1. 緒言

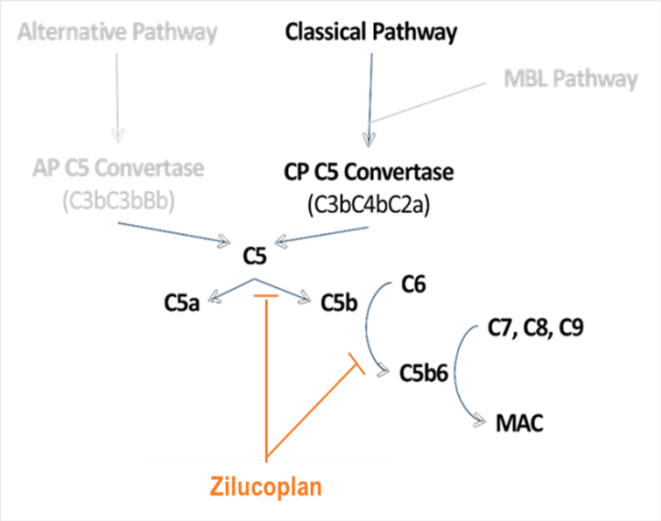
ジルコプランナトリウム（以下、ジルコプラン）はたん白質を構成しない 4 アミノ酸、アセチル化 N 末端、及び C 末端カルボン酸を含め、15 アミノ酸から成る大環状ペプチドである。*In vivo* における薬物動態プロファイル全般を改善するために、本ペプチドの C 末端アミノ酸に側鎖を介して PEG24-（gamma）GLU-パルミチン酸（C16 脂質）が融合されている。ジルコプランは防腐剤無添加の無菌溶液であり、ニードル安全装置を備えた単回使用の皮下注射剤として供給される。 全身型重症筋無力症（gMG）、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、筋萎縮性側索硬化症、免疫介在性壊死性ミオパチー（IMNM）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 gMG を適応症としたものである。COVID-19、INMN 及び PNH については、安全性以外の理由から開発を中止している。

ジルコプランはヒト補体第 5 成分（C5）のレベルで補体活性化を阻害する。すなわち、C5 に高い親和性で結合することで、C5 転換酵素による C5a 及び C5b への開裂を阻害する。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膜侵襲複合体（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。gMG 患者の神経筋接合部における抗アセチルコリン受容体を介した補体活性化のように、補体活性化の異常又は調節不全に陥った場合に、ジルコプランの C5 開裂阻害作用によりアナフィラトキシンである C5a 及び自己細胞表面に細胞溶解性を示す MAC 両方の形成及び活性を阻害することができる。ジルコプランは C5b に相当する位置の C5 に結合することで、C5b が形成された場合においても、C5b の C6 への結合を阻害し、MAC 形成を抑制する。

以上から、ジルコプランは図 1-1 に示す 2 つの作用機序で MAC 形成を阻害する。

1. C5 の開裂をアロステリックに阻害することによる下流の補体活性の抑制
2. MAC 形成の第一段階（C5b の C6 への結合）の直接的な阻害

図 1-1　補体系におけるジルコプランの作用機序



AP=第 2 経路、CP=古典経路、MBL=レクチン経路、 MAC=膜侵襲複合体

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法を用いて実施した。

表面プラズモン共鳴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し、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から、ジルコプランと標的（C5）との結合特異性を確認した。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 の形成に対する濃度依存的な阻害作用を示し、更に感作抗体でコートした霊長類及びブタ由来の赤血球に対する溶血抑制作用を示した。

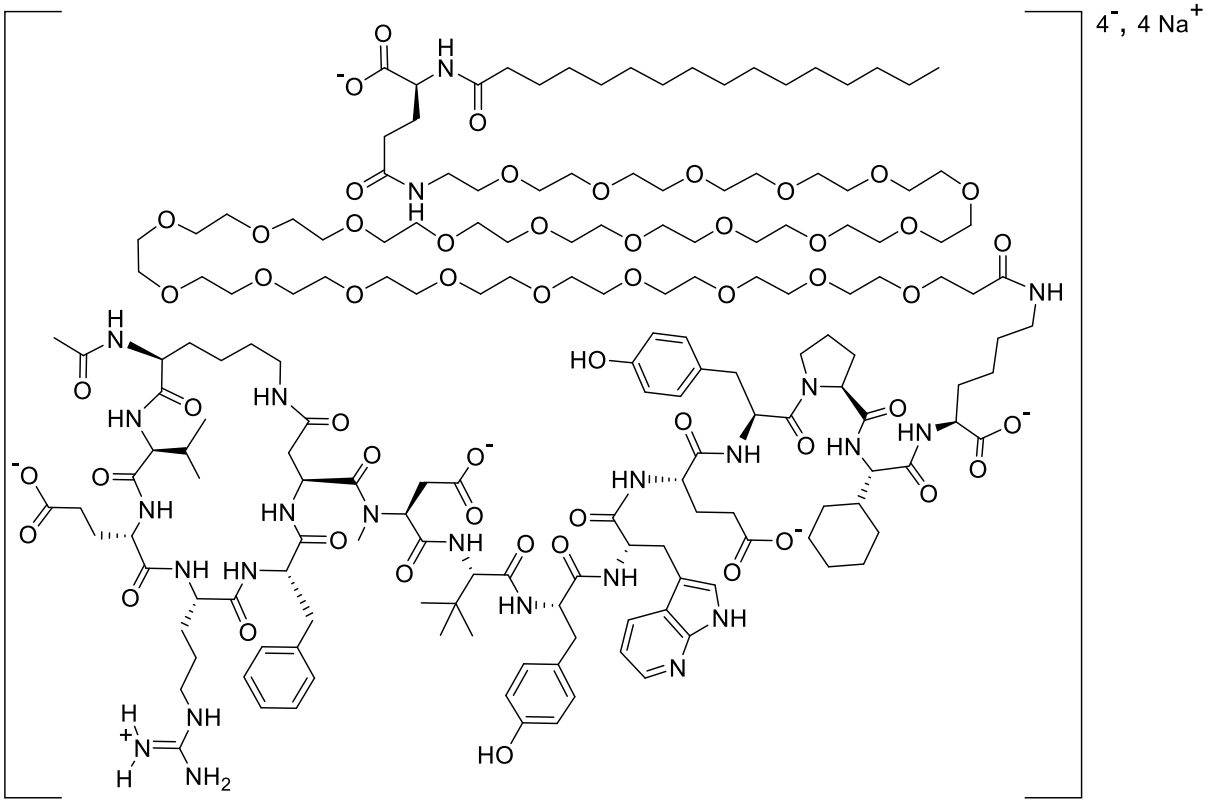
補体経路の終末においてジルコプランの阻害作用がみられることを踏まえると、補体の過剰活性化の要因が古典経路や第 2 経路のいずれであっても、ジルコプランは補体活性を阻害することが可能である。

※調整中

2.　有効成分に関する情報

JAN（日本名） JAN（英　名）	ジルコプランナトリウム Zilucoplan Sodium
r-INN	Zilucoplan
化学名	アセチル-[L-リシル [1]-L-バリル [2]-L-グルタミル [3]-L-アルギニル [4]-L フェニルアラニル [5]-L アスパルチル [6]]-*N*-メチル L-アスパルチル [7]-L *tert*-ロイシル [8]-L チロシル [9]-L-7-アザトリプトフィル [10]-L グルタミル [11]- L-チロシル [12]-L プロリル [13]-L シクロヘキシルグリシル [14]-[L-リシル [15]，N^{ε}-パルミトイル-γ-L-グルタミル-（1-アミノ-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-テトラコサオキサペンタヘプタコンタン-75-オイル）]，環状（ラクタム 6→1），四ナトリウム
申請販売名	ジルビスク皮下注 16.6/23.0/32.4mg シリンジ
成分記号	RA101495
CAS 登録番号	*1841136-73-9*（ジルコプラン）
分子式	$C_{172}H_{274}N_{24}O_{55}Na_4$
分子量	3,650.10 Da
構造式	図 2-1

図 2-1　ジルコプランの構造式



Zilucoplan drug substance

※調整中

3. 製剤処方

ジルコプラン製剤は、1mL 容量のガラス製プレフィルドシリンジとして供給され、連日在宅での自己投与が可能な利便性の高い皮下注射製剤である。本剤は防腐剤を含まない、ジルコプラン原薬、リン酸二水素ナトリウム一水和物／無水リン酸一水素ナトリウム（リン酸緩衝液）、塩化ナトリウム、及び注射用水からなるリン酸緩衝（ヒト血漿に対して）等張生理食塩水の処方である。

ジルコプラン製剤の成分及び組成を表 3-1 に示す。

表 3-1 ジルコプラン製剤の成分及び分量

成分名	規格	配合目的	分量 (mg/mL)	各用量当たりの分量（mg）		
				16.6mg	23.0mg	32.4mg
ジルコプラン[a]	別紙規格（M3.2.S.4.1 項）	有効成分	40.00	16.64	22.96	32.40
リン酸二水素ナトリウム一水和物	別紙規格（米国薬局方）	pH 調整剤	2.90	1.21	1.66	2.35
無水リン酸一水素ナトリウム	薬添規	pH 調整剤	4.11	1.71	2.36	3.33
塩化ナトリウム	日局	等張化剤	4.42	1.84	2.54	3.58
注射用水	日局	溶剤	適量（全量 1.0 mL）	適量（全量 0.416 mL）	適量（全量 0.574mL）	適量（全量 0.810mL）

