF:Ag 値（通常、正常血漿中 vWF:Ag 値の 15～50%［正常集団の平均値との比較により算出］）及びそれに比例した FVIII:C の低下の範囲(9)に相当するものであった。これらの患者では一般的に軽度の出血症状が認められる(10)。

図 5 - カニクイザルにおける vWFpp/vWF:Ag 比（A001-PHA-[redacted]-ANR-002 試験）

[redacted] 20095/[redacted] 試験にて、動物に媒体（灰色の実線）を投与するか又はローディング用量であるカプラシズマブ 6 mg/kg の静脈内投与を行った後、2 mg/kg を 4 時間間隔で 6 回の連日静脈内投与を 2 週間行った（黒色の実線）。所定の時点で採取した血漿検体における新規合成プロペプチド vWF（vWFpp）及び vWF:Ag（成熟 vWF）の濃度を測定した（A001-PHA-[redacted]-ANR-002 試験、本文の説明参照）。vWFpp/vWF:Ag 濃度比は、合成又は消失における変化の指標として使用できる。結果、vWFpp/vWF:Ag 比の増加が認められ、これは vWFpp 濃度が変化せず vWF:Ag 値が低下したことに起因したことから、vWF がカプラシズマブに結合すると消失が変化することが示された。
図下部の黒色の棒は試験における投与期間を示す（14 日目まで）。
データは対照群 4 匹又は投与群 3 匹の平均値 ± SD を表す。対応のない t 検定を行ったところ、カプラシズマブ投与群で vWFpp/vWF:Ag 比の有意な増加が認められた。
* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001



vWF は、vWF の細胞内プロセシングに重要な超高分子量のプロペプチド（vWFpp）とともに合成される。ゴルジ体でフューリンによって vWFpp と成熟 vWF とが切り離され、vWFpp 及び成熟 vWF の両方がバイベル・パラーデ小体に貯蔵される。カニクイザルを用いた 13 週間及び 26 週間反復投与毒性試験（それぞれ[[redacted] 24024 試験]及び[AA93337 試験]）の血漿を用いた *ex vivo* 試験において、vWFpp/成熟 vWF 比の検討を行ったところ、カプラシズマブの投与により vWFpp の増加ではなく成熟 vWF の減少が認められ、この比が変化することが示された（図 5、[A001-PHA-[redacted]-ANR-002 試験]

並びに[A068-NC-[redacted]-004 試験]）。このことから、カニクイザルでみられた vWF:Ag 値の低下は、合成速度の変化ではなく、カプラシズマブが結合することによる vWF の消失速度の変化に起因すると考えられた。これはカプラシズマブ投与時に vWF の速やかな減少がみられたことと一致しており、そのことからも vWF の合成又は放出の変化に起因するものではないことが示唆される（図 5、A001-PHA-[redacted]-ANR-002 試験）。26 週間反復投与毒性試験において、カプラシズマブを 1 か月間反復投与した高用量群で vWF:Ag 値の増加傾向が認められた。この変化は、カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験におけるすべての用量群の一部の動物でも認められた。ヒトの場合と同様に、カプラシズマブ投与により初期に標的濃度が低下したことで、ヒト PK/PD モデルで述べられているような標的発現を増加させるフィードバックメカニズムが誘導されたと考えられる。

2.3.2.2.1 vWF プロペプチド濃度に対するカプラシズマブの影響（A068-NC-[redacted]-004 試験）

非臨床及び臨床データにおいて、カプラシズマブの反復投与により vWF:Ag 濃度の低下が認められ、同時に FVIII 濃度の低下が認められた。さらなる特性評価を行うと、これらの減少は一過性であるように見え、vWF 動態に対するカプラシズマブの可逆的作用が示された。

本試験では、この減少が vWF のクリアランス増加によるものかどうかを、カニクイザルを用いた 13 週間及び 26 週間反復投与毒性試験（[redacted] 24024 及び AA93337）並びに臨床第 I 相及び第 II 相試験（ALX-0681-1.1/08 及び ALX-0681-2.1/10）で得られた血漿検体中の vWF プロペプチド（vWFpp）レベルを測定することにより理解することを目的とした。vWFpp と成熟 vWF:Ag の同時放出は 1:1 モル比で起こるが、vWF:Ag と比較して *in vivo* での vWFpp の半減期は短く、従って vWFpp と vWF:Ag 間のモル比の変化は vWF クリアランス変化の良いマーカーである。各試験での vWF:Ag レベルはすでに測定されており、非臨床及び臨床試験からの血漿試料中 vWF pp を ELISA で分析した。抗ヒト vWF pp モノクローナル抗体（clone CLB-Pro 35）を捕捉ツールに、HRP 標識抗ヒト vWF pp モノクローナル抗体（clone CLB-Pro 14.3)）を検出ツールにした。ヒトプール血漿を検量線作成に用いた。

vWF:Ag に対する vWFpp の比率が、カプラシズマブ投与により増加したことから、カプラシズマブと複合体を形成している場合、vWF のクリアランスが増加することが示唆された。初期の *in vitro* での検討では内皮細胞による vWF 放出に対してカプラシズマブは影響しなかったことから、生合成の減少よりもクリアランスの増加によるものと考えられた。

全体として、カプラシズマブの投与時には、vWF:Ag レベルの低下とそれに伴う FVIII レベルの低下が *in vivo* で観察されている。vWFpp/vWF:Ag 比の *ex vivo* バイオマーカー解析により、vWF-カプラシズマブ複合体の消失速度の増加が示唆された[A068-NC-[redacted]-004 試験]。

2.3.2.3 後天性 TTP の有効性マーカー

TTP の急性期症状の確認及び治療時の寛解のモニタリングには血小板数を使用した。上述したように（2.3 項参照）、ヒヒ後天性 TTP モデルにおいてカプラシズマブは抗 ADAMTS13 中和抗体の存

在により誘導される UL-vWF を阻害することで血小板数を変化させた。当該試験の予防的投与群において、カプラシズマブは TTP の発症を抑制し、これに伴って、PD マーカーRICO の抑制、循環血中 vWF:Ag の低下及び血小板減少の抑制が認められた。同様に、試験の治療的投与群において、カプラシズマブは血小板数を初期の減少から回復させ、この変化に伴ってこれらの PD マーカーにも同様の変化が認められた。後天性 TTP の疾患条件下でのヒヒにおける PK、vWF:Ag 及び血小板のデータを用いて曝露量、vWF:Ag 及び血小板数の間の関連性を説明できる連続的 PK/PD モデルを構築し（[A068-NC-[redacted]-005 試験]）、検討を行ったところ、カプラシズマブの薬理作用と TTP における有効性との間に関連が認められた。

2.3.2.3.1 ヒヒ後天性 TTP モデルにおけるカプラシズマブの PK/PD モデリング（A068-NC-[redacted]-005 試験）

この解析の主な目的は以下のとおりであった。

1. ヒヒにおけるカプラシズマブの血漿中濃度 - 時間プロファイルを記述する
2. ヒヒ後天性 TTP モデルにおける対応する vWF:Ag 及び血小板レベルを記述する
3. ヒヒ後天性 TTP モデルにおける薬物曝露／近位バイオマーカー（vWF:Ag）レベル／遠位バイオマーカー（血小板）レベルの関係を確立する

