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

2.6.6 毒性試験の概要文

Total number of pages: 47

目　　次

2.6.6 毒性試験の概要文 1

目　　次 2

表　目　次 4

図　目　次 4

略号と用語の定義 5

1　　まとめ 6

2　　単回投与毒性試験 8

3　　反復投与毒性試験 9

3.1　　モルモットを用いた反復投与毒性試験 9

3.2　　カニクイザルを用いた反復投与毒性試験 10

3.2.1　　カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験 10

3.2.2　　カニクイザルを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験 13

3.2.3　　カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験 16

4　　遺伝毒性試験 24

5　　がん原性試験 25

6　　生殖発生毒性試験 30

6.1　　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 30

6.2　　胚・胎児発生に関する試験 30

6.3　　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 31

7 局所刺激性試験 32

8 その他の毒性試験：免疫原性試験 33

8.1 カニクイザル及びモルモットを用いた単回投与毒性試験における免疫原性 33

8.2 カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験における免疫原性 34

8.3 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における免疫原性 34

8.4 カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験における免疫原性 35

8.5 モルモットを用いたカプラシズマブの筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験における免疫原性 35

8.6 妊娠モルモットを用いたカプラシズマブの連日反復筋肉内投与による TK 及び PD 試験における免疫原性 36

9 考察及び結論 38

参 考 文 献 45

表　目　次

表 1 - カプラシズマブについて実施した毒性試験 6

表 2 - モルモットを用いた 13 週間反復投与毒性試験における主要所見 10

表 3 - カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験で観察された vWF:Ag 及び FVIII:C 値の最大変化の要約（[redacted]20095/[redacted] 及び [redacted]22631 試験） 11

表 4 - カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験の主要な所見 14

表 5 - カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験で観察された vWF:Ag 及び FVIII:C 値の最大変化の要約（[redacted]24024 試験） 15

表 6 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験で観察された vWF:Ag 及び FVIII:C 値の最大変化の要約（AA93337 試験） 19

表 7 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験における主要な所見 23

表 8 - VWD 患者で報告されたがん症例の概要 27

表 9 - 単回投与毒性試験における免疫原性データの要約 34

表 10 - 反復投与毒性試験における免疫原性データの要約 36

図　目　次

図 1 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験における vWF:Ag 及び FVIII:C 血漿中濃度の比較 20

図 2 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験の高用量群（40 mg/kg/日）の動物 M2234 における vWF:Ag 及び FVIII 特性 22

図 3 - ヒトを対象とした第 I 相臨床試験、カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験及びモルモットを用いた 13 週間反復投与毒性試験における血漿中 vWF:Ag 及び FVIII:C 値経時変化曲線の比較 40

図 4 - モルモットを用いた 13 週間反復投与毒性試験及び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 RICO アッセイにより示された vWF 活性の中和を指標とするカプラシズマブの薬力学活性 43

略号と用語の定義

ADA	抗薬物抗体（Anti-drug antibodies）
AFA	抗FVIII抗体（Anti-FVIII antibodies）
aPTT	活性化部分トロンボプラスチン時間（Activated partial thromboplastin time）
AUC	曲線下面積（Area under the curve）
CI	信頼区間（Confidence interval）
C_{max}	最高血清中濃度（Maximum serum concentration）
ECG	心電図（Electrocardiogram）
ESR	赤血球沈降速度（Erythrocyte sedimentation rate）
FVIII:C	凝固第VIII因子活性（Factor VIII clotting activity）
FVIII	凝固第VIII因子（Factor VIII）
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）
GMR	幾何平均比（Geometric mean ratio）
GPIb-IX-V	糖タンパク質Ib-IX-V （glycoprotein Ib-IX-V）
ICH	医薬品規制調和国際会議（International Council of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use）
LDH	乳酸脱水素酵素（Lactate dehydrogenase）
LMWH	低分子量ヘパリン（Low molecular weight heparin）
NOAEL	無毒性量（No observed adverse effect level）
PD	薬力学（Pharmacodynamic）
PK	薬物動態（Pharmacokinetic）
RICO	リストセチン・コファクター活性（Ristocetin cofactor activity）
SMQ	標準検索式（Standardised MedDRA Query／MedDRA）
TK	トキシコキネティクス（Toxicokinetic）
TTP	血栓性血小板減少性紫斑病（Thrombotic thrombocytopenic purpura）
VWD	von Willebrand 病（von Willebrand disease）
vWF:Ag	von Willebrand 因子抗原（von Willebrand Factor antigen）
vWF	von Willebrand 因子（von Willebrand Factor）

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）の毒性評価を、ICH S6(R1)に従い、2つの非臨床動物種（げっ歯類動物種としてモルモット、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、von Willebrand因子（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*で示された薬力学効果の検討に基づいて選択された（Module[2.6.2]の表2に要約）。

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	静脈内ボーラス投与	[redacted]20093/[redacted]	適用
用量漸増試験	カニクイザル	静脈内ボーラス投与	[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投与	[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	皮下投与	[redacted]24023	適用
2週間反復投与毒性試験	カニクイザル	静脈内ボーラス投与	[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投与	[redacted]22631	適用
13週間反復投与毒性試験	カニクイザル	皮下投与	[redacted]24024	適用
26週間反復投与毒性試験	カニクイザル	皮下投与	AA93337	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	筋肉内投与	[redacted]20179/[redacted]	適用
妊娠モルモットを用いたTK/PD試験	モルモット、ダンキン・ハートレイ	筋肉内投与	[redacted]25265	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、静脈周囲及び皮下投与	[redacted]20340/[redacted]	適用

a　すべてのGLP適用試験は経済協力開発機構（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）及び最大曝露量が得られるように設計した。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、非臨床毒性試験で観察された所見（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）及び血液凝固第 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（図 3）。

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、投与後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）による増悪あるいは阻害性抗 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 匹に投与後認められた（3 項参照）。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）が得られた。

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。補助的トキシコキネティクス（TK）/薬力学（PD）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、成熟した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十分に特徴づけられており、血栓性血小板減少性紫斑病の患者を対象とした本薬の使用は支持された。本薬をヒトに使用する際に障害となる所見は認められなかった。

2　単回投与毒性試験

単回投与毒性試験を、モルモット及びカニクイザルを用いて実施した。

[[redacted]20093/[redacted]試験]では、1 群雌雄各 5 匹のダンキン・ハートレイ系モルモットに、カプラシズマブを 0（プラセボ）、2 又は 20 mg/kg の用量で静脈内ボーラス投与した。毒性の徴候は認められなかった。

[[redacted]20094/[redacted]試験]では、雌雄各 2 匹のカニクイザルに、カプラシズマブを 0（プラセボ）、7.5、74.7 及び 747 µg/kg の用量で静脈内ボーラス投与した。投与間に 2～3 日のウォッシュアウト期間をおいた。試験を通して毒性の徴候は認められなかった。

[[redacted]22630/1 試験]では、1 群雌雄各 3 匹のカニクイザルに、カプラシズマブを 0（プラセボ）、0.02、0.4 又は 8 mg/kg の用量で皮下又は静脈内ボーラス投与した。投与関連の局所刺激性反応及び忍容性のない全身性反応はみられず、途中死亡例も認められなかった。

カプラシズマブの高用量を皮下又は静脈内投与された雄あるいは雌において、vWF:Ag 値の減少が、対照群と比較して試験 2～4 日目に認められた。

カプラシズマブを皮下又は静脈内投与されたすべての群における投与前の FVIII:C 値は、対照群とほぼ同程度又はわずかに低かった。全体として、中及び高用量群の雄あるいは雌では、用量に依存した FVIII:C 値の減少が投与の約 1～2 時間後に認められた。FVIII:C 値の最大の変化は、皮下投与後では試験 3 日目に、静脈内投与後では試験 2 日目に、それぞれ認められた。わずかな変化は上記の低用量群でも雌の全例にみられたが、投与の約 4 時間後には認められなかった。中及び高用量静脈内投与群の雌における FVIII:C 値の多くは、試験 15 日目にも引き続き有意な減少を示したが、その他のすべての投与群では試験 3 又は 4 日目以降、FVIII:C 値は正常に戻った。

カプラシズマブを 0.02、0.4 及び 8 mg/kg の用量で皮下又は静脈内投与されたいずれの動物においても、体重、体重増加量、摂餌量、摂水量及び血液学的パラメータにおいて、投与関連の影響は対照群と比較して認められなかった。剖検時の肉眼観察では投与関連の変化はみられなかった。病理組織学的検査では、カプラシズマブの投与に関連すると考えられる形態学的変化は認められなかった。

3　反復投与毒性試験

3.1　モルモットを用いた反復投与毒性試験

カプラシズマブをモルモットに 6 時間間隔で 1 日 4 回、13 週間（92 日間）にわたって反復皮下投与したときの亜慢性毒性を確認するとともに、変化がみられた場合の 8 週間回復期間終了時における回復性を評価するため、[[redacted] 24023 試験]を実施した。

死亡例は認められなかった。0.4、4 及び 40 mg/kg/日の用量において、投与関連の局所刺激性反応はみられなかった。剖検時の肉眼観察では、すべての投与群の数例において、注射部位の皮下組織出血が観察された。発現頻度及び重症度は用量に伴って増加した。この変化は、抗血栓剤であるカプラシズマブの薬理作用に関連したものである。病理組織学的検査では、雌雄の動物の注射部位において、いかなる投与関連の毒性変化も認められなかった。

カプラシズマブ投与動物において、いずれの血液学的パラメータにも、投与関連の影響は認められなかった。血液生化学的パラメータの検査では、血液凝固に対するカプラシズマブの作用に関連する可能性がある血漿中アルブミン、グロブリン及び総タンパク値に、用量に依存した変化がみられた。

vWF:Ag 及び FVIII:C 値が、すべてのカプラシズマブ投与群で、試験 1 又は 2 日目以降に、対照群と比較して減少した。vWF:Ag 値の減少は、低用量群では 6～37%、中用量群では 5～37%、高用量群では 5～40%であり、FVIII:C 値の減少は、低用量群では 15～32%、中用量群では 7～27%、高用量群では 5～36%であった。注射部位の所見及び血液生化学的パラメータの変化には完全な回復性が認められた。vWF:Ag 値の変化は、試験 93 及び 95 日目には完全に消失した。以前に高用量での投与を受けた動物で、ごく軽度の FVIII:C 減少が試験 93 及び 95 日目に認められた。

体重、体重増加量、摂餌量、摂水量、血液学的検査及び尿検査のパラメータ、赤血球沈降速度（ESR）、眼又は視覚領域、聴力、相対及び絶対器官重量並びに骨髄球系／赤芽球系比には、検討したいずれの用量においても投与関連の影響はみられなかった。

剖検時の肉眼観察では、いかなる投与関連の毒性変化も認められなかった。病理組織学的検査では、カプラシズマブの投与に関連すると考えられる形態学的変化はみられなかった。

試験期間中、抗血栓作用により誘発された異常な出血は認められなかった。本試験においてカプラシズマブを皮下投与したときの NOAEL は、40 mg/kg/日であった。

本試験の主要な所見並びに TK 及び PD データを表 2 に要約する。概要表を Module 2.6.7 [表 2.6.7.7.1] に示す。

表 2 - モルモットを用いた 13 週間反復投与毒性試験における主要所見

試験の種類	投与量 (mg/kg/日) 1 日 4 回（6 時間ごと）皮下投与	$C_{max,\ Day\ 3}$ (µg/mL)	$AUC_{tau,\ Day\ 3}$ (µg•h/mL)	RICO（対照群との比較による%変化）、91 日目	主要な所見
モルモットを用いた 13 週間反復投与毒性試験 [redacted]24023 試験	0.4	1.078	5.479	-54.0	FVIII:C 減少（雌のみ）
	4	2.197	10.45	-83.3	FVIII:C 及びアルブミン／グロブリン比減少（雌のみ）、グロブリン増加（雌のみ）
	40	9.984	49.97	-84.9	FVIII:C 及びアルブミン減少（雌のみ）、グロブリン及び総タンパク増加（雌雄）、アルブミン／グロブリン比減少（雌雄）

すべてのデータは雌雄を併合した群平均値である。RICO：リストセチン・コファクター活性

3.2 カニクイザルを用いた反復投与毒性試験

3.2.1 カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験

カニクイザルを用いた複数の用量（4 時間間隔で 1 日 6 回静脈内あるいは皮下投与）での 2 週間反復投与毒性試験を実施した（[[redacted]20095/[redacted] 試験][[redacted]22631 試験]）。すべての用量において、評価項目は一般状態観察、体重、摂餌量、摂水量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、ESR、器官重量、病理組織学的検査及び骨髄塗抹標本の骨髄球系／赤芽球系比とした。また、いずれの試験においても、安全性薬理評価項目として、ECG（心拍数及び電気的複合体）、血圧、眼又は視覚領域及び聴力の検査を実施した。

毒性の徴候はみられず、器官及び組織の変化は認められなかった。vWF:Ag 値減少又は vWF 活性欠如のみられる von Willebrand 病（VWD）患者における症状として報告されている月経過多の有無について特に注意して観察した。[redacted]22631 試験の投与期間中、9 匹の雌カニクイザルで月経がみられたが、異常出血は認められなかった。FVIII:C 及び vWF:Ag 濃度のベースラインからの減少がすべての投与群でみられた。vWF:Ag 及び FVIII:C 値において観察された投与群及び雌雄ごとの最大変化の概要を表 3 に示す。いずれの試験においても、NOAEL は 12 mg/kg/日静脈内及び皮下投与（2 mg/kg/回の用量での 1 日 6 回）であった。概要表を Module 2.6.7 [表 2.6.7.7.2]及び[表 2.6.7.7.3]に示す。

表 3 - カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験で観察された vWF:Ag 及び FVIII:C 値の最大変化の要約（[redacted]20095/[redacted] 及び [redacted]22631 試験）

2 週間反復静脈内投与毒性試験 [redacted]20095/[redacted] 試験		vWF:Ag				FVIII:C			
		個体別値		平均値		個体別値		平均値	
投与量	性	底値(U/mL)	底値 (%)	底値(U/mL)	底値 (%)	底値(U/mL)	底値 (%)	底値(U/mL)	底値 (%)
0 mg/kg （対照）	雄	0.35	34.0	0.43	17.1	0.80	46.7	0.95	37.0
	雌	0.37	27.5	0.40	21.3	0.74	61.8	1.01	39.5
LD 0.006 mg/kg、 MD 0.0015 mg/kg （低用量）	雄	0.21	56.3	0.31	39.2	0.78	54.5	0.96	46.2
	雌	0.23	53.8	0.35	29.9	0.43	76.4	0.77	57.6
LD 0.6 mg/kg、 MD 0.2 mg/kg （中用量）	雄	0.14	76.7	0.28	46.6	0.16	91.8	0.30	80.9
	雌	0.13	72.9	0.28	42.9	0.08	95.4	0.48	72.1
LD 6 mg/kg、 MD 2 mg/kg （高用量）	雄	0.14	72.5	0.23	57.1	0.25	85.6	0.38	78.4
	雌	0.12	76.4	0.20	63.0	0.11	92.5	0.35	78.8

変化は、観察された最小絶対値（底値、U/mL）及びベースラインからの最大相対減少（底値、%減少）として示す。
個体別値：値は投与群及び雌雄ごとの個々の動物の底値を示す。
平均値：値は投与群及び雌雄ごとの平均底値を示す。平均底値（%減少）は以下のように算出した：平均相対減少は、投与群及び雌雄ごとの個々の動物全例について、時点ごとに算出した（各動物の個体別ベースラインと比較した%減少）。それに続いて平均底値（%減少）を記載した。
LD：負荷用量、MD：維持用量、U：単位

表 3 - カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験で観察された vWF:Ag 及び FVIII:C 値の最大変化の要約（[redacted] 20095/[redacted] 及び [redacted] 22631）（続き）

2 週間反復皮下投与毒性試験 [redacted]22631 試験		vWF:Ag				FVIII:C [a]			
		個体別値		平均値		個体別値		平均値	
投与量	性	底値 (U/mL)	底値 (%減少)	底値 (U/mL)	底値 (%減少)	底値 (U/mL)	底値 (%減少)	底値 (U/mL)	底値 (%減少)
皮下 0 mg/kg/4 時間（対照）	雄	1.36	48.1	2.00	35.3	0.62	72.6	0.70	68.5
	雌	1.85	32.0	2.50	26.8	0.76	65.6	1.00	60.1
皮下 0.02 mg/kg/4 時間	雄	0.74	77.8	1.33	64.1	0.32	86.4	0.55	76.3
	雌	0.41	81.9	0.56	75.1	0.16	91.2	0.24	82.9
皮下 0.4 mg/kg/4 時間	雄	0.50	86.3	0.52	82.9	0.12	94.3	0.15	92.9
	雌	0.36	83.2	0.70	74.1	0.17	91.0	0.24	86.5
皮下 2 mg/kg/4 時間	雄	0.28	85.0	0.47	80.6	0.12	94.6	0.20	89.9
	雌	0.49	84.4	0.67	77.5	0.16	92.8	0.22	90.2
静脈内 0 mg/kg/4 時間（対照）	雄	1.42	39.1	2.47	24.9	0.77	66.8	0.95	63.9
	雌	0.80	55.6	0.80	55.6	0.52	63.4	0.52	63.4
静脈内 2 mg/kg/4 時間	雄	0.61	77.1	0.87	70.1	0.36	85.5	0.62	78.0
	雌	0.40	81.8	0.56	76.8	0.17	94.4	0.26	87.5

a 外れ値はデータセットから除外した。

3.2.2 カニクイザルを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験

カプラシズマブをカニクイザルに 6 時間間隔で 1 日 4 回、13 週間（92 日間）反復皮下投与したときの亜慢性毒性を確認するとともに、変化がみられた場合の 8 週間回復期間終了時における回復性を評価するため、[[redacted]24024 試験]を実施した。

途中死亡例は認められなかった。カプラシズマブを 0.4、4 又は 40 mg/kg/日の用量で投与されたカニクイザルで、注射部位にごく軽度から重度の血腫及び腫脹が投与期間中に観察され、用量依存性が認められた。病理組織学的検査では、雌雄カニクイザルの注射部位において、いかなる投与関連の変化もみられなかった。

カプラシズマブの抗血栓作用に起因する異常な出血が、4 mg/kg/日群の雄 1 匹（注射部位）及び雌 1 匹（注射部位及び過度の月経出血）並びに 40 mg/kg/日群の雌 1 匹（注射部位、鼻及び歯肉）において、少数の試験日（最長 3 日間）で観察された。最初の発現は 15 回目投与後であった。更なる行動及び外観の変化は認められなかった。

