目次

1. 非臨床試験の概括評価 5
2. 薬理試験 6
2.1 効力を裏付ける試験 6
2.1.1 *In vitro* 薬理試験 6
2.1.1.1 C5 に対する結合能 6
2.1.1.2 作用機序　C5 開裂及び MAC を介した細胞溶解に対する阻害作用 6
2.1.1.3 遺伝子変異型 C5 阻害作用 8
2.1.2 ジルコプランの種特異性 9
2.1.3 機能アッセイにおけるジルコプラン及び代謝物の活性比較 9
2.1.4 *In vivo* 薬理試験 10
2.2 副次的薬理試験 12
2.2.1 表面プラズモン共鳴法により評価した標的結合特異性 12
2.2.2 ヒト血清中の C5 に対するジルコプランの結合特異性 12
2.2.3 機能的受容体アッセイにおけるジルコプラン及び代謝物 RA102758 の活性 12
2.2.4 In vitro パネルを用いたジルコプラン、代謝物 RA102758 及び RA103488 の乱用性評価 12
2.3 安全性薬理試験 13
2.3.1 心血管系安全性薬理試験 13
2.3.2 呼吸器系安全性薬理試験 14
2.3.3 中枢神経系安全性薬理試験 14
2.4 薬力学的薬物相互作用試験 14
3. 薬物動態試験 14
3.1 分析方法 14
3.2 吸収 15
3.2.1 カニクイザルに反復皮下投与したときの抗薬物抗体 15
3.3 分布 15
3.4 代謝 16
3.5 排泄 17
3.6 薬物動態学的薬物相互作用 17
3.7 ヒト代謝物の全身曝露 18
4. 毒性試験 18
4.1 単回投与毒性 18
4.2 反復投与毒性 19
4.2.1 SD ラットにおける 4 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 19
4.2.2 カニクイザルにおける 4 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 19
4.2.3 カニクイザルにおける 13 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 20
4.2.4 カニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 22
4.3 遺伝毒性 23
4.3.1 *In vitro* 試験 23
4.3.2 *In vivo* 試験 23
4.4 がん原性 23
4.5 生殖発生毒性 24
4.5.1 カニクイザルにおける 13 週間皮下投与による雄受胎能試験及び 8 週間回復性試験 24

※調整中

4.5.2　カニクイザルにおける胚・胎児発生試験を含む拡充型出生前及び出生後の発生に関する皮下投与試験（3ヵ月間の授乳期／成熟期を含む）……24
4.5.3　幼若動物試験……25
4.6　局所刺激性……25
4.7　ジルコプラン投与の続発症に関連する上皮の細胞浸潤及び小水疱変性の総合的評価……25
4.8　その他の毒性試験……27
4.8.1　乱用及び依存性評価……27
4.8.2　不純物及び分解物の評価……27
4.9　全身曝露……29
5.　総括及び結論……29
6.　参考文献……31

表目次

表 2-1　古典経路における溶血に対する IC_{50} 値（1%NHS）……9
表 2-2　古典経路における溶血に対する IC_{50} 値（0.5nM ヒト C5 を補充した 1.5%ヒト C5 欠損血清）……9
表 2-3　安全性薬理試験リスト……13
表 3-1　カニクイザル及びヒトにおける定常状態での薬物の最高血漿中濃度（C_{max}）及び全身曝露量（AUC_{0-24}）の比較……18
表 4-1　安全性が確認されている不純物の種間比較……28
表 4-2　申請規格と適格レベルの比較……28
表 4-3　毒性試験における曝露量と定常状態におけるヒト薬物濃度に基づく推定安全域……29

図目次

図 2-1　ジルコプランによる C5a（左図、C5a ELISA）及び MAC（右図、Wieslab®ELISA）形成に対する阻害作用……7
図 2-2　補体古典経路による溶血阻害作用……8
図 2-3　カニクイザルにおけるジルコプランの PK/PD の相関……10
図 2-4　雄カニクイザルにおける反復皮下投与後のジルコプランの PK/PD 相関関係……11
図 3-1　ジルコプランの *in vivo* 主要代謝経路……17

※調整中

略語及び名称一覧表

略語（名称）	内容	
AUC	area under the drug concentration versus time curve	薬物濃度-時間曲線下面積
ALP	alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	筋萎縮性側索硬化症
ALT	alanine aminotransferase	アラニン・アミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the drug concentration versus time curve	薬物濃度-時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	乳がん耐性たん白
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸排泄ポンプ
C3	complement component 3	補体第 3 成分
C4	complement component 4	補体第 4 成分
C5	complement component 5	補体第 5 成分
C5aR	C5a anaphylatoxin chemotactic receptor	C5a アナフィラトキシン走化性受容体
C6	complement component 6	補体第 6 成分
C7	complement component 7	補体第 7 成分
C8	complement component 8	補体第 8 成分
C9	complement component 9	補体第 9 成分
CAII	carbonic anhydrase II	炭酸脱水酵素 II
CCK	cholecystokinin	コレシストキニン
CH50	50% hemolytic complement activity	血清補体価
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
COVID-19	corona virus disease 19	新型コロナウイルス感染症
CV	cardiovascular	心血管
CYP	cytochrome P-450	シトクロム P450
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定
ePPND	enhanced pre- and post-natal development	拡充型出生前及び出生後の発生
F	bioavailability	バイオアベイラビリティ
GABA	gamma-aminobutyric acid	γ-アミノ酪酸
GGT	gamma-glutamyl-transferase	γ-グルタミルトランスフェラーゼ
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
gMG	generalized myasthenia gravis	全身型重症筋無力症
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓
hERG	human *ether-a-go-go*-related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
HSA	human serum albumin	ヒト血清アルブミン
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学検査
IMNM	immune-mediated necrotizing myopathy	免疫介在性壊死性ミオパチー

略語（名称）	内容	
ka	association rate constant	結合速度定数
kd	dissociation rate constant	解離速度定数
K_D	dissociation constant	平衡解離定数
LC-MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
MAC	membrane attack complex	膜侵襲複合体
MATE1	multi-drug and toxin extrusion protein 1	多剤排出輸送体 1
MATE2-K	multi-drug and toxin extrusion protein 2-K	多剤排出輸送体 2-K
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2	多剤耐性関連たん白質 2
MRP3	multidrug resistance-associated protein 3	多剤耐性関連たん白質 3
NHP	non-human primate	ヒト以外の霊長類
NHS	normal human serum	健常ヒト血清
NOAEL	no-observed-adverse-effect level	無毒性量
NTCP	sodium/taurocholate co-transporting polypeptide	ナトリウム／タウロコール酸共輸送ポリペプチド
OAT1	organic anion transporter 1	有機アニオントランスポーター1
OAT3	organic anion transporter 3	有機アニオントランスポーター3
OATP1B1	organic anion transporting polypeptide 1B1	有機アニオン輸送ポリペプチド 1B1
OATP1B3	organic anion transporting polypeptide 1B3	有機アニオン輸送ポリペプチド 1B3
OCT1	organic cation transporter 1	有機カチオントランスポーター1
OCT2	organic cation transporter 2	有機カチオントランスポーター2
OECD	organisation for economic co-operation and development	経済協力開発機構
OX	orexin	オレキシン
PD	pharmacodynamic	薬力学
pH	negative logarithm of hydrogen ion concentration	水素イオン濃度指数
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PNH	paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	発作性夜間ヘモグロビン尿症
RDW	red blood cell distribution width	赤血球分布幅
S9	rat liver metabolizing system	ラット肝代謝活性化系
sC5b-9	soluble C5b-9 complex	可溶性 C5b-9 複合体
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
$t_{½}$	terminal half-life	最終相半減期
t_{max}	time to reach maximum concentration after drug administration (or time at which the maximum plasma concentration occurred)	最高薬物濃度到達時間
UGT	urine 5’-diphospho-glucuronosyltransferase	ウリジン 5’-二リン酸グルクロン酸転移酵素

略語は毒性学及び薬理学で認められている用語を使用した。

1. 非臨床試験の概括評価

ジルコプランナトリウム（以下、ジルコプラン）は 15 アミノ酸から成る大環状ペプチドであり、ヒト補体第 5 成分（C5）の不適切な活性化が関与する疾患の治療を意図した補体阻害剤である。全身型重症筋無力症（gMG）患者、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、免疫介在性壊死性ミオパチー（IMNM）及び新型コロナウイルス感染症（COVID-19）関連の呼吸窮迫症候群を適応症とした臨床試験が実施されており、本申請は抗アセチルコリン受容体抗体陽性の成人患者の gMG を適応症としたものである。

ジルコプランは 1 日 1 回の自己投与が可能な製剤として開発され、安全装置の付いた使い捨ての注射剤として供給され、皮下注射用の無菌防腐剤無添加溶液として配合されている。

ジルコプランは C5 のレベルで補体活性化を以下の 2 つの機序により阻害する。1)ジルコプランは C5 と結合してアロステリックに C5 の C5a 及び C5b への開裂を阻害することにより下流の補体活性化を防ぐと共に 2) C5b-C6 複合体形成を妨げることにより膜侵襲複合体（MAC）形成の第一段階を直接阻害する。C5a は強力なアナフィラトキシンであり、C5a アナフィラトキシン走化性受容体（C5aR）1 及び C5aR2 を介したシグナル伝達により生物学的作用を媒介する。C5b は C6、C7、C8 及び複数の C9 分子を含めた追加補体成分を引き寄せることによって、細胞膜内に挿入される細孔様構造である MAC 形成の核となる。グラム陰性微生物等の細菌の細胞膜内へ MAC が挿入されると細胞溶解が誘導される。一方、ほ乳類有核細胞に対して、MAC の持続的な細胞表面への挿入は、膜脱分極、炎症及び壊死を引き起こし、赤血球細胞等の脱核した細胞に対しては細胞溶解を引き起こす。したがって、C5 開裂阻害により、gMG 患者の神経筋接合部において、抗アセチルコリン受容体を介する補体活性化等、異常又は調節不全な補体活性化の条件下にある自己細胞表面での細胞溶解性 MAC の産生が阻止される。

ヒトへのジルコプラン投与のサポートのために、*in vitro* 試験及び *in vivo* 試験両方を含めた、効力を裏付ける試験、安全性薬理試験及び毒性試験を実施した。吸収、分布、代謝及び排泄に関する試験も実施した。

ジルコプランはカニクイザルでヒトと同様の薬理活性を示し、ブタにおいて中等度の阻害を示し、ラットでは非常に弱い作用（カニクイザルの 1/100 未満）しか認められず、マウス、モルモット、イヌ又はウサギ等の他の動物種では活性は認められなかった。薬理活性、代謝物プロファイルの類似性及び未変化体に対する代謝物の比率に基づき、カニクイザルは毒性試験に最も適切な動物種であると考えられる。4 週間反復投与毒性試験はラット及びカニクイザルの両動物種で実施し、13 週間及び 39 週間皮下投与毒性試験はカニクイザルを用いて実施した。反復投与毒性試験では、ジルコプランで臨床的に関連する標的器官に毒性は認められなかった。

心血管（CV）系及び呼吸器系の独立した安全性薬理試験はカニクイザルを用いて実施し、CV 系の安全性薬理評価はカニクイザルを用いた反復投与毒性試験の中でも実施した。中枢神経系（CNS）に対する安全性評価は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用のカニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験の一部として実施した。

細菌を用いる *in vitro* 復帰突然変異（Ames）試験及び染色体異常試験並びにラット骨髄を用いた *in vivo* 小核試験を実施した。ジルコプランのがん原性試験は実施していないが、ジルコプラン、代謝物及び不純物の発がん性についての包括的評価は行われている（Carcinogenicity Assessment Document）。加えて、ジルコプランの生殖発生毒性を評価するため、カニクイザルにおける胚・胎児発生を含めた拡充型出生前及び出生後の発生（ePPND）に関する複合試験、並びに雄受胎能試験を実施した。

全ての主要な非臨床安全性試験は、現行の規制ガイドライン並びに業界標準に従い、地域及び経済協力開発機構（OECD）の GLP に準拠して、OECD データ相互受け入れ制度に加盟する国々で実施した。ジルコプランの曝露プロファイルに関する情報を取得するために、反復投与毒性試験の中でトキシコキネティクス（TK）測定を行った。

2.　薬理試験

2.1　効力を裏付ける試験

ジルコプランの効力を裏付ける試験は *in vitro* で直接的な結合アッセイ及び補体機能阻害アッセイ、並びに酵素結合免疫吸着測定（ELISA）法を用いて実施した。表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いることにより、ジルコプランが C5 の特異的な部位に強力かつ速やかに結合すること、一方で解離速度は緩やかであることが示された。ジルコプランと同じコア配列を有するビオチン化ペプチドがヒト血清中の C5 を特異的に捕捉したことにより、ジルコプランと標的（C5）との結合が確認された。また、ジルコプランは、補体活性化経路の古典経路及び第 2 経路双方において C5a 及び C5b の形成に対する用量依存的な阻害作用を示し、更に抗体で感作した様々な動物種由来の赤血球の溶血に対する抑制作用を示した。ジルコプランは、霊長類に対して強力な補体阻害作用を示し、中等度の阻害を示したブタを除く他のほとんどの動物種に対する阻害作用は弱かった。