[a] 遊離酸に相当する

4. 申請する効能又は効果、用法及び用量

【効能又は効果】

全身型重症筋無力症（ステロイド剤又はステロイド剤以外の免疫抑制剤が十分に奏効しない場合に限る）

【用法及び用量】

通常、成人にはジルコプランとして下表に示す用量を 1 日 1 回皮下投与する。

体重	投与量
56kg 未満	16.6mg
56kg 以上 77kg 未満	23.0mg
77kg 以上	32.4mg

※調整中

目次

1. まとめ 4
2. 効力を裏付ける試験 5
2.1 *In vitro* 薬理試験 5
2.1.1 C5 に対する結合 5
2.1.1.1 C5 に対する結合能（試験番号 TR-0019） 5
2.1.1.2 C5 TED ドメインに対する結合（試験番号 TR-0073） 5
2.1.1.3 C5b6 複合体の解離（試験番号 TR-0073、RRUS0010 及び TR-0151） 6
2.1.2 作用機序—C5 開裂生成物及び MAC を介した細胞溶解に対する阻害作用 7
2.1.2.1 C5a 及び MAC に対する ELISA を用いた C5 開裂の検出（試験番号 TR-0023） 7
2.1.2.2 補体古典経路及び第 2 経路における溶血阻害作用（試験番号 TR-0020） 8
2.1.2.3 Wieslab®補体系 ELISA（古典経路、第 2 経路及びレクチン経路）におけるジルコプランの特性（試験番号 TR-0024） 8
2.1.2.4 遺伝子変異型 C5 阻害作用（試験番号 RRUS0007 及び RRUS0006） 9
2.1.3 ジルコプランの種特異性（試験番号 TR-0021） 10
2.1.4 機能アッセイにおけるジルコプランと代謝物の活性比較（試験番号 RRUS0001、RRUS0002 及び VV-QUAL-00131） 11
2.2 *In vivo* 薬理試験 12
2.2.1 単回静脈内又は単回皮下投与試験及び 7 日間反復皮下投与試験（試験番号 TR-0125） 12
2.2.2 4、13 及び 39 週間反復投与毒性試験（試験番号 TR-0042、TR-0043 及び TR-0154） 13
2.2.3 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（試験番号 8366459） 14
3. 副次的薬理試験 14
3.1 表面プラズモン共鳴法により評価した標的結合特異性（試験番号 TR-0151） 14
3.2 ヒト血清中のたん白質に対するジルコプランの結合特異性（試験番号 TR-0152） 14
3.3 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（試験番号 TR-0150） 14
3.4 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（試験番号 100061456 及び 100062196） 15
4. 安全性薬理試験 16
4.1 心血管系 17
4.1.1 *In vitro* 心血管系安全性薬理試験（試験番号 150507.SBR） 17
4.1.2 心血管系に対する *in vivo* 安全性薬理試験（試験番号 20076954、20074710、20076807 及び 20086030） 17
4.2 呼吸器系 17
4.2.1 カニクイザルを用いた心血管系及び呼吸器系の安全性薬理試験（試験番号 20076954） 17
4.3 中枢神経系 18
4.3.1 カニクイザルを用いた中枢神経系の安全性薬理試験（試験番号 20074710） 18
5. 薬力学的薬物相互作用試験 18
6. 考察及び結論 18
7. 図表 19
8. 参考文献 19

※調整中

表目次

表 2-1 様々な動物種におけるジルコプランの溶血阻害作用 11
表 2-2 古典経路における溶血に対する IC50 値（1% NHS） 11
表 2-3 古典経路における溶血に対する IC50 値（0.5nM ヒト C5 を補充した 1.5%ヒト C5 欠損血清） 11
表 3-1 in vitro 薬理試験：機能的細胞内及び核内受容体アッセイ 15
表 3-2 in vitro 薬理試験：結合アッセイ 16
表 3-3 in vitro 薬理試験：機能的細胞内及び核内受容体アッセイ 16
表 4-1 安全性薬理試験リスト 16

図目次

図 2-1 C5 TED と RA30303 の X 線結晶構造の概略図 5
図 2-2 C5b6、C5 及び C6 のバンドを示すネイティブゲル電気泳動 6
図 2-3 ジルコプランの C6 への結合に関する表面プラズモン共鳴センサーグラム 6
図 2-4 ジルコプランによる C5a（左図）及び sC5b-9（右図）形成に対する阻害作用（ELISA） 8
図 2-5 ジルコプランによる MAC（Wieslab®ELISA）形成に対する阻害作用 9
図 2-6 野生型及び遺伝子変異型ヒト C5 R885 を介した補体古典経路による溶血に対するジルコプラン及びエクリズマブの阻害作用 10
図 2-7 カニクイザルにおけるジルコプランの PK/PD の相関 12
図 2-8 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 13

略語及び名称一覧表

略語（名称）	内容	
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	筋萎縮性側索硬化症
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
C6	complement component 6	補体第 6 成分
C7	complement component 7	補体第 7 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
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
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定
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
GABA	gamma amino butyric acid	γ-アミノ酪酸
gMG	generalized myasthenia gravis	全身型重症筋無力症
GPCR	G protein-coupled receptor	G たん白質共役受容体
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
IMNM	immune-mediated necrotizing myopathy	免疫介在性壊死性ミオパチー
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
NHP	non-human primate	ヒト以外の霊長類
NHS	normal human serum	健常ヒト血清
OX_1	orexin-1	オレキシン-1
PD	pharmacodynamics	薬力学
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PNH	paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	発作性夜間ヘモグロビン尿症
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

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。

※調整中

1. まとめ

ジルコプランナトリウム（以下、ジルコプラン）はたん白質を構成しない 4 アミノ酸、アセチル化 N 末端、及び C 末端カルボン酸を含め、15 アミノ酸から成る大環状ペプチドである。*In vivo* における薬物動態（PK）プロファイル全般を改善するために、本ペプチドの C 末端アミノ酸に側鎖を介して PEG24-（gamma）GLU-パルミチン酸（C16 脂質）が融合されている。全身型重症筋無力症（gMG）、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 gMG を適応症としたものである。本剤は 1 日 1 回自宅で自己投与可能な皮下投与製剤として開発した。

ジルコプランはヒト補体第 5 成分（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。

gMG 患者の神経筋接合部における抗アセチルコリン受容体を介した補体活性化のように、補体活性化の異常又は調節不全に陥った場合に、ジルコプランの C5 開裂阻害作用によりアナフィラトキシンである C5a 及び自己細胞表面に細胞溶解性を示す MAC 両方の形成及び活性を阻害することができる。

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し、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から、ジルコプランと標的（C5）との結合を確認した。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 の形成に対する濃度依存的な阻害作用を示し、更に感作抗体でコートした様々な動物種由来の赤血球に対する溶血抑制作用を示した。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、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。ジルコプランはヒト及びヒト以外の霊長類（NHP）で同様の薬理活性を示すことから、カニクイザルをジルコプランの薬理活性を評価する非臨床試験の適格動物種として選択した。カニクイザルにジルコプラン 0.2 及び 4mg/kg/日を 7 日間毎日投与した時、血漿中濃度は 2.5μg/mL 超を示し、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 又は 39 週間反復投与毒性試験で採血した血漿を用いて、*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 又は 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 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。

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠したジルコプランの安全性薬理の標準的なバッテリー試験として以下の試験を実施した。心血管（CV）系としてヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（hERG）*in vitro* 試験及びカニクイザル *in vivo* 試験を実施し、呼吸器系としてカニクイザル *in vivo* 試験を実施し、中枢神経系（CNS）はカニクイザル 4 週間反復投与毒性試験の一部として実施した。安全性薬理試験ではジルコプラン投与に関連した CV 系、呼吸器系又は CNS に生物学的に意味のある影響は認められなかった。

※調整中

2. 効力を裏付ける試験

2.1 *In vitro* 薬理試験

2.1.1 C5 に対する結合

2.1.1.1 C5 に対する結合能（試験番号 TR-0019）

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。ヒト C5 をコートしたセンサーチップ表面に段階的に希釈した濃度のジルコプランを注入した後、解離相を評価するために緩衝液のみを注入した。得られた SPR センサーグラムを分析し、結合速度及び解離速度並びに親和性を算出した。

25℃ におけるジルコプランのヒト C5 に対する結合速度定数（ka）値は $6.3 \pm 2.5 \times 10^{5} M^{-1} s^{-1}$、解離速度定数（kd）値は $2.1 \pm 1.1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 及び平衡解離定数（K_D）値は $4.3 \pm 3.5 \times 10^{-10}$ M（n=4）であった。