対照群と比較した vWF:Ag 及び FVIII:C 値の減少が、すべてのカプラシズマブ投与群で、試験 2 日目以降に認められた。vWF:Ag 値の減少は、低用量群では 42～79%、中用量群では 52～92%、高用量群では 48～82%であった。FVIII:C 値の減少は、低用量群では 26～71%、中用量群では 47～85%、高用量群では 26～66%であった。

また、尿中総ビリルビン濃度の増加が、4 mg/kg/日群の雌 3 匹中 1 匹並びに高用量（40 mg/kg/日）群の雄 5 匹中 1 匹及び雌のほぼ全例で、試験 65 及び 88/89 日目にみられた。

回復期間終了時には、注射部位血腫及び尿中ビリルビン値増加は完全に正常化した。

体重、体重増加量、摂餌量、摂水量、血液学的検査、血液生化学的検査、ESR、眼又は視覚領域、聴力、相対及び絶対器官重量並びに骨髄球系／赤芽球系比には、いずれの用量においても投与関連の影響は認められなかった。また、検討した安全性薬理パラメータ［心血管系機能（収縮期及び拡張期血圧、心拍数、電気的複合体、心臓調律及び波形）、呼吸系及び呼吸数の評価を含めたケージサイド観察による身体運動活性及び行動パターン］において、投与関連の変化は認められなかった。

剖検時の肉眼観察では、投与関連の変化は認められなかった。病理組織学的検査（腎臓も含む）では、カプラシズマブの投与に関連すると考えられる形態学的変化はみられなかった。

本試験におけるカプラシズマブの皮下投与による NOAEL は、40 mg/kg/日であった。

本試験の主要な所見並びにトキシコキネティクス及び薬力学データを表 4 に要約する。本試験の概要表を Module 2.6.7 [表 2.6.7.7.4]に示す。

表 4 - カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験の主要な所見

試験の種類	投与量 (mg/kg/日) 1 日 4 回（6 時間ごと）皮下投与	$C_{max,\ Day\ 3}$ (µg/mL)	$AUC_{tau,\ Day\ 3}$ (µg•h/mL)	RICO（対照群と比較した%変化）、91 日目	主要な所見
カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験 [redacted]24024 試験	0.4	0.874	4.605	-100	FVIII:C 及び vWF:Ag の減少
	4	1.718	9.390	-100	FVIII:C 及び vWF:Ag の減少、尿中ビリルビン増加（雌 1/3 匹）
	40	15.84	85.16	-100	FVIII:C 及び vWF:Ag の減少、尿中ビリルビン増加（雄 1/5 匹及び雌 5/5 匹）

すべてのデータは雌雄の動物を合わせた群平均値である。RICO：リストセチン・コファクター活性

カニクイザルにおいて、薬理作用により FVIII:C 及び vWF:Ag 濃度が減少した。すべての投与群において、両パラメータの減少は速やかかつ顕著であった。vWF:Ag 及び FVIII:C 値について観察された最大変化の概要を、投与群及び雌雄別に表 5 に示す。

予想外のこととして、程度は投与群よりはるかに低かったが、対照動物においても vWF:Ag 及び FVIII:C 値がしだいに減少した。この変化の理由は不明である。血漿検体の薬物動態（PK）解析により、これらの動物はカプラシズマブに曝露されなかったことが確認された。可能性のある説明として、頻繁な採血による血漿中 vWF:Ag 及び FVIII:C 値への影響が考えられる。この所見に一致して、一過性の赤血球減少及び代償性の骨髄反応（網状赤血球増加）が認められた。血小板数の変化は認められなかった。

表 5 - カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験で観察された vWF:Ag 及び FVIII:C 値の最大変化の要約（[redacted]24024 試験）

13 週間反復投与毒性試験 [redacted]24024 試験 [a]		vWF:Ag				FVIII:C [b]			
		個体別値		平均値		個体別値		平均値	
投与量	性	底値 (U/mL)	底値 （%減少）	底値 (U/mL)	底値 （%減少）	底値 (U/mL)	底値 （%減少）	底値 (U/mL)	底値 （%減少）
0 mg/kg （対照）	雄	1.02	62.8	1.67	43.1	1.13	56.9	1.27	47.2
	雌	0.69	55.1	1.31	27.5	0.98	56.8	1.16	39.7
0.4 mg/kg/日	雄	0.34	82.6	0.59	76.9	0.40	82.4	0.54	72.6
	雌	0.29	83.6	0.38	79.8	0.30	84.1	0.46	78.1
4 mg/kg/日	雄	0.10	95.3	0.26	87.5	0.09	96.0	0.28	86.7
	雌	0.09	96.1	0.16	90.1	0.07	96.4	0.32	83.6
40 mg/kg/日	雄	0.23	89.2	0.50	74.9	0.37	80.0	0.63	66.7
	雌	0.29	84.7	0.51	73.5	0.42	78.6	0.72	60.0

変化は、観察された最低の絶対値（底値、U/mL）及びベースラインからの最大相対減少（底値、%減少）として示す。

個体別値：値は投与群及び雌雄ごとの個々の動物の底値を示す。

平均値：値は投与群及び雌雄ごとの平均底値を示す。平均底値（%減少）は以下のように算出した：平均相対減少は、投与群及び雌雄ごとの個々の動物全例について、時点ごとに算出した（各動物の個体別ベースラインと比較した%減少）。それに続いて平均底値（%減少）を記載した。

U：単位

a この概要では回復時点は計算に入れなかった。

b 分析の外れ値はデータセットから削除した。

3.2.3　カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験

13 週間反復投与毒性試験でモルモット及びカニクイザルにおける薬理作用を比較した結果に基づき、26 週間反復投与毒性試験（[AA93337 試験]）を実施する動物種としてカニクイザルを選択した。カニクイザルは、カプラシズマブによる vWF:Ag 及び FVIII:C 値の減少に関して、ヒトでの状況に最も近いことが示されている。カニクイザルにカプラシズマブを 0、0.135、1.35 又は 13.5 mg/kg/回で 1 日 3 回（0、0.4、4 又は 40 mg/kg/日）の用量、26 週間皮下投与した。投与期間の後に 13 週間の回復期間をおいた。

PK モデリングを用いた予測に基づき、曝露量を最大（13 週間反復投与毒性試験と同程度）にするため、投与スケジュール（6 時間間隔で 2 回投与後、12 時間おいて 1 回投与）を選択した。評価パラメータに対するストレスの影響及び概日リズムの乱れを最小化するため、このスケジュールを使用し、夜間には動物の取扱いを行わなかった。13 週間反復投与毒性試験と同じ投与レジメンを採用すると、概日リズムの乱れが影響する懸念があった。

本試験の概要表を Module 2.6.7[表 2.6.7.7.5]に示す。

死亡

対照群の雄 1 匹（M 2203）は、2 回の心呼吸停止がみられた後、91 日目に途中安楽死させた。

高用量群の雄 1 匹（M 2234）は、貧血の持続的徴候及び出血傾向増加がみられたため、85 日目に途中安楽死させた。所見の詳細は後述する。

一般状態の変化

長期投与後に注射部位の硬結及び浮腫がすべての投与群で観察された。これは過去の毒性試験における所見と類似していた。これらの所見に関連して、フィブリン沈着を伴う出血及びリンパ系細胞集簇といった急性及び慢性炎症性の病理組織学的変化が観察された。発現頻度あるいは重症度は投与群の方が対照群よりわずかに高く、すべての変化は投与中止後に回復した。

カプラシズマブの薬理作用が粘膜出血傾向増加として発現し、注射部位の出血又は血痕が、中用量群（3 回）及び高用量群（1 回）の 2 匹で散見された。0.4 mg/kg/日群の雄 1 匹で、鼻腔からのごく軽度の出血が散見された。外皮蒼白化が中用量群の雄 1 匹及び高用量群の雄 4 匹で観察された。体幹又は四肢の血腫が、0.4 mg/kg/日群の 2 匹及び 4 mg/kg/日群の 1 匹で認められた。これらの所見は投与期間中に観察され、カプラシズマブの抗血栓作用により予想される結果であった。

体重、摂餌量、眼科学的検査、及び検討した安全性薬理パラメータ（心血管系機能［収縮期及び拡張期血圧、心拍数、電気的複合体、心調律並びに波形］、呼吸系及び呼吸数の評価を含むケージサイド観察による身体運動活性及び行動パターン）において、カプラシズマブ投与関連の毒性変化は認められなかった。血清生化学的検査及び尿検査のパラメータには、明らかな変化はみられなかった。

赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン、網状赤血球数など）の変化が、対照群及びカプラシズマブ投与群でみられたが、後者の変化がより顕著であった。観察された変化は主に投与の最初の 2

週間（すなわち検体採取が最も集中的であった時期）にみられ、一部の動物では試験のより後半の時点でも散見された。所見は試験中に採取した血液検体の数及び容量が多かったことに関連している可能性がある。

高用量群では、1匹の個体（M2233、下記参照）における変化に起因する平均血小板数のごく軽度の減少が認められた。活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）延長が、試験を通してすべての投与群の雄並びに中及び高用量群の雌でみられたが、これは薬理作用により予測される変化（FVIII:C減少による二次的変化、下記参照）であった。すべての群の一部の動物で個別的かつ散発的なESR亢進がみられ、一部の動物ではそれに関連してフィブリノゲンが増加したが、それに伴う一般状態の変化は認められなかった。

総白血球数及び白血球百分率は概ね対照群の範囲内に留まっており、背景対照データ範囲内又はそれに近かった。各群（対照群を含む）の少数例で、背景対照データ範囲から外れた好酸球数増加が数回認められた。リンパ球サブセットには投与関連の変化は認められなかった。高用量群の雌1匹で、ナチュラルキラー細胞（CD8+/CD16+として判定）の比率低下が、119日目から181日目（最終投与日）まで及び回復期間を通して認められた。

投与に誘発された血液学的パラメータ（赤血球パラメータ、血小板数、aPTT）の変化は、回復期間終了時に完全な回復がみられた。

13週間反復投与毒性試験の結果に基づいて予想されたとおり、カプラシズマブ投与群の全例でvWF:Ag及びFVIII:Cが減少した。減少はすべての投与群で1日目（初回投与24時間後）から14日目まで認められた。その後、vWF:Ag及びFVIII:Cの平均値増加が、最高用量群で最も顕著に認められた（1匹の動物M2233の外れ値データにより影響を受けた可能性あり）。投与期間中、vWF:Ag及びFVIII:C値は投与前値に達しなかった（外れ値のみられたM2233を除く）。4 mg/kg/日群の雄1匹（M2224）で投与期間中にFVIII:Cの持続的な低値がみられたため、観察を延長するため回復性試験群に再度割り付けた。回復期間終了時のvWF:Ag及びFVIII:C値は正常範囲内であった。対照群を含むすべての投与群で投与最終日にみられた種々のパラメータの変化は、集中的な採血による二次的変化と解釈された。観察されたvWF:Ag及びFVIII:C値の最大変化の要約を、投与群及び雌雄別に表6に示す。vWF:Ag及びFVIII:C値の血漿中濃度の比較を図1に示す。2匹の動物（ADA陽性が確認され曝露量への影響がみられたF2220及び途中安楽死させたM2234）は、明瞭化のためデータ解析及び平均値の図示から除外し、個体別値として示した。

浮腫様の外観が散見される注射部位の硬結あるいは暗色化が、剖検時に対照群及び投与群の動物のすべての注射部位に認められた。これに関連する病理組織学的所見として、急性及び慢性の炎症性変化が観察され、発現頻度あるいは重症度は投与群の方がわずかに高かった。

投与期間終了時に、薬物投与群の動物では、プラセボ投与対照群の動物と比較して、腋窩リンパ節及び脾臓における二次リンパ濾胞の発達増加がみられた。これは注射部位の炎症性変化に関連すると考えられた。

投与期間終了時の剖検で、高用量群の雌2匹（F2235、F2237）において、胸骨及び大腿骨の骨髄の全般的細胞数増加及び赤血球系細胞増殖が認められた。これらの変化は注射部位の出血及び炎症性変

化による二次的変化と考えられたが、所見の重症度には同じ群の他の動物と比較して相関がみられなかった。

13 週間の回復期間後に、上記の変化（注射部位、リンパ節及び骨髄）はほぼ完全に回復した。

26 週間の投与期間終了時又は 13 週間の回復期間後に安楽死させた動物でみられた他のすべての病理組織学的変化は、偶発的又は投与とは無関係と考えられた。

20%の閾値を下回る vWF 活性中和［RICO（リストセチン・コファクター活性）アッセイ］を指標とする速やかかつ持続的な PD 効果が、投与期間中に中及び高用量群のほぼ全例で観察された。低用量群における PD 効果には、閾値の 20%付近での変動が認められた。

抗薬物抗体応答（ADA）がすべての投与群で検出された。低用量群の雌 1 匹では、活性薬物曝露量が失われた（PK 及び PD マーカーの減少）ため、毒性学的評価から除外した。

表 6 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験で観察された vWF:Ag 及び FVIII:C 値の最大変化の要約（AA93337 試験）

26 週間反復投与毒性試験 (AA93337 試験) *a,b,c*		**vWF:Ag**				**FVIII:C**			
		個体別値		**平均値**		**個体別値**		**平均値**	
投与量	**性**	**底値 (U/mL)**	**底値 （%減少）**	**底値 (U/mL)**	**底値 （%減少）**	**底値 (U/mL)**	**底値 （%減少）**	**底値 (U/mL)**	**底値 （%減少）**
0 mg/kg （対照）	**雄**	1.20	31.4	2.26	14.2	1.38	31.2	1.49	23.3
	雌	1.17	44.8	1.74	17.4	1.18	44.6	1.51	31.0
0.4 mg/kg/日 *c*	**雄**	0.15	87.4	0.83	70.0	0.18	89.7	0.91	56.7
	雌	0.78	71.1	1.17	59.2	1.04	57.2	1.30	47.4
4 mg/kg/日	**雄**	0.21	92.9	0.83	74.1	0.20	89.6	0.85	60.9
	雌	0.54	83.6	0.58	76.8	0.70	67.6	0.95	54.5
40 mg/kg/日 *b*	**雄**	0.43	76.1	1.00	62.4	0.74	53.2	1.13	42.0
	雌	0.51	76.3	0.87	63.7	1.04	56.1	1.27	42.9

変化は、観察された最低の絶対値（底値、U/mL）及びベースラインからの最大相対減少（底値、%減少）として示す。

個体別値：値は投与群及び雌雄ごとの個々の動物の底値を示す。

平均値：値は投与群及び雌雄ごとの平均底値を示す。平均底値（%減少）は以下のように算出した：平均相対減少は、投与群及び雌雄ごとの個々の動物全例について、時点ごとに算出した（各動物の個体別ベースラインと比較した%減少）。それに続いて平均底値（%減少）を記載した。

U：単位

a この概要では回復時点は計算に入れなかった。

b 動物 M2234（40 mg/kg/日）は途中安楽死例であり、投与が 2 回中断されたため、この動物の vWF:Ag 及び FVIII:C データは除外した。

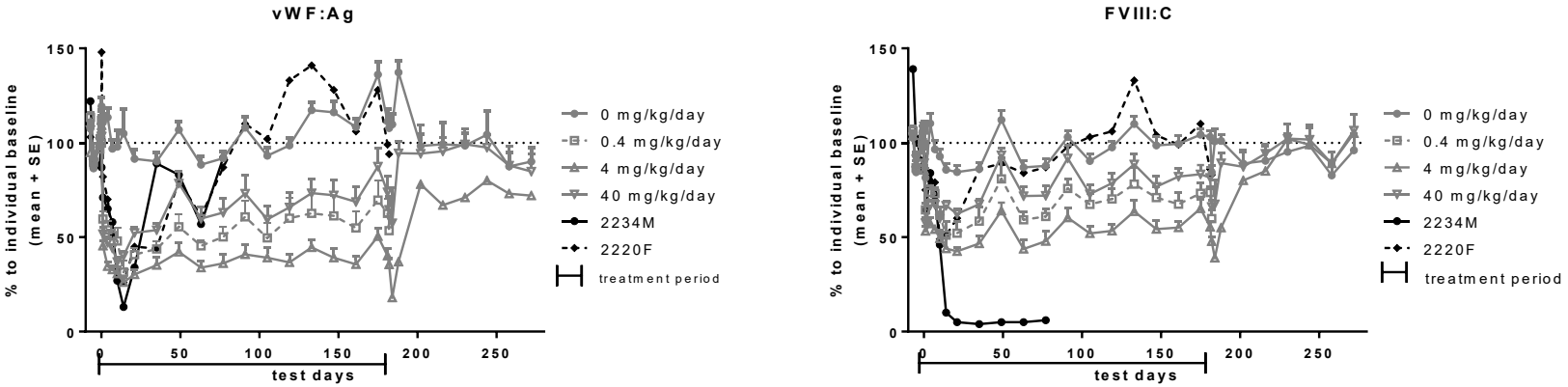
c 動物 F2220（0.4 mg/kg/日）は ADA 陽性並びに曝露量及び PD マーカーの低下のため毒性評価から除外されたことから、この動物の vWF:Ag 及び FVIII:C データは除外した。

図 1 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験における vWF:Ag 及び FVIII:C 血漿中濃度の比較

報告された生データを以下のように処理した：個体別値を平均値として要約し、灰色で示した（動物 F2220 及び M2234 は除外し、個体別値を黒の印及び線で示した。本文参照）。誤差バーは SE を示す。vWF:Ag 及び FVIII:C 濃度を個体別ベースラインに対する%として示す。0 日目は投与初日である。

（左図）雌雄のカニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験の低用量群（0.4 mg/kg/日）、中用量群（4 mg/kg/日）及び高用量群（40 mg/kg/日）における平均 vWF:Ag 濃度

（右図）雌雄のカニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験の低用量群（0.4 mg/kg/日）、中用量群（4 mg/kg/日）及び高用量群（40 mg/kg/日）における平均 FVIII:C 値



個体別所見

高用量群（40 mg/kg/日）の雄 1 匹（M2233）で、77 日目に血小板数減少が認められた。この血小板減少は 133 日目に重度の血小板減少症に進行し、個体別ベースライン値から 90%を上回る減少がみられた。血小板数の低値は投与期間終了時（181 日目）まで引き続きみられたが、202 日目には速やかかつ完全な回復が認められた。M2233 における血小板数の変化は vWF:Ag 値の顕著な増加に一致していた。この臨床検査マーカーの変化に関連する一般状態の変化は認められなかった。この原因は明らかになっておらず、カプラシズマブの薬理作用との直接の関連性は依然として不確定である。

高用量群（40 mg/kg/日）の雄 1 匹（M2234）で、貧血の徴候及び出血傾向増加が認められた。所見の詳細な経過の説明を以下に記載し、結果を図 2 に示す。