ヒヒにおける反復投与時のカプラシズマブの薬物動態及び免疫原性については、ヒヒにおける静脈内ボーラス投与時のカプラシズマブの薬物動態及び免疫原性を評価するための予備試験のデータを用いた（ALX-0081-TR007 試験、Module 2.6.5[表 2.6.5.3 D]）。

ヒヒ TTP モデルにおけるカプラシズマブの有効性及び安全性については、*in vivo* 後天性 TTP モデルのデータを用いた（A068-PHA-[redacted]-ANR-001-V1 試験）。

これら 2 つの非臨床薬物動態試験及び薬理試験を併合したデータから対象集団 PK/PD データセットを構築した。対象集団 PK/PD 解析は、NONMEM、version 7.3（ICON Development Solutions）及びソフトウェアツール PsN、version 4.2.0 を用いた非線形混合効果モデル化により行った。モデルは、AMD opteron 6386SE CPU、GNU GCC/Gfortran 4.8.2 コンパイラ、SLURM 2.5.7 スケジューラ、MPICH1 3.1.0 並列化を使用して、Linux クラスター（Linux kernel 2.6.32-431.17.1 搭載 Red Hat Enterprise Server Release 6.5）で開発された。NONMEM、version 7.3 における η-ε 相互作用（FOCE - INT）を用いた最初の条件付き推定を、全モデルランに対して採用した。vWF:Ag を血小板数に結びつける輸送モデルへの入力として機能する TMDD モデルを含む、連続した PK/PD アプローチに従った。固定及び個体間ランダム効果パラメータを推定し、2 つのモデルは相加的な残差変動を実施した。

ヒヒへの静脈内又は皮下投与後のカプラシズマブの薬物動態は、TMDD モデルにより十分に記述された。パラメータの個体間変動は固定効果に関する指数誤差を通してモデル化し、残差変動は相加的誤差モデル（線形スケールにおける指数誤差モデルに対応する対数スケール）としてモデル化し

た。バイオアベイラビリティを除き、全ての固定及び個体間及び残差分散パラメータを中程度又は良好な精度（55%未満の相対標準誤差［RSE］）で推定した。相加的残留誤差項は＜11%の精度で推定した。

輸送モデルは、以前の TMDD モデルパラメータ及びヒヒ TTP モデルからの血小板数データに基づいて構築され、有効性試験内の 3 つの試験デザイン（対照、予防、治療）下での血小板数の経時変化を適切に記述した。指数関数的個体間変動を輸送モデルパラメータに適用し、相加的誤差モデルで残差変動を記述した。ランダム効果プロットの調査は、フィードバックパラメータに対する TTP ヒヒ薬理学的モデルの研究デザインの効果を明らかにした。この共変量をモデルに含めることにより、標準的な診断プロットを顕著に改善することなく、観察されたバイアスが修正された。全ての固定及び個体間及び残差分散パラメータを中程度又は良好な精度（40%未満の相対標準誤差［RSE］）で推定した。相加的残留誤差項は＜12%の精度で推定した。PK、vWF:Ag 及び血小板数を同時に適合させる試みは、モデルの過剰パラメータ化をもたらした。

以上、TMDD 及びトランジットモデルを含む連続した PK/PD モデリングアプローチにより、ヒヒにおけるカプラシズマブの薬物動態の特性評価、及び後天性 TTP の疾患モデルにおける曝露量、vWF:Ag 及び血小板数の関係の特性評価が可能となった。カプラシズマブを投与した動物及び溶媒を投与した動物を記述するために、PK 及び PD を記述するための TMDD モデル（vWF）と血小板動態を記述するための輸送コンパートメントモデルの組合せを採用することができる[A068-NC-[redacted]-005 試験]。

3　副次的薬理試験

3.1　結合特異性

カプラシズマブと vWF との相互作用は非常に特異的であり、カプラシズマブはヒトの血液細胞及び血小板とは相互作用しなかった（[ALX-0081 TR020 試験]）。ヒト組織パネルの免疫組織化学染色では、カプラシズマブは予想どおり vWF 発現細胞（すなわち巨核球及び内皮細胞）のみに結合した（[2710/001 試験]）。

カプラシズマブは、不活性又は活性化 vWF A1 ドメインへの結合を介して、血小板 GPIb-IX-V と vWF との相互作用を選択的に阻害したが、線維性コラーゲン及び VI 型コラーゲンに対する vWF の相互作用能には影響を及ぼさず（[ALX-0081 TR012 試験]及び[ALX-0081 TR057 試験]）、vWF プロテアーゼである ADAMTS13 と vWF の相互作用及び ADAMTS13 の活性にも影響を及ぼさなかった（[ALX-0081 TR013 試験]）。最後に、カプラシズマブは vWF に対する FVIII の結合に影響を及ぼさなかった（図 1、[Analysis report - SPR analysis 試験]）。

マウス、ラット及びウサギ（[2710/027 試験]）、モルモット（[2710/003 試験]）、カニクイザル（[2710/002 試験]）並びにヒト（[2710/001 試験]）の標準的な一連の組織を用いてカプラシズマブの組織交差反応性を評価する 4 つの試験を実施した。最初の試験においてオフターゲット陽性染色がみられたのは、ウサギの胃、精巣及び胸腺組織のみであった。その他の試験でヒトを含む種の交差反応性を検討したところ、カプラシズマブは vWF 発現組織、特に血管内皮細胞及び骨髄巨核球に特異的に結合することが示された。モルモット、カニクイザル及びヒトの組織において、オフターゲット結合は認められなかった。

3.1.1　カプラシズマブの特異性：血液細胞との相互作用（ALX-0081 TR020 試験）

この試験の目的は、vWF に対するカプラシズマブの特異性をさらに検討し、カプラシズマブがヒト血液細胞と相互作用するかどうかを検証することであった（[ALX-0081 TR020 試験]）。

カプラシズマブは ^{125}I で放射性標識化し、vWF コートビーズを用いた結合実験で残存活性を測定した。100 倍量の過剰非標識カプラシズマブの存在下又は非存在下で、放射性標識カプラシズマブ（0.1 µg/mL）を 0.1%カゼイン添加 PBS 中でヒト全血とインキュベートし、その活性を測定した。標識化カプラシズマブは vWF コートポリスチレンビーズに結合し、この結合は非標識カプラシズマブにより阻害されたことから、標識化後もカプラシズマブの活性が維持されることが確認された。続いて、0.1 µg/mL の放射性標識カプラシズマブをヒト全血と 37°C で 45 分間インキュベートし、遠心分離して PRP 及び PPP 分画を作製した後、全血及び各分画中の残存放射活性を測定した。さらに、残った血球分画を洗浄し、この分画中の放射活性も測定した。

その結果、この放射能標識カプラシズマブを用いて、カプラシズマブはヒト血球と相互作用しないことが示された。すなわち、全ての活性が PPP 分画中に保持されており（1 mL PPP での放射活性は 104 ± 2%［平均 ± s.e.］）、血球分画中での放射活性は 2.5 ± 0.1%であった。

3.1.2 カプラシズマブの特異性：vWF と線維性コラーゲンとの相互作用（ALX-0081 TR057 試験）

この試験の目的は、vWF に対するカプラシズマブの特異性をさらに調査し、vWF と線維性コラーゲンとの相互作用を阻害するかどうかを検証することであった（[ALX-0081 TR057 試験]）。

vWF と線維性コラーゲンとの相互作用を測定する ELISA を開発した。この相互作用に対するヒト vWF に対するカプラシズマブ及び陽性対照のナノボディ C37H（ヒト vWF A3 ドメインを標的とし、線維性コラーゲンと結合することがわかっている）の効果を測定した。0.45 µg/mL の vWF を系列希釈したカプラシズマブ又は C37H と PBS 中でプレインキュベートし、コラーゲンをコーティングしたウェルに移した。1.5 時間後、結合した vWF を HRP 標識抗 vWF ポリクローナル抗体で検出した。