2.1.1.2 C5 TED ドメインに対する結合（試験番号 TR-0073）

C5 は、C5 転換酵素による開裂で、小さい断片（Leu679-Arg751）の C5a と、大きい断片の C5b の二つの断片に分かれる。ジルコプランは C5b の一部である C5 チオエステル様ドメイン（TED 又は C5d と呼ばれる）に結合する。ジルコプランのペプチド部分の類似体である RA30303（RA100553）と複合体を形成したヒト C5 TED（Leu982 - Lys1305）の結晶構造を、X 線構造解析法により 2.0Å の分解能で解析した。得られた電子密度は、C5 TED との複合体における RA30303 の明確な配向性と立体配座を示す。図 2-1 に C5 TED と RA30303 の X 線結晶構造の概略図を示す。

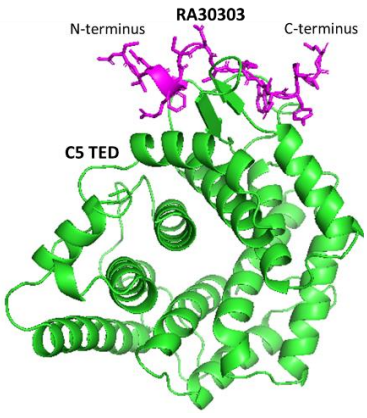
1) RA101495（ジルコプラン）

AC0-LYS(1)-VAL-GLU-ARG-PHE-ASP(1)-ASm-TBG-TYR-W01-GLU-TYR-PRO-CHG-B28

2) RA30303（TED との結晶構造に使用した）

AC0-XLm(1)-VAL-GLU-ARG-PHE-cYS(1)-ASP-TBG-TYR-W01-GLU-TYR-PRO-I01- NVL-NH2

図 2-1 C5 TED と RA30303 の X 線結晶構造の概略図



C5 TED is shown in green ribbon model, and RA30303 is shown in magenta stick model (TR-0073).

ジルコプランと RA30303 の相違点は、以下の 4 点である。

(1) ジルコプランにおけるラクタムブリッジに替えてキシレンチオエーテルブリッジの使用

(2) ジルコプランにおける NMeAsp (ASm7) に替えて Asp7 を使用

(3) ジルコプランにおける CHG に替えて α-Me Phg (I01) を使用

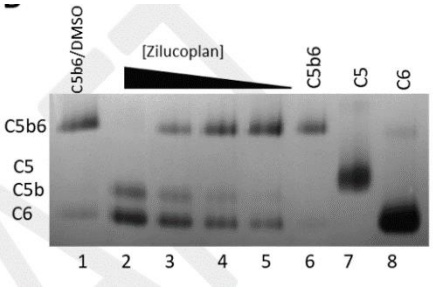
(4) ジルコプランにおける LYS (Palm-Glu-EG24)（B28 とも呼ばれる）に替えて NVL を使用。B28 は、アルブミン結合を介してジルコプランの in vivo PK/PD 特性を改善するように設計された。

2.1.1.3　C5b6 複合体の解離（試験番号 TR-0073、RRUS0010 及び TR-0151）

C5b は C5 転換酵素による C5 開裂の準安定中間産物であり、C6 に結合して安定な複合体を形成しない限り凝集体を形成する傾向がある（Cooper and Müller-Eberhard, 1970; DiScipio et al, 1983）。C5 TED と RA30303 の X 線構造解析により（図 2-1）、ジルコプランの C5b への結合部位は C5d であることが示された（試験番号 TR-0073）。

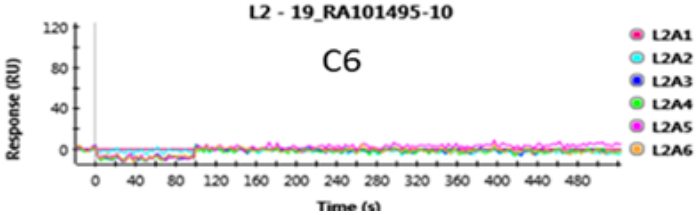
開裂直後の C5b は不安定であり凝集体を形成する傾向があるため、単離された C5b を用いてリガンドへの結合を直接評価する実験系は存在しない。したがって、C5b6 複合体に対するジルコプランの影響を検討した。ヒト血清から精製した安定な C5b6 複合体とジルコプランをインキュベートすると、ネイティブゲル電気泳動によって示されるように、C5b6 が 2 つのバンドに解離することが確認された（図 2-2：試験番号 RRUS0010）。ジルコプランは C6 に結合しないため（図 2-3：試験番号 TR-0151）、このデータはジルコプランが C6 と競合して C5b に結合し、その結果 C5b6 の解離が生じることを示す。

図 2-2　C5b6、C5 及び C6 のバンドを示すネイティブゲル電気泳動



Native gel analysis of C5b6 in the presence and absence of zilucoplan. Lane 2-6, C5b6 after incubation with various concentrations of zilucopan (1% DMSO) at 37ºC for 1hr prior to gel loading. Lane 1 and 6, C5b6 placed at 37ºC/1hr with 1% DMSO (lane 1) or none (lane 6). Lane 7 and 8, C5 and C6 alone.

図 2-3　ジルコプランの C6 への結合に関する表面プラズモン共鳴センサーグラム



※調整中

SPR measurement indicates no measurable binding of zilucoplan to C6. Human complement C6 was immobilized on a sensor chip via amine coupling. Varying concentrations of zilucoplan (RA101495, 0, 0.12, 0.37. 1.1, 3.3 and 10μM from A1 to A6 on channel L1) were flown onto C6 surface. No binding signals was observed.

2.1.2 作用機序—C5 開裂生成物及び MAC を介した細胞溶解に対する阻害作用

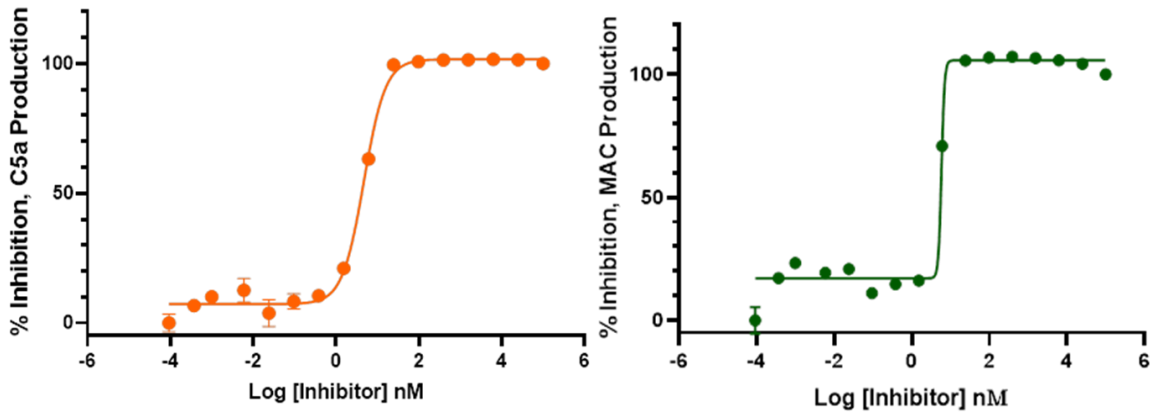
C5 開裂に対するジルコプランの阻害能を複数の *in vitro* 試験で評価した。古典経路の活性化に伴う C5 の可溶性の開裂生成物である C5a 及び可溶性 C5b-9 複合体（sC5b-9）の測定（TR-0023）、及び古典経路、第 2 経路又はレクチン経路における MAC 形成の ELISA による検出を行った（TR-0024）。更に、古典経路又は第 2 経路における MAC の細胞膜挿入による溶血反応を用いて、ジルコプランの機能を評価した（TR-0020）。C5 の可溶性開裂生成物の生成阻害作用は溶血阻害作用と相関していた。

2.1.2.1 C5a 及び MAC に対する ELISA を用いた C5 開裂の検出（試験番号 TR-0023）

抗体で感作したヒツジ赤血球を、補体活性を保持した 1%健常ヒト血清（NHS）に曝露すると補体古典経路が活性化して C5 が開裂し、MAC が形成されて溶血を誘導する。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することにより評価した。さらに、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と、C5b 生成の補完的指標となる、sC5b-9 が生成される。上清中の sC5b-9 及び C5a 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、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阻害強度（IC_{50} 値）は C5a 及び sC5b-9 の生成に対してそれぞれ 4.7nM 及び 5.9nM を示し（図 2-4）、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の阻害の主な作用機序は C5 開裂の阻害作用であることが示唆された。

図 2-4　ジルコプランによる C5a（左図）及び sC5b-9（右図）形成に対する阻害作用（ELISA）



ELISA=酵素結合免疫吸着測定、MAC=膜侵襲複合体（sC5b-9 と同一）

2.1.2.2　補体古典経路及び第 2 経路における溶血阻害作用（試験番号 TR-0020）

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精度の高い 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+}非存在下で 6% NHS によるウサギ赤血球を用いた溶血により評価した。

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、古典経路の IC_{50} 値は 4.9nM、0.5nM のヒト C5 を添加した C5 欠損血清における古典経路の IC_{50} 値は 2.4nM であり、第 2 経路の IC_{50} 値は 59.2nM であった。