一般状態の変化は 24 日目に発現したが、これはカニクイザルを用いた先行する 1 つの毒性試験で検討された投与期間の範囲内であり、高用量の 40 mg/kg/日で類似の所見は報告されなかった。M2234 への投与が最初に中断されたのは 28 日目であり、この時、一般状態の変化として広範な四肢のびまん性血腫、注射部位からの出血並びに赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット及び網状赤血球数など）及び血液生化学的パラメータ（ビリルビンなど）の顕著な変化がみられた。8 日間の休薬期間（28～35 日目）及び 36 日間の休薬期間（49～85 日目）後に完全な回復がみられず、引き続き一般状態の変化並びに再生性貧血を示唆する血液学的及び血液生化学的パラメータの変動が認められたため、85 日目に途中安楽死させた。

vWF:Ag 値は予想どおり投与により減少し、投与を中止すると投与前値まで回復した。それと同時に FVIII:C の顕著な減少（個体別ベースライン値から 95%超の減少）がみられたが、これは 2 回の投与中断及び vWF:Ag 値増加にもかかわらず回復しなかった。その後の検討により、FVIII に対する抗体が 14 日目以降に報告された。FVIII 抗原（FVIII:Ag）分析により、これらの抗 FVIII 抗体には阻害作用があることが示された。それは FVIII:Ag 濃度が 21 日目以降に部分的に回復した（投与前濃度には到達せず）のに対し、FVIII:C は引き続き低かったからである。M2234 では ADA は検出されなかった（特筆すべきこととして、薬物ウォッシュアウトは 85 日目には完全であったため、アッセイの完全な感度が保証された）。LDH 値が一過性に増加したのに対し、ハプトグロビン濃度は 28～35 日目の低値から 49 日目の増加した値まで変動し、それに伴って炎症状態を示すその他のパラメータ（ESR、アルブミン、グロブリン及び血小板数）の変化が認められた。所見は血腫形成及びその後の血腫吸収を伴う出血性貧血と解釈された。これはマーカーの間欠性変動と溶血性事象との適合性がより低いことに基づくものであるが、利用可能なデータセットに基づくと溶血性事象の可能性は否定できない。

可能な解釈及び連鎖的な事象を以下に概説する。

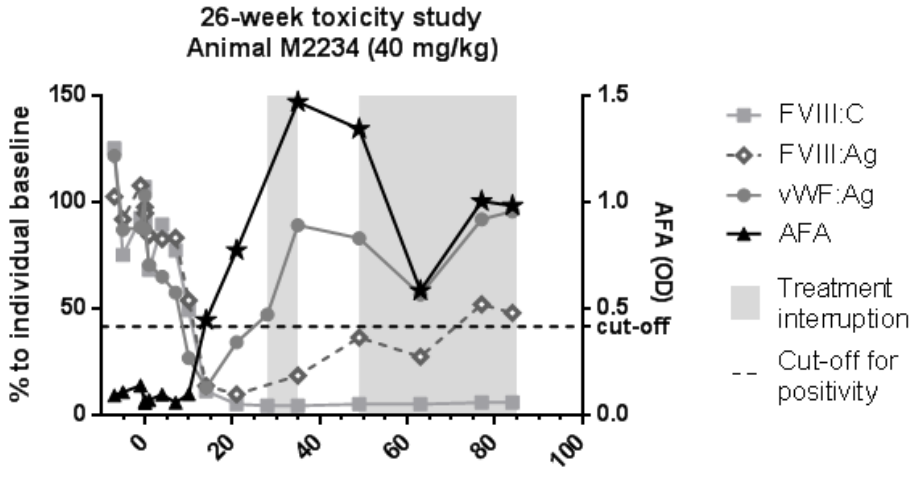
- カプラシズマブを介した vWF 活性阻害により注射部位の血腫及び出血事象が誘導された。この場合、実験処置（拘束又は採血などの処置部位に一致する重度の血腫の所見）があったと思われる(1)。阻害性抗 FVIII 抗体により、出血リスクが更に増加し、回復が妨げられた可能性がある。全体として、この動物では血腫による失血が重大であった可能性がある。

- 失血は抗 FVIII 抗体の発現に関する既知の関連リスクであり(2)、広範な血腫により貧血が誘発されることが報告されている(1)(3)。このため、実験処置が引き金となった著しい失血及び完全な vWF 中和により、連鎖的な事象が引き起こされた可能性がある。
- この動物では更なるリスク要因が特定された。この試験コホートでは試験前に症状を伴わない腸炎エルシニア菌感染が診断されており（個々の動物では後の時点で確認されなかったが）、M2234 が試験前に感染していた可能性は否定できない。全例について試験開始前に抗菌剤治療（エンロフロキサシン）を実施した。腸炎エルシニア菌感染あるいはフルオロキノロン系抗生物質を用いた治療により、自己免疫を介した続発症が誘発される可能性があることが報告されており(4)(5)(6)、これが発症に寄与した可能性がある。

この動物で病的状態がみられたため、26 週間反復投与毒性試験における NOAEL は 4 mg/kg/日に決定された。

図 2 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験の高用量群（40 mg/kg/日）の動物 M2234 における vWF:Ag 及び FVIII 特性

FVIII:C（■）、FVIII:Ag（◇）及び vWF:Ag（●）の血漿中濃度を、個体別ベースライン値に対する%として示す（第 1 の y 軸）。抗 FVIII 抗体シグナル（▲ AFA）を吸光度（OD）値として示す（第 2 の y 軸）。アッセイ特異的カットオフを上回る値（ヒトスクリーニング ELISA での AFA シグナル陽性を示す）には星印（★）を付ける。X 軸は投与日（投与初日を 0 日目とする）を示す。灰色の領域はこの動物の休薬期間を示す。動物は 85 日目に安楽死させた。



抗 FVIII 抗体

レトロスペクティブな検討により、13 週間及び 26 週間反復投与毒性試験で使用した 4 匹のカニクイザルにおいても、抗 FVIII 抗体が検出された。これらの動物では一般状態の変化は認められなかっ

た。ヒトスクリーニング ELISA で陽性となるキット特異的カットオフを上回る陽性シグナルが、以下の動物で得られた。

- 26 週間反復投与毒性試験でカプラシズマブの投与（0.4 及び 4 mg/kg/日）を受けた雄 2 匹（40 匹中）。いずれの動物においても、投与下での陽性シグナルは一過性であった（投与後抗体がみられた期間は、M2214 では 21 日間、M2224 では 1 回であった）。
- 13 週間反復投与毒性試験の雄 2 匹（32 匹中）（4 及び 40 mg/kg/日）。これらの動物では、最終検体採取時点を含めて複数の投与後時点で陽性であった。

所見の正確な原因は不明であった。一部の動物では所見の性質が一過性であったため、カプラシズマブ投与との直接の相関は不確定であった。抗 FVIII 抗体の発現は、関連する臨床症状のない健康人においても自然発生的にみられることが報告されている(7)(8)。3 つの第 1 相試験及び後天的血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）を有する被験者を対象とした第 2 相試験からの利用可能なカプラシズマブの臨床データにおいて、抗 FVIII 抗体の存在を裏付ける、FVIII:C 値と vWF:Ag 値との不一致は認められなかった。したがって、この非臨床所見の臨床的意義は引き続き不確定である。

要約

本試験の主要な所見を表 7 に要約する。

表 7 - カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験における主要な所見

試験の種類	投与量（mg/kg/日）1 日 3 回(6/12 時間ごと）皮下投与	C_{max} 1 日目 /182 日目 (µg/mL)	AUC_{tau} 1 日目/182 日目 (µgh/mL)	RICO（対照群と比較した%変化）、182 日目	主要な所見
カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験 AA93337 試験	0（対照）	0 / 0	0 / 0	104.5	雄 1 匹を瀕死安楽死させた。
	0.4	1.13 / 6.05	18.9 / 126	-85.2	FVIII:C 及び vWF:Ag の減少（雄）、APTT 延長（雄）、血球数の変化（雌）
	4	2.44 / 16.8	41.8 / 300	-85.6	NOAEL FVIII:C 及び vWF:Ag の減少（雌雄）、APTT 延長（雌雄）、血球数の変化（雌）
	40	14.6 / 63.5	231 / 1050	-85.6	雄 1 匹を瀕死安楽死させた。 FVIII:C 及び vWF:Ag の減少（雌）、APTT 延長（雌雄）、血球数の変化（雌）

すべての値は雌雄の動物を合わせた群平均値である。

4　遺伝毒性試験

ICH S6(R1) に従い、カプラシズマブの遺伝毒性試験は実施していない。

5　がん原性試験

カプラシズマブは特異性の高い生物学的製剤であり、vWF の A1 ドメインに対する阻害作用あるいは循環血中 vWF:Ag 値減少ががん発生のリスク要因であるとのエビデンスは、これまでのところ得られていないことから、がん原性を検討するための独立した試験は現時点では計画していない。生物学的製剤についてこのような長期がん原性試験の実施可能性は、非臨床試験動物種で最終的に抗薬物抗体が発現し、それが曝露量及び作用を妨害する可能性があるため、限定的である。

そのため、ここでは、カプラシズマブの非臨床及び臨床試験からの最新の知見並びに標的である vWF 及び vWF と血小板との相互作用に関する文献データを含めて、理論上のがん原性評価を提示する。

カプラシズマブは血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）患者の治療を目的として開発中であり、疾患の急性再燃時に標準治療に加えて投与することとし、患者が再発性疾患のリスク下にある間は 1 日 1 回投与する予定である。維持治療は 1 回のエピソードにつき約 1～3 か月間継続される。カプラシズマブを慢性持続的に投与する予定はない。

カプラシズマブについて *in vitro* 及び *in vivo* 安全性試験が実施されている。オフターゲット反応性はみられていないため、カプラシズマブには直接的な発がん作用はないと予想される。カプラシズマブの薬理作用、すなわち vWF の A1 ドメインを標的とする血栓形成抑制及び循環血中 vWF:Ag 値減少には、免疫系調節、細胞増殖、細胞遊走又は突然変異形成に関与しているとの報告はない。

非臨床安全性試験パッケージには、ヒト、カニクイザル、モルモット、マウス、ラット及びウサギの組織を用いた交差反応性試験が含まれていた（Module 2.6.2 [2.2 項]）。モルモット及びカニクイザルを、それぞれげっ歯類及び非げっ歯類の動物種として毒性試験を実施した。慢性毒性試験を、カニクイザルを用いて 26 週間の反復投与により実施したところ、免疫系への影響は認められなかった（[[redacted]22630/1 試験]、[[redacted]24024 試験]、[[redacted]22631 試験]及び[AA93337 試験]）。また、重篤な感染症及び悪性腫瘍の徴候もみられなかった。26 週間反復投与毒性試験において、前腫瘍性病変及び腫瘍性病変のエビデンスは認められなかった（AA93337 試験）。カニクイザルを用いた毒性試験に加えて、モルモットを用いた 13 週間反復投与毒性試験（[[redacted]24023 試験]）及び最終的な胚・胎児発生に関する試験（Segment II、[[redacted]20179/[redacted] 試験]）を実施した。これらの試験においても、感染症、免疫及び腫瘍性病変に関して被験物質関連の所見は認められなかった。胚・胎児発生に関する試験の胎児検査では、カプラシズマブの催奇形性は示されなかった。すなわち、胎児の外表、内臓及び骨格検査では、投与関連の奇形及び変異は認められなかった。

安全性臨床データベースを用いて検索を実施した。2019 年 1 月 16 日に、Ablynx データベースサーチを、以下の基準を用いて実施した。

- データ固定時点：2018 年 12 月 31 日までの累積データ
- MedDRA 基本語又は MedDRA 標準検索式（SMQ）：SMQ「悪性腫瘍」にコードされた事象を少なくとも 1 件有するカプラシズマブの全症例

- 臨床試験のプラセボ群についても実施

カプラシズマブ投与を受けた患者において 3 症例、すなわち大腸癌、胆嚢癌及び形質細胞骨髄腫（骨髄腫悪化）が特定された。プラセボ群の患者において 4 症例、すなわち甲状腺癌、前立腺癌、骨及び肝臓への癌転移（患者の病歴に腎臓癌を含む）、並びに大腸癌が特定された。

カプラシズマブ投与との関連が特定された悪性腫瘍の症例はなかった。

カプラシズマブの標的である vWF のがんにおける役割はまだ研究対象の段階である。確立された主要な生理作用である一次止血調節作用に次いで、vWF は細胞増殖、転移及び血管新生に関与する過程において役割を果たすことが、より明らかになってきつつあるが、関与する分子的経路はまだ完全には解明されていない(9)(10)(11)(12)。

- **血管新生における役割：**vWF はこの過程における負の調節因子として作用することが示されている。Starke らは、*in vitro* 及び *in vivo* において、vWF の欠損が血管新生を刺激することを示している。すなわち、内皮細胞における低分子干渉 RNA による vWF 発現阻害は、*in vitro* での内皮細胞増殖及び血管新生の増加を引き起こした。vWF 欠損マウスを用いた Matrigel plug モデルにおいて、*in vivo* で血管新生を検討した。Matrigel plug を皮下注射 7 日後に検査したところ、血管新生増加及び血管網拡大が、同腹児対照と比較して認められた。VWD 患者の血液由来内皮細胞前駆細胞から増殖させた内皮細胞を用いた *in vitro* 試験でも確認されている(13)。これらの細胞は健康人由来対照と比較して Matrigel 上で著しい管腔形成の増加を示し、増殖及び基底膜遊走の増加も示された。
- **可能性のある vWF のアポトーシス促進作用及び転移に対する防御的役割：**vWF 欠如により腫瘍細胞の転移能が増加するとの報告がある(14)(15)(16)。vWF 欠乏マウスに B16-BL6 黒色腫又は肺癌細胞を静脈内注入したところ、野生型マウスと比較して転移巣が増加した。vWF 欠乏マウスに黒色腫細胞とともに vWF を投与（血漿中 vWF 濃度を回復）したところ、この変化が抑制されたことから、転移に対する vWF の防御的役割が確認された。*In vitro* 解析により、vWF は腫瘍細胞の増殖及び浸潤には影響せず、細胞死を誘導することが明らかになった。この結果を *in vivo* で確認するため、肺における腫瘍細胞の早期生存性を解析したところ、vWF の存在により、注入後 24 時間でこれらの細胞の生存率が低下することが示された(14)。Mochizuki らが実施した試験により、vWF のアポトーシス促進作用が確認された。すなわち、ADAM28（vWF に結合して開裂させることによりアポトーシス促進作用を不活化する）により vWF を不活性化したところ、マウス異種移植モデルにおいて肺転移が促進された(17)。

これとは対照的に、最新ではないが多数の試験により、vWF の作用阻害は抗腫瘍効果が生じる可能性があること、又は少なくとも発がんに関して中立的であることが示唆されている。Karpatkin らは、3 つの異なる腫瘍細胞株を用いたマウス肺転移モデルにおいて、vWF に対する抗体（ヒト多血小板血

漿のリストセチン誘導凝集を阻害する）が転移を減少させることを示した(18)。*In vitro* での HUVEC 細胞に対する腫瘍細胞の接着が vWF の添加により亢進したことから、早期転移のプロモーターとしての作用がある。この作用は抗 vWF 抗体の添加により特異的に阻害された(19)。しかし、この細胞培養系には血小板は含まれていなかったため、vWF－血小板相互作用はこの阻害作用には関与しなかった。

- **腫瘍性疾患の負の予後マーカーとしての vWF:**結腸直腸癌の患者を対象とした試験において、腫瘍組織にはより多数の vWF 陽性微小血管があり、マクロファージは存在しないことが示され、これらの所見と臨床転帰不良との間に正の関連があることがデータにより示唆された(20)。また、血漿中 vWF は、結腸直腸癌(21)(22)、卵巣癌及び胃癌(23)(24)のようなさまざまな癌腫の臨床予後マーカーである。これらの患者では vWF 値が上昇し、それに関連して生存転帰不良がみられる。しかし、vWF は急性期炎症マーカーであるため、その濃度増加が原因であるのか、がん関連炎症過程に関連するものであるのかを確認することは困難である(10)。

- **VWD 患者における発がんリスクに対する vWF 欠乏の影響：**種々の型の VWD ではさまざまな程度の vWF 欠乏がみられ、極端な例では完全な vWF 欠損（VWD 3 型）が認められる。これまでに報告された VWD 患者における新生物発現のケーススタディは極めて少なく（表 8）(25)(26)、疫学的研究はまれである。数年前、イタリア人の VWD 患者を対象としたがんのレトロスペクティブ試験が報告された(27)。VWD の型と診断されたがんの頻度及び型の間に関連が認められ、VWD 2 型の患者は、試験に組み入れられた VWD 患者集団全体と比較して、がんを有する VWD 患者のコホートに存在する割合が有意に高かった。このデータを解釈する場合、検討できたがんの症例数は限られたものにすぎなかった（92 例の VWD 患者における 106 件のがん）ことを考慮する必要がある。VWD 2 型、特にサブタイプ 2A（血漿中の高分子量 vWF が欠如）では、血管異形成が最も高頻度に認められた(28)。このため、これらの患者における定性的 vWF 欠損が、腫瘍形成の根底にある異常な血管新生に関与している可能性がある(29)(30)。VWD 患者でさまざまながんが記録されたが、これらの患者と正常集団との間でのがん有病率の比較はなされていない。VWD ががん発生のリスクを増加させるか否かを評価するには、更なる試験が必要と考えられる。

表 8 - VWD 患者で報告されたがん症例の概要

がんの種類	**症例数**	**参考文献**
固形がん		
環状細管を有する卵巣性索腫瘍	1	Bercaw 2010(26)
母斑様基底細胞癌症候群（Gorlin-Goltz 症候群）	2	Gallego 2008(25)
泌尿生殖器	19	Franchini 2016(27)[b]
消化管	17	
乳癌	16	

がんの種類	症例数	参考文献
肝細胞癌	6	
呼吸系	9	
膵臓	3	
その他のがん [a]	17	
血液		
非ホジキンリンパ腫	10	Franchini 2016(27)[b]
骨髄増殖性疾患	5	
多発性骨髄腫	2	
慢性リンパ性白血病	1	
急性骨髄性白血病	1	

a 皮膚癌（6 例）、甲状腺（4 例）、髄膜腫（4 例）、胸腺（1 例）、下垂体（1 例）及び骨（1 例）

b 18 のイタリア血友病治療センターで 1981～2014 年に収集された情報。データによると、92 例の VWD 患者で 106 件のがんが認められた。VWD 患者集団におけるがんの発現頻度は不明である。