効力を裏付ける試験として霊長類を用いたモデルにおいて評価した。カニクイザルにジルコプランを 0.2 及び 4mg/kg/day を 7 日間毎日投与すると、血漿中濃度は 2.5μg/mL 超を示し、*ex vivo* アッセイで溶血を 90%以上阻害するのに十分な濃度であった。補体活性は、カニクイザルの 4、13 及び 39 週間反復投与毒性試験で採血した血漿を用いた *ex vivo* の溶血アッセイでも評価した。ジルコプランは、初回投与の 2 時間後から、4、13 及び 39 週間の全投与期間を通して溶血に対してほぼ完全な阻害を示した。これらの試験の 4 週間又は 8 週間の回復期間後では、血漿サンプルの溶血レベルがほぼベースラインまで回復しており、補体系に対する阻害作用はほとんど又は全く残存していなかった。このことは、ジルコプランが動物の血中から消失していることを示している。

2.1.1　*In vitro* 薬理試験

2.1.1.1　C5 に対する結合能

SPR 法を用いてジルコプランと C5 との結合相互作用を測定した（試験番号 TR-0019）。その結果、25℃において、結合速度定数（ka）値 6.3 ± 2.5×$10^5$$M^{-1}$$s^{-1}$、解離速度定数（kd）値 2.1 ± 1.1×$10^{-4}$$s^{-1}$ 及び平衡解離定数（K_D）値 0.43 ± 0.35nM（n=4）を示した。

2.1.1.2　作用機序　C5 開裂及び MAC を介した細胞溶解に対する阻害作用

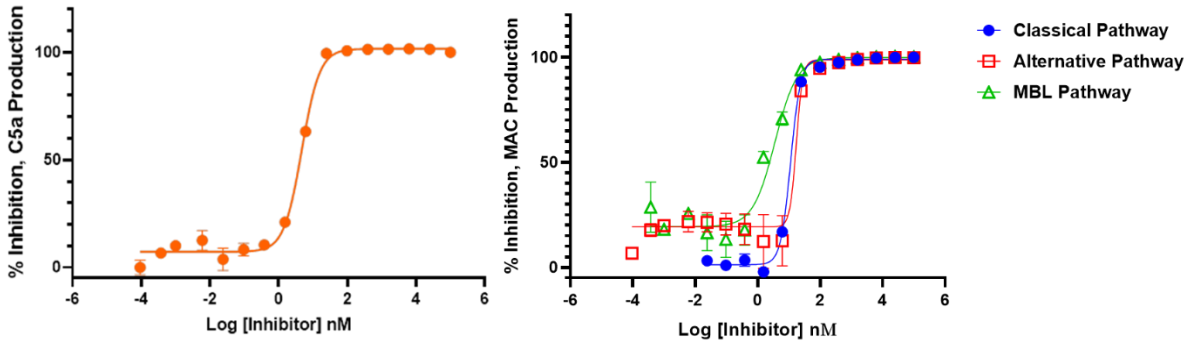
C5 開裂に対するジルコプランの阻害能を複数の *in vitro* 試験で評価した。古典経路の活性化に伴う C5 の開裂生成物である可溶性の C5a 及び可溶性 C5b-9 複合体（sC5b-9）の測定（試験番号 TR-0023）、及び古典経路、第 2 経路又はレクチン経路における MAC 形成の ELISA による検出を行った（試験番号 TR-0024）。更に、古典経路又は第 2 経路における MAC の細胞膜挿入による溶血反応を用いて、ジルコプランの機能を評価した（試験番号 TR-0020）。可溶性の C5 開裂生成物形成阻害作用は溶血阻害作用と相関していた。なお、C5 開裂及び MAC を介した細胞傷害に対する阻害作用は、エクリズマブの臨床的有効性の根拠となるものである。

抗体で感作したヒツジ赤血球に補体活性を保持した 1%健常ヒト血清（NHS）を曝露すると補体古典経路が活性化して C5 を開裂し、溶血を誘導する MAC を生成する。更に、ビトロネクチンのような因子により MAC の細胞膜挿入を阻害することで、C5b 生成指標となる sC5b-9 が生成される。溶血は上清中に遊離したヘモグロビンの光学密度を測定し、上清中の sC5b-9 及び C5a の両方は ELISA を用いて測定した。本試験でジルコプランは溶血に対する阻害作用を示し、最大効果を 50%阻害するのに必要な濃度（IC_{50}）値は 9.6nM であった。一方、ジルコプラン非存在下では完全な溶血が認められた。ELISA を用いたジルコプランの C5 開裂阻害強度（IC_{50} 値）は C5a（図 2-1、左図）及び sC5b-9 に対してそれぞれ 4.7nM 及び 5.9nM を示し、溶血試験における阻害強度と相関した。したがって、ジルコプランによる補体を介した溶血阻害の主な作用機序は C5 開裂に対する阻害作用であることが示された（試験番号 TR-0023）。

補体古典経路を介したヒツジ赤血球を用いた溶血に関する別試験では、1%NHS を用いて評価すると共に 1.5%ヒト C5 欠損血清に 0.5nM のヒト C5 を添加して溶血を評価した。C5 濃度を 5～7nM から 0.5nM に低下させた本試験条件により、ヒト C5 に対してジルコプランのように 5nM 未満の親和性を示す化合物の機能的な IC_{50} 値を測定することができる。更に、第 2 経路活性化後の溶血に対するジルコプランを介した阻害作用は、古典経路活性化をブロックするために Ca^{2+}非存在下の条件で 6%NHS によるウサギ赤血球を用いた溶血を用いて評価した。これらの試験系において、ジルコプランは補体を介した溶血に対し阻害作用を示した。各補体経路の試験結果より、古典経路の IC_{50} 値は 4.9nM、0.5nM ヒト C5 を補充した C5 欠損血清古典経路の IC_{50} 値は 2.4nM であり、第 2 経路の IC_{50} 値は 59.2nM であった（試験番号 TR-0020）。

Wieslab®補体活性アッセイキットを用いて補体古典経路、第 2 経路又はレクチン経路における MAC 形成阻害作用を更に評価した。本アッセイでは、ジルコプランは古典経路（図 2-1、右図、黒丸表示）又は第 2 経路（図 2-1、右図、白四角表示）に特異的に活性化されたプレート表面への MAC の蓄積を濃度依存的に阻害した。結論として、ジルコプランはこれらアッセイで MAC 阻害作用を示し、古典経路、第 2 経路又はレクチン経路での IC_{50} 値はそれぞれ 11.2、17.2 及び 3.6nM であった（試験番号 TR-0024）。

図 2-1　ジルコプランによる C5a（左図、C5a ELISA）及び MAC（右図、Wieslab®ELISA）形成に対する阻害作用



ELISA=酵素結合免疫吸着測定、MAC=膜侵襲複合体、MBL=マンノース結合レクチン

※調整中

2.1.1.3　遺伝子変異型 C5 阻害作用

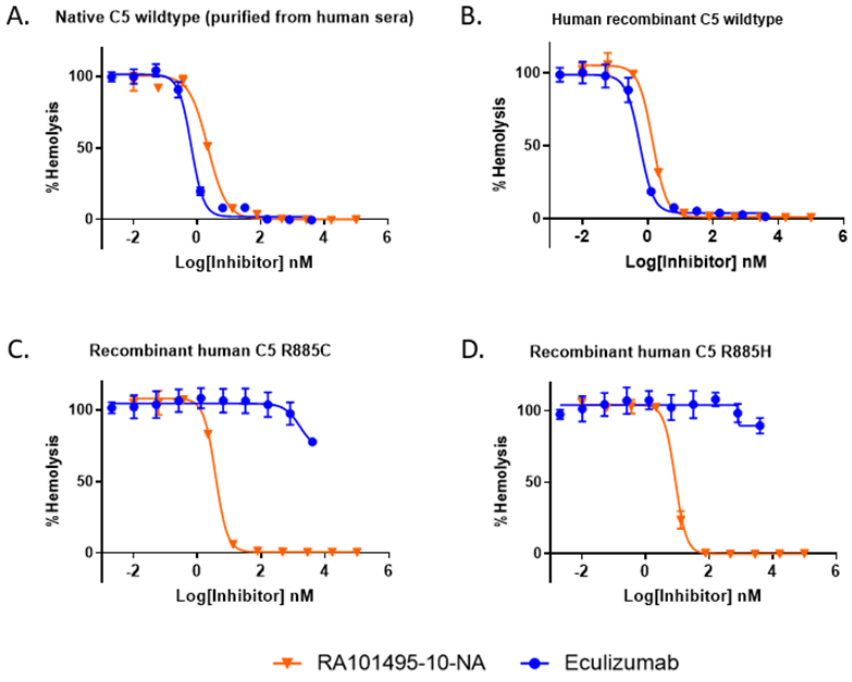
ジルコプランの C5 結合部位は、既存の補体 C5 阻害薬であるエクリズマブの C5 結合部位とは異なる。Nishimura らは、C5 の p.Arg885His 多型（R885H）と予測される単一ミスセンスヘテロ接合性変異 c.2654G→A を有する 11 例の PNH 日本人患者（PNH 日本人患者集団の約 3.2%）について報告しており、それらの患者では、エクリズマブの C5 への結合が阻害されるため、エクリズマブによる治療に抵抗性となることを明らかにした。（Nishimura et al. 2014）。また、同じアミノ酸残基における異なる変異である p.Arg885Cys 多型（R885C）が、エクリズマブへの反応が乏かったアジア系のアルゼンチン人 PNH 患者で発見されている（Nishimura et al. 2014）。エクリズマブとは異なり、ジルコプランは非臨床試験において遺伝子変異型 C5 への結合が確認されている。

SPR 法を用いて、ジルコプラン又はエクリズマブと遺伝子変異型 C5（R885C 及び R885H）との結合相互作用を測定した（試験番号 RRUS0007）。その結果、ジルコプランは野生型 C5（ヒト血清から精製）、野生型 C5 ヒト組換えたん白質及び変異型 C5 ヒト組換えたん白質（R885C 及び R885H）に結合した。一方、エクリズマブは野生型 C5（ヒト血清由来及び組換えたん白質）に結合したものの、変異型 C5 ヒト組換えたん白質（R885C 及び R885H）には結合しなかった。

また、ジルコプラン又はエクリズマブの遺伝子変異型 C5 に対する阻害能を、補体阻害を評価する信頼性の高い方法である補体古典経路によるヒツジ赤血球溶血アッセイを用いて評価した（試験番号 RRUS0006）。エクリズマブが野生型 C5（ヒト血清由来及び組換えたん白質）に対してのみ溶血阻害を示したのに対し、ジルコプランは野生型に加え、変異型（R885C 及び R885H）に対しても活性を示した（図 2-2）。

以上より、ジルコプランは C5 変異（R885）を有する患者に対しても効果を示すことが期待される。

図 2-2　補体古典経路による溶血阻害作用



RA101495=ジルコプラン

※調整中

2.1.2　ジルコプランの種特異性

溶血アッセイは、様々な動物種由来の血清／血漿における補体阻害剤の特性及び被験物質の動物種に関連した相対活性を比較するのに信頼性の高い方法である。薬剤の安全性評価に適切な動物種を選択する際に、使用動物の C5 に対するジルコプランの阻害活性は重要な要素である。2.1.1.2 項に示すように、溶血アッセイにより C5 開裂及び MAC を介した溶血を評価できる。ジルコプラン阻害活性を動物種間で比較するために、本アッセイで使用する様々な動物種由来の血清又は血漿の濃度は、阻害剤の非存在下で抗体感作ヒツジ赤血球を 50%溶血する濃度（血清補体価［CH50］と呼称）に調整した（試験番号 TR-0021）。

ジルコプランは、ヒト及びヒト以外の霊長類（NHP）の血清又は血漿での補体誘発溶血に対して強力な阻害作用を示し、ブタ由来の血清サンプルにおいて中等度の阻害を示した。ラットでは非常に弱い阻害作用（カニクイザルの 1/100 未満）が認められ、マウス、モルモット、イヌ又はウサギの他の動物種では阻害活性はほとんど認められなかった。ジルコプランはヒト及び NHP で同様の薬理活性を示したため、カニクイザルを非臨床試験で使用する動物種として選定した。

2.1.3　機能アッセイにおけるジルコプラン及び代謝物の活性比較

補体古典経路活性化経路の下流である C5 開裂に対するジルコプランの 3 代謝物（RA102758、RA103488 及び RA106009）の阻害活性を、*in vitro* で抗体感作ヒツジ赤血球の溶血反応を用いて評価した。抗体感作ヒツジ赤血球を用いた溶血反応は 2.1.1.2 項で示したように、1%NHS 又は 0.5nM ヒト C5 を補充した 1.5%ヒト C5 欠損血清に曝露して誘導した（試験番号 RRUS0001、RRUS0002 及び VV-QUAL-00131）。下記の表に示すように、RA102758 は補体系に強い薬理作用は示さなかったが、RA103488 及び RA106009 はいずれも薬理作用を示し、IC_{50}値はジルコプランと同程度であった。しかし、RA106009 はサル血漿中でのみ検出され、ヒト血漿中には検出されなかった（試験番号 18512）。

表 2-1　古典経路における溶血に対する IC_{50}値（1%NHS）

試験番号	化合物	IC_{50}（nM）
TR-0020	ジルコプラン	4.9
RRUS0001	ジルコプラン	4.6
	RA102758	30,884
RRUS0002	ジルコプラン	5.2
	RA103488	5.5

NHS=健常ヒト血清

表 2-2　古典経路における溶血に対する IC_{50}値（0.5nM ヒト C5 を補充した 1.5%ヒト C5 欠損血清）

試験番号	化合物	IC_{50}（nM）
TR-0020	ジルコプラン	2.4
RRUS0002	ジルコプラン	0.84
	RA103488	0.62
VV-QUAL-00131	RA106009	0.42