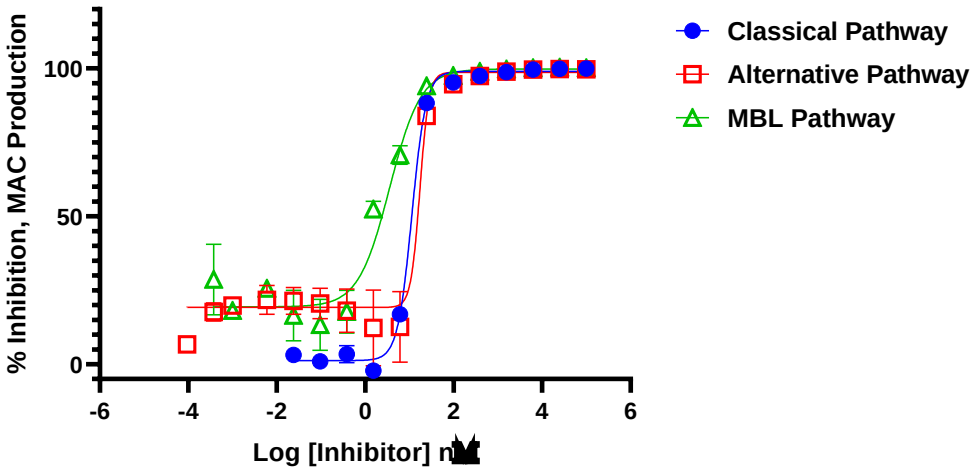
2.1.2.3　Wieslab®補体系 ELISA（古典経路、第 2 経路及びレクチン経路）におけるジルコプランの特性（試験番号 TR-0024）

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 2-5、黒丸表示）又は第 2 経路（図 2-5、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作した。

結論として、ジルコプランはこれらアッセイで MAC 形成阻害作用を示し、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。

図 2-5　ジルコプランによる MAC（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

2.1.2.4　遺伝子変異型 C5 阻害作用（試験番号 RRUS0007 及び RRUS0006）

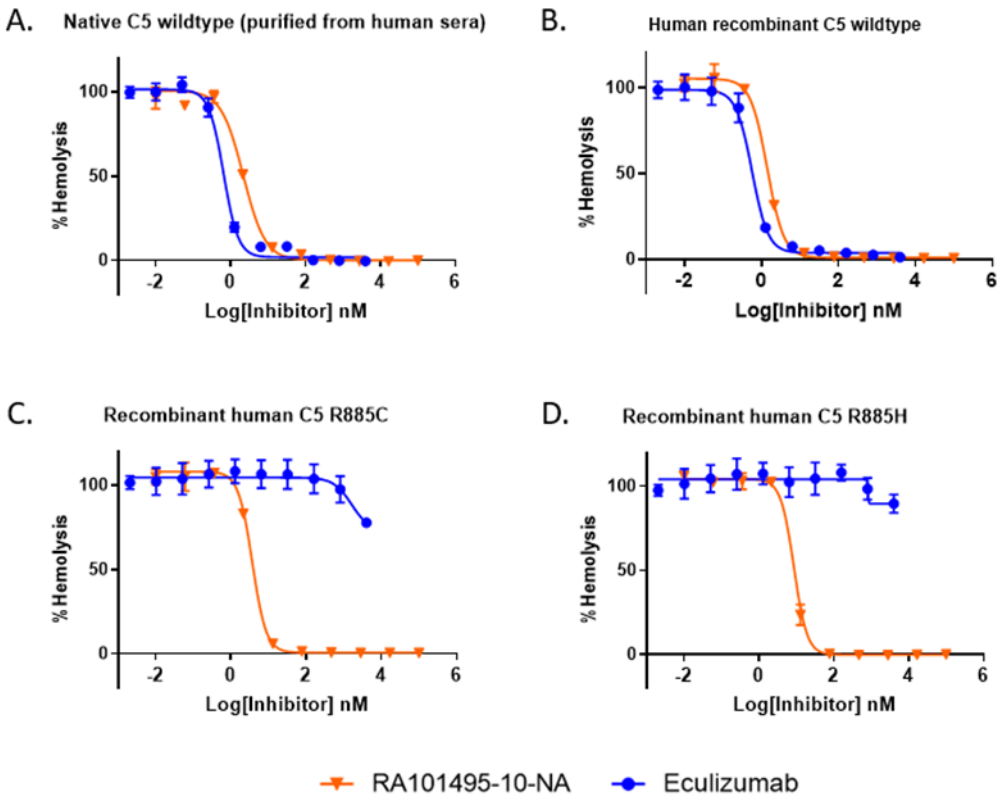
ジルコプランの C5 結合部位は、既存の補体 C5 阻害薬であるエクリズマブの C5 結合部位とは異なる。Nishimura らは、C5 の p.Arg885His 多型（R885H）と予測される単一ミスセンスヘテロ接合性変異 c.2654G→A を有する 11 例（約 3.2%）の PNH 日本人患者について報告しており、それらの患者では、エクリズマブの C5 への結合が阻害されるため、エクリズマブによる治療に抵抗性となることを明らかにした。（Nishimura et al. 2014）。また、同じアミノ酸残基における異なる変異である p.Arg885Cys 多型（R885C）が、エクリズマブへの反応が乏し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（RRUS0007 試験）。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（RRUS0006 試験）。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 2-6）。

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 2-6　野生型及び遺伝子変異型ヒト C5 R885 を介した補体古典経路による溶血に対するジルコプラン及びエクリズマブの阻害作用



RA101495=ジルコプラン

2.1.3　　ジルコプランの種特異性（試験番号 TR-0021）

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モデルを選択する際に、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。2.1.2 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。ジルコプランの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）に調製した。

ジルコプランは、ヒト及び 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（表 2-1）。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、イヌ又はウサギでは阻害活性はほとんど認められなかった。結果として、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。

表 2-1　様々な動物種におけるジルコプランの溶血阻害作用

動物種		IC_{50}（nM）
ヒト		7
NHP	カニクイザル	4
	ヒヒ	5
	チンパンジー	10
	アカゲザル	18
イヌ（ビーグル）		>4,636
ウサギ		>66,554
ブタ	ミニブタ	50
	ブタ	113
げっ歯類	ラット	609
	マウス	>35,649
	モルモット	>100,000

IC_{50}=50%阻害濃度

2.1.4　機能アッセイにおけるジルコプランと代謝物の活性比較（試験番号 RRUS0001、RRUS0002 及び VV-QUAL-00131）

補体古典経路活性化の下流である 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。溶血反応は 2.1.2 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。

下の表に示すように、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。

表 2-2　古典経路における溶血に対する IC50 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 2-3　古典経路における溶血に対する IC50 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

2.2　*In vivo* 薬理試験

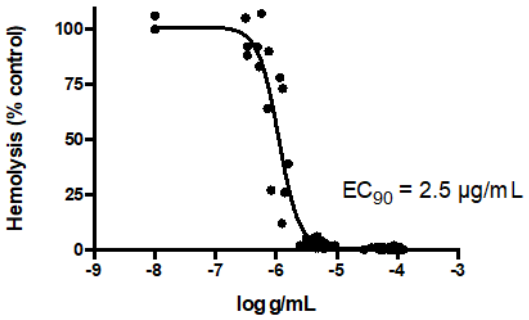
ジルコプランは霊長類の C5 開裂に対して強力な阻害作用を示し、ヒト及び NHP において同程度の薬理活性を示す。ジルコプランはブタにおいて中等度の阻害を示し、ラットでは非常に弱い阻害作用（カニクイザルの 1/100 未満）が認められ、他のげっ歯類、イヌ又はウサギでは阻害活性は認められなかった。したがって、ジルコプランの阻害活性を非臨床試験で評価する適切な動物種としてカニクイザルを選択した。

2.2.1　単回静脈内又は単回皮下投与試験及び 7 日間反復皮下投与試験（試験番号 TR-0125）

ジルコプランの補体活性は単回静脈内又は単回皮下投与後、及び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（20059043、20087646、20072469 及び 20082852 試験から採取）を用いて評価した。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（20059043 及び 20087646 試験）。20059043 試験では、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。20087646 試験では、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（20072469 及び 20082852 試験）。20072469 試験では、ジルコプラン 0.21 及び 4.2mg/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。20082852 試験では、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 回皮下投与した。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の溶血アッセイにより *ex vivo* で測定した。

結論として、これら試験間で一貫性があり、図 2-7（20072469 試験のデータ）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 2-7　カニクイザルにおけるジルコプランの PK/PD の相関



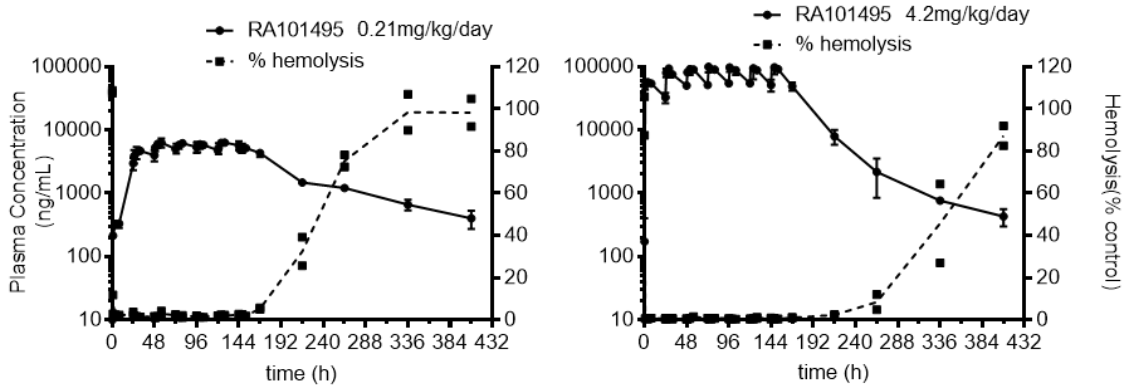
EC_{90}=最大効果の 90%の効果を示す濃度、PD=薬力学、PK=薬物動態