- **転移及び血管新生に対する血小板－vWF 相互作用中和の影響 :** カプラシズマブは vWF に対する血小板の結合を阻害することにより血栓形成を抑制する。止血における役割に次いで、がんの転移及び血管新生における血小板受容体及び血小板刺激因子に対する役割が、実験的エビデンスにより裏付けられている(31)(32)(33)。カプラシズマブは、vWF の A1 ドメインと GPIb-IX-V 受容体複合体との間の相互作用を特異的に阻害する。GPIb-IX-V 受容体複合体は、血行性転移の過程に関与する可能性があるが、その作用については矛盾したデータがある。肺転移のマウスモデルにおいて、Fab フラグメントにより GPIbα 受容体を阻害すると、B16F10 黒色腫コロニーの数が増加することが示された(34)。これらの結果とは対照的に、ノックアウトマウスで得られたデータでは、GPIb 欠損が実験的転移において防御的であることが示された(35)(36)。Jain らの報告によると、GPIb-IX ノックアウトマウスでは肺癌転移巣の数が 15 分の 1 に減少した(35)。ヒト卵巣癌細胞と血小板との共インキュベーションにより、増殖速度は有意に増加したが、GPIbαのような血小板付着表面タンパク質を阻害しても増殖作用は低減しなかった(37)。vWF は GPIb-IX 受容体複合体の主要リガンドであり、vWF 及び GPIb-IX はいずれも腫瘍形成過程に関与すると考えられるが、全体の過程において両因子がどのように互いに影響するかは、更なる研究の対象である。

抗血小板治療及び抗 vWF 治療は抗腫瘍作用を有する可能性があるとの *in vitro* 及び *in vivo* 所見が得られたことから、がん患者を対象としたヘパリン及び低分子量ヘパリン（LMWH）の使用による生存上のベネフィットへの効果が、多数の臨床試験（主に進行腫瘍又は末期疾患の患者が対象）で検討されている。ヘパリンはカプラシズマブの標的結合部位である vWF の A1 ドメインに弱く結合し(38)、

カプラシズマブと同様にリストセチン誘導血小板凝集を阻害する(39)。多数の試験において、LMWH又は未分画ヘパリン（UFH）にランダム化された患者における全生存期間の有意な改善が個々に報告された(40)(41)(42)(43)。これらのデータとは対照的に、悪性神経膠腫患者を対象とした別の試験において、LMWH群での死亡率増加傾向が報告された(44)。文献データを要約すると、進行固形がん患者の全生存期間に対するLMWHの効果の系統的概要として、プラセボ又は抗凝固剤の投与を受けていない患者と比較して、生存上のベネフィットは中等度にすぎないか又はないことが示された(45) (46)。限定的なステージの疾患を有する患者の生存に対するヘパリンの使用についてはほとんど知られておらず、がんの予防に対する使用についてさえもほとんど知られていない。

結論：

- カプラシズマブはvWFのA1ドメインを標的とする極めて特異的なナノボディであり、毒性試験の結果によると、カプラシズマブは免疫系調節、細胞増殖及び突然変異誘発に関与しない。毒性試験において腫瘍性病変は検出されなかった。
- カプラシズマブを長期治療に使用する予定はなく、半減期は短い。
- Ablynx臨床データベースを調査したところ、カプラシズマブの投与と関連があると考えられる悪性腫瘍の症例は認められなかった。
- 標的であるvWFの役割及びがん原性の種々の様相についての血小板との相互作用に関する文献データは存在するが、主に血管新生サポート及び転移に関するものであり、がん発生自体に関するものではない。データには矛盾があり、所見の臨床的意義は不確定である。今後実施されるVWD患者を対象とした試験により更に明らかになる可能性があり、将来において詳細な追跡調査を実施すべきである。
- 現時点において、vWFへの血小板結合に対する短期阻害又は循環血中vWF:Ag値の短期減少ががん発生のリスクとなると考える根拠は存在しない。

6　生殖発生毒性試験

6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

機能的評価を含む雌雄の受胎能の検討を、カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（[redacted] 24024 試験]）の一環として実施した。試験期間終了時に、雄動物において精巣及び精巣上体の病理組織学的検査（GLP 適用）に加えて、超音波による精巣サイズの測定及びスペルミオグラムによる精子機能の評価（いずれも GLP 非適用）を実施した。

雌動物では、生殖器官の病理組織学的検査（GLP 適用）に加えて、28 日ごとの膣細胞検査による性周期の観察を、35 日目以降に実施した（初回投与日を 0 日目とする；GLP 非適用）。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に関連する変化は認められなかった。

上記の結果、及びカプラシズマブ投与時と類似の vWF 及び FVIII 血漿中濃度低下を示す VWD1 型の女性患者において、受胎能への障害は認められていないこと(47)を考慮し、追加の受胎能試験は実施しなかった。

6.2　胚・胎児発生に関する試験

妊娠可能な女性を対象とした臨床使用をサポートするため、モルモットを用いた胚・胎児発生に関する試験（Segment II）を筋肉内投与により実施した（[redacted]20179/[redacted] 試験]）。

カプラシズマブを、1 群 30 匹の雌のモルモットに、0、0.05、1 又は 20 mg/kg/日の用量で、妊娠 6～41 日に 1 日 1 回筋肉内投与した。薬物濃度及び免疫原性の評価は母動物においてのみ実施した。

途中死亡例はなかった。母動物には全身毒性の徴候はみられず、体重、体重増加量、妊娠 6 日以降の正味の体重変化、摂餌量及び摂水量には、投与関連の影響は認められなかった。黄体数、着床数、吸収胚数、性比、胎児体重、胎盤重量、出生時の生存胎児数並びに着床前及び着床後胚・胎児死亡率には、対照と比較して投与関連の影響は認められなかった。胎児の外表／内臓肉眼検査及び胎児頭部の軟組織検査（WILSON の方法）において、投与関連の奇形及び変異は認められなかった。骨格検査（DAWSON の方法）では投与関連の奇形、変異及び遅延は認められなかった。

結論として､カプラシズマブ投与に関連した奇形､変異及び遅延の発現頻度増加はみられなかった。NOAEL は 20 mg/kg/日（試験の最高用量）であった。

上記試験（[redacted]20179/[redacted] 試験）では、母動物において高い曝露量が確認されたが、母動物毒性及び胎盤機能障害は認められなかった。しかし、カプラシズマブの胎盤通過性は評価しなかったため、妊娠モルモットを用いたフォローアップ TK 試験を実施した（[redacted]25265 試験]）。雌のモルモットに、カプラシズマブを 0、20 又は 40 mg/kg/日の用量で、妊娠 6～41 日又は妊娠 6～61 日の期間、1 日 1 回筋肉内投与した。母動物及び胎児の血漿検体中カプラシズマブ曝露量並びに母動物の vWF:Ag 及び FVIII:C 値を測定した。その結果、胎児へのカプラシズマブの低い曝露がみられたが、正確な濃度は測

定できなかった。母動物の曝露による胎児発生への影響は認められなかった。モルモットにおける胎盤通過性はヒトを含む霊長類よりも高い可能性があることを考慮する必要がある(48)(49)。NOAEL は 40 mg/kg/日（試験の最高用量）であった。[redacted]20179/[redacted] 試験の概要表を Module 2.6.7[表 2.6.7.13]に示す。

上記の結果に加え、カプラシズマブ投与時と類似の vWF 及び FVIII 血漿中濃度の低下を示す VWD1 型の女性患者において、本薬が胚・胎児発生に影響を及ぼさないことが示唆されている(47)(50)。ICH S6 ガイドラインでは、サル以外に評価に適切な動物種がある場合は、サルを用いた試験は不要とされているため、追加の胚・胎児発生毒性試験は実施しなかった。

6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

モルモットの胚・胎児発生に関する試験においては、妊娠 6～41 日（器官形成期の臨界期を含む）又は妊娠 6～61 日（61 日は出生予定日の数日前）までの投与で、胚発生、器官形成期及びその後の発生に、懸念となる所見は認められなかった。TK 試験において胎児曝露が確認されたが、胚・胎児発生毒性は認められなかった。さらに、カプラシズマブ投与時と類似の vWF 及び FVIII 血漿中濃度の低下を示す VWD1 型の女性患者において、それらが胚・胎児発生に影響を与えることは示唆されていないこと(47)(50)を考慮し、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。

7　局所刺激性試験

局所刺激性を検討するため、独立した試験を、ウサギ（非交差反応性動物種）を用いて、カプラシズマブの 1.2 mg/kg までの用量（投与容量 0.5 mL/kg）の静脈内、皮下、筋肉内、動脈内及び静脈周囲投与により実施した（[[redacted]20340/[redacted]試験]）。投与関連の変化はみられなかった。

また、反復投与後の局所刺激性については、モルモット及びカニクイザルを用いた最長 6 か月間の毒性試験の一環として評価した。これらの試験では、注射部位の浮腫、硬結、紅斑、腫脹、血腫あるいは出血が散見された。これらの所見を Module2.6.7 [表 2.6.7.7.1]、[表 2.6.7.7.4]及び[表 2.6.7.7.5]に要約する。これらの所見の多くは、発現頻度が対照動物及びカプラシズマブ投与動物において同程度であり、カプラシズマブの薬理作用に関連する出血を除いて、用量依存性は認められなかった。

以上のように、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。

8　その他の毒性試験：免疫原性試験

カプラシズマブの免疫原性については、カニクイザル及びモルモットを用いたカプラシズマブの PK 及び TK 評価の解析の一環として評価した。抗体応答は曝露量に影響を及ぼし、その結果、PK/PD 及び毒性評価に影響を及ぼす可能性もあるため、これらの試験で得られたデータについては、免疫原性を考慮に入れて解釈する必要がある。

バリデートされたスクリーニング及び確認アッセイを用いて免疫応答を特徴づけた。これらのアッセイにより、カプラシズマブの推定半減期の 5 倍を上回る長さの回復期間を含む試験において、ADA 検出が可能になった。カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験を除くすべての試験で使用した ADA アッセイは、薬物干渉に対する感受性がみられた。しかしながら、カプラシズマブは半減期が極めて短く、投与を中止すると速やかに消失するため、このアッセイは回復期間を含む試験において ADA 検出に対する適切な感度を示した。26 週間反復投与毒性試験では、投与下での抗カプラシズマブ抗体の検出をサポートするため、より薬物の存在による影響を受けにくいアッセイを用いて免疫原性を評価した。これらの試験に適用した ADA アッセイを Module [2.6.4]に記載した。

カプラシズマブ活性に対する抗体の中和作用の有無を評価するため、PK と PD の結果を関連付けることにより、データを更に解析した。要約すると、カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験（[[redacted]20095/[redacted] 試験]）において ADA 陽性が確認された 2 匹の動物は、いずれも他の動物と比較して PK 結果の逸脱（経時的なカプラシズマブ濃度の増加）がみられたため、TK 解析から除外した。26 週間反復投与毒性試験では、投与下で発現した抗カプラシズマブ抗体が 1 匹の動物の活性薬物曝露量に影響を及ぼしたことから、この動物は毒性評価から除外した。

いずれの毒性試験においても、免疫応答により誘発された毒性変化は認められなかった。

8.1　カニクイザル及びモルモットを用いた単回投与毒性試験における免疫原性

カニクイザルを用いた単回投与毒性試験（[redacted]20094/[redacted] 及び [redacted]22630/1 試験）では免疫原性を評価したが、モルモットを用いた単回投与毒性試験（[redacted]20093/[redacted] 試験）では評価しなかった。

8 mg/kg の用量での静脈内又は皮下投与されたカニクイザルでは、12 日目（単回投与日を 1 日目とする）以降に抗カプラシズマブ抗体応答が検出された（[[redacted]22630/1 試験]）。PK/PD 結果によると、動物は試験期間を通して活性カプラシズマブに曝露されたが、PK プロファイルに影響を及ぼす ADA 応答の徴候は認められなかった。ADA 陽性動物において、免疫応答により誘発された毒性変化は報告されなかった。

要約を表 9 に示す。

表 9 - 単回投与毒性試験における免疫原性データの要約

試験番号	動物種	経路	投与量	追跡調査期間*	ADA 応答	検出日*	結果
[redacted] 20093/[redacted]	モルモット	静脈内	0, 2, 20 mg/kg	投与後 24 時間	ADA 検査は実施せず	該当せず	該当せず
[redacted] 20094/[redacted]	カニクイザル	静脈内	0, 7.5, 74.7, 747 µg/kg 1 群ー用量漸増	投与後 14 日目	ADA は検出されず ADA 検体採取の時点での薬物干渉の可能性あり ([redacted]/029-008 試験])	該当せず	免疫関連の毒性所見なし
[redacted] 22630/1	カニクイザル	静脈内 皮内	0, 0.02, 0.4, 8 mg/kg	投与後 14 日目	8 mg/kg 皮下投与群で 2/6 匹 8 mg/kg 静脈内投与群で 1/6 匹 利用可能な薬物ウォッシュアウト検体採取時点（12 及び 15 日目）	12 日目 12 日目	PK 及び PD には ADA の影響なし ADA に関連する毒性所見なし

* 初回投与日を 1 日目とする。

8.2 カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験における免疫原性

カニクイザルを用いた静脈内及び皮下投与による 2 週間反復投与毒性試験において、カプラシズマブの免疫原性を評価した。

4 週間の回復期間を含む 2 週間反復静脈内投与毒性試験において、免疫原性が、中用量群（負荷用量は 600 µg/kg、維持用量は 200 µg/kg）の 1 匹で 17 日目（初回投与日を 1 日目とする）に、最高用量群（負荷用量は 6000 µg/kg、維持用量は 2000 µg/kg）の 2 匹で 42 日目に、それぞれ検出された（[redacted] 20095/[redacted] 試験]）。これら 3 匹の動物のうち 2 匹（1 匹は中用量群、1 匹は高用量群）は、PK プロファイル逸脱がみられたため、TK 計算から除外した。毒性評価にはすべての動物を含めた。主試験中における ADA の高感度検出は、薬物の存在のため実施できなかった。

[redacted]22631 試験]（皮下又は静脈内投与による 2 週間反復投与毒性試験）において、免疫原性は検出されなかった。しかし、この試験では回復期間をおかなかったため、検体中における高濃度の薬物の存在により、抗体応答がマスクされた可能性がある。

RICO を指標とする薬力学効果には、すべての投与群で試験期間を通して変化はみられなかったことから、持続的な薬物曝露が確認され、問題となる中和作用は認められなかった。すべての動物を対象とした毒性評価において、免疫原性に関連する可能性がある毒性の徴候は検出されなかった。

8.3 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における免疫原性

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（それぞれ[redacted]24023 試験]及び[redacted] 24024 試験]）では、対照群の 4 匹及び高用量群の 4 匹について 8 週間の回復期間をおいた。免疫原性試験を、全例について 92 日目（投与初日を 1 日目とする）に、回復試験例について 8 週間のウォッシ

ュアウト期間中に、それぞれ実施した。主試験中における ADA の高感度検出は、薬物の存在のため実施できなかった。

回復性試験群のいずれの動物においても、抗カプラシズマブ抗体陽性は確認されなかった。試験期間を通して薬力学効果（RICO）を測定したところ、カプラシズマブには薬理活性があることが確認された。これらのデータは PK データと相関しており、活性カプラシズマブが定量化された。

すべての動物を対象とした毒性評価において、免疫原性に関連する可能性がある毒性の徴候は検出されなかった。

8.4 カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験における免疫原性

カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験（[AA93337 試験]）では、全例についての免疫原性試験を、10 日目（投与初日を 0 日目とする）以降、2 週間ごとに in-life 期間を通して実施するとともに、対照群及び最高用量群の回復性試験例について 13 週間の休薬期間中に実施した。動物 M2224（中用量群）も回復性試験例としたため、検体の免疫原性評価も行った。抗カプラシズマブ抗体が 4 匹で検出された。すなわち、低用量群の 1 匹（動物 F2220）で 63 日目以降に、中用量群の 1 匹（動物 M2224）で 202 日目以降に、高用量群の 2 匹（動物 M2233 及び F2240）でそれぞれ 202 及び 244 日目以降に、それぞれ検出された。最高用量群での主試験中における ADA の高感度検出は、薬物の存在のため実施できなかった。

動物 F2220 では、投与下で発現した抗体応答によりカプラシズマブ曝露量が干渉された。3.2 µg/mL 以下の濃度のカプラシズマブ存在下で、63 日目以降（投与初日を 0 日目とする）に抗体が検出された。この動物における薬力学マーカー（RICO）により、35 日目以降の効果喪失が示され、vWF:Ag 及び FVIII:C は、それぞれ試験 77 及び 91 日目にベースライン値に到達した。この動物は毒性評価及び PD 評価から除外した。

他の 3 匹の ADA 陽性動物では抗体応答による PK プロファイル及び PD パラメータへの影響はみられず（データは示さず）、動物は投与期間を通して活性薬物に曝露された。

動物 M2233（202 日目以降に検出可能な ADA）では、3.2 項に記述したように血小板減少症が認められた。

8.5 モルモットを用いたカプラシズマブの筋肉内投与による胚・胎児発生に関する試験における免疫原性

胚・胎児発生に関する試験（[[redacted]20179/[redacted] 試験]）では、1 群 20 匹の妊娠モルモットについて、試験期間を通して免疫原性試験を実施した。

35 日間の筋肉内投与後に、0.05～20 mg/kg の広い用量範囲で ADA は検出されなかった。しかし、干渉的薬物濃度により検出が妨害された可能性がある。本試験には回復期間をおかなかった。全例について PK 評価を実施し、総活性 PK アッセイを用いて得られた PK データにより、動物における活性

カプラシズマブへの曝露が示されたことから、いずれの動物においても高親和性中和抗体は発現しなかったことが確認された。

8.6 妊娠モルモットを用いたカプラシズマブの連日反復筋肉内投与による TK 及び PD 試験における免疫原性

妊娠モルモットを用いた TK 試験（[[redacted]25265 試験]）では、免疫原性試験を実施しなかった。PK 及び PD データにより母動物における明らかなカプラシズマブへの曝露が確認され、総活性薬物を検出する PK アッセイ（遊離型及び標的結合型カプラシズマブの両方を測定）を用いると、胎児においても活性カプラシズマブへの曝露が認められた。

反復投与毒性試験でみられた免疫原性の要約を表 10 に示す。

表 10 - 反復投与毒性試験における免疫原性データの要約

試験番号	動物種	経路	投与量 (mg/kg/日)	投与期間	回復期間	ADA 応答	検出日	結果
[redacted]20179/[redacted]	モルモット	筋肉内	0, 0.05, 1, 20	35 日間	回復期間なし	ADA は検出されず。薬物濃度が高くウォッシュアウト期間がなかったため、ADA の結果についての結論は出せなかった。	-	-
[redacted]20095/[redacted]	カニクイザル	静脈内	0.0135, 1.6, 16	2 週間	4 週間	中用量で 1/4 匹 高用量で 2/4 匹 主試験中は薬物の存在により信頼性のある ADA の検出は実施できなかった。	17 42	毒性評価との関連性なし 2 匹の動物（1 匹は中用量群、1 匹は高用量群）を PK 解析から除外した－ PK プロファイルの逸脱
[redacted]22631	カニクイザル	静脈内 皮下	0, 12 0, 0.12, 2.4, 12	2 週間	回復期間なし	ADA は検出されず–回復期間がなく、高い薬物濃度により ADA の存在がマスクされた可能性あり	-	-