※調整中

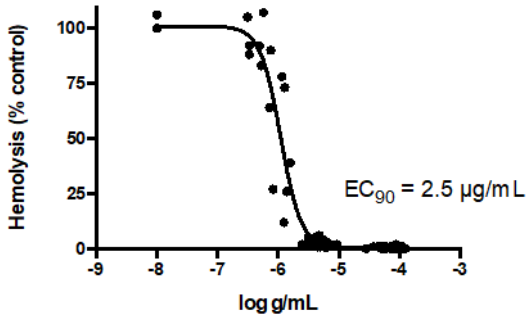
2.1.4　*In vivo* 薬理試験

ジルコプランは霊長類の C5 開裂に対して強力な阻害作用を示し、ヒト及び NHP において同程度の薬理活性を示す。ジルコプランはブタにおいて中等度の阻害を示し、ラットにおける阻害作用（カニクイザルの 1/100 未満）は非常に弱く、他のげっ歯類、イヌ又はウサギでは阻害活性は認められなかった。したがって、動物モデルでジルコプランの阻害活性を評価する試験には適切な動物種としてカニクイザルを選択した。

ジルコプランの薬物動態（PK）及び用量反応性は単回静脈内又は単回皮下投与後、又は反復皮下投与後のカニクイザルから採血した血漿サンプルを用いて評価した（試験番号 TR-0125：試験番号 20059043、20087646、20072469 及び 20082852 で得られた血漿サンプルを用いた補体活性評価試験）。カニクイザルを用いて単回投与 PK／薬力学（PD）試験を 2 試験実施した。試験番号 20059043 では、ジルコプラン 0.5mg/kg を雄カニクイザル（各群 2 例）に単回静脈内又は皮下に投与した。試験番号 20087646 では、ジルコプラン 0.4mg/kg を雄カニクイザル（各群 2 例）に単回静脈内又は皮下に投与した。カニクイザルを用いて反復投与試験を 2 試験実施した。試験番号 20072469 では、ジルコプラン 0.2 及び 4mg/kg を雄カニクイザル（各群 2 例）に 7 日間毎日皮下に投与した。試験番号 20082852 では、ジルコプラン 0.2、0.4 及び 0.6mg/kg を雄カニクイザル（各群 2 例）に 3 日に 1 回、合計 3 回投与した。血漿中薬物濃度は液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）で測定し、補体活性は採血した血漿を補体供給源として用いた抗体感作ヒツジ赤血球を使用した溶血アッセイにより *ex vivo* で測定した。

結論として、これら試験間の結果は一致しており、図 2-3（試験番号 20072469 のデータ）の PK/PD の相関図に示すように、90%以上の溶血阻害を達成するために必要なカニクイザルにおける血漿中薬物濃度は、2.5μg/mL 以上であることが示された。

図 2-3　カニクイザルにおけるジルコプランの PK/PD の相関



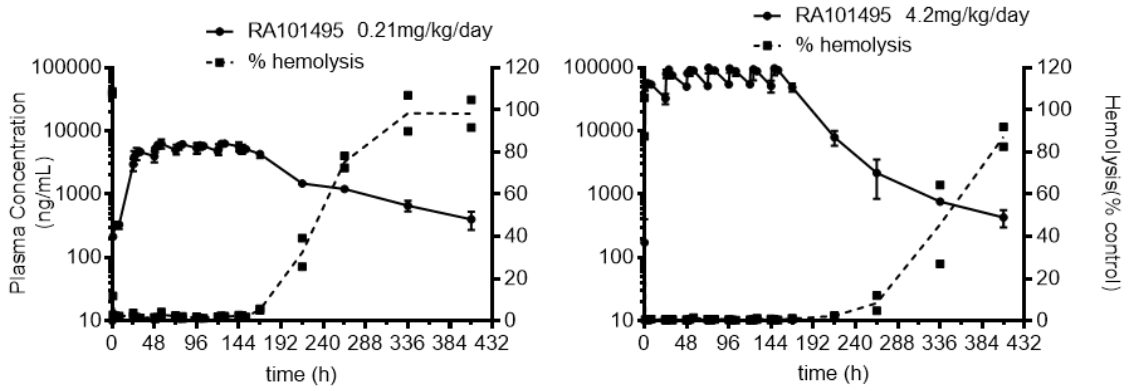
EC_{90}=最大効果の 90%の効果を示す濃度、PD=薬力学、PK=薬物動態

図 2-4（試験番号 20072469 のデータ）に示すように、0.2mg/kg/day の初回投与 1 時間後から投与期間中及び最終投与 24 時間後まで、*ex vivo* アッセイで溶血はベースラインの 10%未満をほぼ維持していた。最終投与 4 日後に溶血はベースラインの 75%を超えた（図 2-4 の左図）。

ジルコプランは 4mg/kg/day 投与群で初回投与 1 時間後から投与期間を通して溶血をほぼ完全に阻害し（1%未満）、最終投与 48 時間後（Day 9、216 時間、図 2-4 の右図に示す）では 3%未満を示す阻害を維持した。最終投与の 4 日後、溶血はベースラインのおよそ 10%に達した（Day 11、

264 時間、図 2-4 の右図に示す）。本結果により更にジルコプランの PK 及び PD プロファイル間の強固な相関が示された。

図 2-4　雄カニクイザルにおける反復皮下投与後のジルコプランの PK/PD 相関関係



PD=薬力学、PK=薬物動態、RA101495=ジルコプラン

カニクイザルを用いた 4、13 及び 39 週間反復投与毒性試験（それぞれ試験番号 20074710、20076807 及び 20086030）並びに 13 週間反復投与雄受胎能試験（試験番号 8366459）の一部として、*ex vivo* 溶血アッセイによりカニクイザル血漿サンプルの補体活性を評価した。ジルコプランを 4、13 及び 39 週間それぞれ最高用量 4、10 及び 6mg/kg/day 並びに 13 週間 4mg/kg/day まで毎日皮下投与した。

4 及び 13 週間反復投与毒性試験の結果、すべての投与量（4 週：1、2 及び 4mg/kg/day、13 週：0.25、1、2 及び 10mg/kg/day）で初回投与 2 時間後から 4 及び 13 週間の投与期間中は溶血に対してそれぞれ速やかで継続的な阻害作用を示した。即ち対照群の溶血率が 90%を超えていたのに対し、各投与群では 5%未満であった。両試験における 4 週間の回復期間後では、血漿サンプルの溶血レベルはほぼベースラインに回復しており、補体系に対する阻害作用はほとんど又は全く残存していなかった。このことから、動物の血中から薬剤が消失していることが確認された。

39 週間反復投与試験の結果は、初回投与 2 時間後から 39 週間の投与期間中は溶血に対して *ex vivo* で速やかで継続的な阻害作用を示した。即ち対照群の溶血率が 90%を超えていたのに対し、0.25mg/kg/day 投与群では 20%未満、1、2、4 及び 6mg/kg/day 投与群では 10%未満であった。8 週間の回復期間後では、血漿サンプルの溶血レベルはほぼベースラインに回復しており、補体系に対する阻害作用はほとんど又は全く残存していなかった。このことから、動物の血中から薬剤が消失していることが確認された。

13 週間反復投与雄受胎能試験由来の血漿における補体活性評価の結果、被験物質投与群のすべての動物から採取された血漿サンプルは、動物個体 P0105（1mg/kg 投与群）を除き、溶媒対照群のサンプル及び投与前値と比較して、初回投与後 1 時間以内からその後 13 週間を通して 95%を超える溶血抑制を示した。回復性試験動物の補体活性は、回復性試験期間に投与前値まで戻った。

2.2　副次的薬理試験

2.2.1　表面プラズモン共鳴法により評価した標的結合特異性

ヒト補体たん白質 C3、C4、C5、C6 及び C7 をアミンカップリング法により ProteOn GLH センサーチップに別々に固定した。C3 サブドメイン（C3d）、脂肪酸不含ヒト血清アルブミン（HSA）及びヒト炭酸脱水酵素 II（CAII）も別々に固定した。これら各たん白質表面とジルコプランとの結合は 25℃で SPR により測定した（試験番号 TR-0151）。その結果、ジルコプランの C5 に対する特異的結合が示され、K_D 値は 1.4nM を示した。ジルコプランは HSA 及び C4 に対して弱い結合が認められた（K_D>10μM）。検討した他のたん白質に対する結合は認められなかった。本試験結果によりジルコプランの C5 に対する選択性が示された。

2.2.2　ヒト血清中の C5 に対するジルコプランの結合特異性

プルダウンアッセイは、ジルコプランの結合相手であるたん白質を捕捉・同定するために用いた（試験番号 TR-0152）。ジルコプランのコア配列と同じたん白質構造を有するビオチン化分子を NHS とインキュベートした。ストレプトアビジンビーズによりペプチド及び結合たん白質をプルダウンし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。C5α 及び β 鎖に相当する 2 つのたん白質が選択的に結合し、ウエスタンブロット法により C5α 及び β 鎖であることを確認した。本アッセイでは血清中の他のたん白質との結合は検出されなかった。

2.2.3　機能的受容体アッセイにおけるジルコプラン及び代謝物 RA102758 の活性

本試験において、ジルコプラン及びその主要代謝物（RA102758）が 4 つの G たん白質共役受容体であるコレシストキニン（CCK）1、CCK2、グルカゴン及びセクレチン受容体に対してアゴニスト又はアンタゴニスト活性を有するか評価した。ジルコプラン及び RA102758 は、30μM まで、G たん白質共役受容体である CCK1、CCK2、グルカゴン及びセクレチン受容体に対してアゴニスト活性を示さなかった（試験番号 TR-0150）。ジルコプラン及び RA102758 は、10μM まで、検討したいずれの受容体に対してもアンタゴニスト活性を示さなかった。検討した最高濃度（30μM）では、ジルコプランは CCK2 受容体に対してアンタゴニスト活性（対照群のアゴニスト反応に対し阻害率 62%）を示し、RA102758 は CCK1 受容体に対してアンタゴニスト活性（対照群のアゴニスト反応に対し阻害率 57.4%）を示した。検討した最高濃度である 30μM は臨床試験での総血漿中濃度の約 10 倍程度であり、ジルコプランのたん白結合率（ヒト血漿内で 99%超）を考慮すると、臨床的に意義のある用量又は治療を上回る用量において問題とならない。

2.2.4　In vitro パネルを用いたジルコプラン、代謝物 RA102758 及び RA103488 の乱用性評価

ジルコプラン、その 2 種類の代謝物 RA102758 及び RA103488 と乱用に関連することが知られている 35 種類の標的パネルとの相互作用能を、30μM（ジルコプラン）または 3μM（代謝物）での結合アッセイで評価した（試験番号 100061456）。結合率は、各標的に特異的な放射性標識リガンドの%結合阻害として算出した。ジルコプランはオレキシン-1（OX_1）受容体（62%）と γ-アミノ酪酸（GABA）トランスポーター（52%）に顕著に（すなわち 50%超阻害）結合した。代謝物は、35 の標的のいずれに対しても顕著な結合を示さなかった。

さらに、特定された 2 つの標的に対するジルコプランの濃度反応関係を、結合アッセイ（両標的に対して）及び機能アッセイ（OX_1 受容体に対するアゴニスト／アンタゴニスト作用）を用いて評価した（試験番号 100062196）。結合アッセイにおいて、ジルコプランの IC_{50} は OX_1 受容体に対して 33μM、GABA トランスポーターに対して 11μM であった。また、ジルコプランは OX_1 受容体に対してアンタゴニスト作用を示し、その IC_{50} は 44μM であったが、これは想定される血漿中遊離ジルコプラン濃度の 1000 倍超である。

したがって、これらの作用には薬理学的臨床的意義はないと考えられる。

2.3　安全性薬理試験

カニクイザルを用いた CV 系及び呼吸器系安全性薬理試験に加えて、ヒト胎児腎臓（HEK）293 細胞を用いて、ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（hERG）カリウムチャネル電流に対するジルコプランの作用を *in vitro* 試験で実施した。ジルコプランの CNS 機能に対する作用はカニクイザルを用いた 4 週間反復投与 GLP 適用毒性試験の一部として評価した。

表 2-3　安全性薬理試験リスト

試験の種類	GLP 適応	試験番号
HEK293 細胞を用いた hERG パッチクランプ	適用	150507.SBR
カニクイザルを用いた CV 系／呼吸器系テレメトリー	適用	20076954
カニクイザルを用いた CNS 安全性	適用	20074710

CNS=中枢神経系、CV=心血管、GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、HEK=ヒト胎児腎臓、hERG=ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子

2.3.1　心血管系安全性薬理試験

hERG カリウムチャネルを安定発現している HEK293 細胞の I_{Kr} 電流（急速活性型遅延整流心臓カリウム電流）に対するジルコプランの *in vitro* 作用は、平行パッチクランプ法を用いて生理的温度に近い温度で評価した（試験番号 150507.SBR）。溶媒対照群が 0.4 ± 1.2%（n=3）の阻害を示したのに対し、ジルコプランは検討した最大濃度である 300μM（遊離薬物濃度として 1.07mg/mL に相当）で hERG を介した電流を阻害せず、39.2 ± 7.7%（n=4）の増加を示した。

覚醒下にテレメターを装着した雄カニクイザルを用いて CV 系及び呼吸器系 *in vivo* 安全性薬理試験を実施した（試験番号 20076954）。カニクイザル（各群 4 例）に溶媒（50mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 + 0.9%塩化ナトリウム）を初日に、2 及び 10mg/kg のジルコプランを第 8 日に皮下投与した。