C37H は、vWF と I 型及び III 型コラーゲンとの相互作用を濃度依存的かつ完全に阻害した。カプラシズマブは、モル量比較で vWF の約 2000 倍に相当する 100 µg/mL（～3600 nmol/L）の濃度でも I 型又は III 型コラーゲンと vWF との相互作用に影響を及ぼさなかった。

3.1.3 ヒト及び他の動物種におけるカプラシズマブの組織交差反応性

本試験の目的は、免疫組織化学的手法を用いて、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、カニクイザル及びヒトの細胞・組織のパネルから組織学的に調製した凍結切片と、ビオチン化カプラシズマブ（2.875、5.75 及び 11.5 µg/mL）の潜在的交差反応性を評価することであった。

- げっ歯類及びウサギ [[redacted]2710/027]

マウス及びラットの組織では、カプラシズマブによる特異的な陽性染色は観察されなかった。

ウサギでは、胃、精巣、胸腺の血管内皮の内皮細胞に特異的な細胞質～細胞膜の陽性染色が認められた。また、個々の血管で見られる内皮細胞における染色の数と強度の両方が異なることを示した。

しかし個々の組織内の全ての血管がカプラシズマブによる内皮細胞の染色を示すわけではないことが観察された。

- モルモット [[redacted]2710/003]

モルモット組織標本の結果から、選択された組織の血管内皮の内皮細胞には細胞質～細胞膜への染色があることが示された。染色陽性の血管に関しては、毛細血管、細動脈、細静脈の内皮細胞がカプラシズマブ陽性であった。骨髄では巨核球の細胞質～細胞膜の染色も認められた。

他のどの細胞型又は組織構造においても特異的な免疫組織化学染色陽性は認められなかった。

- カニクイザル [[redacted]2710/002]

カニクイザル組織標本から得られた結果は、血管内皮の内皮細胞に細胞質～細胞膜への染色があることを示した。染色陽性の血管に関しては、毛細血管、細動脈、細静脈の内皮細胞がカプラシズマブ陽性であった。骨髄では巨核球の細胞質～細胞膜の染色も認められた。血液細胞（ドナー3 例）を除き、検査した全ての組織で血管内の内皮細胞、及び骨髄中の巨核球の特異的な細胞質～細胞膜の染色が示された。

検査したカニクイザル組織パネルの他の細胞型又は組織構造では、特異的な免疫組織化学的染色陽性は認められなかった。

- ヒト [[redacted]2710/001]

ヒト組織パネルにおいて、血管内皮の内皮細胞に細胞質～細胞膜の染色が認められた。染色陽性の血管に関しては、毛細血管、細動脈、細静脈の内皮細胞がカプラシズマブ陽性であった。骨髄では巨核球の細胞質から細胞膜の染色も認められた。

血液細胞（ドナー3 例）を除き、検査した全ての組織で血管内の内皮細胞、及び骨髄中の巨核球の特異的な細胞質から細胞膜の染色が示された。

検査したヒト組織のパネルから得られた他の細胞型又は組織構造では、特異的な免疫組織化学的染色陽性は認められなかった。

3.1.4 カプラシズマブの特異性：vWF と FVIII との相互作用（Analysis report - SPR analysis 試験）

本研究の目的は、生理的状態で標的結合を模倣し、FVIII の存在下で機能的標的である vWF に結合するカプラシズマブを評価することであった。この評価は SPR により行った（[Analysis report - SPR analysis 試験]）。

ヒト組換え vWF を標準的なアミンカップリングキットを用いてセンサーチップ表面に固定化した。FVIII の存在下でカプラシズマブが vWF に同時に結合する能力を検証するために、10 nmol/L カプラシズマブ、5 nmol/L の FVIII、又は 10 nmol/L のカプラシズマブと 5 nmol/L の FVIII の混合物のいずれかの異なる試料を 1 回、45 µL/分の流量で 2 分間 vWF 表面上に流し、260 秒間解離させた。さらに、10 nmol/L カプラシズマブの同時検体注入を 2 分間行い（ステップ 1）、続いて 5 nmol/L FVIII を 2 分間注入した（ステップ 2）。アッセイは、3 mmol/L EDTA 及び 0.005%ポリソルベート 20 添加 HEPES 緩衝生理食塩液を使用し、室温で実施した。

これらの実験条件下で、カプラシズマブと FVIII の vWF への同時結合が示された（図 1）。この結果は、カプラシズマブと vWF の結合構造と、FVIII と vWF の結合構造に関する既存の報告と一致するものである(11)(12)。

3.2 出血リスク

ヒヒを用いた2つの試験でカプラシズマブ投与に伴う出血リスクを評価した。[ALX-0081 TR008 試験]では、カプラシズマブを漸増累積用量で静脈内投与するか、又は別の群においてローディング用量投与後に静脈内注入した。Surgicut 器具で腕に創傷を作製し、15 秒ごとにろ紙で慎重に軽くたたき、皮膚出血時間を評価した。また、ヒヒの鼠径部に創傷（長さ 2 cm、深さ 0.8～1.0 cm）を作製し、創傷にガーゼを挿入して 30 分ごとに取り換え、重量を測定することで失血量を評価した。対照として ReoPro®（abciximab）及びプラビックス®（クロピドグレル）を使用した。

薬理学的作用量（完全な RICO 阻害を示す用量）のカプラシズマブを投与すると、皮膚出血時間が延長した。しかし、この作用の持続時間は、カプラシズマブの方が対照薬よりも短かった。同様に、外科的出血モデルにおける失血は、カプラシズマブ投与群の方が ReoPro®投与群よりも軽度で、プラビックス®投与群よりわずかに軽度であった。

血液凝固検査では、投与した薬剤に関係なく、PT 及び aPTT の変化は認められなかった。

同じ動物種を用いた 2 つ目の試験でも非常に類似した結果が得られた（[ALX-0081 TR009 試験]）。

ヒヒの *in vivo* TTP モデル（[A068-PHA-[redacted]-ANR-001-v1 試験]）において、CT スキャン並びに器官の肉眼検査及び病理組織学的検査で出血リスクを評価した。治療用量において、脳 CT スキャンで頭蓋内出血のいかなる徴候も認められなかったことから、カプラシズマブの安全性が示された。カプラシズマブ投与動物で様々な器官の肉眼検査及び病理組織学的検査を行ったところ、出血のないことが更に裏付けられた。

aPTT の変化はカニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験のみで認められた。投与期間終了時（26 週目）に、対照と比較して、中用量群で aPTT が最大 27.7%延長した。この変化は完全に回復した。13 週間及び 26 週間試験では、試験期間中に散発的な出血（鼻、歯肉、月経過多など）が認められた。26 週間試験の高用量群の 1 匹は、貧血及び出血の徴候がみられた後、瀕死状態から安楽死に至った。これは臨床用量の 84.2 倍の曝露量が得られる用量で生じたものであった（Module [2.7.1]、REP-2-ALX-antiVWF-PMX-1 試験）。

要約すると、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ごく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から安楽死に至った。これは臨床の 84.2 倍の曝露量で生じたものであった。

