2.6.1　緒言

アフリベルセプト（VEGF Trap）〔一般名 aflibercept（INN）/アフリベルセプト（遺伝子組換え）（JAN）〕は、血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor）阻害薬（抗VEGF 薬）であり、ヒト免疫グロブリン G1 の Fc ドメインにヒト VEGF 受容体の細胞外ドメインを結合した組換え融合糖タンパク質である。本邦では 2011 年 6 月 24 日に「アイリーア硝子体内注射液 40mg/mL」及び「アイリーア硝子体内注射用キット 40mg/mL」の製造販売承認申請を行い、2012 年 9 月 28 日に「中心窩下脈絡膜新生血管を伴う加齢黄斑変性（AMD）」を効能・効果として承認された。その後、「糖尿病黄斑浮腫（DME）」の追加効能・効果が 2014 年 11 月に承認された。いずれの効能・効果についても 1 回用量は 2mg（容量 0.05mL）である。

今回の承認申請は、アフリベルセプトの高濃度製剤（114.3mg/mL：以下、本剤）を 8mg の用量（容量 0.07mL）で滲出型 AMD（nAMD）及び DME の患者に硝子体内投与した臨床試験成績に基づき行うものであり、申請区分は「新剤形医薬品」である。本剤の臨床開発に際し、効力薬理試験については、血管漏出を有する網膜新生血管ウサギモデルを用いて、本剤の血管漏出抑制作用及びその作用期間の延長について既承認製剤と比較した（2.6.2.2.2.1）。非臨床薬物動態試験については、既提出の試験成績によりアフリベルセプトの薬物動態特性は既に明らかにされていることから、独立した非臨床薬物動態試験は実施しなかった。一方、追加実施した毒性試験で抗アフリベルセプト抗体の力価測定を行うための新たな分析法を確立した（2.6.4.2.1）。毒性試験については、ヒトに本剤投与時の安全性を担保するため、カニクイザルを用いた反復硝子体内投与試験 2 試験を実施した（2.6.6.3.1 及び 2.6.6.3.2）。毒性試験では、本剤中の新添加物の安全性についても評価した（2.6.6.8.1）。

なお、既提出の試験成績については中心窩下脈絡膜新生血管を伴う AMD に対する初回承認申請書添付資料（以下 AMD CTD） 2.6.2～2.6.7 を参照。

本申請区分	医療用医薬品、新剤形医薬品
申請効能・効果	中心窩下脈絡膜新生血管を伴う加齢黄斑変性、糖尿病黄斑浮腫
申請用法・用量	アフリベルセプト（遺伝子組換え）として 8mg（0.07mL）を 4 週ごとに 1 回、連続 3 回（導入期）硝子体内投与する。その後の維持期においては、通常、16 週ごとに 1 回、硝子体内投与する。なお、症状により投与間隔を適宜調節する。

非臨床試験の概括評価（2.4）及び概要（2.6.1～2.6.7）で使用した略語の一覧を表に示す。

略語一覧

略語	英語名称	日本語名称
ADA	Anti-Drug (aflibercept) antibody	抗薬物（アフリベルセプト）抗体
AMD	Age-related macular degeneration	加齢黄斑変性
AMD CTD	-	既承認 40mg/mL 製剤の中心窩下脈絡膜新生血管を伴う AMD に対する初回承認申請書添付資料
ANOVA	Analysis of variance	分散分析
AUC	Area under the concentration time curve	濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{tau}	AUC calculated during the dosing interval	投与間隔における AUC
$AUC_{0\text{-}Xdays}$	AUC from time 0 to X days	0 時間から x 日までの AUC
BW	Body Weight	体重
C_{max}	Maximal concentration	最高濃度
C_{trough}	Lowest concentration in a dosing interval	トラフ濃度
DME	Diabetic macular edema	糖尿病黄斑浮腫
DL-α-AAA	DL-alpha-aminoadipic acid	DL-α-アミノアジピン酸
ERG	Electroretinogram	網膜電図
EFD	Embryofetal development	胚・胎児発生
FA	fluorescein angiography	蛍光眼底造影
GD	Gestation day	妊娠日数
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
HMWs	High molecular weight species	高分子量分子種（凝集体）
IOP	intraocular pressure	眼圧
IV	Intravenous	静脈内
IVT	Intravitreal	硝子体内
JET ECG	Jacketed external telemetry electrocardiography	ジャケット付き外部テレメトリー心電図