心電図波形の形態及び P-QRS-T 複合波の間隔期間に対して、2 及び 10mg/kg のいずれの投与量においてもジルコプラン投与に関連した変化は認められなかった。心電図及び体温の通常日内変化については、溶媒投与群と同程度でジルコプラン投与による影響を受けなかった。加えて、平均血漿中薬物濃度 79.1μg/mL を示す検討最高用量である 10mg/kg においても、ジルコプラン投与に起因する心拍数及び動脈血圧の変化は認められなかった。投与前値及び溶媒投与後の値と比較して、2 及び 10mg/kg の投与量において、ジルコプラン投与後にいかなる呼吸器系パラメータも変化は認めら

れなかった。したがって、エスノブリッジング試験（UP0113 試験）の最大薬物濃度の 6.4 倍の濃度までジルコプランは CV 系機能に対して有害作用は示さないと予想される（表 4-3）。

カニクイザルを用いた 4、13 及び 39 週間 GLP 適用毒性試験の一部として心電図検査も実施した。ジルコプラン投与に関連する心電図の変化は認められなかった。

2.3.2　呼吸器系安全性薬理試験

2.3.1 項に記載した。

2.3.3　中枢神経系安全性薬理試験

4 週間反復投与毒性試験（試験番号 20074710）の一部として実施した CNS の安全性評価では、ジルコプランをカニクイザル（各群雄雌各 3 例）に 4 週間毎日 1、2 及び 4mg/kg/day を皮下投与した。CNS の評価パラメータとして一般状態、行動、運動機能、脳神経、固有受容器反応、姿勢反応、及び脊髄神経に対する評価を実施した。最大血漿中濃度 64.2μg/mL を示す、最高用量 4mg/kg/day のジルコプランを投与した後に神経学的な変化は認められなかった。

2.4　薬力学的薬物相互作用試験

ジルコプランの薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

3.　薬物動態試験

ジルコプランの薬物動態特性は、一連の *in vitro* 試験並びに Sprague-Dawley（SD）ラット及びカニクイザルを使用した *in vivo* 試験で検討した。ジルコプランはラットの C5 との相互作用が弱いことが示されており（M2.6.2.2.1.3 項）、ラットでは有意な薬理活性が示されなかった。この理由から、薬理、薬物動態及び毒性試験ではカニクイザルを主要な動物種として使用した。

ジルコプランの TK 評価は、連日皮下投与したときのラット（4 週間）とサル（最大 39 週間）の反復投与毒性試験（M2.6.6 項）、サルにおける雄受胎能試験、及び胚・胎児発生試験を含む拡充型出生前及び出生後の発生に関する試験で実施した。なお、4 週間及び 13 週間のサル試験では血漿試料中代謝物（RA103488、RA102758 及び RA106009）測定も実施した。

ジルコプランの血漿たん白結合、代謝物、及び薬物相互作用能の可能性を評価するために *in vitro* 試験を実施した。これらの *in vitro* 試験は、「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）」非適用であったが、適切な陽性及び陰性対照を使用することにより試験の適格性を確認した。

3.1　分析方法

ラット及びサルにおけるジルコプランの予備的薬物動態の検討に使用した分析方法は、非 GLP であるが、適切なレベルの精度及び真度を確保するために開発し、適格性を確認した。ラット及びサルにおける GLP 適用反復投与毒性試験、並びに心血管系、呼吸器系及び中枢神経系安全性薬理試験のサポートに使用された全ての分析方法は、GLP ガイドラインに従って開発し、適格性を確

認した。これらの方法には、血漿たん白質沈殿法及びそれに続く LC-MS/MS 法が組み合わされている。

3.2　吸収

ラット及びサルに単回静脈内投与したとき、ジルコプランは両動物種で低クリアランス、低分布容積を示した。ラットにおけるバイオアベイラビリティ（F）は、経口投与したとき 0.106%であり、経口吸収が乏しいことが示された。雄性 SD ラットに単回皮下投与したとき、ジルコプランは中等度の吸収（t_{max} の範囲は 4.67～5.33 時間）、約 9.3～9.5 時間の $t_{½}$ 平均値、及び検討した投与量（1 及び 10mg/kg）での投与量比例性の曝露を示した。ジルコプランをサルに単回皮下投与したとき、t_{max} 平均値が投与後約 8 時間と緩徐な吸収であった。サルにおいて、ジルコプランは皮下投与時に高いバイオアベイラビリティ（F=73%）及び 7 日間に渡る長い $t_{½}$ を示した。サルにおけるジルコプランの曝露は、0.2～4mg/kg/day の範囲で投与量比例を下回り、7 日間皮下投与後の蓄積率は 1.6～1.8 の範囲であった。ラット及びサルは、全試験期間を通じてジルコプランの曝露を受け、全身曝露に有意な性差は観察されなかった。

ジルコプランを 40mg/kg/day まで皮下投与したラット 4 週間毒性試験において、定常状態におけるジルコプランの血漿中曝露量（AUC）は雌雄動物で概して投与量比例的に増加した。反復投与したとき、28 日目の蓄積率が 1.56～2.99 でわずかな蓄積が観察された。

カニクイザルに 10mg/kg/day まで反復皮下投与した全ての毒性試験において、定常状態の血漿中曝露量はほぼ投与量比例的に増加した。反復投与したとき、蓄積率が 1.45～2.18 の範囲でわずかな蓄積が観察された。

3.2.1　カニクイザルに反復皮下投与したときの抗薬物抗体

カニクイザルの 4 週間、13 週間及び 39 週間毒性試験、並びに胚・胎児発生試験を含む ePPND 試験で抗薬物抗体の有無を検討した。試験したすべての動物のうち、4 週間毒性試験（試験番号 20074710）の 4mg/kg/day 群の 10 例中 1 例及び 13 週間毒性試験（試験番号 20076807）の 0.25mg/kg/day 群の 6 例中 1 例でのみ抗薬物抗体が確認された。この 2 例の血漿中ジルコプランの曝露量はそれぞれの投与群の曝露量と同程度であり、抗薬物抗体の存在がジルコプランの曝露量に明確な影響を与えないことが示された。

3.3　分布

ラット、サル及びヒトにおいて、ジルコプランは高い血漿たん白結合率（>99%）を示し、赤血球への有意な分布を示さなかった。ラットにおける定量的全身オートラジオグラフィー試験では、[^{14}C]ジルコプラン由来放射能は単回皮下投与後に広く分布し、C_{max} に達した後、投与後 8 週間まで少なくとも半分の組織中に放射能が滞留し、ゆっくりと低下した。脂質・パルミトイル側鎖標識[^{14}C]ジルコプランを投与したラットから採取した肝臓を使用して追加の代謝プロファイル試験を実施した。トリパルミチン酸グリセリルがラット肝臓中主要代謝物であり、ラット肝臓中放射能成分は全てパルミチン酸由来であった。この結果は、ジルコプランの末端脂質部分が内在性代謝サイクルに組み込まれ、組織内放射能の半減期が長いことにつながるという仮説を支持する。Long-Evans ラットにおいて、薬物由来放射能の色素組織への明確な親和性は認められなかった。

サルにジルコプラン 1mg/kg を単回皮下投与したとき、ジルコプランは投与後 6 時間にわたって血漿（C_{max} 18.6ng/mL at 2h）、微小透析液（C_{max} 241ng/mL at 3h）及び脳脊髄液（C_{max} 75ng/mL at 2h）サンプルで定量可能であり、サルにおけるジルコプランの脳内移行性が認められた。

Ex-vivo ヒト胎盤灌流モデル（母体灌流液中薬物濃度：10、20 及び 50μg/mL）におけるジルコプランの平均胎児移行率（胎児と母体の灌流液中濃度比）は、0.5～1.0%の範囲であった。また、ジルコプランの胎盤移行は母体灌流液中のヒト C5 たん白質の存在による影響を受けなかった。

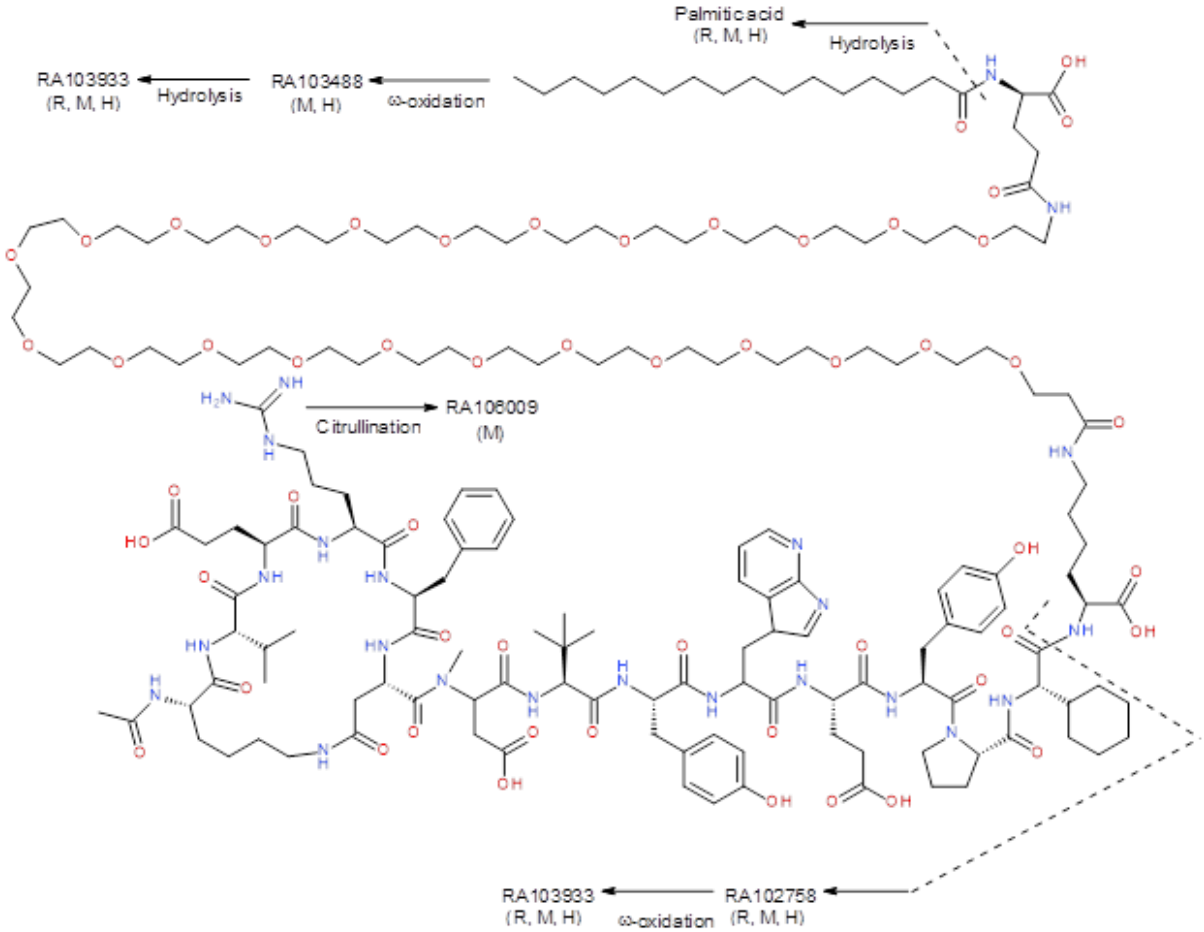
3.4　代謝

ジルコプランの 2 つの主要代謝経路は加水分解及び末端のω-酸化であることが確認され、RA102758 及び RA103488 の 2 種類の主要代謝物が産生された。RA102758 は、エチレングリコール-パルミトイル末端に結合したジルコプランの C 末端リジン残基として同定された。RA103488 は、ジルコプランのパルミトイル末端のω-水酸化体として同定された。RA103488 産生は主にシトクローム P450（CYP）4F2 に依存し、CYP4A11、4F3A 及び 4F3B の寄与はわずかである。ラットにおいて、未変化体が血漿中主要成分として存在し、RA102758 は尿及び糞中主要成分であった。サルにおいて、ジルコプランを単回及び反復投与したとき、RA102758 及び RA103488 は、未変化体の薬物濃度-時間曲線下面積（AUC）の>10%を占めた。両主要代謝物はヒトにおいて類似した割合で観察されたことから、ジルコプランの代謝経路が霊長類とヒトで同様であることが示された（すなわち、ヒト固有の代謝物はない）。

RA102758 は血漿たん白質に高率に結合する（>99%）が、補体系への薬理学的効果は有していなかった。これに対して、RA103488 も血漿たん白質に高率に結合する（>99%）が、薬理活性が観察された（溶血を指標としたとき、同じアッセイにおいて、未変化体の IC_{50} 値 5.2nM、RA103488 の IC_{50} 値 5.5nM であった）。しかしながら、RA103488 はヒト血漿中でジルコプランの 10%未満（AUC を指標として）であり（M2.7.2 項）、総体的な薬理活性に RA103488 が実質的に寄与するとは考えられない。

RA103488 同様、ジルコプランのシトルリン化物である RA106009 は補体介在性溶血を阻害するもう一つの代謝物である。RA106009 はサル血漿中で存在は確認されたが、ヒト血漿中では検出されなかった。