3.2.1 ヒヒにおけるカプラシズマブの出血リスク評価試験並びにプラビックス及び ReoPro との比較試験（ALX-0081 TR008 試験）

この試験では、カプラシズマブ、プラビックス及び ReoPro（abciximab）を用い、本法と過去に実施した皮膚出血時間法を比較することにより、患者の臨床外科的出血に対する新しい検査法の予測性を評価した。また、全血球数、プロトロンビン時間（PT）、aPTT、vWF 濃度及び *ex vivo* RIPA 阻害などの他の安全性パラメータも測定した（[ALX-0081 TR008 試験]）。

方法：体重 8～17kg の雌雄ヒヒ（*Papio ursinus*）を用い、各被験物質群では 3～4 匹、対照群では 2 匹の動物を割り当てた。投与経路は静脈内注射とした。ヒヒの鼠径部に切開を行い、創部にガーゼを留置した。このガーゼは 30 分ごとに交換した。2 回のベースライン測定（2×30 分）後、カプラシズマブ、ReoPro、プラビックスのいずれかをヒヒ Folts モデル（ALX-0081-TR009 試験）において循環血流減少（CFR）の部分的阻害を示す用量で投与した。各投与後 30 分毎にガーゼを交換し、被験物質を 2～3 倍量ずつ増量して追加投与した。実験の最後に、ガーゼに集められた血液量を、ガーゼを秤量することによって測定した。皮膚出血時間も測定し、血腫の存在を観察した。RIPA、vWF 及び FVIII レベル、血小板数、PT 及び aPTT などの他のパラメータを測定した。

結果：ガーゼ（外科的出血）の出血及び血腫の存在に関して、ReoPro と比較してカプラシズマブの安全性が優れていることが示された。皮膚出血時間測定はこの試験においても以前の試験と同様の結果を示した。すなわち、カプラシズマブで皮膚出血時間の延長が認められた場合、24 時間以内に正常化したが、ReoPro 又はプラビックスの投与後は出血時間が 24 時間延長した。RIPA はカプラシズマブの予想有効量で阻害がみられた。カプラシズマブは vWF 及び FVIII 濃度、血小板数、PT 及び aPTT に影響を及ぼさなかった。

結論：今回の結果から、ReoPro 及びプラビックスに対して、出血が少なく、モニタリングが容易で可逆的な効果が迅速に得られることを特徴とするカプラシズマブの臨床安全性の改善が示唆された。

3.2.2 ヒヒ Folts モデルにおけるカプラシズマブの有効性及び薬理作用、並びに Aspegic、ヘパリン、プラビックス及び ReoPro との比較 （ALX-0081 TR009 試験）

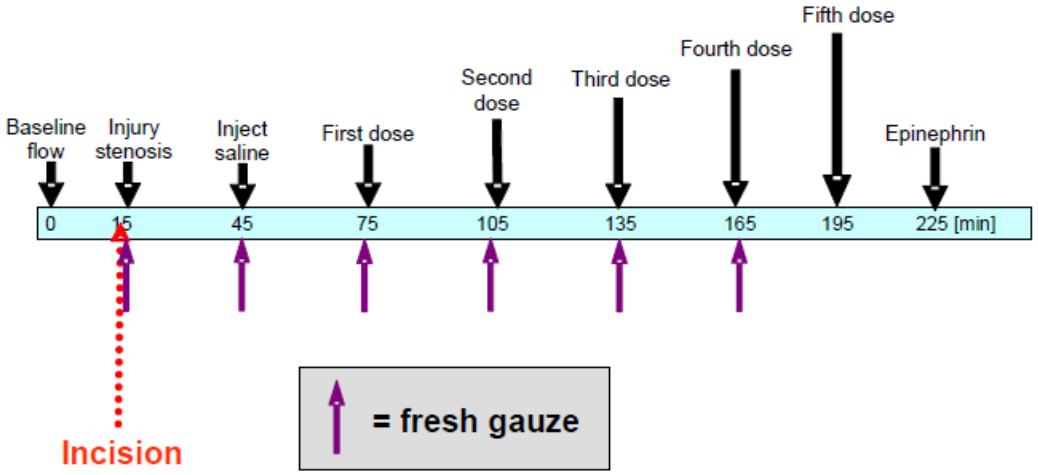
本試験の目的は、カプラシズマブの *in vivo* 動脈血栓症モデルにおける有効性及び薬理作用を評価し、Aspegic（ASA）、ヘパリン、プラビックス及び ReoPro の 結果と比較することであった（[ALX-0081 TR009 試験]）。

方法：体重 8～17kg の雌雄ヒヒ（*Papio ursinus*）を用い、各被験物質群では 3～9 匹、対照群では 2 匹の動物を割り当て、一部の動物は左右の大腿をウォッシュアウト期間を置いて 1 回ずつに分けて使用した。ヒヒでの改良 Folts モデルを用いて、急性血栓症の予防における有効性を判定した。このモデルでは、大腿動脈と大腿静脈の間にシャントを作り、大腿動脈を鉗子で傷害し、狭窄を加えて高いずり速度を得た。多血小板血栓が形成され、機械的に脱落し、循環血流減少（CFR）をもたらした。被験物質の漸増用量（Aspegic［1～40 mg/kg、n=3］、ヘパリン［15～240 IU/kg、n=3］、プラビックス［1～10 mg/kg、n=4］、カプラシズマブ［3～270 µg/kg、n=9］、ReoPro［20～500 µg/kg、n=3］）

を静注し、CFR に及ぼす影響を検討した。最高用量の被験物質を注射した後、新たな傷害を作製し、エピネフリンを注射して、被験物質の効力をさらに試験した。本試験で用いた用量は、カプラシズマブの *in vitro* 試験の結果、すなわち、ヒト血液中に添加した場合、0.2～0.4 µg/mL の濃度のカプラシズマブでコラーゲンに対する血小板接着の阻害が得られていることに基づいている。

各用量の被験物質について血液サンプルを採取し、全血球数、PT 及び aPTT 凝固時間、第 VIII 因子レベル、vWF 濃度、及びカプラシズマブを投与したヒヒではカプラシズマブ濃度について分析した。それ以外の被験物質についても、皮膚出血時間試験及び鼠径部の明確な創傷からの総出血量を測定する出血モデルを用いて、出血の有無を検査した（図 6 ）。

図 6 - 投与及びガーゼ交換（紫の矢印）スケジュール



結果：Aspegic とヘパリンはこのモデルでは効果がなかった。プラビックスを投与した動物では、良好な抗血栓作用が認められたが、エピネフリンを注入すると CFR が再出現した。ReoPro は CFR を強く阻害し、その効果は新たな損傷とエピネフリン注入時にも維持された。カプラシズマブは ReoPro と同等の有効性を示したが、有効性を最大にするために必要な用量は ReoPro に必要な用量よりも 10 倍低かった。

最初の設定では、明確に定義された創傷からの総出血量を測定する出血モデルにおいて、異なる試験物質を試験した。ReoPro の強力な抗血栓作用に伴い、対照値の最大 40 倍の劇的な出血量の増加が認められた。プラビックス投与群で認められた出血量は、カプラシズマブの効果（最大 11 倍）と同様に低かった（最大 14 倍）。また、カプラシズマブの投与可能期間は、プラビックス及び ReoPro と比較して、出血量を大幅に増加させることなく非常に長かった。