2.6.6 毒性試験の概要文
カプラシズマブ（遺伝子組換え）

試験番号	動物種	経路	投与量 (mg/kg/日)	投与期間	回復期間	ADA 応答	検出日	結果
[redacted] 24023	モルモット	皮下	0, 0.4, 4, 40	13 週間	8 週間	カプラシズマブ投与動物では ADA が検出されず。2 匹のプラセボ投与動物で 120 日目に ADA 陽性検体が示された。 92 日目（主試験終了時）には高い薬物濃度により ADA を見逃した可能性あり。 回復期間（薬物ウォッシュアウト検体）では予想された薬物に起因する偽陰性はなかった。	-	-
[redacted] 24024	カニクイザル	皮下	0, 0.4, 4, 40	13 週間	8 週間	ADAは検出されず。 主試験中は薬物の存在により信頼性のある ADA の検出は実施できなかった。	-	-
AA93337	カニクイザル	皮下	0, 0.4, 4, 40	26 週間	13 週間	低用量で 1/8 匹 中用量で 1/8 匹 高用量で 2/12 匹 最高用量群において、主試験中は薬物の存在により信頼性のある ADA の検出は実施できなかった。	63 202 202/244	1 匹（低用量）で薬物曝露量が影響を受けた。 この動物は毒性評価及び PD 評価から除外した。

1 日目は投与初日と定義されるが、例外として 26 週間反復投与毒性試験では投与初日を 0 日目とした。

9　考察及び結論

反復投与毒性試験

非臨床毒性試験プログラムは、カプラシズマブ投与により類似した薬理作用を示す 2 つの交差反応性動物種を用いて実施した。*In vitro* 結合アッセイ及び *in vitro* 有効性アッセイにより、モルモット及びカニクイザルを適切な動物種として使用することが支持された。表面プラズモン共鳴試験において、カプラシズマブの一価サブユニットは、カニクイザル及びモルモットの vWF A1 ドメインに対して、それぞれ同程度又は約 10 分の 1 の親和性を示した（Module[2.6.2]参照）。ICH S6(R1)に従い、26 週間反復投与毒性試験における唯一の動物種としてカニクイザルを選択した。これは投与時の体内動態における vWF:Ag の変化がより顕著で、その結果として FVIII:C の変化もより顕著であったことに基づくものである。

毒性試験として、両動物種を用いた静脈内及び皮下投与による単回投与毒性試験、カニクイザルを用いた静脈内及び皮下投与による 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皮下投与による 13 週間反復投与毒性試験、並びにカニクイザルを用いた皮下投与による 26 週間反復投与毒性試験を実施した。すべての反復投与毒性試験には安全性薬理の評価項目をおき、局所刺激性評価も実施した。カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験では、機能測定を含む雌雄の受胎能パラメータの評価を実施した。

全体として、カプラシズマブの忍容性は良好であった。カプラシズマブの薬理作用に関連する出血傾向増加が、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、過度の月経出血、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）で観察された。

一般毒性試験に組み込んだ受胎能、局所刺激性及び安全性薬理の評価で検討したパラメータにおいて、カプラシズマブ投与に関連した変化は認められなかった。

総活性薬物の測定及び PD 評価（vWF 中和、すなわち RICO 活性が 20%未満）により、活性薬物への曝露が示された。抗薬物抗体がみられたものの、薬物曝露量にはほとんど影響しなかった。例外は 26 週間反復投与毒性試験の 1 匹であり、この動物は試験結果の解釈から除外した。

いずれの試験においても、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 の減少がみられた。カニクイザルに比べ、モルモットでは FVIII:C 減少がより軽度であった。vWF:Ag の減少及び特に FVIII:C の減少は、臨床においてモニタリングすることが可能な潜在的安全性マーカーとしても特定されている。カプラシズマブのこれらの薬理作用は、vWF の量的又は質的欠乏により誘発される疾患である VWD を想起させるものであった。この臨床状態は、カプラシズマブ長期投与によるリスクの評価の指針となる。

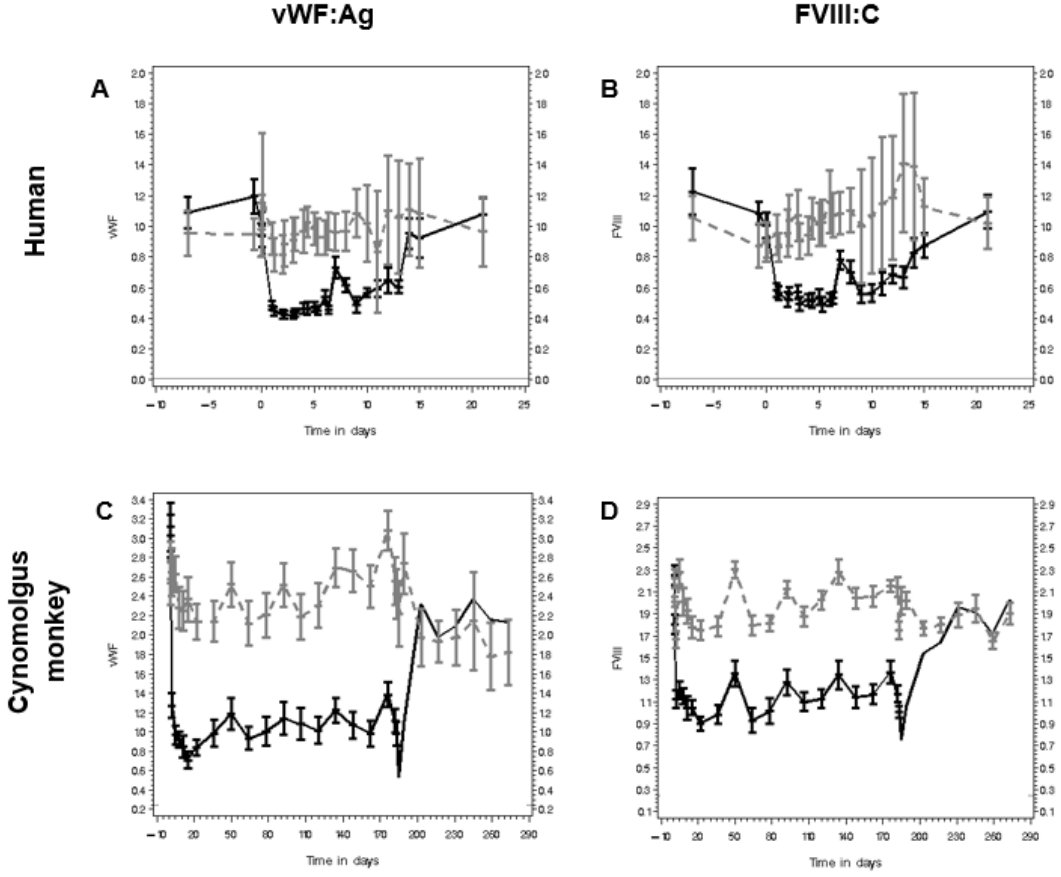
vWF:Ag 及び FVIII:C 値の減少がカプラシズマブの臨床試験でもみられることは、非臨床試験に用いた動物種の適切性を裏付けるものである。ヒトにおける PK/PD モデルから、カプラシズマブとの複合

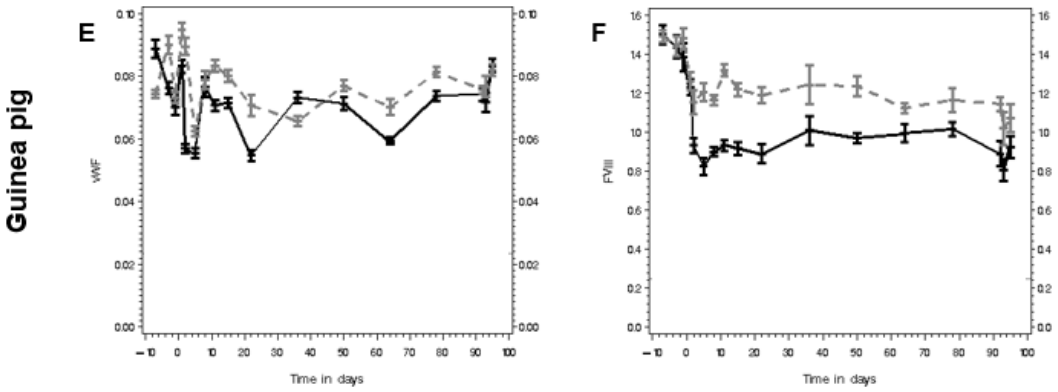
体を形成した vWF は遊離型 vWF タンパク質よりも速やかに消失すると推定される。これは *in vitro* データにより裏付けられている。この変化は投与後短時間で認められ、初回投与後約 1 週間で新たな平衡状態に達し、更なる経時的な減少はみられなかった。26 週間反復投与毒性試験における vWF:Ag 及び FVIII:C 値は、14 日間の投与後に中用量で再度増加する傾向がみられ、高用量群ではより顕著に認められたが、投与期間中では投与前の濃度に到達しなかった。投与中止後には速やかに正常値に到達した。持続的標的占有により最大作用に到達すると、用量を増加させても更なる減少は生じないと推測される。

モルモット、カニクイザル及びヒトにおける vWF:Ag 及び FVIII:C の経時的変化の比較を図 3 に示す。

図 3 - ヒトを対象とした第 I 相臨床試験、カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験及びモルモットを用いた 13 週間反復投与毒性試験における血漿中 vWF:Ag 及び FVIII:C 値経時変化曲線の比較

vWF:Ag/FVIII:C 体内動態の最も顕著な変化がみられた投与群（臨床データでは 10 mg/日、カニクイザルでは 4 mg/kg/日、モルモットでは 40 mg/kg/日）を黒の実線グラフで示し、比較のため対照群（灰色の点線グラフ）を示す。明確化のため、他の投与群は除外した。26 週間反復投与毒性試験のすべての投与群は図 1 に示している。カニクイザル及びモルモットにおける vWF:Ag の相対値をヒト等価単位で示す。モルモットの vWF:Ag アッセイは非平行性のため半定量的である。
第 I 相臨床試験では、健康被験者に連日 14 日間皮下投与した。グラフには投与終了後の期間が含まれる。対照的に、モルモットのデータは 92 日目（初回投与日を 1 日目とする）まで報告され、回復期間は除外されている。
（A）最高用量群及び対照群の男性健康被験者における平均 vWF:Ag 濃度（平均値±SE）（ALX-0681-1.1/08）
（B）最高用量群及び対照群の男性健康被験者における平均 FVIII:C 値（平均値±SE）（ALX-0681-1.1/08）
（C）26 週間反復投与毒性試験の中用量群及び対照群における雌雄のカニクイザルの平均 vWF:Ag 濃度（平均値±SE）
（D）26 週間反復投与毒性試験の中用量群及び対照群における雌雄のカニクイザルの平均 FVIII:C 値（平均値±SE）
（E）13 週間反復投与毒性試験の高用量群及び対照群における雌雄のモルモットの平均 vWF:Ag 濃度（平均値±SE）
（F）13 週間反復投与毒性試験の高用量群及び対照群における雌雄のモルモットの平均 FVIII:C 値（平均値±SE）





カニクイザルを用いた 2 週間、13 週間及び 26 週間反復投与毒性試験のレトロスペクティブスクリーニングを行った結果、更に 4 匹で試験薬投与中に抗 FVIII 抗体が発現したことが確認されたが、一般状態の変化は認められなかった。このうち 2 匹については、投与期間中の一過性のものであった。カプラシズマブ投与との関連性は明らかでない。抗 FVIII 抗体はヒトにおいて偶発的所見として報告されている(7)。

要約すると、モルモット及びカニクイザルを用いたカプラシズマブの反復投与毒性試験における主要な所見は高用量での出血リスク増加であった。これはカプラシズマブの薬理作用に関連したものである。PK/PD モデリングに基づくと、カプラシズマブの 10 mg の用量での連日投与を受けた患者における定常状態の C_{max} 中央値は約 0.6 µg/mL、AUC 中央値は約 12.473 µg•h/mL であった（Module 2.6.7 [表 2.6.7.3]参照）。これをカニクイザル 26 週間反復投与毒性試験の NOAEL での定常状態の AUC と比較したとき、安全域は 10 超であり、雄動物の C_{max}（C_{max} は雄の方が高かったが、雄での投与による影響が大きかったため）と比較したときの安全域は約 50 であった。

反復投与毒性試験では、カプラシズマブの抗凝固薬理作用に関連する所見以外の所見は認められなかった。TTP 患者には vWF 値増加が認められるため、TTP 患者は健康なカニクイザルと比較して vWF 減少への感受性が低い可能性がある。

遺伝毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験

ICH S6(R1)に従い、カプラシズマブについて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を実施したが、毒性の徴候は認められなかった。妊娠モルモットを用いた追跡調査 TK 試験で、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、母動物及び胎児のいずれにおいてもカプラシズマブへの曝露が示されたが、胎児発生への影響は認められず、後天性 TTP 患者における推奨臨床用量の 10 mg/日（この用量での PK/PD モデリングにより予測された C_{max} は 0.6 µg/mL、AUC_{τ} は 12.473 µg•h/mL）での C_{max} 及び AUC_{τ} と比較した安全域は 20 を上回った。これらの試験において更なるリスクは特定されなかった。

免疫原性試験

曝露量に影響を及ぼす抗カプラシズマブ抗体は、反復投与試験で散発的に検出されたにすぎなかった。すなわち、モルモット及びカニクイザルにおけるカプラシズマブの免疫原性は低かった。

毒性試験におけるカプラシズマブの薬力学活性

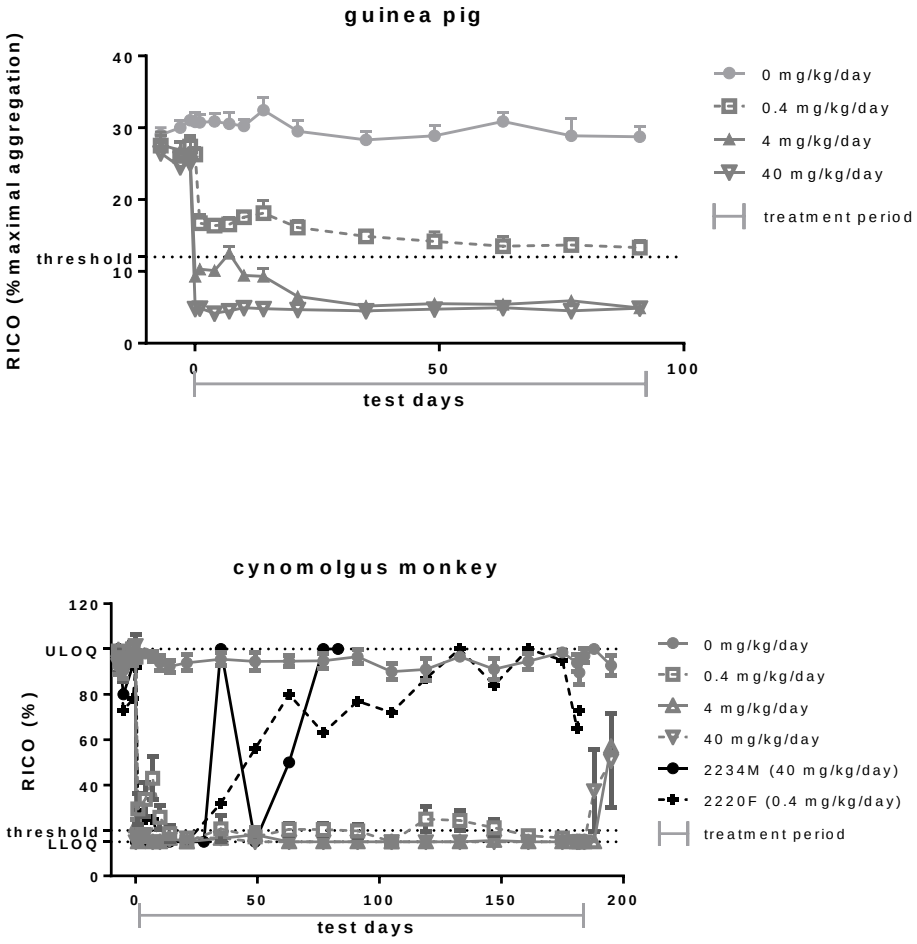
カニクイザルでは、高い曝露量に一致して、20%未満の RICO 活性と定義される vWF 活性の完全な中和が、投与期間を通してすべての投与群で示された。モルモットでは、中及び高用量群で標的中和に対する完全な薬力学的効果が示され、低用量群で部分的阻害作用が認められた（図 4）。これにより、カプラシズマブは毒性試験に使用したいずれの動物種においても薬理活性を示し、動物の曝露量は（サルでは反復投与毒性試験の低用量においても）完全な標的阻害を得るのに十分であった。したがって、毒性試験で検討した動物種及び用量は、ヒトにおけるカプラシズマブの作用を予測するのに適していた。

図 4 - モルモットを用いた 13 週間反復投与毒性試験及び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 RICO アッセイにより示された vWF 活性の中和を指標とするカプラシズマブの薬力学活性

vWF 活性を、カニクイザルについては RICO として、モルモットについては%最大凝集として、試験日（投与初日を 0 日目とする）ごとに示した。報告された生データを以下のように処理した：個体別値を平均値として要約した。誤差バーは平均値の標準誤差（SE）を示す。モルモットのデータは 91 日目まで報告し、回復期間は除く。vWF の完全な中和を表す閾値を点線で示す。

（上図）13 週間反復投与毒性試験の対照群、低用量群（0.4 mg/kg/日）、中用量群（4 mg/kg/日）及び高用量群（40 mg/kg/日）における雌雄のモルモットの平均 RICO 活性。モルモットのアッセイにおける閾値は、最大 RICO 凝集の 12%と算出された。

（下図）26 週間反復投与毒性試験の対照群、低用量群（0.4 mg/kg/日）、中用量群（4 mg/kg/日）及び高用量群（40 mg/kg/日）における雌雄のカニクイザルの平均 RICO 活性。動物 M2234（40 mg/kg/日）は投与中断の対象となったため平均値から除外し、個体別値として示した（黒の実線）。動物 F2220（0.4 mg/kg/日、黒の点線で示す）も平均値から除外した。この動物は抗薬物抗体（ADA）陽性であり、投与期間中に曝露量及び薬力学（PD）マーカーへの反応が減少したため、毒性評価から除外した。カニクイザルにおける%RICO 活性に関する薬理学的閾値は 20%である（[A001-BST-08-ANR-008-v1 試験]）。このアッセイの定量下限（LLOQ）は 15%であった。このアッセイの定量上限（ULOQ）（100%）を上回る報告値がみられた検体を外挿により算出し、100%に設定した。