図 3-1　ジルコプランの *in vivo* 主要代謝経路



R: Rat, M: Monkey, H: Human

3.5　排泄

単回皮下投与したとき、ラットの尿及び糞中のジルコプラン量は投与量の 2%未満であった。胆管カニューレを挿入したサルでは、単回静脈内投与後のジルコプランは尿中で定量できず、胆汁中では投与量の 0.1%未満であった。これらの結果から、ラット及びサル共にジルコプランの主要なクリアランス経路が代謝であることが示唆された。

3.6　薬物動態学的薬物相互作用

ジルコプラン又は RA102758 が CYP アイソフォーム（1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、3A 及び 4F）、UGTs（1A1、1A3、1A4、1A6、1A9、2B7 及び 2B15）又はトランスポーター（P-糖たん白質、BCRP、BSEP、MRP2、MRP3、MATE1、MATE2-K、NTCP、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1 及び OATP1B3）を阻害する可能性を *in vitro* で評価した。ジルコプランの CYP 誘導試験の結果と合わせて、ジルコプランとこれら試験した CYP 酵素、UGT、又はトランスポーターの基質との間に臨床的に意味のある相互作用は無いと考えられた。ジルコプランは、主要 CYP 酵素（1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A）又はトランスポーター（P-糖たん白質、

BCRP、OATP1B1 及び OATP1B3）の基質ではなかった。したがって、ジルコプランとこれらの主要 CYP 酵素又はトランスポーターの阻害剤又は誘導剤との間の薬物間相互作用は考えられない。

3.7　ヒト代謝物の全身曝露

以下の表に示すように、毒性試験はヒトで想定される主要代謝物の曝露量を十分にカバーできる曝露量範囲で実施されている。

表 3-1　カニクイザル及びヒトにおける定常状態での薬物の最高血漿中濃度（C_{max}）及び全身曝露量（AUC_{0-24}）の比較

代謝物	カニクイザル						ヒト	
	0.25mg/kg/day（13 週）（試験番号 TR-0129）			10mg/kg/day（13 週）（試験番号 TR-0129）			0.3mg/kg/day（UP0113 試験）[a]	
	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-24} (μg·h/mL)	AUC ratio (M/H)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-24} (μg·h/mL)	AUC ratio (M/H)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-24} (μg·h/mL)
RA102758	0.450	9.90	0.365	49.3	1040	38.4	1.27	27.1
RA103488	1.05	22.4	0.926	8.71	178	7.36	1.11	24.2

M/H=カニクイザル／ヒト

[a] 出典はエスノブリッジング試験の臨床試験報告書データ（UP0113試験）。白人群における14日目の C_{max}及びAUC_{0-24}（RA102758及びRA103488）の幾何平均値（n=6）

4.　毒性試験

ジルコプランの包括的な毒性試験プログラムは、ラット及びカニクイザルにおける反復皮下投与毒性試験、一連の遺伝毒性試験、カニクイザルにおける生殖発生毒性試験、並びに *in vitro* 及び *in vivo* 安全性薬理試験で検討されている。ジルコプランは、カニクイザルではヒトと同様の薬理活性、ブタでは中等度の活性を示し、ラットでは非常に弱く（カニクイザルの 1/100 未満）、マウス、モルモット、イヌ、ウサギなどの他の動物種では活性を示さなかった。ジルコプランの薬理活性、代謝物プロファイルの類似性、及び代謝物と未変化体の比率に基づき、カニクイザルが毒性試験に最も適格な動物種であると考えられた。4 週間反復投与毒性試験は、ラット及びカニクイザルの両動物種で実施した。ジルコプランのラットでの薬理活性は非常に弱いため、13 週間及び 39 週間皮下投与毒性試験はカニクイザルを用いた。全ての非臨床安全性試験は、現行の規制ガイドライン並びに業界標準に従い、地域及び OECD の GLP に準拠して、OECD データ相互受け入れ制度に加盟する国々で実施した。

4.1　単回投与毒性

ジルコプランの単回投与毒性試験は実施していない。しかし、カニクイザルの安全性薬理試験において 10mg/kg の投与量で良好な忍容性が認められ、毒性変化及び投与部位の所見も報告されなかった（M2.6.2.4 項）。

4.2　反復投与毒性

4.2.1　SD ラットにおける 4 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

ジルコプランを 2.5、10 及び 40mg/kg/day で SD ラットに 4 週間連日皮下投与した（試験番号 20074709）。ジルコプランは、毒性評価のために 1 群あたり雌雄各 15 例に投与され、主試験には各群 10 例、回復性試験には各群 5 例の動物を使用した。対照群の動物には 50mM リン酸ナトリウム（pH 7.0）に 0.9%塩化ナトリウムを加えた溶媒を投与した。

ジルコプランに関連する用量依存的で可逆的な一般状態の変化は、投与部位で観察された擦傷及び硬い／軟らかい腫脹のみであった。投与部位での擦過傷は、10 及び 40mg/kg/day 群の複数の動物に認められ、擦過傷の発現頻度は用量依存的に増加した。40mg/kg/day 群でのこれらの変化は、投与部位の硬いあるいは軟らかい腫脹としばしば関連していた。加えて、投与部位にジルコプランに関連する用量依存的で可逆的な皮膚の紅斑及び浮腫が認められた。2.5、10 及び 40mg/kg/day 群のそれぞれ 30 例中 1 例、8 例及び 29 例の動物に紅斑が認められた。10 及び 40mg/kg/day 群のそれぞれ 30 例中 3 例及び 30 例の動物に 1 箇所以上の投与部位での浮腫が認められた。投与期間終了時には、ほとんどの動物で紅斑が消失し、40mg/kg/day 群の 3 例を除くすべての動物で軽度な浮腫スコアしか示さなかったか、又は浮腫は認められなかった。

投与終了剖検時では、40mg/kg/day 群における投与部位の皮膚の肥厚増加、痂疲、変色あるいは暗赤色の病巣等の肉眼的皮膚所見が認められた。10mg/kg/day 群以上の投与群で投与部位に被験物質に関連する病理組織学的所見が認められた。通常みられる所見として、皮下筋の変性及び皮下組織における単核細胞浸潤、混合細胞浸潤、線維化、浮腫、並びに 40mg/kg/day 群では皮膚表面のびらん又は潰瘍形成を伴う皮下組織における膿瘍形成が観察された。4 週間の回復性試験後、被験物質に関連する肉眼的及び病理組織学的所見は認められなかった。

所見の重篤度と特質に基づき、40mg/kg/day 群での投与部位の所見は毒性とみなされた。40mg/kg/day 群における臨床病理パラメータの軽微かつ非有害なジルコプランに関連する変化として、ヘモグロビン濃度の可逆的な減少、並びに網状赤血球数、赤血球分布幅（RDW）、好中球数及びフィブリノーゲン量の可逆的な増加が認められた。4 週間の回復性試験後、いずれのジルコプラン投与量群でも、被験物質に関連する肉眼的及び病理組織学的所見は認められなかった。

結論として、ジルコプランを SD ラットに 4 週間連日皮下投与した結果、投与量 40mg/kg/day まで概して忍容性は良好であった。標的器官への可逆的な変化は、40mg/kg/day 群の投与部位における有害反応に限定されていた。これらの結果に基づき、無毒性量（NOAEL）は 10mg/kg/day と考えられ、この用量における平均 C_{max} は 59.6μg/mL（雌雄合算、雄で 54.4μg/mL、雌で 64.8μg/mL）、平均 $AUC_{0\text{-}24}$ は 1065μg·h/mL（雌雄合算、雄で 1030μg·h/mL、雌で 1100μg·h/mL）であった。

全身曝露量を考慮し、投与部位での被験物質に関連する局所の影響を除外すると、NOAEL は 40mg/kg/day と考えられ、この用量における平均 C_{max} は 171.5μg/mL（雌雄合算、雄で 157μg/mL、雌で 186μg/mL）、平均 $AUC_{0\text{-}24}$ は 3505μg·h/mL（雌雄合算、雄で 3060μg·h/mL、雌で 3950μg·h/mL）であった。

4.2.2　カニクイザルにおける 4 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

ジルコプランを 1、2 及び 4mg/kg/day でカニクイザルに 4 週間連日皮下投与した（試験番号 20074710）。対照群（50mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 に 0.9%塩化ナトリウムを添加した溶媒を投与）及び 4mg/kg/day 群では、ジルコプランを 1 群あたり雌雄各 5 例の動物に投与し、主試験には

各群 3 例、回復性試験に各群 2 例を供した。1 及び 2mg/kg/day 群にはそれぞれ雌雄各 3 例の動物を使用した（これらの群の回復性試験は実施せず）。

ジルコプランに関連する影響として、2mg/kg/day 以上の群で胆汁酸及びリパーゼの上昇、投与部位の軽微な浮腫、1mg/kg/day 以上の群で胸腺における軽微から軽度の髄質細胞数の増加、及び軽微なリンパ濾胞の増加、投与部位における病理組織学的所見の出現頻度並びに重篤度の用量非依存的でわずかな可逆的な増加が認められた。病理組織学的所見として、軽微ないし軽度の浮腫、線維増殖、出血、筋細胞の変性／再生、あるいは皮下の混合細胞型炎症が認められた。回復性試験終了時の剖検では、対照群と比較して、皮下投与部位における病理組織学的所見の出現頻度及び重篤度のジルコプランに関連する増加は観察されず、投与終了時の剖検でみられた病理組織学的所見の回復性が証明された。

2 及び 4mg/kg/day 群でそれぞれ雄 1 例の肝臓で胆管周囲の軽微及び軽度な混合細胞型炎症が認められた。混合細胞型炎症は、主に単核細胞、少数の多形核細胞、限局性胆管周囲分布及び胆管上皮過形成により特徴づけられたが、同様の炎症は、胆嚢及び胆／膵管ではいずれの動物でも観察されなかった。試験実施時点では、病巣の分布、雌での同様の所見がないこと及びカニクイザルにおける背景データで報告されている肝臓所見との類似性のため、胆管周囲の炎症は偶発的である可能性が高く、ジルコプラン投与とは関係がないと考えられた。胆汁酸及びリパーゼの変化、肝臓の所見については、ジルコプラン投与の続発症に関連する病理所見の総合的評価の項で議論する（4.7 項）。

結論として、ジルコプランを投与量 1、2 及び 4mg/kg/day でカニクイザルに 4 週間連日皮下投与した結果、忍容性は良好であった。観察された所見は、出現頻度及び程度が限定されていること、及び一過性／可逆的であったことから、毒性とは考えられなかった。

これらの結果に基づき、NOAEL は最高用量の 4mg/kg/day であり、この用量における平均 C_{max} は 64.25μg/mL（雌雄合算、雄では 65.7μg/mL、雌では 62.8μg/mL）、最終投与時の平均 $AUC_{0\text{-}24}$ は 1140μg·h/mL（雌雄合算、雄では 1250μg·h/mL、雌では 1030μg·h/mL）であった。

4.2.3　カニクイザルにおける 13 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

ジルコプランをカニクイザルに 0.25、1、2 及び 10mg/kg/day の投与量で 13 週間連日皮下投与した（試験番号 20076807）。対照群（50mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 に 0.9%塩化ナトリウムを添加した溶媒を投与）、2 及び 10mg/kg/day 群には、ジルコプランを 1 群あたり雌雄各 5 例の動物に投与し、主試験に各群 3 例、回復性試験にそれぞれ 2 例を供した。0.25 及び 1mg/kg/day 群にはそれぞれ雌雄各 3 例を使用した（これらの群の回復性試験は実施せず）。

一般状態の変化として、顔の赤面及び乾燥、眼窩周囲の発赤を伴う両側性の眼分泌物、肝臓と膵臓の血液生化学的検査値の変化、並びに病理組織学的変化を伴うわずかな顔面黄疸と腹痛が 10mg/kg/day 群の雄 5 例中 3 例に認められた（1 例は 3 つの一般状態の各所見を示した）。全ての動物は計画剖検まで生存した。

血液生化学的パラメータのジルコプランに関連した変化として、10mg/kg/day 群でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニン・アミノトランスフェラーゼ（ALT）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、γ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）、総ビリルビン、コレステロール、リパーゼ、アミラーゼ、胆汁酸及びクレアチンキナーゼの上昇、並びにアルブミン及びアルブミン／グロブリン比の低下が認められ、0.25～2mg/kg/day の低用量群でリパーゼ、GGT、ALP

及びアミラーゼの散発的な上昇が認められた。凝固系パラメータのジルコプランに関連した変化として、0.25、1 及び 10mg/kg/day 群の 1～2 例でフィブリノーゲンの上昇が認められた。

Day 91 の投与終了時剖検において、0.25mg/kg/day 以上の群で膵臓、腎臓、舌、食道、唾液腺、甲状腺、直腸、回腸、胃及び膀胱に病理組織学的変化が認められた。概して、これらの所見の出現頻度及び重篤度に用量依存的な増加が認められたが、2mg/kg/day 以下の群でみられた変化は、出現頻度及び重篤度が比較的低かったため、毒性とは考えられなかった。10mg/kg/day 群の雄 1 例で病理組織学的変化として膵臓の顕著な炎症（血管炎）が観察され、毒性とみなされた。この動物には、また軽度の膵臓腺房細胞変性及び軽度の膵管過形成が観察され、これらの所見に関連してアミラーゼとリパーゼの上昇が認められた。1mg/kg/day 以上の群のそれぞれ雌 1 例で、軽微ないし軽度の膵臓腺房細胞変性が認められたが、この変化の程度は膵臓機能に重大な影響を及ぼす可能性が低いことから、毒性と考えられなかった。胸腺の髄質において、軽微から中等度のリンパ球数増加（0.25mg/kg/day 以上の群の雄、1mg/kg/day 以上の群の雌）及びリンパ濾胞形成が認められた（0.25mg/kg/day 及び 2mg/kg/day 以上の群の雄、1mg/kg/day 以上の群の雌）。血管／血管周囲の単核細胞浸潤が、膵臓、腎臓、舌、食道、唾液腺、甲状腺、直腸、回腸、胃及び膀胱で観察され、出現頻度及び重篤度（軽微から中等度）は用量反応的に増加した（0.25mg/kg/day 以上の群の雌雄）。直腸では、筋層で高頻度に軽微ないし軽度の混合細胞型炎症を有する平滑筋の再生を伴う軽微から顕著な筋変性が認められた（0.25mg/kg/day 群の雌雄、10mg/kg/day 群の雄）。2mg/kg/day 群の雄 1 例は、直腸粘液腺に好中球性炎症が観察されたが、筋変性は認められなかった。