略語	英語名称	日本語名称
LOAEL	Lowest observed adverse effect level	最小毒性量
NA、n.a.又はN/A	Not applicable	該当なし
nAMD	Neovascular AMD	滲出型AMD
ND	Not determined	検出されていない
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	No observed effect level	無影響量
OP	Ocular photography	眼底写真
RNV	Retinal neovascularization	網膜新生血管
SC	Subcutaneous	皮下
SEM	Standard error of the mean	標準誤差
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	Time of maximal plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	血管内皮増殖因子
VEP	Visual-evoked potential	視覚誘発電位
w/v	Weight/volume	重量／容量

2.6.2　薬理試験の概要文の目次

2.6.2.1　まとめ..... 2
2.6.2.2　効力を裏付ける試験..... 3
2.6.2.2.1　*In vitro* 試験 3
2.6.2.2.2　*In vivo* 試験 3
2.6.2.2.2.1　RNV ウサギモデルにおけるアフリベルセプト投与による血管漏出抑制作用 3
2.6.2.3　副次的薬理試験..... 5
2.6.2.4　安全性薬理試験..... 5
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用..... 7
2.6.2.6　考察及び結論..... 7
2.6.2.7　図表..... 8
引用文献一覧 8

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

アフリベルセプトの血管漏出抑制作用を持続させ、1 年間あたりの投与回数を減らすことを目的として、滲出型加齢黄斑変性（nAMD）及び糖尿病黄斑浮腫（DME）を対象とした高濃度製剤（114.3mg/mL、以下、本剤）を 8mg（容量 0.07mL）の用量で硝子体内投与する臨床試験が実施された。

薬理試験（効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験を含む）の資料は、中心窩下脈絡膜新生血管を伴う AMD に対する初回承認時申請書添付資料（以下、AMD CTD）として提出・評価済みである。今回、本剤 8mg の開発を支持するため、網膜新生血管（RNV）ウサギモデルを用いて *in vivo* 試験を新たに実施し、本項では、当該 RNV ウサギモデルにおけるアフリベルセプトの効果について記載した（2.6.2.2.2.1）。

また、初回承認申請時に既提出の安全性薬理試験及び本承認申請にあたり追加実施したカニクイザル 6 ヵ月反復硝子体内投与試験における各種動物の遊離型アフリベルセプトの血漿中濃度と本剤 8mg を nAMD 又は DME 患者の片眼に反復硝子体内投与後の遊離型アフリベルセプトの血漿中濃度（国外第Ⅱ相 CANDELA 試験、国際共同第Ⅲ相 PHOTON 及び PULSAR 試験の母集団薬物動態解析：5.3.3.5.2 R-14327 Table 21）との曝露量比を算出した（2.6.2.4）。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 試験

AMD CTD 2.6.2.2.1 参照

2.6.2.2.2 *In vivo* 試験

AMD CTD 2.6.2.2.2 参照

今回新たに実施した RNV ウサギモデルを用いた試験について、以下に記載する。

2.6.2.2.2.1 RNV ウサギモデルにおけるアフリベルセプト投与による血管漏出抑制作用

参照項目： 4.2.1.1.1 R-13499

ウサギに DL-α-アミノアジピン酸（AAA）を硝子体内投与することにより、網膜グリア細胞の損傷及び血液網膜関門の破綻が生じ、持続的な網膜変性及び網膜血管漏出を有する RNV が誘発される。この RNV ウサギモデルは、持続的な血管漏出及び血管病変の観点から、ヒト AMD の病態を模倣している。そこで、DL-α-AAA 誘発 RNV ウサギモデルを用いて、血管漏出に対するアフリベルセプトの抗 VEGF 作用及びその作用時間を評価することで、RNV に対するアフリベルセプト硝子体内投与の効果について検討した。