図 2-8（20072469 試験のデータ）に示すように、0.2mg/kg/日の初回投与 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。薬物投与終了後に溶血率の増加が認められたように（最終投与 4 日後に溶血はベースラインの

75%を超えた；図 2-8 の左図）、本試験でジルコプラン血漿中濃度と溶血率の間で逆相関が認められた。

ジルコプランは 4mg/kg/日投与群で初回投与 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 2-8 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 2-8 の右図に示す）。本結果によりさらにジルコプランの PK 及び PD プロファイル間の強固な相関が示された。

図 2-8　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

2.2.2　4、13 及び 39 週間反復投与毒性試験（試験番号 TR-0042、TR-0043 及び TR-0154）

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 20074710、20076807 及び 20086030 試験）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/日まで毎日皮下投与した。

4 及び 13 週間反復投与試験の結果から、すべての投与量（4 週：1、2 及び 4mg/kg/日、13 週：0.25、1、2 及び 10mg/kg/日）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ほぼ完全な阻害作用が確認された。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。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から、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* で完全な阻害作用が確認された。即ち対照群の溶血率が 90%を超えていたのに対し、0.25mg/kg/日投与群では 20%未満、1、2、4 及び 6mg/kg/日投与群では 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。

2.2.3　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（試験番号 8366459）

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 13 週間 0、1、2 及び 4mg/kg/日で毎日皮下投与した。

その結果、動物個体 P0105（1mg/kg/日群）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。

3.　副次的薬理試験

3.1　表面プラズモン共鳴法により評価した標的結合特異性（試験番号 TR-0151）

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。

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 値>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。

3.2　ヒト血清中のたん白質に対するジルコプランの結合特異性（試験番号 TR-0152）

プルダウンアッセイを、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。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。

その結果、ジルコプランのビオチン化アナログは C5 と特異的な複合体を形成し、ストレプトアビジン(SA)-M280 ビーズでプルダウンされた。SDS-PAGE では、α 及び β ポリペプチド鎖を連結するジスルフィド結合が還元され、2 つのポリペプチドがそれぞれのサイズに対応する 2 つのバンドとして分離された。抗 C5/C5α 抗体を用いたウエスタンブロット法により、ジルコプランの結合相手の C5α 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。

3.3　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（試験番号 TR-0150）

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（GPCR）のコレシストキニン（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。いずれの受容体も遺伝子組み換えヒト型たん白質を使用した（表 3-1）。アゴニスト活性は各受容体に対するアゴニスト対照化合物の反応に対する百分率（%）として算出し、アンタゴニスト活性は各受容体に対するアゴニスト対照化合物の反応に対する阻害率（%）として算出した。

表 3-1　in vitro 薬理試験：機能的細胞内及び核内受容体アッセイ

Assay	Source	Stimulus	Incubation	Measured Component	Detection Method	Bibl.
Receptors						
CCK_1 (CCK_A) *(h)* (agonist effect)	human recombinant (CHO cells)	none (10 µM CCK-8s for control)	10 min 37°C	cAMP	HTRF	755
CCK_1 (CCK_A) *(h)* (antagonist effect)	human recombinant (CHO cells)	CCK-8s (300 nM)	10 min 37°C	cAMP	HTRF	755
CCK_2 (CCK_B) *(h)* (agonist effect)	human recombinant (CHO cells)	none (100 nM CCK-8s for control)	30 min 37°C	cAMP	HTRF	752
CCK_2 (CCK_B) *(h)* (antagonist effect)	human recombinant (CHO cells)	CCK-8s (10 nM)	30 min 37°C	cAMP	HTRF	752
glucagon *(h)* (agonist effect)	human recombinant (CHO cells)	none (10 nM glucagon for control)	10 min 37°C	cAMP	HTRF	624
glucagon *(h)* (agonist effect)	human recombinant (CHO cells)	none (10 nM glucagon for control)	10 min 37°C	cAMP	HTRF	624
glucagon *(h)* (antagonist effect)	human recombinant (CHO cells)	glucagon (0.3 nM)	10 min 37°C	cAMP	HTRF	624
glucagon *(h)* (antagonist effect)	human recombinant (CHO cells)	glucagon (0.3 nM)	10 min 37°C	cAMP	HTRF	624
secretin *(h)* (agonist effect)	human recombinant (CHO cells)	none (3 nM human secretin for control)	30 min RT	cAMP	HTRF	811
secretin *(h)* (antagonist effect)	human recombinant (CHO cells)	human secretin (0.3 nM)	30 min RT	cAMP	HTRF	811

ジルコプラン及びその主要代謝物 RA102758 は、30µM まで、GPCR 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。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作用（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作用（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。

3.4　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（試験番号 100061456 及び 100062196）

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（100061456 試験）。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（ヒト遺伝子組み換え）（62%）と γ-アミノ酪酸（GABA）トランスポーター（ラット大脳皮質由来）（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。

※調整中

表 3-2　in vitro 薬理試験：結合アッセイ

Assay	Source	Ligand	Conc.	Kd	Non Specific	Incubation	Detection Method	Bibl.
Receptors								
OX_1 *(h)* (agonist radioligand)	human recombinant (CHO cells)	[^{125}I]orexin-A	0.1 nM	0.87 nM	SB 334867 (1 µM)	60 min RT	Scintillation counting	920
Transporters								
GABA transporter (antagonist radioligand)	rat cerebral cortex	[^{3}H]GABA (+ 10 µM isoguvacine) (+ 10 µM baclofen)	10 nM	4600 nM	GABA (1 mM)	30 min RT	Scintillation counting	214

表 3-3　in vitro 薬理試験：機能的細胞内及び核内受容体アッセイ

Assay	Source	Stimulus	Incubation	Measured Component	Detection Method	Bibl.
Receptors						
OX_1 *(h)* (agonist effect)	human recombinant (CHO cells)	none (100 nM orexin-A for control)	RT	intracellular [Ca^{2+}]	Fluorimetry	876
OX_1 *(h)* (antagonist effect)	human recombinant (CHO cells)	orexin-A (3 nM)	RT	intracellular [Ca^{2+}]	Fluorimetry	876

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（100062196 試験）。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。

4.　安全性薬理試験

カニクイザルを用いて、CV 系、呼吸器系、及び CNS に対するジルコプランの作用を評価した。カニクイザルを用いた CV 系及び呼吸器系の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、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* 試験で評価した。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 4-1　安全性薬理試験リスト

試験の種類	GLP 適用	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

※調整中

4.1 心血管系

4.1.1 *In vitro* 心血管系安全性薬理試験（試験番号 150507.SBR）

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（ChanTest 試験）。

ジルコプランは検討した最大濃度である 300μM（非結合薬物濃度として 1.07mg/mL に相当）で hERG を介した電流を阻害せず、対照群では 0.4 ± 1.2%の阻害（n=3）を示したのと対照的に 39.2 ± 7.7%の増加（n=4）を示した。

4.1.2 心血管系に対する *in vivo* 安全性薬理試験（試験番号 20076954、20074710、20076807 及び 20086030）

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を実施した（それぞれ、20074710、20076807 及び 20086030 試験）。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。

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 系及び呼吸器系の *in vivo* 安全性薬理試験を実施した（20076954 試験）。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。一般状態、体重、リード II 心電図、動脈血圧、インピーダンスにより測定した呼吸パラメータ（呼吸数、1 回換気量及び分時換気量）、体温、及びバイオアナリシスパラメータを観察し、異常が認められた場合にはその回復性も含めて評価した。

ジルコプラン投与後に死亡例又は顕著な一般状態の変化は認められなかった。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、ジルコプラン投与に関連した変化は 2 及び 10mg/kg のいずれの投与量においても認められなかった。心電図及び体温の通常の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 又は 10mg/kg の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、臨床試験で想定される最大血漿中薬物濃度（想定 C_{max}：20.7μg/mL）の 3.82 倍又はエスノブリッジング試験（UP0113 試験）で得られた最大血漿中薬物濃度の 6.38 倍の濃度までジルコプランは CV 系及び呼吸器系の機能に対して臨床的に意義のある有害作用は示さないと予想される。

4.2 呼吸器系

4.2.1 カニクイザルを用いた心血管系及び呼吸器系の安全性薬理試験（試験番号 20076954）

4.1.2 項に記載した。

4.3 中枢神経系

4.3.1 カニクイザルを用いた中枢神経系の安全性薬理試験（試験番号 20074710）

4 週間反復投与毒性試験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/日を皮下投与した。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。

ジルコプランを最高用量 4mg/kg/日（最大血漿中濃度 64.2µg/mL：臨床試験で想定される最大血漿中濃度の 3.10 倍又はエスノブリッジング試験（UP0113 試験）で得られた最大血漿中薬物濃度の 5.18 倍に相当）まで投与した後に神経学的な変化は認められなかった。