投与期間終了時の動物では肝臓の変化は認められなかったが、4 週間回復性試験の 10mg/kg/day 群の雄 1 例で以下の有害な顕微鏡的変化が認められた：肝臓における架橋門脈を有する中等度の胆管過形成、中等度な卵円形細胞過形成、軽微な線維化、及び中等度の肝細胞グリコーゲンの増加。この個体では、投与期間中に AST、ALT、ALP、GGT、総ビリルビン及びコレステロールの上昇並びに僅かな顔面黄疸と腹痛が見られたが、4 週間回復性試験の剖検時にはこれらの所見は認められなかった。この個体は、膵臓における中等度の腺房萎縮及び軽度の単核細胞浸潤を伴う膵管過形成を有していた。これらの所見は、ジルコプランに関連している可能性が高いと考えられ、投与終了時の剖検動物に膵臓腺房細胞変性が認められたこと、及び投与期間中の臨床病理所見により毒性と考えられた。この所見は高用量群の 1 例に認められ、Day 58 頃に獣医師が観察した一般状態の変化と関連していた。

血管／血管周囲の単核細胞浸潤は、部分的に可逆的であったが、10mg/kg/day 群での膵臓及び肝臓、2mg/kg/day 群での胸腺における組織学的変化は、4 週間回復性試験後では完全には回復しなかった。

免疫組織化学検査（IHC）では、高用量群（10mg/kg/day）及び対照群（0mg/kg/day）のそれぞれ 6 例の舌、直腸及び膵臓に、免疫複合体の沈着を示唆するようなサルの免疫グロブリン（Ig）G、IgM 又は補体第 3 成分（C3）を含む顆粒状の沈着物は認められなかった。

高用量群（10mg/kg/day）動物 6 例の舌、直腸及び膵臓組織では、血管／血管周囲の単核細胞浸潤を有する血管の、主に固有粘膜下組織及び血管周囲領域において、IgG、IgM 及び C3 の漏出の増加、並びに IgG、IgM 及び C3 の染色の増加を伴う浸潤性／炎症性単核細胞が検出された。これらの結果は、血管透過性の増加を引き起こす血管／血管周囲の単核細胞浸潤に関連する局所血管の血管傷害による影響の可能性が高い。

これらの結果に基づいて、NOAEL は 2mg/kg/day と考えられ、Day 91 での対応する平均 C_{max} は雌雄合算で 34.05μg/mL（雄の平均 C_{max} は 37.6μg/mL、雌の平均 C_{max} は 30.5μg/mL）であり、平均

$AUC_{0\text{-}24}$は雌雄合算で 573.5μg·h/mL（雄の平均 $AUC_{0\text{-}24}$は 659μg·h/mL、雌の平均 $AUC_{0\text{-}24}$は 488μg·h/mL）であった。これらの曝露量は、第 III 相臨床試験における推定最大 C_{max}及び AUC をそれぞれ約 1.6 倍及び 2.1 倍、並びにエスノブリッジング試験（UP0113 試験）で得られた C_{max}及び AUC をそれぞれ 2.7 倍及び 2.2 倍上回っている（表 4-3）。

4.2.4　カニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性試験及び 8 週間回復性試験

カニクイザルを用いた 39 週間反復投与毒性試験では、ジルコプランを投与量 0.25、1、2、4 及び 6mg/kg/day で皮下投与した（試験番号 20086030）。対照群（50mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 に 0.9%塩化ナトリウムを添加）、2、4 及び 6mg/kg/day 群では、ジルコプランを 1 群あたり雌雄各 5 例の動物に投与し、主試験に各群 3 例、回復性試験にそれぞれ 2 例を供した。0.25 及び 1mg/kg/day 群にはそれぞれ雌雄各 3 例を使用した（これらの群の回復性試験は実施せず）。

ジルコプランに起因する一般状態の変化として、局所的ないくつかの部位での腫脹、眼分泌物、局所的及び全身的な皮膚の発赤、投与部位の反応、並びに様々な皮膚損傷又は擦過傷が含まれていた。ジルコプランに関連するとみなされる血液生化学的変化として、全ての投与群でアルブミンの減少が認められ、6mg/kg/day 群で最大の変化を示した。ジルコプランの最高用量（6mg/kg/day）を投与した動物は、血清中濃度の約 2%であると報告（Willcox et al. 1997）されている局所 C5 を阻害するのに十分に高い涙液中の薬物濃度を示した。これらの結果は、4 及び 6mg/kg/day を投与された動物にみられる粘膜皮膚接合部の感染症（例：結膜炎）の発症を示唆している可能性がある。

本試験において、3 例の動物（0.25、4 及び 6mg/kg/day 群で各 1 例）を試験途中で安楽死させた。そのうち 0.25mg/kg/day の 1 例は、試験開始前からの状態と考えられた慢性的で重度の大腸炎がストレスにより悪化したために安楽死させたが、被験物質に直接関連する可能性は低いと考えられた。

ジルコプランを 4 及び 6mg/kg/day で投与した 2 例は、被験物質に関連する皮膚の重度の潰瘍及びびらんのため、計画剖検よりも早期に安楽死させた。これらの動物には安楽死の決定に寄与した被験物質に関連する追加所見（肝線維症、肺浮腫、中等度の膵臓腺房細胞変性、及び腺房萎縮を伴う膵管変性／再生）が 1 つ又は複数認められた。早期死亡と投与終了剖検時に共通するいくつかの病理所見として、舌、子宮頸部、膣、食道、胃及び皮膚でインターフェース単核／混合細胞浸潤及び上皮性小水疱変性、膵臓腺房細胞変性、肝線維化、胆管過形成、肺浮腫、唾液腺管過形成、及び子宮内膜変性が認められた。

0.25mg/kg/day 以上の数例の動物では、食道、舌の切片（一部動物で主に T 細胞の浸潤がみられ、マクロファージは少なく、B 細胞のクラスターが時折存在した）、及び膣粘膜と子宮頸部（一部動物で上皮性小水疱変性を伴う）には、軽微から顕著な単核細胞及び混合細胞の浸潤が認められた。子宮頸部の単核細胞浸潤及び小水疱変性は、扁平上皮化生の出現頻度と重篤度の増加を伴い、上皮のびらんを伴うことは稀であった（1mg/kg/day 以上の群）。脾臓について、1mg/kg/day 以上の群で濾胞性リンパ球数の軽微ないし軽度の増加が認められた。1mg/kg/day 以上の群で胸腺髄質の軽微から顕著な細胞数増加は T 細胞数の増加からなり、B 細胞が豊富なリンパ濾胞を伴うことが多く、6mg/kg/day 群ではまれに多核巨細胞の出現及び出血を伴っていた。6mg/kg/day 群における骨髄でのリンパ球凝集体は対照群及び低用量群と比較して増加し、リンパ濾胞形成をしばしば伴っていた。

IHC で評価した 4 及び 6mg/kg/day 群の動物で、IgG 産生は細胞外及びインターフェース細胞浸潤がみられた細胞質内で増加した。細胞浸潤の形態及びそれらに関連する上皮の変化は、初期の安楽死動物について記載されたものと同様であり、上皮の用量依存的な小水疱変性を含んでいた。

ジルコプランに関連する複数の所見は、回復性試験終了時の剖検には完全に回復していた。しかし、食道の粘膜浸潤、子宮頸部粘膜の扁平上皮化生、胸腺の髄質細胞数増加及び骨髄の軽微なリンパ球凝集体は、回復性試験終了時にも残っていた。胸腺及び骨髄に部分的な回復を示す変化がみられた。さらに、胸腺では髄質細胞数増加の程度は軽微から軽度であり、髄質拡張の特徴を欠いていた。

4 及び 6mg/kg/day 群の 2 例で上皮組織の細胞浸潤及び小水疱変性がびらん及び潰瘍に進行したため、最低用量から認められたこれらの所見は有害であるとみなし、結果として、この試験における NOAEL は推定されなかった。最大耐量は 2mg/kg/day であり、この用量での平均 C_{max} は 32.25μg/mL（雌雄合算、雄では 30.6μg/mL、雌では 33.9μg/mL）、$AUC_{0\text{-}24}$ は 541μg·h/mL（雌雄合算、雄では 534μg·h/mL、雌では 548μg·h/mL）であり、これらは、第 III 相臨床試験における推定最大 C_{max} 及び AUC のそれぞれ約 1.6 倍及び 2.0 倍、並びにエスノブリッジング試験（UP0113 試験）で得られた C_{max} 及び AUC のそれぞれ 2.6 倍及び 2.1 倍に相当する（表 4-3）。

4.3　遺伝毒性

ジルコプランの遺伝毒性は、細菌を用いる *in vitro* 復帰突然変異試験及びヒト末梢血リンパ球を用いる *in vitro* 染色体異常試験で検討した。また、SD ラットの骨髄細胞を用いて *in vivo* 小核試験も実施した。

4.3.1　*In vitro* 試験

ジルコプランの 5000μg/plate までの用量で、サルモネラ菌（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）及び大腸菌（WP2*uvrA*）のいずれの試験菌株においても、ラット肝代謝活性化系（S9）の存在下又は非存在下で復帰突然変異コロニー数の増加を引き起こさなかったことから、細菌を用いる復帰突然変異試験では陰性であった。

ジルコプランは、S9 の有無にかかわらず、培養ヒト末梢血リンパ球の染色体異常、倍数性及び核内倍加の誘発性に対して陰性であった。処理時間は、S9 の有無にかかわらず 3 時間、及び S9 なしで 24 時間とし、500μg/mL までの濃度で試験を実施した。

4.3.2　*In vivo* 試験

ラットにジルコプラン 125、250 及び 500mg/kg を皮下投与した小核試験において、骨髄細胞中に小核を有する多染性赤血球の出現率の増加は認められず、投与 48 時間後の多染性／正染性赤血球比にも影響を及ぼさなかった。また、陽性対照群を含めることで、本試験の遺伝毒性に対する感度が示された。

4.4　がん原性

ジルコプランのがん原性試験は実施していない。ジルコプラン、代謝物及び不純物の発がん性についての包括的評価は行われている（Carcinogenicity Assessment Document）。この発がん性評価

には、利用可能なすべての薬理学の情報、ジルコプランの利用可能な非臨床及び臨床データ、生物学、及び他の C5 阻害剤についての腫瘍発生のリスク評価が含まれる。ジルコプランの包括的な非臨床プログラムは実施されており、C5 欠損症の家族及び C5 欠損マウス系統は腫瘍発生のエビデンスを示さないことを考慮すると、ヒトでの潜在リスクに対する更なる理解が加わる可能性が低いため、霊長類での更なる検討を行う理由に乏しい。げっ歯類での試験は、ジルコプランがマウスと交差反応せず、ラットでの薬理活性が非常に弱いので（カニクイザルの 1/100 未満）妥当ではなく、C5 を欠損するマウス系統のデータは評価に含まれている。

入手可能なすべてのデータを総合的に評価した結果、C5 阻害が悪性腫瘍のリスクを高めることを示唆するエビデンスはないと結論付けられた。

4.5　生殖発生毒性

4.5.1　カニクイザルにおける 13 週間皮下投与による雄受胎能試験及び 8 週間回復性試験

ジルコプランの雄受胎能への影響を評価するため、0、1、2 及び 4mg/kg を 0.2mL/kg の液量で、雄カニクイザル（1 群あたり 6 例）に 13 週間連日皮下投与した。1 群あたり雄 4 例の動物は、13 週間投与の翌日に試験を終了させ、1 群あたり雄 2 例は 8 週間の休薬期間後に試験を終了させた（試験番号 8366459）。

13 週間にわたるジルコプラン投与により、死亡または一般状態の変化は観察されなかった。体重変動、精巣の大きさ、臨床病理検査、イムノフェノタイピング及び器官重量は、ジルコプランの影響を受けなかった。全動物の精子形成は完全であり、すべての精子形成段階が全動物の精巣に認められた。精巣の軽微から軽度な片側性又は両側性の生殖細胞の枯渇／変性は、カニクイザルで認められる自然発生病変と一致していたため、被験物質とは関連がないと考えられた。

ジルコプランを 1、2 及び 4mg/kg の投与量で 13 週間連日皮下投与した結果、良好な忍容性が認められ、いずれの毒性変化も誘発しなかった。試験結果及び本試験条件に基づき、NOAEL は高用量の 4mg/kg/day と考えられ、NOAEL における C_{max} は 103μg/mL、$AUC_{0\text{-}24}$ は 1990μg·h/mL であった。これらの曝露量は、第 III 相臨床試験での推定最大曝露量（C_{max} 及び AUC）のそれぞれ約 5.0 倍及び 7.2 倍、並びにエスノブリッジング試験（UP0113 試験）で得られた C_{max} 及び AUC のそれぞれ 8.3 倍及び 7.8 倍であった（表 4-3）。