第 2 の設定では、皮膚出血時間を外科手術装置を用いて測定した。カプラシズマブを投与した動物では、有効な用量から投与を開始し、皮膚出血時間が延長した。これは ReoPro 又はプラビックスを投与した動物でも観察されたが、それぞれ有効用量の 20～2 倍低い用量から開始した。カプラシズマブ投与群の皮膚出血時間は、ReoPro 及びプラビックス投与群とは対照的に、24 時間後に正常化した。この出血試験モデルによる結果は、ReoPro とプラビックスの効果とは対照的に、カプラシズマブの皮膚出血時間に対する効果は可逆性が高く、持続時間も短いことを示している。血小板数、vWF 及び FVIII 値、aPTT 及び PT などのその他の血液パラメータは、カプラシズマブ投与による影響を受けなかった。

結論：結果は、カプラシズマブがヒヒの Folts モデルにおいて非常に有効であることを示した。様々な出血試験で得られた結果は、抗血栓治療薬としての ReoPro 及びプラビックスと比較して、カプラシズマブの安全性（出血リスクに関して）が向上したことを示しており、正常止血に対しては、高用量でもより軽度で可逆的な効果が認められた。

4 安全性薬理試験

安全性薬理評価は、カニクイザルを用いた 2 つの 2 週間反復投与毒性試験、カニクイザル及びモルモットを用いた 13 週間反復投与毒性試験並びにカニクイザルを用いた 26 週間慢性投与毒性試験の一部として行った。これらの反復投与毒性試験のデザイン概要を以下の表 6 に示す。

表 6 - 反復投与毒性試験のデザインの概要

Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses	GLP compliance	Study no.
Dunkin-Hartley guinea pig	SC	13 weeks 4 times daily (6 hour interval) 8 weeks recovery	0, 0.4, 4, 40 mg/kg/day	Yes	[redacted] 24023
Cynomolgus monkey	IV	2 weeks 6 times daily (4 hour interval)	0, 0.006 + 0.0015 mg/kg/doce [a] 0.6 + 0.2 mg/kg/dose [a] 6 + 2 mg/kg/dose [a]	Yes	[redacted] 20095/[redacted]
Cynomolgus monkey	IV, SC	2 weeks 6 times daily (4 hour interval)	0, 12 (IV) mg/kg/day 0, 0.12, 2.4, 12 (SC) mg/kg/day	Yes	[redacted] 22631
Cynomolgus monkey	SC	13 weeks 4 times daily (6 hour interval) 8 weeks recovery	0, 0.4, 4, 40 mg/kg/day	Yes	[redacted] 24024
Cynomolgus monkey	SC	26 weeks 3 times daily (2 x 6 hour interval + 12 hour interval) 13 weeks recovery	0, 0.4, 4, 40 mg/kg/day	Yes	AA93337

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; SC = subcutaneous
Vehicle control: [redacted] mol/L [redacted] % Tween 80 (pH [redacted])
a Doses are not expressed as daily doses, but as loading dose + maintenance dose with the following frequencies: first day of dosing: loading dose + 5 maintenance doses, all following days: 6x maintenance dose

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。

4.1 中枢神経系

モルモットにおいて、体性運動量並びに行動パターンを含むケージサイド観察を毎日、投与の前後に実施した。カニクイザルでも、同じパラメータ（毎日）に加えて体温を試験期間中の複数の時点で評価した。

いずれの試験においても、中枢神経系の安全性薬理パラメータに関する所見は 40 mg/kg/日までの用量で報告されなかった。

4.2 呼吸系

モルモットにおいて、呼吸系の評価を含むケージサイド観察を毎日、投与の前後に実施した。カニクイザルでも、同じパラメータを毎日評価した。

いずれの試験においても、呼吸系の安全性薬理パラメータに関する所見は 40 mg/kg/日までの用量で報告されなかった。

4.3 心血管系

カプラシズマブの全体的な心血管系安全性評価として、心血管機能（心拍数、心電図測定値及び血圧）の評価並びに心臓及び血管の剖検後検査（心臓重量並びに心臓及び血管の肉眼検査及び病理組織学的検査）を行った（[A068-NC-[redacted]-001 報告書]）。この評価は、表 6 に示すカニクイザルを用いた 4 つの毒性試験及びモルモットを用いた 1 つの毒性試験で得られたデータに基づいている。サルを用いた 4 つの試験において心電図及び血圧を測定した時点を表 7 に要約する。

表 7 - サルにおける心電図及び血圧評価の概要

試験	評価の時点	評価のタイミング
2 週間 （[[redacted] 20095/[redacted] 試験]）	1、15 及び 40/42 日目	投与前及び投与 5 分後；心電図後に血圧測定
2 週間 （[[redacted] 22631 試験]）	1 及び 15 日目	投与前及び投与 5 分後；心電図後に血圧測定
13 週間 （[[redacted] 24024 試験]）	投与前並びに 1、50、92、120 及び 148 日目	投与前及び投与 5 分後；心電図後に血圧測定
26 週間 （[AA93337 試験]）	投与前並びに 0、49、91、133、175、231 及び 266 日目	投与前及び投与 5 分後；心電図後に血圧測定

いずれの試験においても、心血管系の安全性薬理パラメータに関する所見は 40 mg/kg/日までの用量で報告されなかった。

カニクイザルにおいて、被験物質に関連する血圧、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。サル及びモルモットの試験において、カプラシズマブによる心臓重量の変化並びに心臓及び血管の病理組織学的変化は認められなかった。結論として、カニクイザル及びモルモットの試験において、心血管機能並びに心臓及び血管の形態にカプラシズマブ投与による有害な作用は認められなかった。

4.4　まとめ

以上、いずれの試験においても、安全性薬理パラメータに関する所見は 40 mg/kg/日までの用量で報告されなかった。PK/PD モデリングに基づくと、1 日 10 mg のカプラシズマブを投与された患者の定常状態の C_{max} の中央値は約 0.6 µg/mL であった（Module 2.6.7、[表 2.6.7.3]参照）。これを、モルモットを用いた 13 週間試験及びカニクイザルを用いた 26 週間試験の 40 mg/kg/日投与における定常状態での C_{max} と比較した時の安全域は 30 超であった。

5　薬力学的薬物相互作用試験

後天性 TTP の臨床適応症を裏付けるための薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

6　考察及び結論

カプラシズマブの薬効薬理特性を *in vitro* 及び *in vivo* で検討した。その結果、カプラシズマブは標準分子量及び病態生理に関連する超高分子量の両方の vWF 多量体の血小板 GPIb-IX-V 結合能を中和することが示された。カプラシズマブによる標的への結合は特異的で、カプラシズマブによる vWF 阻害作用は GPIb-IX-V 相互作用部位に選択的であるため、オフターゲット薬理作用が生じるリスクは非常に低い。

内因性の血漿中 vWF 又は遺伝子組換え vWF A1 ドメインを用いた *in vitro* 及び *in vivo* 試験で種交差反応性を広範に分析した。カプラシズマブはモルモット、ヒヒ又はカニクイザルの vWF に結合してこれを中和することが示され、薬理作用はヒトと量的及び質的に類似していた。これらのデータから、モルモット、ヒヒ及びカニクイザルを非臨床有効性試験及び毒性試験に適した動物種とする根拠が裏付けられた。カプラシズマブはヒト、カニクイザル及びモルモットの vWF に高い親和性を示すため、vWF 多量体に対するカプラシズマブの親和性を SPR（Biacore）法を用いて定量することは技術的に不可能であった。代わりに、vWF A1 ドメインに対するカプラシズマブの一価構成タンパクの親和性を SPR で比較したところ、モルモットに対する親和性の強さは、ヒト又はカニクイザルの vWF A1 ドメインと比較して 1/10 であった。血漿から精製したヒト vWF 多量体に対するカプラシズマブの親和性を Gyrolab プラットフォームで測定したところ、数 pmol/L レベル（3.67 pmol/L）であった。