全体の要約及び結論

要約すると、カプラシズマブの毒性は、適切な動物種を用いて、薬理活性用量で十分に特徴づけられている。問題となる安全性リスクとして特定されたのは、過剰な薬理作用による出血増加のみである。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。

結論として、毒性試験において、カプラシズマブの製造販売承認及びヒトにおける使用継続の障害となる所見は認められなかった。

参 考 文 献

1. Landi, F, et al. Physical Restraint and Subcutaneous Hematoma in an Anticoagulated Patient. South Med J 2001; 94(2): 254-5.
2. Coppola, A, et al. Understanding inhibitor development in haemophilia A: towards clinical prediction and prevention strategies. Haemophilia 2010;16: 13-9.
3. Incalzi, R. Life-threatening subcutaneous hematoma caused by an axillary pad in an anticoagulated patient. South Med J 2000; 93: 315-6.
4. Scherer, K and Bircher, AJ. Hypersensitivity reactions to fluoroquinolones. Curr Allergy Asthma Rep 2005; 5: 15-21.
5. Bottone, EJ. Yersinia enterocolitica: the charisma continues. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 257-76.
6. van Beek, EJ, Peters, M and ten Cate, JW. Factor VIII inhibitor associated with ciprofloxacin. Thromb Haemost 1993; 69: 403.
7. Whelan, S, et al. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. Blood 2012; doi:10.1182/blood-2012-07-444877.
8. Krudysz-Amblo, J, et al. Quantitation of anti-factor VIII antibodies in human plasma. Blood 2009;113(11):2587-94.
9. Lenting, PJ, et al. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. J Thromb Haemost 2012; 10: 2428-37.
10. Franchini, M, et al. von Willebrand factor and cancer: a renewed interest. Thromb Res 2013; 131(4): 290-2.
11. Mojiri, A, et al. Von Willebrand factor contribution to pathophysiology outside of von Willebrand disease. Microcirculation 2018; e12510.
12. Randi, AM, et al. von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. Blood 2018;132(2):132-40.
13. Starke, RD, et al. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. Blood 2011; 117(3): 1071-80.
14. Terraube, V, et al. Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice. J Thromb Haemost 2006; 4(3): 519-26.
15. Terraube, V, et al. Role of von Willebrand factor in tumor metastasis. Thromb Res 2007; 120 Suppl 2: S64-S70.
16. Shavit, JA, et al. Coagulation and metastasis--an unexpected role for von Willebrand factor. J Thromb Haemost 2006; 4(3): 517-8.
17. Mochizuki, S, et al. Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. Journal of the National Cancer Institute 2012; 104(12): 906-22.
18. Karpatkin, S, et al. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. J Clin Invest 1988; 81(4): 1012-9.

19. Morganti, M, et al. Von Willebrand's factor mediates the adherence of human tumoral cells to human endothelial cells and ticlopidine interferes with this effect. Biomed Pharmacother 2000; 54(8-9): 431-6.
20. Lackner, C, et al. Prognostic relevance of tumour-associated macrophages and von Willebrand factor-positive microvessels in colorectal cancer. Virchows Arch 2004; 445: 160-7.
21. Wang, WS, et al. Plasma von Willebrand factor level as a prognostic indicator of patients with metastatic colorectal carcinoma. World J gastroenterol 2005; 11(14): 2166-70.
22. Schellerer, VS, et al. The clinical value of von Willebrand factor in colorectal carcinomas. Am J Transl Res 2011; 3(5): 445-53.
23. Koh, SCL, et al. The association between fibrinogen, von Willebrand Factor, antithrombin III, and D-dimer levels and survival outcome by 36 months from ovarian cancer. Clin Appl Thromb Hemost 2006; 12(1): 3-8.
24. Yang, X, et al. Gastric cancer-associated enhancement of von Willebrand factor is regulated by vascular endothelial growth factor and related to disease severity. BMC cancer 2015; 15: 80.
25. Gallego, L, et al. Association von Willebrand's disease and nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). Haemophilia 2008; 14: 835-7.
26. Bercaw, JL, et al. Sex cord tumor with annular tubules in a young adolescent with Von Willebrand's disease. J Pediatr Adolesc Gynecol 2010; 23: e111-4.
27. Franchini, M, et al. Cancers in Patients with von Willebrand Disease: A Survey from the Italian Association of Haemophilia Centres. Seminars in thrombosis and hemostasis 2016; 42(1): 36-41.
28. Franchini, M, et al. Von Willebrand disease-associated angiodysplasia: a few answers, still many questions. British Journal of Haematology 2013b; 161: 177-82.
29. Franchini, M, et al. Gastrointestinal angiodysplasia and bleeding in von Willebrand disease. Thrombosis and Haemostasis 2014; 112(3): 427-31.
30. Federici, AB, et al. The bleeding score predicts clinical outcomes and replacement therapy in adults with von Willebrand disease. Blood 2014; 123(26): 4037-44.
31. Bambace, NM, et al. The platelet contribution to cancer progression. Journal of thrombosis and haemostasis 2011; 9: 237-49.
32. Gil-Bernabe, AM, et al. Coagulation and metastasis: what does the experimental literature tell us? British Journal of Haematology 2013; 162: 433-41.
33. Jain, S, et al. Platelets: linking hemostasis and cancer. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010; 30(12): 2362-7.
34. Erpenbeck, L, et al. Inhibition of platelet GPIb alpha and promotion of melanoma metastasis. Journal of Investigative Dermatology 2010; 130: 576-86.
35. Jain, S, et al. Platelet glycoprotein Ib alpha supports experimental lung metastasis. PNAS 2007; 104(21): 9024-8.
36. Kanaji, T, et al. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. Blood 2002; 100(6): 2102-7.
37. Cho, MS, et al. Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells. Blood 2012; 120(24): 4869-72.

38. Fujimura, Y, et al. A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val-449 to Lys-728. J Biol Chem 1987; 262(4): 1734-9.
39. Pekcelen, Y, et al. Heparin and ristocetin-induced platelet aggregation. Thrombos Haemostas 1976; 35: 485-7.
40. Lebeau, B, et al. Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. Cancer 1994; 74: 38-45.
41. Altinbas, M, et al. A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer. J Thromb Haemost 2004; 2: 1266-71.
42. Klerk, CPW, et al. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. J Clin Oncol 2005; 23(10): 2130-5.
43. Lecumberri, R, et al. Adjuvant therapy with bemiparin in patients with limited-stage small cell lung cancer: results from the ABEL study. Thrombosis Research 2013; 132: 666-70.
44. Perry, JR, et al. PRODIGE: a randomized placebo-controlled trial of dalteparin low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis in patients with newly diagnosed malignant glioma. J Thromb Haemost 2010; 8: 1959-65.
45. Sanford, D, et al. The effect of low molecular weight heparin on survival in cancer patients: an updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. J Thromb Haemost 2014; 12: 1076-85.
46. Lazo-Langner, A, et al. The effect of low-molecular-weight heparin on cancer survival. A systematic review and meta-analysis of randomized trials. J Thromb Haemost 2007; 5: 729-37.
47. Kujovich, JL, et al. von Willebrand disease and pregnancy. J Thromb Haemost 2005; 3: 246-53
48. Miller, RK, et al. Marginal transfer of ReoPro (Abciximab) compared with immunoglobulin G (F105), inulin and water in the perfused human placenta in vitro. Placenta 2003; 24: 727-38.
49. Briggs, GG, et al. Drugs in pregnancy and lactation. Vol. 8 (Lipincott Williams and Wilkins, 2008).
50. Lee, CA, et al. von Willebrand disease and women's health. Semin Hematol 2005; 42: 42-8.

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

2.6.7 毒性試験概要表

Total number of pages: 37

目　　次

2.6.7 毒性試験概要表 1

目　　次 2

表　目　次 3

1　　毒性試験一覧表 4

2　　トキシコキネティクス試験の一覧表 7

3　　トキシコキネティクス試験成績の一覧 8

4　　毒性試験使用ロット 10

5　　単回投与毒性試験 12

6　　反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験 13

7　　反復投与毒性試験 14

8　　*In Vitro* 遺伝毒性試験 27

9　　*In Vivo* 遺伝毒性試験 28

10　　がん原性試験 29

11　　生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験 30

12　　生殖発生毒性試験－受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 31

13　　生殖発生毒性試験－胚･胎児発生に関する試験 32

14　　生殖発生毒性試験－出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 34

15　　幼若動物を用いた試験 35

16　　局所刺激性試験 36

17　　その他の毒性試験 37

表 目 次

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - study program 4

表 2.6.7.2 - Overview of toxicokinetics studies[a] 7

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – overview of toxicokinetics data 8

表 2.6.7.4 - Toxicology drug substance 10

表 2.6.7.5 - Single-dose toxicity 12

表 2.6.7.7.1 - A) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies 14

表 2.6.7.7.2 - B) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies 17

表 2.6.7.7.3 - C) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies 19

表 2.6.7.7.4 - D) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies 21

表 2.6.7.7.5 - E) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies 24

表 2.6.7.11 - Reproductive and developmental toxicity - nonpivotal studies – noteworthy findings 30

表 2.6.7.13 - Reproductive and developmental toxicity - fertility and early embryonic development to implantation 32

表 2.6.7.16 - Local tolerance 36

1 毒性試験一覧表

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - study program

Test Article: Caplacizumab

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Concentrations/ Doses[a]	GLP	Testing Facility	Study Number (Location)
Single Dose Toxicity							
Single dose toxicity in guinea pigs	guinea pig, Dunkin Hartley	intravenous bolus	single dose	0; 2 and 20 mg/kg	Yes	[redacted]	[redacted 20093/redacted] (4.2.3.1-1)
					Yes	[redacted]	[redacted 2710/012] (4.2.3.1-1a)
					No	[redacted]	[AB-redacted-01] (4.2.3.1-1b)
Dose-escalation study in Cynomolgus monkeys	Cynomolgus monkey	intravenous bolus	single escalating doses	0; 7.5; 74.7 and 747 µg/kg	Yes	[redacted]	[redacted 20094/redacted] (4.2.3.1-2)
					Yes	[redacted]	[redacted 2710/006] (4.2.3.2-2a)
					No	[redacted]	[AB-redacted-03] (4.2.3.1-2a)
					Yes	[redacted]	[redacted /029-008] (4.2.3.1-2b)
Single dose toxicity in Cynomolgus monkeys	Cynomolgus monkey	intravenous bolus or subcutaneous injection	single dose	0; 0.02; 0.4 and 8 mg/kg	Yes	[redacted]	[redacted 22630/1] (4.2.3.1-3)

a Unless otherwise specified. For Repeat-Dose Toxicity, the NOAEL (No Observed Adverse-Effect Level) is underlined.

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: Caplacizumab

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Concentrations/ Doses[a]	GLP	Testing Facility	Study Number (Location)
Repeat-Dose Toxicity							
13-week repeat-dose toxicity in guinea pigs	guinea pig, Dunkin Hartley	subcutaneous injection	4 times daily (6h intervals) for 13 weeks	**4 x** 0; 0.1; 1 and <u>10</u> mg/kg/day	Yes	[redacted]	[redacted24023] (4.2.3.2-1)
2-week repeat-dose toxicity in Cynomolgus monkeys	Cynomolgus monkey	intravenous bolus	6 times daily (4h intervals) for two weeks	**6 x** 0.006/0.0015; 0.6/0.2 and <u>6/2</u> mg/kg/day[b]	Yes	[redacted]	[redacted20095/redacted] (4.2.3.2-2)
					Yes	[redacted]	[redacted2710/006] (4.2.3.2-2a)
					No	[redacted]	[AB-redacted-04] (4.2.3.2-2b)
					Yes	[redacted]	[redacted/029-007] (4.2.3.2-2c)
2-week repeat-dose toxicity in Cynomolgus monkeys	Cynomolgus monkey	intravenous bolus or subcutaneous injection	6 times daily (4 h interval) for two weeks	i.v.: **6 x** 0, <u>2</u> mg/kg/day s.c.: **6 x** 0, 0.02, 0.4 and <u>2</u> mg/kg/day	Yes	[redacted]	[redacted22631] (4.2.3.2-3)
13-week repeat-dose toxicity in Cynomolgus monkeys	Cynomolgus monkey	subcutaneous injection	4 times daily (6 h interval) for 13 weeks	**4 x** 0; 0.1; 1 and <u>10</u> mg/kg/day	Yes	[redacted]	[redacted24024] (4.2.3.2-4)
26-week repeat-dose toxicity in Cynomolgus monkeys	Cynomolgus monkey	subcutaneous injection	3 times daily (2x6/1x12 h interval) for 26 weeks	**3 x** 0; 0.135; 1.35 and <u>13.5</u> mg/kg/day	Yes	[redacted]	[AA93337] (4.2.3.2-5)
Genotoxicity							
not assessed							

Abbreviations: TK: toxicokinetics

a Unless otherwise specified. For Repeat-Dose Toxicity, the NOAEL (No Observed Adverse-Effect Level) is underlined.

b The higher dose was only administered at the first administration on the first treatment day as loading dose, followed by repeated injections of the lower maintenance dose.

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: Caplacizumab

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Concentrations/ Doses[a]	GLP	Testing Facility	Study Number (Location)
Carcinogenicity							
not assessed							
Reproductive and Developmental Toxicity							
Embryo-fetal development (Segment II) in guinea pigs	guinea pig, Dunkin Hartley	intramuscular injection	35 days (gestation days 6-41)	0; 0.05; 1 and <u>20</u> mg/kg/day	Yes	[redacted]	[redacted]20179/[redacted] (4.2.3.5.2-1)
TK/PD in pregnant guinea pigs	guinea pig, Dunkin Hartley	intramuscular injection	35 days (gestation days 6-41)	0; 20 and <u>40</u> mg/kg	Yes	[redacted]	[redacted]25265] (4.2.3.5.2-2)
Local Tolerance							
Local tolerance after single administration	rabbit, Himalayan	intravenous, intramuscular, intraarterial, paravenous and subcutaneous	single dose	5 x 2.35 mg/ animal	Yes	[redacted]	[redacted]20340/[redacted] (4.2.3.6-1)
Other Toxicity Studies							
not assessed							

a Unless otherwise specified. For Repeat-Dose Toxicity, the NOAEL (No Observed Adverse-Effect Level) is underlined.

2　トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2 - Overview of toxicokinetics studies[a]

Test Article: Caplacizumab

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Dose Levels	GLP	Testing Facility	Study Number
13-week repeat-dose toxicity in guinea pigs	guinea pig, Dunkin Hartley	subcutaneous injection	**4 x** 10 mg/kg/day	Yes	[redacted]	[redacted]24023]
2-week repeat-dose toxicity in Cynomolgus monkeys	Cynomolgus monkey	intravenous bolus	**6 x** 0.006/0.0015; 0.6/0.2 and 6/2 mg/kg/day[b]	Yes	[redacted]	[redacted] 20095/[redacted]]
2-week repeat-dose toxicity in Cynomolgus monkeys	Cynomolgus monkey	intravenous bolus or subcutaneous injection	i.v.: **6 x** 0, 2 mg/kg/day s.c.: **6 x** 0, 0.02, 0.4, 2 mg/kg/day	Yes	[redacted]	[redacted]22631]
13-week repeat-dose toxicity in Cynomolgus monkeys	Cynomolgus monkey	subcutaneous injection	**4 x** 10 mg/kg/day	Yes	[redacted]	[redacted]24024]
26-week repeat-dose toxicity in Cynomolgus monkeys	Cynomolgus monkey	subcutaneous injection	**3 x** 0; 0.135; 1.35 and 13.5 mg/kg/day	Yes	[redacted]	[AA93337]
TK in pregnant guinea pigs	guinea pig, Dunkin Hartley	intramuscular injection	0; 20 and 40 mg/kg/day	Yes	[redacted]	[redacted]25265]
Embryo-fetal development (Segment II) in guinea pigs	guinea pig, Dunkin Hartley	intramuscular injection	0; 0.05; 1 and 20 mg/kg/day	Yes	[redacted]	[redacted] 20179/[redacted]]

Abbreviations: TK: toxicokinetics

a Only studies and dose levels at which steady state C_{max} and AUC were assessed are listed (C_{max} only for study 20179/[redacted]).

b The higher dose was only administered at the first administration on the first treatment day as loading dose, followed by repeated injections of the lower maintenance dose.