4.5.2　カニクイザルにおける胚・胎児発生試験を含む拡充型出生前及び出生後の発生に関する皮下投与試験（3 ヵ月間の授乳期／成熟期を含む）

胚・胎児発生試験を含む ePPND 試験では、カニクイザルの妊娠 20 日から 100 日又は妊娠終了時まで投与した場合、並びに出産及び授乳後（母動物に投与せず）のジルコプランの影響を評価するために実施した。胚・胎児発生試験では、溶媒対照（溶媒：50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0）、あるいはジルコプランを投与量 1、2 及び 4mg/kg で雌ザル 16 例（1 群あたり 4 例）に 80 日間連日皮下投与した（妊娠 20 日～100 日）。ePPND 試験では、溶媒対照（溶媒：50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0）あるいはジルコプランを投与量 1、2 及び 4mg/kg で雌ザル 64 例（1 群あたり 16 例）に約 140 日間連日皮下投与した（妊娠 20 日から分娩まで）（試験番号 8340294）。

ジルコプランを投与したすべての妊娠動物は、全評価日（妊娠 20、58、90 及び 142 日）にすべての用量段階でジルコプランに曝露された。$AUC_{0\text{-}24}$ 及び C_{max} を指標とした曝露量は、全評価日にわたり用量相関的に増加した。すべての出生児のジルコプラン血漿中濃度は、すべての母動物の用

量段階で授乳 21 日では定量限界未満であった。ジルコプランは分娩後 21 日の母動物の血漿中、及び分娩後 28 日に採取された乳汁サンプルに検出されなかった。ジルコプラン投与動物における抗薬物抗体は陰性であった。

ジルコプランの忍容性は良好であり、母動物の被験物質に関連する死亡はみられなかった。授乳 90 日まで、母動物の一般状態観察及び体重の変化に対するジルコプランに関連する影響は認められなかった。臨床病理パラメータである CH50 の薬理学的に推察される低下は、被験物質を投与したすべての母動物にみられ、出生時に投薬を停止した後、正常レベルに戻った。

ジルコプランを投与量 1、2 及び 4mg/kg で妊娠中のカニクイザルに 1 日 1 回皮下投与したとき、母動物、胚・胎児発生期（妊娠 20～100 日）、並びに出生前及び出生後の発達時期（妊娠 20 日から出産を経て授乳／出生後 90 日まで）に毒性は誘発されなかった。出生児の成長と発達に悪影響はなく、形態学的所見に毒性学的懸念はなかった。以上の試験成績より、胚・胎児発生、並びに出生前及び出生後の発生への影響に対する NOAEL は高用量の 4mg/kg/day と考えられた。NOAEL における平均 C_{max} は 72.9μg/mL、対応する $AUC_{0\text{-}24}$ は 1190μg·h/mL であった。これらの曝露量は、第 III 相臨床試験での推定最大曝露量（C_{max} 及び AUC）をそれぞれ約 3.5 倍及び 4.3 倍、並びにエスノブリッジング試験（UP0113 試験）で得られた C_{max} 及び AUC をそれぞれ 5.9 倍及び 4.6 倍上回る（表 4-3）。

4.5.3　幼若動物試験

ジルコプランの幼若動物試験は実施しなかった。ジルコプランの小児集団への使用は、本申請の適用範囲外である。

4.6　局所刺激性

個別の局所刺激性試験は実施していない。しかし、投与部位における局所刺激性の評価は、カニクイザル及びラットの反復投与毒性試験の中で実施した。カニクイザルにおける投与部位の反応は概して軽度で可逆的であったが、ラットでは一部の高用量群の動物でより顕著であり、その理由はラットの反復毒性試験では投与量がより高いためであると考えられた。

4.7　ジルコプラン投与の続発症に関連する上皮の細胞浸潤及び小水疱変性の総合的評価

薬理作用を示すカニクイザルにおける主な所見として、上皮単核細胞浸潤、小水疱変性及びそれらに関連する続発症が動物の様々な部位に認められた。免疫学的な所見及び変性の特性より、既往の病原体の再活性化又は新規感染に続発する抗原刺激に対する免疫応答が示唆された。39 週間投与試験では、2 例の早期安楽死動物を鎮静化し、患部を採取し培養した結果、日和見病原体（黄色ブドウ球菌、ベータ型溶血性連鎖球菌、シュードモナス菌及び腸球菌）が分離された。これらの試験に用いた動物は、一般的な病原体（例：サルレトロウイルス、サル免疫不全ウイルス、はしか）及び腸内病原体（ランブル鞭毛虫、クリプトスポリジウム、エントアメーバ）の事前スクリーニングを受けたが、霊長類コロニーにおける潜伏感染のスクリーニング時の課題はよく認識されている（Olivier et al. 2010）。そのため、検出された病原体に加えて、他の未発見の病原体が存在し、所見に関与したことを排除することはできない。B ウイルス（Macacine Herpes Virus-1）などのウイルス感染症は、上皮向性であり、霊長類のコロニー内に潜伏して感染症になることが多く、免疫抑制下で粘膜の小水疱や潰瘍などの病変を示すことがある（Keeble et al. 1958, Wachtman and

Mansfield 2012）。ジルコプランのげっ歯類における定量的全身オートラジオグラフィーは、皮膚に薬物由来物質が蓄積していることを示していない（試験番号 16863 及び C18038）。更に、ジルコプラン投与により局所的に高濃度の薬物が存在する皮下の投与部位では、小水疱形成を伴わずに軽微から軽度の細胞浸潤のみが認められ、上皮病変が高濃度の薬物の領域と関連しないことを示している。したがって、GLP に準拠したジルコプランの毒性試験で観察された上皮病変は、カニクイザルの病原体の再活性化又は新規感染が原因である可能性がある。このような感染症とそれに関連する続発症は、バックグラウンドの微生物叢、バックグラウンド又は潜伏感染のレベル、ストレス、衛生、サル間の相互汚染、及び相対的な脆弱性が動物種間で大きく異なるため、ヒトに直接外挿することはできない（Olivier et al. 2010）。臨床試験で認められた感染症の解析は安全性統合解析（M5.3.5.3.3）に記載した。

膵臓の細胞浸潤及び変性、リンパ球数増加、散発性の架橋胆管過形成と肝線維化が観察されており、これらも病原体の増殖、コロニー形成、感染に続発した所見であり、胆管の二次上行感染によるものと考えられる。持続的に感染した動物では、通常は唾液腺、膵臓、腎臓、胸腺髄質、骨髄にリンパ濾胞が現れる可能性がある（Guzman et al. 1999）。また、肝臓の所見が病原体感染の二次的な結果であった可能性もある。*Enterocytozoon bieneusi* は、マカク属のサルの消化管の一般的な微胞子虫寄生虫であり、免疫抑制下では、胆管過形成と架橋肝線維化を引き起こす。さらに、様々な再活性化ヘルペスウイルスも肝胆道系に感染して壊死を引き起こす可能性がある（Wachtman and Mansfield 2008）。このような感染症とそれに関連する続発症は、ヒトに直接外挿することはできない（Martin and Bugelski 2012; Olivier et al. 2010; Sasseville and Mansfield 2010; Price 2010）。

リンパ球過形成（記載はリンパ球数増加、リンパ球凝集体の増加又はリンパ濾胞の増加など様々）は、サルを用いた 4、13、及び 39 週間投与試験の胸腺、並びに 39 週間投与試験中の骨髄及び脾臓で認められた。後者の試験では、リンパ濾胞は進行中の免疫（B 細胞）応答を示す活動的な二次濾胞と考えられた。これは、免疫抑制及び二次的な日和見病原体の増殖、コロニー形成及び感染をもたらした C5 の薬理学的阻害に対する適応免疫応答の可能性がある。このような感染とそれに関連する続発症は、ヒトに直接外挿することができない。注目すべきことは、ジルコプランの C5 薬理活性が非常に弱い（カニクイザルの 1/100 未満）ラットの 4 週間投与 GLP 試験では胸腺、骨髄又は脾臓の病変に被験物質に関連する変化はなく、全身感染の徴候は観察されなかったことである。

数例の動物（4、13 及び 39 週間投与毒性試験で用いた動物）は、腹痛／黄疸／胆管過形成／胆管周囲炎症又は架橋胆管過形成及び肝線維化を示した。13 週間及び 39 週間投与試験の動物では、胆汁うっ滞性肝障害の血液生化学的バイオマーカーの明確な増加が観察された。これらの病変の可逆性は、13 週間投与試験では回復性試験の動物に変化が認められたため、また 39 週間投与試験では皮膚病変のために早期終了が必要な動物で変化が同定されたため、評価できなかった。しかし、13 週間投与試験の投与期間中で観察された肝臓の顕微鏡的変化を伴う肝酵素の変化は、回復性試験の剖検時には観察されず、影響を受けた動物では可逆性の傾向を示していた。13 週間投与試験では、投与終了時剖検動物及び回復性試験動物（高用量の一部動物を除く）のいずれにおいても、39 週間投与試験では、試験終了時まで生存した動物においても、架橋胆管過形成及び肝線維化は観察されなかった。

膵臓については、13 週間及び 39 週間投与試験で投与量及び期間に依存する可逆的な単核細胞浸潤が時折認められた。これらの試験では、投与量 1mg/kg/day 以上で軽微ないし軽度の外分泌膵臓腺房細胞変性が散発的に認められた。これらの所見は、投与量 10mg/kg/day 未満で可逆的であった。13 週間投与試験では、リパーゼ及びアミラーゼの散発的な増加が 0.25、2 及び 10mg/kg/day 群

で観察され、1mg/kg/day 群では観察されなかったが、これらの酵素は 10mg/kg/day でより一貫して増加した。対照的に 39 週間投与試験では、早期安楽死動物を除き、統計学的に有意ではない軽微ないし軽度のリパーゼ及びアミラーゼの増加が、6mg/kg/day 群でのみ観察された。13 週間の雄受胎能試験及び胚・胎児発生を含む ePPND 試験では、膵酵素値の一貫的な上昇は認められず、上皮単核細胞浸潤及び小水疱変性も観察されなかった。

霊長類の感染に関連する安全性の所見は、試験毎に大きく異なる可能性があり、特に霊長類は異なる共生細菌叢を持ち、異なる病原体に対して異なる感受性を示すため、ヒトで予想される感染の発生率と種類を正確に予測する能力は限定されている（Martin and Bugelski 2012; Olivier et al. 2010; Sasseville and Mansfield 2010; Price 2010）。加えて、いくつかのウイルス性、細菌性及び寄生性の病原体は、霊長類集団に固有であり、臨床的に検出できないままであるか、免疫機能が適切な動物では軽度で自己制限的である（Sasseville and Mansfield 2010）。ヒトと NHP の感染に関連する安全性の所見の違いは、ヒトと比較して、皮膚、粘膜、消化管に存在する細菌叢の違い、免疫状態の違い、サルの衛生／身づくろい行動の違いが原因である可能性が最も高い。これらは、試験内の個々の動物間で観察された感染関連の影響が異なることの原因である可能性もある。このような様々な違いは、試験に使用されたサルの起源、コロニー、又は委託研究機関に応じて、被験物質が異なる感染プロファイルを示す理由にも関与している可能性がある。更に、免疫調節は霊長類にこれらの病原体の一次感染又は再発の影響を受けやすくする可能性がある（Price 2010; Olivier et al. 2010）。

4.8　その他の毒性試験

4.8.1　乱用及び依存性評価

乱用性に関する包括的な評価は M4.2.3.7.4 に添付した。

ジルコプランの乱用及び依存性を評価するための独立した *in vivo* 非臨床試験は実施していない。環状ペプチドの一般的特性と一致して、ジルコプランは標的たん白である C5 に対して優れた選択性を示した。*In vitro* パネルを用いた乱用性評価試験において、ジルコプランは、薬理学的又は臨床的に意義のある濃度で、他の副次的標的のいずれにも結合しなかった（M2.6.2.3.4 項）。GLP 適用毒性試験の所見から、ジルコプランは動物において行動又は顕著な中枢神経系への影響を及ぼさないことが示された（M2.6.6 項）。

4.8.2　不純物及び分解物の評価

安全性が確認されている原薬中の不純物について、不純物 RA102860（EG_{20}）、RA104108（EG_{23}）、RA104109（EG_{25}）及び RA104284（EG_{28}）の種間比較を表 4-1 に示す。

13 週間の毒性試験では、2 ロット（ロット 7002399 及び 7002436）が用いられた。本試験で安全性が確認されたと考えられる濃度の不純物は、これら 2 ロットのいずれかで観察された最低レベルであり、これにより、動物は毒性試験の全期間中、そのレベルに曝露されたことが保証される。

表 4-1　安全性が確認されている不純物の種間比較

Impurity	Tox batches 13-week Nonhuman Primate Study (NHPs) (%area)	Impurity administered to NHPs (mg/kg/day)[a]	Qualified impurity daily intake based on HED (mg/kg/day)[b]
RA102860 (EG_{20})	1.7	0.034	0.011
RA104108 (EG_{23})	3.0	0.060	0.019
RA104109 (EG_{25})	1.8	0.036	0.012
RA104284 (EG_{28})	0.78	0.016	0.005

[a] Uses the NOAEL of 2mg/kg/day zilucoplan as reference from the 13-week toxicity study.

[b] Uses a factor of 3.1 to convert NHP dose to human dose.