フローチャンバー試験又は標的中和アッセイで TTP 患者の血漿を用いて得られた *in vitro* データから、カプラシズマブは、健康被験者の vWF を中和するのに必要な濃度と同程度の濃度で、血小板と UL-vWF 多量体との相互作用を阻害することが示された。TTP 病態におけるカプラシズマブの治療可能性は、ヒヒ後天性 TTP モデルを用いた *in vivo* 有効性及び安全性試験で更に示された。このモデルにおいて、カプラシズマブは血小板減少、赤血球断片化及び溶血性貧血の急性発現に対して完全な予防及び治療効果を示した。また、このモデルにおいてカプラシズマブによる TTP の治療に関連した出血リスクの増加を示すエビデンスは認められなかった。

カプラシズマブの薬理作用は 2 つの機序によって説明できる。1 つ目として、カプラシズマブは vWF の機能性に影響を及ぼし、それによって vWF が血小板に結合できなくなる。2 つ目として、カプラシズマブは vWF の体内動態に影響を及ぼし、その結果として結合型 vWF:Ag が一過性に減少する。

カプラシズマブによる標的中和のマーカーとして、vWF 機能性の欠如を診断する RICO アッセイが特定された。カプラシズマブによる標的の体内動態変化のマーカーとして、vWF:Ag 及び FVIII:C が特定された。標的占有率と標的中和率の間に相関が認められた。さらに、ヒヒ TTP モデルにおいて、PD マーカーの完全な阻害に伴って、完全な治療又は予防効果が認められた。

リスク評価に影響を及ぼす可能性のある更なる副次的薬理作用は現時点で認められていない。しかし、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ごく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から安楽死に至った。これは臨床用量の 84.2 倍の曝露量で生じたものであった。

カプラシズマブの投与により、vWF:Ag の低下及びそれに伴う FVIII:C の低下が認められた。vWF がカプラシズマブに結合すると、vWF の消失は促進されるが合成速度は変化しないため、カプラシズマブの投与初期にベースライン vWF:Ag 濃度が減少すると考えられる。

反復投与毒性試験に組み込んだ安全性薬理評価において、影響は認められなかった。

結論として、カプラシズマブの薬理作用は十分に評価され、後天性 TTP 患者の治療におけるその使用が支持された。カプラシズマブは出血時間を延長すると考えられ、高用量では肉眼的な出血事象を引き起こす可能性があるが、臨床で管理することが可能である。本薬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。

参 考 文 献

1. Springer, TA. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. J Thromb Haemost. Jul;9 Suppl 1:130-43 Review (2011)
2. Ulrichts, H, Silence, K, Schoolmeester, A et al. Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared to currently marketed antiplatelet drugs. Blood 118, 757-765 (2011).
3. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. Cell. 1998 Sep 4;94(5):657-66.
4. Dong, JF, Moake, JL, Nolasco, L et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. Blood 100, 4033-4039 (2002).
5. Callewaert, F, Roodt, J, Ulrichts, H et al. Evaluation of efficacy and safety of the anti-vWF Nanobody ALX-0681 in a preclinical baboon model of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood 120, 3603-3610(2012).
6. Feys, HB, Roodt, J, Vandeputte, N et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (Papio ursinus). Blood 116, 2005-2010 (2010).
7. Dong, JF, Berndt, MC, Schade, A et al. Ristocetin-dependent, but not botrocetin-dependent, binding of von Willebrand factor to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex correlates with shear-dependent interactions. Blood 97, 162-168 (2001).
8. Michiels, JJ, Gadisseur, A, van der Planken, M et al. Guidelines for the evaluation of intravenous desmopressin and von Willebrand factor/factor VIII concentrate in the treatment and prophylaxis of bleedings in von Willebrand disease types 1, 2, and 3. Semin.Thromb.Hemost. 32, 636-645 (2006).
9. Ginsburg, D and Bowie, EJ. Molecular genetics of von Willebrand disease. Blood 79, 2507-2519 (1992).
10. Sadler, JE. Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. Blood 101, 2089-2093 (2003).
11. Hyun Tae Lee, Ui Beom Park, Tae Jun Jeong, Nahyeon Gu, Sang Hyung Lee, Yujin Kim, and Yong-Seok Heo. High-resolution structure of the vWF A1 domain in complex with caplacizumab, the first nanobody-based medicine for treating acquired TTP. Biochemical and Biophysical Research Communications 567, 49-55 (2021).
12. Chiu PL, Bou-Assaf GM, Chhabra ES, Chambers MG, Peters RT, Kulman JD, Walz T. Mapping the interaction between factor VIII and von Willebrand factor by electron microscopy and mass spectrometry. Blood 126, 935-938 (2015).

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 ― 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 13

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 9
表2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics 13

1　薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program

Test Article: Caplacizumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics					
Crystal structure of A1-vWF in complex with the Nanobody 12A2h1	A1-domain of human von Willebrand factor	in vitro	Ablynx, Belgium	[A001-MOB-[redacted]-ANR-001-v1]	4.2.1.1-1
Affinity determination of caplacizumab for multimeric vWF	human von Willebrand Factor	in vitro	Ablynx, Belgium	[A068-PHA-[redacted]-ISR-003-V1]	4.2.1.1-2
Biological activity and specificity of caplacizumab	human blood, platelets, plasma or vWF	in vitro	Ablynx, Belgium; [redacted], The Netherlands	[ALX-0081 TR012 V02], [ALX-0081 TR012 V02-Amend]	4.2.1.1-3 4.2.1.1-3a
Effects of caplacizumab on platelet adhesion to endothelial cell-derived UL-vWF	human platelet-rich plasma and HUVEC cells	in vitro	Ablynx, Belgium; [redacted], The Netherlands	[ALX-0081 TR013]	4.2.1.1-4
Effect of caplacizumab on vWF levels	human and cynomolgus plasma; HUVEC cells	in vitro	Ablynx, Belgium; [redacted], The Netherlands	[A001-PHA-[redacted]-ANR-002]	4.2.1.1-5
Effect of caplacizumab on platelet function in human blood with increased vWF:Ag levels	human blood from patients undergoing percutaneous coronary intervention	in vitro	Ablynx, Belgium; [redacted] and [redacted], The Netherlands	[A001-PHA-[redacted]-ANR-001]	4.2.1.1-6