3　トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – overview of toxicokinetics data

Test Article: Caplacizumab

Steady State AUC [µgh/mL]							
	Guinea pig, subcutaneous/intramuscular		Cynomolgus monkey, intravenous		Cynomolgus monkey, subcutaneous		Human, subcutaneous
Dose (mg/kg)	M	F	M	F	M	F	
0.0015			2.35[a]	1.13[a]			
0.02					3.86[b]	2.61[b]	
0.135					84.6[d]	213[d]	ca. 12.5 (at a dose of 10 mg/patient)[g]
0.2			43.3[a]	40.1[a]			
0.4					5.64[b]	19.4[b]	
1.35					511[d]	176[d]	
2			102[a]; 31.4[b]	107[a]; 56.4[b]	18.4[b]	33.5[b]	
10	92.0[e]	268.1[e]			137[c]	125[c]	
13.5					1388[d]	832[d]	
20		596.2[f]					
40		596.6[f]					

Abbreviations: AUC: area under the curve, DRF: dose-range finding, EFD: embryo-fetal development, F: female, M: male

***a*:** study [redacted]20095/[redacted], 2-week Cynomolgus, ***b*:** study [redacted]22631, 2-week Cynomolgus, ***c*:** study [redacted]24024, 13-week Cynomolgus, ***d*:** study AA93337, 26-week Cynomolgus,

***e*:** study [redacted]24023, 13-week guinea pig (sc), ***f*:** study [redacted]25265, EFD DRF guinea pig (im), ***g*:** study REP-2-ALX-antiVWF-PMX-1, population PK/PD model

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – overview of toxicokinetics data (continued)

Test Article: Caplacizumab

Steady State C_{max} [µg/mL]							
	Guinea pig, subcutaneous/intramuscular		Cynomolgus monkey, intravenous		Cynomolgus monkey, subcutaneous		Human, subcutaneous
Dose (mg/kg)	M	F	M	F	M	F	
0.0015			0.109[a]	0.088[a]			
0.02					1.08[b]	0.77[b]	
0.05		0.25[g]					
0.135					4.06[d]	10.3[d]	ca. 0.6 (at a dose of 10 mg/patient)[h]
0.2			4.40[a]	2.02[a]			
0.4					1.48[b]	5.62[b]	
1		4.29[g]					
1.35					29.4[d]	9.63[d]	
2			34.9[a]; 39.4[b]	60.8[a]; 52.6[b]	5.21[b]	9.05[b]	
4							
10	18.3[e]	50.6[e]			26.5[c]	23.0[c]	
13.5					79.5[d]	52.7[d]	
20		45.9[f]; 22.4[g]					
40		52.3[f]					

Abbreviations: DRF: dose-range finding, EFD: embryo-fetal development, F: female, M: male

***a*:** study [redacted] 20095/[redacted], 2-week Cynomolgus, ***b*:** study [redacted]22631, 2-week Cynomolgus, ***c*:** study [redacted]24024, 13-week Cynomolgus, ***d*:** study AA93337, 26-week Cynomolgus,

***e*:** study [redacted]24023, 13-week guinea pig (sc), ***f*:** study [redacted]25265, EFD DRF guinea pig (im), ***g*:** study [redacted]20179/[redacted], EFD pivotal guinea pig (im), ***h*:** study REP-2-ALX-antiVWF-PMX-1, population PK/PD model

4　毒性試験使用ロット

表 2.6.7.4 - Toxicology drug substance

Test Article: Caplacizumab

Batch Number	Purity		Product-related Substances			Product-related Impurities						Process-related Impurities				
Test:[a]	[redacted] Main peak	[redacted] Main peak[b]	[redacted] Oxidized substances	[redacted] N-terminal pyroglutamate	Peptide map Isomerization on [redacted]	[redacted] HMWs	[redacted] No other peak with RRT < [redacted]	[redacted] Each single peak with RRT > [redacted]	[redacted] (reducing and non-reducing) HMWs each peak	[redacted] (reducing and non-reducing) LMWs each peak	Peptide map Isomerization on [redacted]	HCP by [redacted]	Host cell total DNA by [redacted]	Bacterial endotoxins		
Proposed commercial specification:	≥ [redacted] %	≥ [redacted] %	≤ [redacted] %	≤ [redacted] %	≤ [redacted] %	≤ [redacted] %	No peak with RRT < [redacted]	≤ [redacted] %	≤ [redacted] %	≤ [redacted] %	≤ [redacted] %	≤ [redacted] ng/mg	≤ [redacted] pg/mg	≤ [redacted] EU/mL	Study #	Type of Study
[redacted]	99.6	97.8[b]	1.9[c]	4.5[d]	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	16[e]	< 6	0.06	[redacted] 20093/[redacted]	Single dose toxicity study in guinea pig
															[redacted] 20094/[redacted]	Dose-escalation study in Cynomolgus monkeys
															[redacted] 20095/[redacted]	2-week RDT study in Cynomolgus monkeys
															[redacted] 20179/[redacted]	Embryo-fetal development toxicity study in guinea pigs
															[redacted] 20340/[redacted]	Local tolerance study in rabbits

Abbreviations: [redacted], [redacted], EU: endotoxin units, HCP: host cell protein, HMW: high molecular weight, [redacted], LMW: low molecular weight, NT: not tested, RDT: repeated dose toxicity, [redacted]

a As some of the analytical methods and the proposed commercial specification for the to be marketed product were not available at the time the non-clinical batches were released, no data are available for the following tests: Peptide map: Isomerization on [redacted] (red. and non-red): HMWs: each band; [redacted] (red. and non-red): LMWs: each band; Peptide map: Isomerization on [redacted]. In addition for batch [redacted] HMWs and [redacted] other peaks were not assessed.
Refer to Module 3.2.S.2.6 for full release data against the historical specification of the non-clinical batches.

b Release test performed using [redacted] method which was subsequently replaced by [redacted] method (refer to Module 3.2.S.7.1 for [redacted] method description).

c Reported as [redacted] pre-peaks.

d Reported as [redacted] post-peaks, i.e. includes post-peak 1 ([redacted]) and post-peak 2 ([redacted]).

e Test performed using the HCP generic method which was subsequently replaced by a process specific HCP by [redacted] method.

表 2.6.7.4 - Toxicology drug substance (continued)

Test Article: Caplacizumab

Batch Number	Purity		Product-related Substances			Product-related Impurities						Process-related Impurities				
Test:[a]	[redacted] Main peak	[redacted] Main peak[b]	[redacted] Oxidized substances	[redacted] N-terminal pyroglutamate	Peptide map: Isomerization on [redacted]	[redacted] HMWs	[redacted] No other peak with RRT < [redacted]	[redacted] Each single peak with RRT > [redacted]	[redacted] (reducing and non-reducing) HMWs each peak	[redacted] (reducing and non-reducing) LMWs each peak	Peptide map: Isomerization on [redacted]	HCP by [redacted]	Host cell total DNA by [redacted]	Bacterial endotoxins		
Proposed commercial specification:	≥ [redacted] %	≥ [redacted] %	≤ [redacted] %	≤ [redacted] %	≤ [redacted] %	≤ [redacted] %	No peak with RRT < [redacted]	≤ [redacted] %	≤ [redacted] %	≤ [redacted] %	≤ [redacted] %	≤ [redacted] ng/mg	≤ [redacted] pg/mg	≤ [redacted] EU/mL	Study #	Type of Study
															[redacted] 22630/1]	Single dose toxicity study in Cynomolgus monkeys
															[redacted] 22631]	2-week RDT study in Cynomolgus monkeys
[redacted]	99.6	97.7[b]	1.9[c]	0.8[e]	NT	0.4[f]	No peak	0.3[g]	NT	NT	NT	48.4[d]	< 7.4	< 1.00	[redacted] 24023]	13-week RDT study in guinea pig
															[redacted] 24024]	13-week RDT study in Cynomolgus monkeys
															[AA93337]	26-week RDT study in Cynomolgus monkeys
															[redacted] 25265]	Toxicokinetics study in pregnant guinea pigs
[redacted]	99.6	97.1[b]	1.9[c]	0.8[e]	NT	0.4[f]	No peak	0.1[g]	NT	NT	NT	51.5[d]	< 7.6	< 1.00	[AA93337]	26-week RDT study in Cynomolgus monkeys

Abbreviations: [redacted], EU: endotoxin units, HCP: host cell protein, HMW: high molecular weight, [redacted], LMW: low molecular weight, NT: not tested, RDT: repeated dose toxicity, [redacted]

a As some of the analytical methods and the proposed commercial specification for the to be marketed product were not available at the time the non-clinical batches were released, no data are available for the following tests: Peptide map: Isomerization on [redacted] (red. and non-red): HMWs: each band; [redacted] (red. and non-red): LMWs: each band; Peptide map: Isomerization on [redacted]. In addition for batch [redacted] HMWs and [redacted] other peaks were not assessed.
Refer to Module 3.2.S.2.6 for full release data against the historical specification of the non-clinical batches.

b Release test performed using [redacted] method which was subsequently replaced by [redacted] method (refer to Module 3.2.S.7.1 for [redacted] method description).

c Reported as [redacted] pre-peaks.

d Test performed using the HCP generic method which was subsequently replaced by a process specific HCP by [redacted] method.

e Reported as [redacted] Post-peak 2.

f Reported as [redacted] Pre-peak.

g Reported as [redacted] Other peaks.

5　単回投与毒性試験

表 2.6.7.5 - Single-dose toxicity

Test Article: Caplacizumab

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dose Levels	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Guinea pig, Dunkin Hartley	intravenous (i.v.) bolus ([redacted])	0; 2 and 20 mg/kg	5M/5F per group	20 mg/kg	not observed	No signs of local or systemic toxicity. vWF or FVIII concentrations not measured. ADA testing not performed.	[[redacted]20093/[redacted]], [[redacted]2710/012], [AB-[redacted]-01]
Cynomolgus monkey	i.v. bolus ([redacted])	0; 7.5; 74.7 and 747 µg/kg	2M/2F	747 µg/kg	not observed	No signs of local or systemic toxicity. No ADA detected.	[[redacted]20094/[redacted]], [[redacted]2710/006], [AB-[redacted]-03], [[redacted]/029-008]
Cynomolgus monkey	i.v. and subcutaneous ([redacted])	0; 0.02; 0.4 and 8 mg/kg	3M/3F per group	8 mg/kg	not observed	No signs of local or systemic toxicity. Statistically significant decrease of FVIII in M+F at 8 mg/kg s.c., in M at 0.4 mg/kg s.c. and in F at 8 mg/kg i.v. Statistically significant decrease of vWF in F at 8 mg/kg i.v. Treatment emergent ADA detected in the highest dose groups (2/6 s.c.; 1/6 animal i.v.).	[[redacted]22630/1]

Abbreviations: ADA: anti-drug antibodies, F: female, FVIII: coagulation factor VIII, M: male, vWF: von-Willebrand factor

6　反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験

該当なし

7　反復投与毒性試験

表 2.6.7.7.1 - A) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies

Test Article: Caplacizumab

Study No.: [REDACTED24023]								
Report Title:	13-week subchronic toxicity study of ALX-0081 by repeated subcutaneous administration four times daily at 6-hour intervals to guinea pigs							
Species/Strain:	Guinea pig, Dunkin Hartley	**Method of Administration:**	subcutaneous		**Date of First Dose:**	[REDACTED], 20[REDACTED](M), [REDACTED], 20[REDACTED](F)		
Initial Age:	approx. 11 weeks (M), approx. 12 weeks (F)	**Vehicle/Formulation:**	[REDACTED], [REDACTED]M [REDACTED], [REDACTED]% Tween 80, pH [REDACTED]		**Duration of Dosing:**	13 weeks		
Special Features:	Assessment of anti-drug antibodies and pharmacodynamic response				**Duration of Postdose:**	8 weeks		
No-Observed Adverse Effect Level:	4 x 10 mg/kg/day (every 6 hours)				**GLP Compliance:**	Yes		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**4 x 0.1 mg/kg**		**4 x 1 mg/kg**		**4 x 10 mg/kg**	
Number of Animals (R= recovery)	**M: 5 + 3R**	**F: 5 + 3R**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5 + 3R**	**F: 5 + 3R**
Toxicokinetics								
C_{max} (day 3) [µg/mL]	0	0	1.06	1.10	2.09	2.31	9.93	10.04
C_{max} (week 13) [µg/mL]	0	0	not measured	not measured	not measured	not measured	18.3	50.6
AUC_{0-6h} (day 3) [µgh/mL]	0	0	5.63	5.34	10.84	10.07	50.1	49.9
AUC_{0-6h} (week 13) [µgh/mL]	0	0	not measured	not measured	not measured	not measured	92.0	268.1
ADA detected	0	0	0	0	0	0	0	0
PD response (% RICO, day 91)[a]	29.0	27.4	-51.4%	-56.6%	-85.2%	-81.4%	-85.9%	-83.9%

Abbreviations: ADA: anti-drug antibodies, AUC: area under the curve, F: female, M: male, PD: pharmacodynamics, R: recovery, RICO: Ristocetin Induced Cofactor, vWF: von-Willebrand factor

a % activity of the Ristocetin cofactor assay for controls (activity lower than 100% is due to lower cross reactivity of guinea pig vWF with the human platelets used in the assay); % of control activity in dose groups, no statistics were performed.

表 2.6.7.7.1 - A) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies (continued)

Test Article: Caplacizumab

Study No.: [redacted]24023								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**4 x 0.1 mg/kg**		**4 x 1 mg/kg**		**4 x 10 mg/kg**	
Number of Animals (R= recovery)	**M: 5 + 3R**	**F: 5 + 3R**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5 + 3R**	**F: 5 + 3R**
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight mean (%[a]) in g	886.2 g	756.5 g	-1.6%	-12.2%	-7.7%	+0.9%	**-15.2%***	-0.9%
Food Consumption (%) in g	36.05 g	43.63 g	+9.6%	-7.3%	+12.8%	-5.8%	+6.2%	+0.1%
Water Consumption	no relevant findings							
Clinical Observations	no relevant findings							
Ophthalmoscopy	no relevant findings							
Electrocardiography	no relevant findings							
Hematology (day 92)								
Factor VIII (U/ml; %)	1.165	1.123	-20%	**-18%***	-16%	**-16%***	-21%	**-21%***
vWF (U/ml; %)	0.075	0.076	0%[b]	-8%	-7%[b]	-6%[b]	0%[b]	-5%[b]
Serum Chemistry (day 92)								
Albumin (g/l; %)	28.31	28.49	+3%	**-6%***	+2%	4%	-2%	**-5%***
Globulin (g/l; %)	18.56	21.26	+13%	-1%	+11%	**+25%***	**+21%***	**+26%***
Albumin/Globulin ratio (no unit; %)	1.531	1.345	-9%	-4%	-8%	**-23%***	**-19%***	**-25%***
Total protein (g/l; %)	46.9	49.8	+7%	-4%	+6%	+8%	**+7%***	**+8%***

Abbreviations: F: female, M: male, R: recovery, vWF: von-Willebrand factor

Figures in bold with asterisk represent statistically significant differences ($p<0.05$).

a At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

b Significant reductions had been observed at earlier time-points.

表 2.6.7.7.1 - A) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies (continued)

Test Article: Caplacizumab

Study No.: [redacted]24023								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**4 x 0.1 mg/kg**		**4 x 1 mg/kg**		**4 x 10 mg/kg**	
Number of Animals (R= recovery)	**M: 5 + 3R**	**F: 5 + 3R**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5 + 3R**	**F: 5 + 3R**
Urinalysis	no relevant findings							
Organ Weights	no relevant findings							
Gross Pathology	no relevant findings							
Histopathology								
Hemorrhagic subcutaneous tissue at injection sites	1/8	4/8	2/5	4/5	3/5	5/5	4/8	5/8
Postdose Evaluation							Factor VIII slightly increased on d93 and d95	

Abbreviations: F: female, M: male, R: recovery

表 2.6.7.7.2 - B) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies

Test Article: Caplacizumab

Study No.: [20095/] and [2710/006] (bioanalysis); [AB-04] (PK analysis) ; [/029-007] (ADA analysis)					
Report Title:	2-week subchronic toxicity study of ALX 0081 by repeated intravenous administrations 6 times daily at 4-hour intervals to Cynomolgus monkeys				
Species/Strain:	Cynomolgus monkey	**Method of Administration:**	intravenous bolus	**Date of First Dose:**	, 20
Initial Age:	28-40 months	**Vehicle/Formulation:**	, M , % Tween 80, pH ±	**Duration of Dosing:**	2 weeks
Special Features:	The first dose on day 1 was a loading dose, followed by lower maintenance doses. ADA assessment.			**Duration of Postdose:**	4 weeks
No-Observed Adverse Effect Level:	6 x 2 mg/kg/day (every 4 hours)			**GLP Compliance:**	Yes (except for AB-04)

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.006/0.0015 mg/kg**		**0.6/0.2 mg/kg**		**6/2 mg/kg**	
Number of Animals (R= recovery)	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**
Toxicokinetics[a]								
C_{max} (week 2) [µg/mL]	not measured	not measured	0.109	0.088	4.40	2.02	34.9	60.8
AUC_{inf} (week 2) [µgh/mL]	not measured	not measured	2.35	1.13	43.3	40.1	102	107
ADA detected	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	2/5
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight mean (%[b]) in kg	2.32 kg	2.14 kg	+0.9%	-2.8%	-1.7%	-5.6%	-2.6%	-3.7%
Food Consumption (%) in g/kg	49.6 g/kg	50.4 g/kg	-1.2%	+0.4%	-0.8%	+1.2%	-1.6%	+2.4%

Abbreviations: ADA: anti-drug antibodies, AUC: area under the curve, F: female, M: male, PK: pharmacokinetics

a One female animal each from the intermediate and high dose group were excluded from the toxicokinetic analysis.

b At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

表 2.6.7.7.2 - B) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies (continued)

Test Article: Caplacizumab

Study No.: [redacted]20095/[redacted]and [redacted]2710/006 (bioanalysis); AB-[redacted]-04 (PK analysis) ; [redacted]/029-007 (ADA analysis)								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.006/0.0015 mg/kg**		**0.6/0.2 mg/kg**		**6/2 mg/kg**	
Number of Animals (R= recovery)	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**
Water Consumption	no relevant findings							
Clinical Observations	no relevant findings							
Ophthalmoscopy	no relevant findings							
Electrocardiography	no relevant findings							
Hematology (pre-dose, day 14)								
Factor VIII (%)	0.954	1.012	0%	-17%	**-69%***	-47%[a]	**-60%***	**-64%***
vWF (%)	0.482	0.478	-22%[a]	-14%	-35%[a]	-34%	-40%[a]	**-42%***
Serum Chemistry	no treatment-related findings							
Urinalysis	no relevant findings							
Organ Weights	no relevant findings							
Gross Pathology	no relevant findings							
Histopathology	no relevant findings							
Postdose Evaluation							no relevant findings	

Abbreviations: F: female, M: male, PK: pharmacokinetics, vWF: von-Willebrand factor
Figures in bold with asterisk represent statistically significant differences ($p<0.05$).
a Significant reductions had been observed at earlier time-points.

表 2.6.7.7.3 - C) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies

Test Article: Caplacizumab

Study No.: [[redacted]22631]

Report Title:	2-week subchronic toxicity study of ALX 0681 by repeated administrations 6 times daily at 4-hour intervals to Cynomolgus monkeys				
Species/Strain:	Cynomolgus monkey	**Method of Administration:**	subcutaneous or intravenous	**Date of First Dose:**	[redacted], 20[redacted]
Initial Age:	34-51 months	**Vehicle/Formulation:**	[redacted], [redacted]M [redacted], [redacted]% Tween 80, pH [redacted]± [redacted]	**Duration of Dosing:**	2 weeks
Special Features:	Doses were injected 6 times per day at 4 h intervals. ADA and PD assessment.			**Duration of Postdose:**	none
No-Observed Adverse Effect Level:	iv and sc: 6 x 2 mg/kg/day (every 4 hours)			**GLP Compliance:**	Yes

	subcutaneous								intravenous			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.02 mg/kg**		**0.4 mg/kg**		**2 mg/kg**		**0 (Control)**		**2 mg/kg**	
Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 2**	**F: 1**	**M: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics												
C_{max} (week 2) [µg/mL]	0	0	1.08	0.77	1.48	5.62	5.21	9.05	0	0	39.4	52.6
AUC_{0-4h} (week 2) [µgh/mL]	0	0	3.86	2.61	5.64	19.4	18.4	33.5	0	0	31.4	56.4
ADA detected	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PD response, day 14 (% RICO)[a]	n.m.	n.m.	-86.3%	-86.1%	-95.8%	-94.7%	-100%	-100%	n.m.	n.m.	-91.7%	-100%
Noteworthy Findings												
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight mean (%[b]) in kg	3.50 kg	3.00 kg	-5.7%	-10%	-3.7%	-5.7%	-7.7%	-2.3%	3.0 kg		±0%	
Food Consumption (%) in g/kg	47.3	47.0	-7.0%	-0.6%	-3.4%	±0%	-2.1%	+2.1%	42.7 g/kg		+4.2%	

Abbreviations: ADA: anti-drug antibodies, AUC: area under the curve, F: female, M: male, PD: pharmacodynamics

a Mean % activity of the Ristocetin cofactor assay compared to pre-dose/baseline value, no statistics were performed. Control samples were not analyzed (n.m. = not measured).

b At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

表 2.6.7.7.3 - C) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies (continued)

Test Article: Caplacizumab

Study No.: [redacted]22631

	subcutaneous								intravenous			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.02 mg/kg**		**0.4 mg/kg**		**2 mg/kg**		**0 (Control)**		**2 mg/kg**	
Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 2**	**F: 1**	**M: 3**	**F: 3**
Water Consumption	no relevant findings											
Clinical Observations	no relevant findings											
Ophthalmoscopy	no relevant findings											
Electrocardiography	no relevant findings											
Hematology (pre-dose, day 15)												
Factor VIII (U/mL; %)	1.527	2.017	**-69%***	**-83%***	**-85%***	**-75%***	**-75%***	**-78%***	1.253		-53%	
vWF (U/mL; %)	2.813	3.433	-37%	**-76%***	**-77%***	**-70%***	**-76%***	**-66%***	2.823		-58%	
Serum Chemistry	no relevant findings											
Urinalysis	no relevant findings											
Organ Weights	no relevant findings											
Gross Pathology	no relevant findings											
Histopathology	no relevant findings											

Abbreviations: F: female, M: male, vWF: von-Willebrand factor
Figures in bold with asterisk represent statistically significant differences ($p<0.05$).