ヒト等価用量に換算するには、mg/kg の用量を用いるべきであり、計算には最高用量の 0.42mg/kg が用いられた。

表 4-2 では、規格値限界の設定値と体重あたりの不純物量（mg/kg/日）で示された安全性が確認された値とを比較している。

表 4-2　申請規格と適格レベルの比較

Impurity	Specification limits	Dose of impurity at specification limit (mg/kg/day)[a]	Qualified impurity daily intake based on HED (mg/kg/day)
RA102860 (EG_{20})	NMT 1.2% area	0.005	0.011
RA104108 (EG_{23})	NMT 3.0% area	0.013	0.019
RA104109 (EG_{25})	NMT 2.5% area	0.011	0.012
RA104284 (EG_{28})	NMT 1.2%area	0.005	0.005

[a] Dose of impurity for a maximal human dose of 0.42mg/kg/day zilucoplan.

表 4-2 の結果から、不純物 RA102860（EG_{20}）、RA104108（EG_{23}）、RA104109（EG_{25}）及び RA104284（EG_{28}）について設定された規格限界値を用いると、最大用量である 0.42mg/kg/日を患者に投与した場合、これらの不純物は、サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験での安全性が確認されているレベル以下で曝露される可能性があることが示されている。これにより、表 4-2 に記載された規格値における不純物の安全性が保証される。

2 つの分解生成物 RRT 0.98 及び 1.02 については、化学合成により得られたペプチド中の不純物の安全性確認の閾値が 1.0%である、欧州薬局方一般モノグラフ 2034「医薬品用物質」に準拠して規格値を設定する。原薬濃度での不純物 RRT 1.02 については、製剤中のこの不純物の濃度が、Ph.Eur. 2034.に従って NMT 1.0%の限界値以下に保たれるように、NMT 0.5%面積の判定基準を適用した。

ジルコプランの不純物の遺伝毒性は ICH M7 に従って評価した。潜在的な遺伝毒性データの文献検索に続いて、Derek 及び Leadscope を用いた細菌変異原性の in silico 予測に不純物が供され、データの専門家によるレビュー後にガイドラインに従って分類された。RA102860（EG_{20}）、RA104108（EG_{23}）、RA104109（EG_{25}）及び RA104284（EG_{28}）は、原薬（アナログ）で得られた Ames 試験

（陰性）と、対応するアミノ酸 EG で得られた in silico 予測（陰性）に基づいて、クラス 5 として報告された。RRT 0.98 及び 1.02 に対応する構造は、原薬の Ames 試験の陰性に基づきクラス 5 として報告された。したがって、上記の不純物は、変異原性を示さない不純物と考えられた。

4.9　全身曝露

臨床開発プログラムを通して、ジルコプランは良好な安全性プロファイル及び忍容性を示している。第 III 相臨床試験におけるヒト最大推定曝露量のモデリング（体重 80kg の患者に 32.4mg の用量を投与したときの推定曝露量：C_{max} は 20.7μg/mL、AUC は 275μg·h/mL；モデリングレポート CL0529）に基づく曝露量比は以下のとおり算出され、適切であると考えられた。エスノブリッジング試験（UP0113 試験）では、ジルコプラン 0.3mg/kg を最大 14 日間連日投与した結果、白人集団での定常状態におけるジルコプランへの平均曝露量は C_{max} が 12.4μg/mL、AUC が 256μg·h/mL であった。モデリングアプローチによる安全域及びエスノブリッジング試験に基づく安全域（表 4-3）が示すとおり、いずれのデータセットに基づいても安全域は適切であるとみなされた。したがって、非臨床プログラムは、1 日 1 回の自己投与可能な皮下注射製剤としてのジルコプランの製造販売承認をサポートする。以上をまとめると、入手可能なデータに基づき、ジルコプランは適切な安全域で補体活性の 95%を上回る阻害と溶血の持続的な阻害を達成できることが示された。

表 4-3　毒性試験における曝露量と定常状態におけるヒト薬物濃度に基づく推定安全域

試験	NOAEL 又は最大耐量 (mg/kg/day)	NOAEL 又は最大耐量における曝露量データ		モデリングアプローチによる安全域 [a]		エスノブリッジング試験に基づく安全域 [b]	
		C_{max} (μg/mL)	AUC (μg·h/mL)	C_{max}	AUC	C_{max}	AUC
サル 13 週間	2	34.05	573.5	1.6	2.1	2.7	2.2
サル 39 週間	2[c]	32.25	541	1.6	2.0	2.6	2.1
サル雄受胎能	4	103	1990	5.0	7.2	8.3	7.8
サル ePPND	4	72.9	1190	3.5	4.3	5.9	4.6

AUC=薬物濃度-時間曲線下面積、C_{max}=最高血漿中濃度、ePPND=拡充型出生前及び出生後の発生、NOAEL=無毒性量

[a] 体重 80kg の患者に 32.4mg の用量を投与したときの推定曝露量（C_{max} は 20.7μg/mL、AUC は 275μg·h/mL）に基づく安全域（CL0529）

[b] エスノブリッジング試験（UP0113 試験の表 14.2.2.4 における Day 14 の白色人種グループの曝露量の算術平均、C_{max} は 12.4μg/mL、AUC は 256μg·h/mL）

[c] 最大耐量に基づく安全域

5.　総括及び結論

非臨床試験により、ジルコプランの薬理、安全性薬理、薬物動態及び毒性を広範に評価した。ジルコプランは C5 と結合し、C5 が C5 転換酵素により開裂して C5a 及び C5b となるのを防ぐ。gMG 患者の神経筋接合部において、抗アセチルコリン受容体を介する補体活性化等、異常又は制御不能な補体活性化の条件下にある自己細胞表面での細胞溶解性 MAC の形成は C5 開裂阻害により阻止し得る。ジルコプランはカニクイザルでヒトと同様の薬理活性を示し、ブタにおいて中等度の阻害を示し、ラットでは非常に弱い作用（カニクイザルの 1/100 未満）しか認められず、マウス、モルモット、イヌ又はウサギ等の他の動物種では活性は認められなかった。

ラット及びサルにおいて、ジルコプランは低クリアランス及び低分布容積を示した。皮下投与後のサルにおいて、ジルコプランは良好に吸収され、バイオアベイラビリティは 73%であった。ジルコプランは高い血漿たん白結合を示し、有意な赤血球移行を示さなかった。臨床薬物濃度におけるジルコプランの平均胎児移行率は低く、ヒト C5 たん白質の存在による影響も受けなかった。

ラット及びサルにおいて、代謝はジルコプランの主要消失経路である。2 種類の主要代謝物、RA102758 及び RA103488 はサル及びヒト血漿中に同様の割合で観察された。RA106009 はサル特異的代謝物であり、ヒト血漿中では検出されなかった。

ジルコプランは主要 CYP 酵素又はトランスポーターの基質ではないため、薬物動態学的薬物相互作用の可能性は低い。ジルコプランは主要 CYP 又は主要トランスポーターの臨床的に意味のある阻害剤又は誘導剤ではない。ジルコプランの薬力学的薬物相互作用については評価していない。

ジルコプランは、カニクイザルにおいて免疫原性を有する可能性が低い。非臨床試験では、抗薬物抗体の出現率が低く、抗薬物抗体が認められたエビデンスとしては 2 検体の陽性反応のみであった。

ラット 4 週、カニクイザル 4、13 及び 39 週反復皮下投与毒性試験、一連の遺伝毒性試験、カニクイザルにおける生殖発生毒性試験、並びに *in vitro* 及び *in vivo* 安全性薬理試験等、トキシコキネティクス試験を含むジルコプランの包括的な毒性試験プログラムを実施した。

GLP に準拠したラットの 4 週間投与毒性試験では、用量依存的な投与部位の所見のみが観察された。カニクイザルにおける注射部位反応は概して軽度かつ可逆的であったが、ラットでは一部の高用量群の動物でより顕著であり、その理由はラットの反復毒性試験では投与量がより高いためであると考えられた。

薬理作用を示すカニクイザルの毒性試験における主な所見として、上皮単核細胞浸潤、小水疱変性及び関連する続発症が観察された。免疫学的な所見及び変性の特性より、既往の病原体の再活性化又は新規感染に続発する抗原刺激に対する免疫応答が示唆された。重要な 39 週間投与試験で特定された病原体に加えて、他の未発見の病原体も所見に関与した可能性がある。このような感染症とそれに関連する続発症はヒトに直接外挿することはできない（Olivier et al. 2010）。結論として、臨床的に関連のある標的器官の毒性は、ジルコプランの重要な毒性試験では認められなかった。

C5 阻害薬は、感染に対する感受性の増大と関連しており、特に髄膜炎菌感染症に関係している。C5 及び終末補体経路の阻害が、ナイセリア種の細菌感染（特に髄膜炎菌感染症）に対する感受性を高めることは十分に実証されている（Ram et al. 2010; Lewis and Ram 2020）。しかし、これまでの臨床試験では、予防的髄膜炎菌ワクチン接種及び予防的抗生物質投与により髄膜炎菌感染症のリスクが軽減されているため、ジルコプラン投与によるナイセリア感染は確認されていない。

妊娠（雌）カニクイザルにおける胚・胎児発生を含む ePPND 試験、並びに性成熟した雄カニクイザルにおける雄受胎能試験では、ジルコプランに関連する発生及び生殖能への影響は認められなかった。

カニクイザルの CV 系及び呼吸器系への影響に関する独立した安全性薬理試験、並びにカニクイザルの反復投与毒性試験における安全性薬理評価では、ジルコプランに関連する影響はみられなかった。GLP に準拠したカニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験の一環として実施した CNS への影響の安全性評価では、ジルコプランの投与後に神経学的変化は観察されなかった。

ジルコプランは、実施した一連の遺伝毒性試験で遺伝毒性のエビデンスを示していない。ジルコプランは、細菌を用いる復帰突然変異（Ames）試験及び *in vitro* 染色体異常試験で遺伝毒性を示さず、ラット骨髄中における *in vivo* 小核試験においても遺伝毒性を示さなかった。ジルコプランのがん原性試験は実施していないが、ジルコプラン、代謝物及び不純物の発がん性についての包括的評価は行われている（Carcinogenicity Assessment Document）。

環状ペプチドの一般的特性と一致して、ジルコプランは標的たん白である C5 に対して優れた選択性を示した。*In vitro* パネルを用いた乱用性評価試験において、ジルコプランは、薬理学的又は臨床的に意義のある濃度で、他の副次的標的のいずれにも結合しなかった。乱用性に関する包括的な評価は M4.2.3.7.4 に添付した。

要約すると、非臨床試験プログラムは、1 日 1 回の自己投与可能な皮下注射製剤としての適切な安全域を有するジルコプランの製造販売承認をサポートする。安全域は、第 III 相臨床試験におけるヒト最大推定曝露量のモデリング（体重 80kg の患者に 32.4mg の用量を投与したとき）及びエスノブリッジング試験（UP0113 試験）に基づき算出した。主要な反復投与毒性試験の AUC に基づく安全域は 2.0～2.2 であり、雄受胎能試験並びに胚・胎児発生試験を含む ePPND 試験の AUC に基づく安全域は 4.3～7.8 であった。以上をまとめると、入手可能なデータに基づき、ジルコプランは適切な安全域で補体活性の 95%を上回る阻害と溶血の持続的な阻止を達成できることを示していた。

6.　参考文献

Guzman RE, Kerlin RL, Zimmerman TE. Histologic lesions in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) naturally infected with simian retrovirus type D: Comparison of seropositive, virus-positive, and uninfected animals. Toxicol Pathol.1999;27:672-7.

Keeble SA, Christofinis GJ, Wood W. Natural virus-B infection in rhesus monkeys. J Pathol. 1958;76(1):189-99.

Lewis LA, Ram S. Complement interactions with the pathogenic Neisseriae: clinical features, deficiency states, and evasion mechanisms. FEBS Lett. 2020;594(16):2670-94.

Martin PL, Bugelski PJ. Concordance of preclinincal and clinical pharmacology and toxicology of monoclonal antibodies and fusion proteins: soluble targets. Br. J. Pharmacology. 2012;166:806-22.

Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Brodsky AL, et al. Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. N Engl J Med. 2014;370:632-9.

Olivier KJ, Price KD, Hutto DL, Lerche NW, Mansfield KG, Simmons JH, et al. Naturally occurring infections in non-human primates (NHP) and immunotoxicity implications: Discussion sessions. Journal of immunotoxicology. 2010;7:138-46. DOI: 10.3109/1547691X.2010.480948

Price KD. Bacterial infections in cynomolgus monkeys given small molecule immunomodulatory antagonists. Journal of Immunotoxicology. 2010;7:128-37.

Ram S, Lewis LA, Rice PA. Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. Clin Microbiol Rev. 2010;23(4): 740-80.

Sasseville VG, Mansfield KG. Overview of known non-human primate pathogens with potential to affect colonies used for toxicity testing. Journal of immunotoxicology. 2010;7:79-92.

Wachtman LM, Mansfield KG. Opportunistic infections in immunologically compromised nonhuman primates. ILAR Journal. 2008;49:191-208.

Wachtman L, Mansfield K. Chapter 1: Viral Diseases of Nonhuman Primates. In: Abee C, Mansfield K, eds. Nonhuman Primates in Biomedical Research, Volume 2: Diseases. 2nd ed. Canada: Elsevier; 2012:1-104.

Willcox MD, Morris CA, Thakur A, Sack RA, Wickson J, Boey W. Complement and complement regulatory proteins in human tears. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997;38(1):1-8.