5. 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。

6. 考察及び結論

ジルコプランは C5 と結合し、C5 転換酵素により開裂されて、C5a 及び C5b となるのを妨げることにより補体活性化を C5 のレベルで阻害する。gMG 患者の神経筋接合部における抗アセチルコリン受容体を介した補体活性化のように、補体活性化の異常又は調節不全に陥った場合に、ジルコプランの C5 開裂阻害作用により自己細胞表面における細胞溶解性の MAC の形成及び活性を阻害することができる。SPR 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し、一方で解離速度は緩やかであることが示された。ジルコプランは、古典経路において C5a の形成を用量依存的に阻害し、古典経路、第 2 経路又はレクチン経路特異的に活性化されたプレート表面に集合する MAC の形成を用量依存性に阻害した。

更に、ジルコプランは C5 開裂阻害作用により、溶血を阻害した。ジルコプランはヒト及び NHP の血清及び血漿において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作用を、ラット血清で弱い阻害作用（カニクイザルの 1/100 未満）を示し、他のげっ歯類、イヌ又はウサギでは阻害活性をほとんど示さなかった。カニクイザルにおいて、血漿中薬物濃度が 2.5µg/mL を超えると十分な溶血阻害作用を示し、90%以上の阻害が認められた。カニクイザルの 4、13 又は 39 週間反復投与毒性試験の一部として採血した血漿サンプルを用いた *ex vivo* の溶血アッセイにおいて、ジルコプランは初回投与の 2 時間後から投与期間の 4 週間、13 週間又は 39 週間を通してほぼ完全な溶血阻害作用を示した。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、動物の血中からジルコプランが消失していることが確認された。

特殊環状ペプチドで一般的に認められる特性と一致して、ジルコプランはその標的である C5 に対して優れた選択性を示した。ジルコプランは検討したいかなる 2 次標的とも薬理学的又は臨床的に意義のある濃度で結合しなかった。

パッチクランプアッセイにおいてジルコプランは効力を裏付ける薬理試験濃度を相当超過した濃度で hERG を介した電流を阻害しなかった。検討した最高濃度のジルコプラン（300µM）は非結合薬物濃度として 1.07mg/mL に相当する。その濃度でジルコプランは hERG を介した電流を 39.2 ± 7.7%まで増加した。カニクイザルを用いて CV 系、呼吸器系及び CNS に対するジルコプランの作

用を評価した結果、ジルコプランは 10mg/kg（平均最大血漿中濃度 79.1μg/mL、臨床試験で想定される最大血漿中濃度の 3.82 倍又はエスノブリッジング試験における最大血漿中濃度の 6.38 倍に相当）まで CV 系又は呼吸器系に顕著な作用は示さず、4mg/kg/日（平均最大血漿中濃度 64.2μg/mL、臨床試験で想定される最大血漿中濃度の 3.10 倍又はエスノブリッジング試験における最大血漿中濃度の 5.18 倍に相当）まで CNS に対する作用は示さなかった（M2.4 表 4-2）。

7. 図表

図表は本文中に示した。

8. 参考文献

Cooper NR and Müller-Eberhard HJ. The Reaction Mechanism of Human C5 in Immune Hemolysis. J Exp Med. 1970;132(4):775–793.

DiScipio RG, Smith CA, Muller-Eberhard HJ, Hugli TE. The Activation of Human Complement Component C5 by a Fluid Phase C5 Convertase. J. Biol. Chem. 1983;258(17):10629-10636.

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.

目次

1. 薬理試験：一覧表 2
2. 効力を裏付ける試験 5
3. 副次的薬理試験 11
4. 安全性薬理試験 13
5. 薬力学的薬物相互作用試験 14

※調整中

1. 薬理試験：一覧表

被験物質：ジルコプラン

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
効力を裏付ける試験					
Measurement of the binding affinity of RA101495 to surface immobilized human complement C5 using ProteOn XPR36	SPR を用いたセンサーチップ表面に固定されたヒト補体 C5 に対する結合親和性の測定	*In vitro*	Ra Pharma	TR-0019	4.2.1.1
Detection of inhibition of C5 cleavage by RA101495 using C5a and MAC ELISAs	健常ヒト血清に曝露後の抗体感作ヒツジ赤血球を用いた溶血アッセイ C5a 及び sC5b-9 の ELISA	*In vitro*	Ra Pharma	TR-0023	4.2.1.1
Inhibition of hemolysis by RA101495 in the classical and alternative complement system pathways	健常ヒト血清又は 0.5nM の C5 たん白質を添加したヒト C5 欠損血清に曝露後の抗体感作ヒツジ赤血球（古典経路）及び健常ヒト血清に曝露後の Ca^{2+}非存在下ウサギ赤血球（第 2 経路）を用いた溶血アッセイ	*In vitro*	Ra Pharma	TR-0020	4.2.1.1
Characterization of RA101495 in the Weislab complement ELISAs (classical, alternative, MBL)	Wieslab® 補体系（古典経路、第 2 経路及びレクチン経路）アッセイ	*In vitro*	Ra Pharma	TR-0024	4.2.1.1
Binding of RA101495 to human complement C5 variants	SPR を用いた遺伝子変異型ヒト C5 たん白質（R885C 及び R885H）に対する結合親和性の測定	*In vitro*	Ra Pharma	RRUS0007	4.2.1.1
A comparison of the potency of RA101495 and eculizumab in the inhibition of hemolysis mediated by human C5 genetic variants	遺伝子変異型ヒト C5 たん白質（R885C 又は R885H）を添加した C5 欠損血清に曝露後の抗体感作ヒツジ赤血球を用いた溶血アッセイ	*In vitro*	Ra Pharma	RRUS0006	4.2.1.1
Species selectivity of inhibition of complement by RA101495	多様な動物種（ヒト、カニクイザル、ヒヒ、チンパンジー、アカゲザル、ブタ、ミニブタ、ラット、ビーグル犬、マウス、ウサギ及びモルモット）由来の血漿又は血清に曝露した抗体感作ヒツジ赤血球を用いた溶血アッセイ	*In vitro*	Ra Pharma	TR-0021	4.2.1.1

※調整中

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
Inhibition of hemolysis by RA102758 in the classical complement system pathway	健常ヒト血清に曝露後の抗体感作ヒツジ赤血球を用いた溶血アッセイ	*In vitro*	Ra Pharma	RRUS0001	4.2.1.1
Assesment of inhibition of hemolysis by RA103488 in the classical and alternative complement system pathway	健常ヒト血清又は 0.5nM の C5 たん白質を添加したヒト C5 欠損血清に曝露後の抗体感作ヒツジ赤血球（古典経路）及び健常ヒト血清に曝露後の Ca^{2+}非存在下ウサギ赤血球（第 2 経路）を用いた溶血アッセイ	[redacted]	Ra Pharma	RRUS0002	4.2.1.1
Primary hemolysis assay characterization of RA106009, a peptide inhibitor of complement component C5	0.5nM の C5 たん白質を添加したヒト C5 欠損血清に曝露後の抗体感作ヒツジ赤血球を用いた溶血アッセイ	*In vitro*	Ra Pharma	VV-QUAL-00131	4.2.1.1
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of RA101495 in cynomolgus monkey	カニクイザルにおける PK/PD 作用	*Ex vivo*	Ra Pharma	TR-0125	4.2.1.1
Assessment of complement activity in plasma of cynomolgus macaques	カニクイザル血漿サンプル（4 週間毒性試験の一部）の補体活性	*Ex vivo*	Ra Pharma	TR-0042	4.2.1.1
Assessment of complement activity in plasma of cynomolgus macaques	カニクイザル血漿サンプル（13 週間毒性試験の一部）の補体活性	*Ex vivo*	Ra Pharma	TR-0043	4.2.1.1
Assessment of complement activity in plasma of cynomolgus macaques	カニクイザル血漿サンプル（39 週間毒性試験の一部）の補体活性	*Ex vivo*	Ra Pharma	TR-0154	4.2.1.1
副次的薬理試験					
Protein binding specificity of RA101495 examined by SPR	センサーチップに固定したヒト C3、C3d、C4、C5、C6、C7、ヒト血清アルブミン及びヒト炭酸脱水酵素 II を用いた SPR 分析	*In vitro*	Ra Pharma	TR-0151	4.2.1.2
Binding specificity of RA101495 in human serum	ジルコプラン（RA101495）のコア配列と同等のペプチド構造を有するビオチン化分子を用いた健常ヒト血清におけるプルダウンアッセイ	*In vitro*	Ra Pharma	TR-0152	4.2.1.2
Evaluation of RA101495 and metabolite RA102758 in cellular receptor functional assays	細胞受容体の機能アッセイ	*In vitro*	[redacted]	TR-0150	4.2.1.2
Binding of zilucoplan and metabolites RA102758 and RA103488 in abuse liability in vitro panel	ほ乳類細胞に発現させた 35 の標的	*In vitro*	[redacted]	100061456	4.2.1.2