表 2.6.7.7.4 - D) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies

Test Article: Caplacizumab

Study No.: [REDACTED24024]

Report Title:	13-week subchronic toxicity study of ALX 0081 by repeated intravenous administrations four times daily at 6-hour intervals to Cynomolgus monkeys with 8-week recovery period				
Species/Strain:	Cynomolgus monkey	**Method of Administration:**	subcutaneous	**Date of First Dose:**	[REDACTED], 20[REDACTED]
Initial Age:	38-73 months	**Vehicle/Formulation:**	[REDACTED] M [REDACTED], [REDACTED]% Tween 80, pH [REDACTED]± [REDACTED]	**Duration of Dosing:**	13 weeks
Special Features:	Doses were injected 4 times per day at 6 h intervals. The study included sperm analyses and vaginal cytology, ADA and PD assessment.			**Duration of Postdose:**	8 weeks
No-Observed Adverse Effect Level:	4 x 10 mg/kg/day (every 6 hours)			**GLP Compliance:**	Yes

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**4 x 0.1 mg/kg**		**4 x 1 mg/kg**		**4 x 10 mg/kg**	
Number of Animals (R=recovery)	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**
Toxicokinetics								
C_{max} (day 3) [µg/mL]	0	0	1.10	0.69	1.67	1.77	19.7	12.8
C_{max} (week 13) [µg/mL]	0	0	not measured	not measured	not measured	not measured	26.5	23.0
$AUC_{48\text{-}45h}$ (day 3) [µgh/mL]	0	0	5.97	3.55	9.35	9.43	102	71.0
AUC_{TD92} (week 13) [µgh/mL]	0	0	not measured	not measured	not measured	not measured	137	125
ADA detected	0	0	0	0	0	0	0	0
PD response, week 13 (% RICO)[a]	125.6	87.7	-100%	-100%	-100%	-100%	-100%	-100%

Abbreviations: ADA: anti-drug antibodies, AUC: area under the curve, F: female, M: male, PD: pharmacodynamics

a Percent activity of the Ristocetin cofactor assay for controls; percent of control activity in dose groups, no statistics were performed.

表 2.6.7.7.4 - D) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies (continued)

Test Article: Caplacizumab

	Study No.: [redacted]24024							
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**4 x 0.1 mg/kg**		**4 x 1 mg/kg**		**4 x 10 mg/kg**	
Number of Animals (R=recovery)	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund								
Body Weight mean (%) in kg	4.78 kg	3.50 kg	-1.0%	-3.7%	+3.1%	-0.9%	-4.6%	-4.6%
Food Consumption (%) in g/kg	30.6 g/kg	37.2 g/kg	-14.1%	-1.3%	+2.3%	+7.5%	+3.3%	+19.4%
Water Consumption	no relevant findings							
Clinical Observations								
Injection site: hematoma	0/5	1/5	2/3	3/3	1/3	0/3	0/5	1/5
Injection site: swelling	0/5	0/5	1/3	0/3	2/3	0/3	4/5	1/5
Bleeding at injection site (day 47)					1/3			
Exaggerated menstrual bleeding, (day 30)						1/3		
Bleeding at injection site (days 53, 58 and 84)						1/3		
Bleeding at injection site (day 15)								1/5
Nose bleed (day 17)								1/5
gingival bleeding (days 23 and 24)								1/5
Ophthalmoscopy								
Electrocardiography	no relevant findings							

Abbreviations: F: female, M: male

表 2.6.7.7.4 - D) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies (continued)

Test Article: Caplacizumab

Study No.: [redacted]24024								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**4 x 0.1 mg/kg**		**4 x 1 mg/kg**		**4 x 10 mg/kg**	
Number of Animals (R=recovery)	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3 + 2R**	**F: 3 + 2R**
Hematology (day 92)								
Factor VIII (%)			0%[a]	-33%[a]	-47%[a]	**-64%***	-7%[a]	-19%[a]
vWF (%)			-48%[a]	**-55%***	-67%[a]	**-76%***	-50%[a]	-18%[a]
Serum Chemistry	no relevant findings							
Urinalysis								
urinary bilirubin increased						1/3 d65 and d88	1/5 d65 and d89	5/5 d65 and d88
Organ Weights	no relevant findings							
Gross Pathology								
hemorrhagic subcutaneous tissue at the injection sites	1/5	2/5	2/3	2/3	3/3	2/3	2/5	1/5
Histopathology	no relevant findings							
Additional Examinations								
sperm analysis	no relevant findings							
vaginal cytology	no relevant findings							
Postdose Evaluation							no relevant findings	

Abbreviations: F: female, M: male, vWF: von-Willebrand factor
Figures in bold with asterisk represent statistically significant differences ($p<0.05$).
a Significant reductions had been observed at earlier time-points.

表 2.6.7.7.5 - E) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies

Test Article: Caplacizumab

Study No.: [AA93337]					
Report Title:	26-week repeated dose toxicity study after three times daily subcutaneous administration of ALX-0081 in the cynomolgus monkey, followed by a 13-week recovery period.				
Species/Strain:	Cynomolgus monkey	**Method of Administration:**	subcutaneous	**Date of First Dose:**	[redacted], 20[redacted]
Initial Age:	53-63 months (sexually mature)	**Vehicle/Formulation:**	[redacted] M [redacted], [redacted]% Tween 80, pH [redacted]± [redacted]	**Duration of Dosing:**	26 weeks
Special Features:	Doses were injected 3 times per day at 6/12 h intervals. ADA and PD assessment.			**Duration of Postdose:**	13 weeks
No-Observed Adverse Effect Level:	3 x 1.35 mg/kg/day (with two 6-hour and one 12-hour interval)			**GLP Compliance:**	Yes

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3 x 0.135 mg/kg**		**3 x 1.35 mg/kg**		**3 x 13.5 mg/kg**	
Number of Animals (R=recovery)	**M: 4 + 2R**	**F: 4 + 2R**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 3 + 1R[a]**	**F: 4**	**M: 4 + 2R**	**F: 4 + 2R**
Toxicokinetics								
C_{max} (week 26)	0	0	4.06	10.3	29.4	9.63	79.5	52.7
$AUC_{0\text{-}24h}$ (week 26)	0	0	84.6	213	511	176	1388	832
ADA detected	not measured	not measured	0/4	1/4[b]	1/4	0/4	1/6	1/6
PD response, week 26 (% RICO)[c]	106	103	-84.9%	-85.4%	-85.8%	-85.4%	-85.8%	-85.4%

Abbreviations: ADA: anti-drug antibodies, AUC: area under the curve, F: female, FVIII:C: coagulation factor VIII clotting activity, M: male, PD: pharmacodynamics, vWF: von-Willebrand factor, vWF:Ag: vWF antigen

a Group 3 male no. 2224 was reassigned for recovery due to persistent low FVIII:C and vWF:Ag concentrations during the treatment period. At the end of the recovery period, FVIII:C and vWF:Ag values were within normal range.

b Group 2 female no. 2220 presented a confirmed positive anti-ALX-0081 antibody response between days 63 and 181 leading to ALX-0081 exposure below the limit of qualification of the bio-analytical method, during this period. This animal was excluded from the toxicokinetic and safety evaluation.

c % activity of the Ristocetin cofactor assay for controls; % of control activity in dose groups, no statistics were performed.

表 2.6.7.7.5 - E) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies (continued)

Test Article: Caplacizumab

Study No.: AA93337								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3 x 0.135 mg/kg**		**3 x 1.35 mg/kg**		**3 x 13.5 mg/kg**	
Number of Animals (R=recovery)	**M: 4 + 2R**	**F: 4 + 2R**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 3 + 1R[a]**	**F: 4**	**M: 4 + 2R**	**F: 4 + 2R**
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	1/6[b]	0/6	0/4	0/4	0/4	0/4	1/6[c]	0/6
Body Weight mean (%) in kg	5.09 kg	3.00 kg	+3.8%	+4.7%	-1.6%	+5.2%	+5.6%	+8.9%
Food Consumption (%) in g	not quantitatively assessed							
Water Consumption	not assessed							
Clinical Observations								
Injection site edema	0/6	0/6	1/4	0/4	2/4	0/4	0/6	0/6
Injection site induration	1/6	0/6	1/4	3/4	4/4	0/4	2/5	4/6
Injection site hematoma	2/6	0/6	1/4	0/4	0/4	0/4	0/6	0/6
Injection site erythema	0/6	0/6	0/4	1/4	0/4	0/4	0/6	0/6
Diffuse hematomas							1/6[d]	
Bleeding from thigh, leg, nostril or injection site on 1-3 days	0/6	0/6	2/4	0/4	1/4	0/4	1/6[d]	1/6
Pale teguments on day 91	0/6	0/6	0/4	0/4	1/4	0/4	4/6	0/6
Ophthalmoscopy	no relevant findings							
Cardiovascular Safety	no relevant findings on ECGs and blood pressure							

Abbreviations: F: female, FVIII:C: coagulation factor VIII clotting activity, M: male, vWF: von-Willebrand factor, vWF:Ag: vWF antigen

a Group 3 male no. 2224 was reassigned for recovery due to persistent low FVIII:C and vWF:Ag concentrations during the treatment period. At the end of the recovery period, FVIII:C and vWF:Ag values were within normal range.

b Group 1 male no. 2203 was euthanized for ethical reasons on day 91 after suspected cardiac arrest and followed by moribund condition. The cause of the cardio-respiratory arrests was uncertain, but probably related to stress of the restraining.

c Group 4 male no. 2234 was prematurely sacrificed on day 85 due to persistent signs of anemia and increased bleeding tendency. Values of animal no. 2234 were excluded from mean values and statistical analysis of group 4 (males).

d Observed in male 2234, which was later sacrificed.

表 2.6.7.7.5 - E) Repeat-dose toxicity: Pivotal Studies (continued)

Test Article: Caplacizumab

	Study No.: AA93337							
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**3 x 0.135 mg/kg**		**3 x 1.35 mg/kg**		**3 x 13.5 mg/kg**	
Number of Animals (R=recovery)	**M: 4 + 2R**	**F: 4 + 2R**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 3 + 1R[a]**	**F: 4**	**M: 4 + 2R**	**F: 4 + 2R**
Hematology (day 181)								
Red blood cell count [10^{12}/L]	5.560	5.392	-2.0%	-7.6%	-5.7%	**-12.5%***	-10.9%	-15.3%
Hemoglobin [g/L]	130.4	124.8	+0.5%	**-15.3%***	-5.4%	**-9.1%***	-9.2%	**-13.7%***
Packed cell volume [%]	42.7	41.0	0%	**-10.1%***	-8.1%	**-9.0%***	-11.2%	**-15.4%***
Reticulocytes, absolute [10^{9}/L]	48.1	71.4	+15.2%	+2.1%	+75.5%	-3.1%	+174.2%	+141.6%
Reticulocytes, relative [%]	0.86	1.33	+19.8%	+7.5%	+109.3%	+12.8%	+290.7%	**+209.8%***
Coagulation: APTT [s]	15.40	15.37	**+16.1%***	+13.0%	**+27.3%***	**+27.7%***	**+9.0%***	**+16.8%***
Factor VIII [IU/mL]	2.12	2.16	**-32.1%***	-16.2%	**-44.8%***	**-45.8%***	-17.5%	**-24.1%***
vWF [IU/mL]	2.87	2.29	**-55.1%***	-12.2%	**-61.3%***	**-51.5%***	-25.4%	**-34.5%***
Serum Chemistry	no relevant findings							
Urinalysis	no relevant findings							
Organ Weights	no relevant findings							
Gross Pathology								
Injection site: firm area; dark focus and/or edematous area	observed across dose-groups without dose-dependence							
Histopathology								
Injection site: hemorrhage and inflammatory responses	observed across dose-groups without dose-dependence							
Postdose Evaluation	no relevant findings							

Abbreviations: APTT: activated partial thromboplastin time, F: female, FVIII:C: coagulation factor VIII clotting activity, M: male, vWF: von-Willebrand factor, vWF:Ag: vWF antigen.

Figures in bold with asterisk represent statistically significant differences ($p<0.05$).

a Group 3 male no. 2224 was reassigned for recovery due to persistent low FVIII:C and vWF:Ag concentrations during the treatment period. At the end of the recovery period, FVIII:C and vWF:Ag values were within normal range.

8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

該当なし

9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

該当なし

10　がん原性試験

該当なし

11　生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験

表 2.6.7.11 - Reproductive and developmental toxicity - nonpivotal studies – noteworthy findings

Test Article: Caplacizumab

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dosing Period	Dose Levels	No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Guinea pig, Dunkin Hartley	intramuscular injection ([redacted], [redacted]M [redacted], [redacted]% Tween 80, pH [redacted])	GD 6-41	0; 20 and 40 mg/kg	10 pregnant females; 5 sectioned on GD 41 and 61, each	Significantly reduced FVIII:C and vWF:Ag in some groups at some time points. No effects on reproductive parameters.	[redacted] 25265]

Abbreviations: FVIII:C: coagulation factor VIII clotting activity, GD: gestation day, vWF:Ag: von-Willebrand factor antigen

12　生殖発生毒性試験－受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

該当なし

13　生殖発生毒性試験－胚･胎児発生に関する試験

表 2.6.7.13 - Reproductive and developmental toxicity - fertility and early embryonic development to implantation

Test Article: Caplacizumab

Study No.: [redacted]20179/[redacted]					
Embryo-fetal Development					
Report Title:	Study of embryo-fetal development in guinea pigs with ALX-0081 by intramuscular administration				
Species/Strain:	Guinea pig, Dunkin Hartley	**Design Similar to ICH 4.1.3?**	Yes	**Duration of Dosing:**	GD 6-41
Initial Age:	approx. 6 weeks	**Method of Administration:**	intramuscular injection	**Day of Mating:**	Day 0
Date of First Dose:	[redacted], 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	[redacted] M [redacted], [redacted]% Tween-80, pH [redacted]±[redacted]	**Day of C-Section:**	GD 61
No-Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 20 mg/kg; **F_1 Litters:** 20 mg/kg			**Special Features:** none	**GLP Compliance:**	Yes

Daily Dose		0 (Control)	0.05 mg/kg	1 mg/kg	20 mg/kg
Toxicokinetics ($C_{max, d1-35}$)		0	0.25 µg/mL	4.29 µg/mL	22.4 µg/mL
Dams:	**No. of Pregnant Females**	20	20	19	21
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
	No. Aborted or With Total Resorption of Litter	0	0	1	1
	Clinical Observations: Injection site hematoma	0	0	0	1
	Necropsy Observations: Placenta indurated, dark discolored	0	0	0	1
	Body Weight (GD 41) [g/% of control]	768 g	0%	+3.3%	+0.7%
	Food Consumption (GD 41) [g/% of control]	54.9 g	-11.9%	+6.1%	+3.7%
	No Pregnant at C-section	20	20	18	20
	Mean No. Corpora Lutea	3.4	3.4	3.5	3.4
	Mean No. Implantation Sites	3.1	3.1	3.3	3.4

Abbreviations: GD: gestation day

表 2.6.7.13 - Reproductive and developmental toxicity - fertility and early embryonic development to implantation (continued)

Test Article: Caplacizumab

	Study No.: [redacted]20179/[redacted]			
Daily Dose	**0 (Control)**	**0.05 mg/kg**	**1 mg/kg**	**20 mg/kg**
Mean % Preimplantation Loss	7.6	6.7	4.2	1.3
Litters: **No. Litters Evaluated**	20	20	18	20
No. Fetuses Evaluated (Live/Dead)	61/0	57/1	59/0	66/0
Mean No. Live Fetuses	3.1	2.9	3.3	3.3
No. runts	1	1	0	0
Mean No. Resorptions	0.1	0.2	0.1	0.1
No. of Litters with Dead Fetuses	0	1	0	0
Mean % Postimplantation Loss	3.3	7.8	1.4	2.5
Mean Fetal Body Weight (g)	80.1	82.2	81.4	80.4
Fetal Sex Ratio (%males)	48	56	46	47
Fetal Anomalies				
Gross External Malformations/Variations	0/0	0/0	0/0	0/0
Visceral Anomalies Malformations/Variations	0/0	0/0	0/0	0/0
Skeletal Anomalies				
Malformations	0	0	0	0
Variations; Fetal Incidence (Affected Fetuses/Litter)	7 (16.4%)	5 (8.5%)	3 (5.1%)	12 (16.8%)

14　生殖発生毒性試験－出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

該当なし

15　幼若動物を用いた試験

該当なし

16　局所刺激性試験

表 2.6.7.16 - Local tolerance

Test Article: Caplacizumab

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dose Levels	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
rabbit, Himalayan	intravenous, intramuscular, intra-arterial, paravenous and subcutaneous ([redacted], [redacted]M [redacted], [redacted]% Tween 80; pH [redacted])	5 x 2.35 mg/ animal	6 male animals	No treatment-related macroscopic or microscopic findings were observed following administration via any of the tested routes.	[redacted] 20340/[redacted]

Local tolerance of caplacizumab following the clinical dose routes (intravenous and subcutaneous injection) was assessed in standard toxicity studies.

17　その他の毒性試験

該当なし