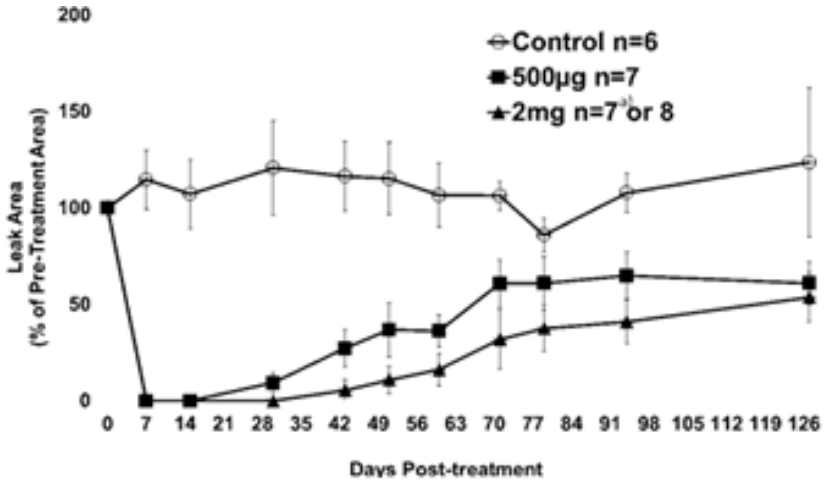
20 週齢の雄ウサギ（New Zealand White）に、80mM の DL-α-AAA を 80μL ずつ両眼に硝子体内投与（右眼：10 時、左眼：14 時）し、RNV を誘発した。DL-α-AAA 投与 12 週間後に、10%のフルオレセインを耳翼辺縁静脈から投与し、フルオレセイン蛍光眼底造影検査により画像を取得した。取得後、画像解析により測定した血管漏出面積を用いて、視神経乳頭面積に対する血管漏出面積の割合を算出後、平均値が同程度となるように群分けを実施した（n＝6～8 眼）。群分け時に、網膜前膜に血管漏出が認められた 1 眼は試験から除外した。群分け後、0.5%プロパラカイン投与による麻酔下でアフリベルセプト 0.5 及び 2mg/eye あるいは媒体〔[redacted]mM L-Histidine、[redacted]%（w/v）Sucrose（pH[redacted]）、[redacted]%（w/v）Polysorbate20〕を単回硝子体内投与した。ウサギに投与した 0.5 及び 2mg/eye の用量は、硝子体容積比で外挿すると、ヒトでは約 2 及び 8mg/eye の用量に相当する。定期的に 10%のフルオレセインを耳翼辺縁静脈から投与し、フルオレセイン蛍光眼底造影検査により画像を取得後、画像解析により血管漏出面積を測定した。なお、アフリベルセプト投与前及び投与後定期的に、眼圧検査により硝子体内投与に伴う眼圧の変化を、レッドフリー眼底撮影により網膜血管構造を、光干渉断層計により炎症反応及び網膜の状態を確認した。

アフリベルセプト及び媒体投与前の血管漏出面積に対する投与後の血管漏出面積の割合では、アフリベルセプト 0.5mg/eye 投与後 79 日目（11 週目）、94 日目（13 週目）及び 127 日目（18 週目）、並びにアフリベルセプト 2mg/eye 投与後 127 日目（18 週目）を除いて、いずれの時点でも媒体投与群と比較してアフリベルセプト投与群で血管漏出が有意に抑制された（p＜0.05、図 2.6.2.2- 1）[i]。アフリベルセプト 0.5 及び 2mg/eye 投与後 7 日目（1 週目）には、いずれの用量でも血管漏出が完全に抑制された。この血管漏出の完全な抑制は、アフリベルセプト

[i] 2mg/eye 投与群における投与後 71 及び 79 日目において、8 眼中 1 眼に欠損値が含まれたため（共に n＝7）、Tukey’s multiple comparison test with mixed effects analysis を用いた再検定の成績及び再作成した図 2.6.2.2- 1 を記載した。なお、R-13499 に記載の結論である「0.5mg/eye 投与群と比較して 2mg/eye 投与群では血管漏出完全抑制期間が延長する」には影響しない。