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
Interaction of zilucoplan with the OX_1 receptor and GABA transporter	ほ乳類細胞に発現させた標的	*In vitro*	[redacted]	100062196	4.2.1.2
安全性薬理試験 [a]					
Effect of RA101495 on cloned hERG potassium channels expressed in human embryonic kidney cells	ヒト胎児腎臓細胞に発現させたクローン hERG カリウムチャネル	*In vitro*	[redacted]	150507.SBR	4.2.1.3
A cardiovascular and respiratory telemetry study of RA101495 by subcutaneous injection in cynomolgus monkeys	遠隔計測器（テレメター）を装着したカニクイザル	sc	[redacted]	20076954	4.2.1.3
Cardiovascular and CNS safety in cynomolgus monkeys as part of the 4-week repeat toxicology study	カニクイザル	sc	[redacted]	20074710	4.2.3.2
Cardiovascular safety in cynomolgus monkeys as part of the 13-week repeat toxicology study	カニクイザル	sc	[redacted]	20076807	4.2.3.2
Cardiovascular safety in cynomolgus monkeys as part of the 39-week repeat toxicology study	カニクイザル	sc	[redacted]	20086030	4.2.3.2
薬力学的薬物相互作用試験					
実施せず					

CNS=中枢神経系、[redacted]、ELISA=酵素結合免疫吸着測定、GABA=ガンマアミノ酪酸、GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、hERG=ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子、MAC=膜侵襲複合体、MBL=マンノース結合レクチン、OX_1=オレキシン-1、PK=薬物動態、PD=薬力学、RBC=赤血球、sc=皮下、SPR=表面プラズモン共鳴

a : 試験は GLP に準拠して実施した

2. 効力を裏付ける試験

被験物質：ジルコプラン

報告書表題	試験系	投与方法	投与量	特記すべき所見	試験番号
Measurement of the binding affinity of RA101495 to surface immobilized human complement C5 using ProteOn XPR36	SPR を用いたセンサーチップ表面に固定されたヒト補体 C5 に対する結合親和性の測定	*In vitro*	ジルコプラン：0、3.7、11.1、33.3、100、300nM	平均結合キネティクス Ka：$6.3 \pm 2.5 \times 10^{5} M^{-1} s^{-1}$； Kd：$2.1 \pm 1.1 \times 10^{-4} s^{-1}$ K_D：$4.3 \pm 3.5 \times 10^{-10} M$	TR-0019
Detection of inhibition of C5 cleavage by RA101495 using C5a and MAC ELISAs	健常ヒト血清に曝露後の抗体感作ヒツジ赤血球を用いた溶血アッセイ C5a 及び sC5b-9 の ELISA	*In vitro*	ジルコプラン：0.000000093、0.000000373、0.000001、0.000006、0.000024、0.000095、0.000381、0.00153、0.00610、0.0244、0.0977、0.391、1.56、6.25、25 及び 100μM	溶血アッセイでの IC_{50}：9.6nM C5a ELISA アッセイでの IC_{50}：4.7nM sC5b-9 ELISA アッセイでの IC_{50}：5.9nM	TR-0023
Inhibition of hemolysis by RA101495 in the classical and alternative complement system pathways	1%健常ヒト血清又は 0.5nM の C5 たん白質を添加した 1.5%ヒト C5 欠損血清に曝露後の抗体感作ヒツジ赤血球（古典経路）及び 6%健常ヒト血清に曝露後の Ca^{2+}非存在下ウサギ赤血球（第 2 経路）を用いた溶血アッセイ	*In vitro*	ジルコプラン：0.000010、0.000060、0.000357、0.002143、0.01286、0.07716、0.462963、2.777778、16.66667 及び 100μM	IC_{50}； 古典経路（1%健常ヒト血清）：4.9nM 古典経路（0.5nM C5 を添加した 1.5%ヒト C5 欠損血清）：2.4nM 第 2 経路（Ca^{2+}非存在下 6%健常ヒト血清）：59.2nM	TR-0020

※調整中

報告書表題	試験系	投与方法	投与量	特記すべき所見	試験番号
Characterization of RA101495 in the Weislab complement ELISAs (classic, alternative, MBL)	Wieslab® のキットを用いた古典経路、第 2 経路及びレクチン経路における MAC の検出	*In vitro*	ジルコプラン： 0.000000093、 0.000000373、 0.000001、 0.000006、 0.000024、 0.000095、 0.000381、 0.001526、 0.006104、 0.024414、 0.097656、 0.390625、1.5625、 6.25、25 及び 100μM	MAC 産生阻害作用 IC_{50}； 古典経路（1%健常ヒト血清）： 11.2nM 第 2 経路（5.5%健常ヒト血清）： 17.2nM レクチン経路（2%健常ヒト血清）：3.6nM	TR-0024
Binding of RA101495 to human complement C5 variants	SPR を用いた遺伝子変異型ヒト C5 たん白質（R885C 及び R885H）に対する結合親和性の測定	*In vitro*	ジルコプラン又はエクリズマブ： 0.625、1.25、2.5、5 及び 10nM	結合親和性 K_D 値 野生型遺伝子組換えヒト C5 ジルコプラン：$4.07x10^{-11}M$ エクリズマブ： $2.06x10^{-13}M$ 遺伝子変異型ヒト C5 R885C ジルコプラン：$2.55x10^{-11}M$ エクリズマブ：検出できず 遺伝子変異型ヒト C5 R885H ジルコプラン：$7.36x10^{-11}M$ エクリズマブ：検出できず	RRUS0007

報告書表題	試験系	投与方法	投与量	特記すべき所見	試験番号
A comparison of the potency of RA101495 and eculizumab in the inhibition of hemolysis mediated by human C5 genetic variants	遺伝子変異型ヒト C5 たん白質（R885C 又は R885H）を添加した C5 欠損血清に曝露後の抗体感作ヒツジ赤血球を用いた溶血アッセイ	*In vitro*	ジルコプラン： 0.01、0.06、0.36、2.14、12.86、77.16、462.96、2777.78、16666.67 及び 100,000.00nM エクリズマブ： 0.002、0.01、0.05、0.26、1.28、6.40、32.00、160.00、800.00 及び 4,000.00nM	赤血球溶血阻害 IC_{50} 野生型遺伝子組換えヒト C5 ジルコプラン：1.4nM エクリズマブ：0.6nM 遺伝子変異型ヒト C5 R885C ジルコプラン：3.7nM エクリズマブ：>4000nM 遺伝子変異型ヒト C5 R885H ジルコプラン：8.6nM エクリズマブ：>4000nM	RRUS0006
Species selectivity of inhibition of complement by RA101495	多様な動物種（ヒト、カニクイザル、ヒヒ、チンパンジー、アカゲザル、ブタ、ミニブタ、ラット、ビーグル犬、マウス、ウサギ及びモルモット）由来の血清に曝露した抗体感作ヒツジ赤血球を用いた溶血アッセイ	*In vitro*	ジルコプラン： 0.0000102、0.0000613、0.000368、0.00214、0.0129、0.0772、0.463、2.78、16.7 及び 100μM	溶血阻害作用 IC_{50}； ヒト及び霊長類：<20nM ミニブタ：51.9nM ブタ：118.6nM ラット：591.2nM 他の全動物種：>4700nM	TR-0021
No inhibition of hemolysis by RA102758 in the classical complement pathway	健常ヒト血清に曝露後の抗体感作ヒツジ赤血球を用いた溶血アッセイ	*In vitro*	ジルコプラン又は RA102758： 0.00001、0.00006、0.00036、0.00214、0.01286、0.07716、0.46296、2.77778、16.66667 及び 100μM	古典経路（1%健常ヒト血清）における IC_{50}； ジルコプラン：4.6nM RA102758：30,884nM	RRUS0001

※調整中

報告書表題	試験系	投与方法	投与量	特記すべき所見	試験番号
Inhibition of hemolysis by RA103488 in the complement classical and alternative pathways	健常ヒト血清又は 0.5nM の C5 たん白質を添加したヒト C5 欠損血清に曝露後の抗体感作ヒツジ赤血球（古典経路）及び健常ヒト血清に曝露後の Ca^{2+}非存在下ウサギ赤血球（第 2 経路）を用いた溶血アッセイ	*In vitro*	ジルコプラン又は RA103488：0.00001、0.00006、0.00036、0.00214、0.01286、0.07716、0.46296、2.77778、16.66667 及び 100μM	古典経路（1%健常ヒト血清）における IC_{50}； ジルコプラン：5.2nM RA103488： 5.5nM 古典経路（0.5nM C5 を添加した 1.5%ヒト C5 欠損血清）における IC_{50}； ジルコプラン：0.84nM RA103488： 0.62nM 第 2 経路（6%健常ヒト血清）における IC_{50}； ジルコプラン：444.2nM RA103488： 568.2nM	RRUS0002
Primary hemolysis assay characterization of RA106009, a peptide inhibitor of complement component C5	0.5nM の C5 たん白質を添加したヒト C5 欠損血清に曝露後の抗体感作ヒツジ赤血球を用いた溶血アッセイ	*In vitro*	RA106009：0.0017、0.0100、0.0598、0.3590、2.1541、12.9244、77. 5463、465.2778、2791.6667 及び 16, 750nM	古典経路（0.5nM C5 を添加した 1.5%ヒト C5 欠損血清）における IC_{50}：0.42nM	VV-QUAL-00131