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

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Assessment of in vitro potency of caplacizumab in TTP plasma and bioanalysis assays	plasma and serum from TTP patients	in vitro	Ablynx, Belgium	[24-A0068-[redacted]-0016]	4.2.1.1-7
Pharmacology of caplacizumab for targeting cynomolgus monkey and guinea pig vWF and comparison with human	human, cynomolgus and guinea pig plasma and vWF	in vitro	Ablynx, Belgium	[A068-PHA-[redacted]-ISR-001-V1]	4.2.1.1-8
Caplacizumab species cross-reactivity	plasma from baboons, cynomolgus and rhesus monkeys, pigs, mini-pigs, dogs, rabbits, hamsters, guinea pigs, rats and mice	in vitro	Ablynx, Belgium; [redacted], Germany; [redacted]	[ALX-0081 TR019]	4.2.1.1-9
Affinity of A1-domain of different species for caplacizumab	human, cynomolgus monkey, guinea pig and mouse A1 domain of vWF	in vitro	Ablynx, Belgium; [redacted], Germany; [redacted]	[ALX-0081 TR043]	4.2.1.1-10
Assessment of in vitro target occupancy and target neutralization of caplacizumab in support of the PK/PD modelling for study ALX-0681-2.1/10	plasma from TTP patients	in vitro	Ablynx, Belgium	[24-A0068-[redacted]-0003]	4.2.1.1-11
Efficacy of caplacizumab in a baboon model of acquired TTP	male baboons	subcutaneous injection	[redacted], South Africa; Ablynx, Belgium	[A068-PHA-[redacted]-ANR-001-v1]	4.2.1.1-12

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

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Modeling of the PK/PD of caplacizumab in a baboon model of acquired TTP	male baboons	intravenous and subcutaneous injection	[redacted], South Africa; Ablynx, Belgium	[A068-NC-[redacted]-005]	4.2.1.1-13
Impact of caplacizumab on vWF propeptide levels	plasma from cynomolgus monkey, healthy individuals and TTP patients	in vitro	Ablynx, Belgium	[A068-NC-[redacted]-004]	4.2.1.1-14
Secondary Pharmacodynamics					
Biological activity and specificity of caplacizumab	human blood, platelets, plasma or vWF	in vitro	Ablynx, Belgium; [redacted], The Netherlands; [redacted]	[ALX-0081 TR012 V02], [ALX-0081 TR012 V02-Amend]	4.2.1.1-3 4.2.1.1-3a
Effects of caplacizumab on ADAMTS-13 activity	human platelet-rich plasma and HUVEC cells	in vitro	Ablynx, Belgium; [redacted], The Netherlands	[ALX-0081 TR013]	4.2.1.1-4
Specificity of caplacizumab: blood	human blood	in vitro	Ablynx, Belgium; [redacted], The Netherlands	[ALX-0081 TR020]	4.2.1.2-1

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

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Specificity of caplacizumab: effects on interaction of vWF with fibrillar collagens	human collagen type I or III	in vitro	Ablynx, Belgium	[ALX-0081 TR057]	4.2.1.2-2
Caplacizumab tissue cross-reactivity in rodents and rabbits	mouse, rat, rabbit tissues	in vitro	[redacted], UK	[2710/027]	4.2.1.2-3
Caplacizumab tissue cross-reactivity in guinea pig	guinea pig tissues	in vitro	[redacted], UK	[2710/003]	4.2.1.2-4
Caplacizumab tissue cross-reactivity in monkey	cynomolgus monkey tissues	in vitro	[redacted], UK	[2710/002]	4.2.1.2-5
Caplacizumab tissue cross-reactivity in human	human tissues	in vitro	[redacted], UK	[2710/001]	4.2.1.2-6
Bleeding risk assessment study with caplacizumab in baboons and comparison with Plavix® and ReoPro®	male and female baboons	intravenous bolus and infusion	[redacted], South Africa; Ablynx, Belgium	[ALX-0081 TR008]	4.2.1.2-7
Efficacy and pharmacology of caplacizumab in a Folts model in baboons and comparison with Aspegic®, Heparin, Plavix® and ReoPro®	male and female baboons	intravenous bolus and infusion	[redacted], South Africa; Ablynx, Belgium; [redacted]	[ALX-0081 TR009]	4.2.1.2-8

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

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Specificity of caplacizumab: effects on interaction of vWF with FVIII	human vWF, factor VIII	in vitro	Ablynx, Belgium	[Analysis report - SPR analysis]	4.2.1.2-9

Safety Pharmacology

Safety pharmacology (clinical signs incl. respiratory and circulatory systems, somatomotor activity and behavior patterns; body temperature; ECGs and blood pressure) was assessed in the repeat-dose toxicity studies in cynomolgus monkeys. In addition, an assessment of the preclinical evaluation of cardiovascular safety of caplacizumab (ALX-0081) including assessment of cardiovascular function (heart rate, electrocardiogram (ECG) measurements and blood pressure), as well as of cardiac and vascular post-mortem examination (heart weight, macroscopical examination and histopathology of heart and blood vessels) has been conducted based on data generated in 4 toxicity studies in cynomolgus monkeys and 1 toxicity study in guinea pigs (report [A068-NC-[redacted]-001], 4.2.1.3-1).

Pharmacodynamic Drug Interactions

not assessed

2　効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics

Test Article: Caplacizumab

Type of Study	Species/ Strain	Admin Method	Concentration/Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
Crystal structure of A1-vWF in complex with the Nanobody 12A2h1	A1 domain of human vWF	in vitro	n.a.	n.a.	The epitope of the Nanobody 12A2hum1 on the vWF A1-domain does not overlap with the binding region of the platelet receptor GPIb-IX-V in this domain.	No	[A001-MOB-[redacted]-ANR-001-v1]
Affinity determination of caplacizumab for multimeric vWF	human vWF	in vitro	n.a.	N=3	The apparent affinity of caplacizumab for multimeric vWF was determined to be in the low pM range (3.76 pM).	No	[A068-PHA-[redacted]-ISR-003-V1]
Biological activity and specificity of caplacizumab	human blood, platelets, plasma or vWF	in vitro	various	N=2-7	Caplacizumab completely and concentration-dependently blocks normal plasma-derived vWF multimers.	No	[ALX-0081 TR012 V02], [ALX-0081 TR012 V02 Amend]
Effects of caplacizumab on platelet adhesion to endothelial cell-derived UL-vWF	human platelet-rich plasma and HUVEC cells	in vitro	10 µg/mL	N=1	Caplacizumab completely blocks the interaction of platelets with UL-vWF in vitro.	No	[ALX-0081 TR013]
Effect of caplacizumab on vWF levels	human and cynomolgus plasma; HUVEC cells	in vitro	0.3-100 µg/mL	N=3	Reduction of vWF:Ag levels upon administration of caplacizumab to cynomolgus monkey is modulated by an altered clearance of the vWF/caplacizumab complexes.	No	[A001-PHA-[redacted]-ANR-002]

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics (continued)

Type of Study	Species/ Strain	Admin Method	Concentra-tion/Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
Effect of caplacizumab on platelet function in human blood with increased vWF:Ag levels	human blood from patients undergoing percutaneous coronary intervention	in vitro	0.1-3 µg/mL	N=9	Caplacizumab completely abolishes platelet adhesion to collagen under flow conditions at 0.8 µg/mL in the blood of all patients and completely inhibited RIPA.	No	[A001-PHA-[redacted]-ANR-001]
Assessment of in vitro potency of caplacizumab in TTP plasma and bioanalysis assays	plasma and serum from TTP patients	in vitro	various	N=14	Caplacizumab completely and concentration-dependently blocks vWF multimers in plasma from acquired and congenital TTP subjects. The in vitro concentration of caplacizumab for target neutralization is directly correlated with the target concentration in these plasma samples.	No	[24-A0068-[redacted]-0016]
Pharmacology of caplacizumab for targeting cynomolgus monkey and guinea pig vWF and comparison with human	human, cynomolgus and guinea pig plasma and vWF	in vitro	various	various	Caplacizumab displays a similar binding mode on human, cynomolgus monkey and guinea pig vWF: (i) an avid target interaction is observed and (ii) similar concentration required for full target occupancy compared to the concentration required for in vitro and in vivo target neutralization.	No	[A068-PHA-[redacted]-ISR-001]
Caplacizumab species cross-reactivity	plasma from baboons, Human, cynomolgus and rhesus monkeys, pigs, mini-pigs, dogs, rabbits, hamsters, guinea pigs, rats and mice	in vitro	0.5-20 nM	3/species	Caplacizumab displays similar in vitro pharmacology for cynomolgus monkey and guinea pig vWF. No cross-reactivity of caplacizumab for mouse, rat, dog and rabbit vWF.	No	[ALX-0081 TR019]