報告書表題	試験系	投与方法	投与量	特記すべき所見	試験番号
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of RA101495 in cynomolgus monkey	カニクイザルにおける PK/PD 作用	*Ex vivo*	20059043：0.5mg/kg を単回静脈内又は皮下投与 20072469：0.21 及び 4.2mg/kg を 1 日 1 回 7 日間皮下投与 20082852：0.2、0.4 及び 0.6mg/kg を 3 日に 1 回合計 3 回皮下投与 20087646：0.4mg/kg を単回静脈内又は皮下投与	サル血漿中のジルコプラン濃度と溶血阻害作用の間には強い相関が認められ、90%を超える溶血阻害作用を達成するにはサル血漿中薬物濃度は 2.5μg/mL 以上が必要であることが示された。	TR-0125
PD report: Analysis of complement activity in cynomolgus plasma samples from 28-day subcutaneous injection toxicity study following daily injection of RA101495 at 1, 2 and 4mpk	カニクイザル血漿サンプル（4 週間毒性試験）の補体活性	*Ex vivo*	20074710：0、1、2 及び 4mg/kg を 1 日 1 回 4 週間皮下投与	初回投与の 2 時間後から投与期間の 4 週間を通して、溶血に対するほぼ完全な阻害作用を示し、0mg/kg 投与群の溶血率が 90%を超えていたのに対し、1、2 及び 4mg/kg 投与群では 5%未満であった。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戻っており、補体系に対する阻害作用は僅か又は全く残っていなかった。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。	TR-0042

報告書表題	試験系	投与方法	投与量	特記すべき所見	試験番号
Inhibition of hemolysis by cynomolgus plasma samples following daily injections of RA101495 at 0.25, 1, 2 and 10mg/kg to support [redacted]20076807: A 13-week toxicity study of RA101495 by subcutaneous injection in cynomolgus monkeys with a 4-week recovery period	カニクイザル血漿サンプル（13 週間毒性試験）の補体活性	*Ex vivo*	20076807：0、0.25、1、2 及び 10mg/kg を 1 日 1 回 13 週間皮下投与	初回投与 2 時間後から 13 週間の投与期間中は溶血に対してほぼ完全な阻害作用を示し、0mg/kg 投与群の溶血率が 90%を超えていたのに対し、0.25、1、2 及び 10mg/kg 投与群では 5%未満であった。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戻っており、補体系に対する阻害作用は僅か又は全く残っていなかった。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。	TR-0043
Inhibition of hemolysis by cynomolgus plasma samples following daily injections of RA101495 at 0.25, 1, 2, 4 and 6 mg/kg to support [redacted]20086030: A 39-week toxicity study of RA101495 by subcutaneous injection in cynomolgus monkeys with an 8-week recovery period	カニクイザル血漿サンプル（39 週間毒性試験）の補体活性	*Ex vivo*	20086030：0、0.25、1、2、4 及び 6mg/kg を 1 日 1 回 39 週間皮下投与	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ほぼ完全な阻害作用を示し、0mg/kg 投与群の溶血率が 90%を超えていたのに対し、0.25mg/kg 投与群では 20%未満、1、2、4 及び 6mg/kg 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戻っており、補体系に対する阻害作用は僅か又は全く残っていなかった。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。	TR-0154

[redacted]、ELISA=酵素結合免疫吸着測定、IC_{50}=50%阻害濃度、ka=結合速度定数、K_D=平衡解離定数、kd=解離速度定数、MAC=膜侵襲複合体、MBL=マンノース結合レクチン、PK=薬物動態、PD=薬力学、SPR=表面プラズモン共鳴

3. 副次的薬理試験

被験物質：ジルコプラン

報告書表題	試験系	投与方法	投与量	特記すべき所見	試験番号
Protein binding specificity of RA101495 examined by SPR	センサーチップに固定化したヒト C3、C3d、C4、C5、C6、C7、ヒト血清アルブミン及びヒト炭酸脱水酵素 II を用いて SPR により標的結合特異性評価	*In vitro*	ジルコプラン：0、123、370、1111、3333 及び 10,000nM	K_D 値： C5 に対する結合：1.4nM C4 に対する結合：40μM ヒト血清アルブミンに対する結合：19μM C3、C3d、C6、C7 及びヒト炭酸脱水酵素 II に対しては特異的な結合は示さなかった。	TR-0151
Binding specificity of RA101495 in human serum	ジルコプラン（RA101495）のコア配列と同等のペプチド構造を有するビオチン化分子を用いて健常ヒト血清からプルダウンアッセイ	*In vitro*	RA101772 及び RA102932 はいずれもジルコプランと同じアミノ酸配列を有するビオチン化分子 RA101772：600pmol RA102932：700pmol	ヒト血清において、ビオチン化分子は選択的に補体 C5 に結合した。他の血清中たん白質はビオチン化分子と結合しなかった。	TR-0152

※調整中

報告書表題	試験系	投与方法	投与量	特記すべき所見	試験番号
Evaluation of RA101495 and metabolite RA102758 in cellular receptor functional assays	細胞受容体の機能アッセイ	*In vitro*	ジルコプラン又はRA102758：1、3.3、10及び30μM	ジルコプラン及びRA102758は30μMの濃度まで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作用は示さなかった。10μMの濃度まで、ジルコプラン及びRA102758は検討したいかなる受容体に対してもアンタゴニスト作用は示さなかった。30μMの濃度でジルコプランはCCK2受容体に対してアンタゴニスト作用（62%阻害）を示し、RA102758はCCK1受容体に対してアンタゴニスト作用（57.4%阻害）を示した。	TR-0150
Binding activity of zilucoplan and metabolites RA102758 and RA103488 in abuse liability *in vitro* panel	ほ乳類細胞に発現させた35の標的	*In vitro*	ジルコプラン：30μM RA102758及びRA103488：3μM	ジルコプランはOX_1受容体及びGABAトランスポーターに顕著に結合した（各放射性標識リガンドとの結合をそれぞれ62%及び52%阻害した）。	100061456
Interaction of zilucoplan with the OX_1 receptor and GABA transporter	ほ乳類細胞に発現させた標的	*In vitro*	放射性標識リガンド結合アッセイ（GABAトランスポーター及びOX_1受容体）：3、10、30、100及び300μM 機能アッセイ（OX_1受容体）：0.1、0.3、1、3、10、30、100及び300μM	放射性標識リガンド結合アッセイ OX_1受容体 IC_{50}：33μM GABAトランスポーターIC_{50}：11μM 機能アッセイ OX_1受容体 IC_{50}：44μM	100062196

CCK=コレシストキニン、GABA=γ-アミノ酪酸、K_D=解離定数、OX_1=オレキシン-1、SPR=表面プラズモン共鳴

4. 安全性薬理試験

被験物質：ジルコプラン

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
心血管系							
HEK293細胞におけるhERGパッチクランプ	hERG cDNAを遺伝子導入したHEK293細胞	*In vitro*	300μM	該当せず	ジルコプランは300μMでhERG電流を39.2±7.7%まで増加させ、溶媒投与群と比較して統計学的に有意な増加であった。hERGカリウム電流に対するジルコプランの作用のIC_{50}値は算出しなかった。	適用	150507.SBR
カニクイザルにおける心血管系／呼吸器系テレメトリー評価	サル／カニクイ	sc	Day1：0mg/kg Day8：2及び10mg/kg	各群雄4例	10mg/kgまでジルコプランに関連する心電図（ECG）の間隔及びECGの波形の形態対する作用はなく、心拍数及び動脈血圧の変化は認められなかった。ジルコプラン10mg/kg投与後8時間における各個体の血漿中濃度は77.7、78.9、76.2及び83.7μg/mL（平均：79.1μg/mL）であった。	適用	20076954
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の心電図検査	サル／カニクイ	sc	4週間：0、1、2及び4mg/kg 13週間：0、0.25、1、2及び10mg/kg 39週間：0、0.25、1、2、4及び6mg/kg	各群雌雄各3例（回復期間設定群では各群雌雄各2例）	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。	適用	20074710 20076807 20086030

※調整中

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び動物数／群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
呼吸器系							
カニクイザルにおける心血管系／呼吸器系テレメトリー評価	サル／カニクイ	sc	Day1：0mg/kg Day8：2及び10mg/kg	各群雄4例	投与前値及び溶媒投与後の値と比較して、10mg/kgまでジルコプラン投与後の呼吸数、1回換気量及び分時換気量に変化は認められなかった。ジルコプラン10mg/kg投与後8時間における各個体の血漿中濃度は77.7、78.9、76.2及び83.7μg/mL（平均：79.1μg/mL）であった。	適用	20076954
中枢神経系							
4週間反復投与毒性試験の一部としてのカニクイザルにおける中枢神経系の安全性評価	サル／カニクイ	sc	0、1、2及び4mg/kg/日	各群雌雄各3例	投与量4mg/kg/日（最大血漿中濃度として、雄：65.7μg/mL、雌：62.8μg/mLに相当）まで、ジルコプラン投与後に神経系の変化は認められなかった。	適用	20074710

cDNA=相補的デオキシリボ核酸、ECG=心電図、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、IC_{50}=50%阻害濃度、sc=皮下

5. 薬力学的薬物相互作用試験

実施せず。

※調整中