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics (continued)

Type of Study	Species/ Strain	Admin Method	Concentra-tion/Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
Affinity of A1-domain of different species for caplacizumab	human, cynomolgus, guinea pig and mouse A1 domain of vWF	in vitro	various	n.a.	The monovalent building block of caplacizumab does interact with similar affinity to cynomolgus monkey vWF A1-domain compared to human vWF A1-domain and only with 10-fold less affinity to guinea pig vWF A1-domain. No interaction with mouse vWF A1-domain is seen.	No	[ALX-0081 TR043]
Assessment of in vitro target occupancy and target neutralization of caplacizumab in support of the PK/PD modelling for study ALX-0681-2.1/10	plasma from TTP patients	in vitro	various	11 patients, N=1-2 per sample	Caplacizumab completely and concentration-dependently blocks vWF multimers in plasma from acquired TTP subjects obtained during an acute episode. A direct correlation is observed between target occupancy and target neutralization.	No	[24-A0068-[redacted]-0003]
Efficacy of caplacizumab in a baboon model of acquired TTP	male baboons	sub-cutaneous injection	2.5 mg/kg, once daily for 5-7 days	4/group	Caplacizumab is able to completely prevent and treat the acute early episodes of TTP in baboons, without indications for increased bleeding risk.	No	[A068-PHA-[redacted]-ANR-001-v1]

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics (continued)

Type of Study	Species/ Strain	Admin Method	Concentration/Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
Modeling of the PK/PD of caplacizumab in a baboon model of acquired TTP	male baboons	sub-cutaneous injection	2.5 mg/kg, once daily for 5-7 days	4/group	A sequential PK/PD model is able to demonstrate a relationship between exposure, vWF:Ag and platelets in a baboon model of acquired TTP	No	[A068-NC-[redacted]-005]
		intra-venous bolus[a]	10; 20; 40 and 80 µg/kg	3 animals			
Impact of caplacizumab on Vwf propeptide levels	plasma from cynomolgus monkey, healthy individuals and TTP patients	in vitro	various	-	-	-	[A068-NC-[redacted]-004]

a intra-individual escalation with 1-2 week intervals

3 副次的薬理試験

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics

Test Article: Caplacizumab

Type of Study	Species/ Strain	Admin Method	Concentration/ Doses[a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
Biological activity and specificity of caplacizumab	human vWF	in vitro	various	N=2-7	Caplacizumab does not interfere with the capacity of vWF to bind to collagen type VI.	No	[ALX-0081 TR012 V02], [ALX-0081 TR012 V02 Amend]
Effects of caplacizumab on ADAMTS-13 activity	human platelet-rich plasma and HUVEC cells	in vitro	10 µg/mL	N=1	Caplacizumab does not interfere with the enzymatic activity of ADAMTS-13.	No	[ALX-0081 TR013]
Specificity of caplacizumab: blood	human blood	in vitro	0.1 µg/mL	N=2-4	Caplacizumab does not bind to human blood cells.	No	[ALX-0081 TR020]
Specificity of caplacizumab: effects on interaction of vWF with fibrillar collagens	human collagen type I or III	in vitro	0.01-100 µg/mL	N=3	Caplacizumab does not interfere with the capacity of vWF to interact with fibrillar collagens.	No	[ALX-0081 TR057]
Caplacizumab tissue cross-reactivity in guinea pig	guinea pig tissues	in vitro	2.875; 5.75 and 11.5 µg/mL	N=1/conc.	Caplacizumab binds to guinea pig tissues, congruent with vWF expression. No off-target binding observed.	Yes	[2710/003]

a Single dose otherwise specified.

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics (continued)

Type of Study	Species/ Strain	Admin Method	Concentration/ Doses[a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
Caplacizumab tissue cross-reactivity in rodents and rabbits	mouse, rat, rabbit tissues	in vitro	2.875; 5.75 and 11.5 µg/mL	N=1/conc.	No specific positive staining with caplacizumab observed in mouse and rat tissues. Specific positive staining observed only in rabbit stomach, testis and thymus tissues.	Yes	[2710/027]
Caplacizumab tissue cross-reactivity in monkey	cynomolgus monkey tissues	in vitro	2.875; 5.75 and 11.5 µg/mL	N=1/conc.	Caplacizumab binds to cynomolgus monkey tissues, congruent with vWF expression. No off-target binding observed.	Yes	[2710/002]
Caplacizumab tissue cross-reactivity in human	human tissues	in vitro	2.875; 5.75 and 11.5 µg/mL	N=1/conc.	Caplacizumab binds to human tissues, congruent with vWF expression. No off-target binding observed.	Yes	[2710/001]
Bleeding risk assessment study with caplacizumab in baboons and comparison with Plavix® and Reopro®	baboon	intra-venous bolus and infusion	10+30+90+ 270 µg/kg or 30 µg/kg + 45 µg/kg/h x 5h	N=6 (dose escalation); N=3 (infusion)	Although skin bleeding time was prolonged at the effective dose of all three compounds, this effect was shorter lasting for caplacizumab and the overall blood loss was lower.	No	[ALX-0081 TR008]
Efficacy and pharma-cology of caplacizumab in a Folts model in baboons and comparison with Aspegic®, Heparin, Plavix® and ReoPro®	baboon	intra-venous bolus and infusion	3; 13; 43; 133 and 403 µg/kg	9 male or female animals	Aspegic® and Heparin were not effective in this model. At efficacious doses, caplacizumab was associated with a lower bleeding risk than Plavix® and ReoPro®.	No	[ALX-0081 TR009]

a Single dose otherwise specified.

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics (continued)

Type of Study	Species/ Strain	Admin Method	Concentration/ Doses[a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
Specificity of caplacizumab: effects on interaction of vWF with Factor VIII	human vWF, factor VIII	in vitro	10 nM	N=1	Caplacizumab does not interfere with the capacity of vWF to interact with factor VIII.	No	[Analysis report - SPR analysis]

a Single dose otherwise specified.

4　安全性薬理試験

Test Article: Caplacizumab

Safety pharmacology (clinical signs incl. respiratory and circulatory systems, somatomotor activity and behavior patterns; body temperature; ECGs and blood pressure) was assessed in the repeat-dose toxicity studies in cynomolgus monkeys. In addition, an assessment of the preclinical evaluation of cardiovascular safety of caplacizumab (ALX-0081) including assessment of cardiovascular function (heart rate, electrocardiogram (ECG) measurements and blood pressure), as well as of cardiac and vascular post-mortem examination (heart weight, macroscopical examination and histopathology of heart and blood vessels) has been conducted based on data generated in 4 toxicity studies in cynomolgus monkeys and 1 toxicity study in guinea pigs (report [A068-NC-[redacted]-001]).

5　薬力学的薬物相互作用試験

Not applicable.