0.5mg/eye投与群では投与後15日目（2週目）まで認められた一方で、アフリベルセプト2mg/eye投与群では投与後30日目（4週目）まで認められた（図2.6.2.2- 1）。

図2.6.2.2- 1　RNVウサギモデルにおけるアフリベルセプト硝子体内投与後の血管漏出抑制作用



Mean retinal vascular leak area in rabbit eyes over time +/- SEM, as a percentage of pre-treatment leak, following single-dose IVT administration of 500 µg or 2 mg aflibercept, or formulation vehicle control (n=numbers of eyes). All timepoints representing treated animals were significantly different from control ($p<0.05$, 2-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test with mixed effects analysis) with the exceptions for 500 µg on day 79, day 94, day 127 and for 2 mg on day 127.
[a] Number of eyes at Day 71 and 79 was 7. Data Source: R-13499

また、アフリベルセプト0.5mg/eye投与群では投与後4週目に3眼（n＝7）で血管漏出が再び認められた一方で、アフリベルセプト2mg/eye投与群では投与後6週目に1眼（n＝8）で血管漏出が再び認められた。よって、0.5mg/eye投与群と比較して2mg/eye投与群では血管漏出完全抑制期間が延長することが明らかとなった。

以上より、アフリベルセプトはRNVウサギモデルにおいて、可逆性の血管漏出抑制作用を示し、その抑制期間を用量依存的に延長した。つまり、高用量のアフリベルセプトは網膜血管漏出抑制期間を延長させることが明らかになった。

2.6.2.3　副次的薬理試験

AMD CTD 2.6.2.3 参照

2.6.2.4　安全性薬理試験

AMD CTD 2.6.2.4 参照

初回承認申請時に既提出の安全性薬理試験において、アフリベルセプトによる呼吸器系機能及び血栓形成に対する影響は認められなかった。また、安全性薬理エンドポイントを組み込んだサルの反復静脈内投与毒性試験において、アフリベルセプトを全身投与しても中枢神経系機能及び心血管系機能への影響は認められなかった。

マウス及びラットを用いた血圧に関する試験において、アフリベルセプトを単回皮下投与すると収縮期及び拡張期血圧いずれも用量依存的な上昇が認められた。更に、切開創及び切除創治癒モデルウサギを用いた試験において、アフリベルセプトを反復静脈内投与すると切開創傷及び切除創傷の治癒速度の遅延、並びに創傷の伸張強度の低下が認められた。

更に、本承認申請にあたり追加実施した安全性薬理エンドポイントを含むカニクイザル 6 ヵ月反復硝子体内投与試験において、高用量のアフリベルセプトを投与しても心血管系機能（脈拍数、血圧及び心電図）、中枢神経系機能及び呼吸器系機能（呼吸数及びパルスオキシメトリー評価）への影響は認められなかった（4.2.3.2.1 R-13513）。

これらの試験での各種動物における遊離型アフリベルセプトの血漿中濃度と本剤 8mg を nAMD 又は DME 患者の片眼に反復硝子体内投与後の遊離型アフリベルセプトの血漿中濃度（国外第Ⅱ相 CANDELA 試験、国際共同第Ⅲ相 PHOTON 及び PULSAR 試験の母集団薬物動態解析：5.3.3.5.2 Table 21）との曝露量比を表 2.6.2.4- 1 に示す。

アフリベルセプトを全身投与（静脈内及び皮下投与）した既提出の安全性薬理試験において、呼吸器系機能、中枢神経系機能及び血栓形成に関する曝露量比は 4240 倍以上〔サル及びウサギの無影響量（NOEL）と比較〕であった。収縮期及び拡張期血圧に関する曝露量比は 6.5 倍（ラットの NOEL と比較）、切開創及び切除創治癒に関する曝露量比は 39.7 倍〔ウサギの最小毒性量（LOAEL）と比較〕であった。呼吸器系機能、中枢神経系機能及び血栓形成における曝露量比と比較すると、収縮期及び拡張期血圧、並びに切開創及び切除創治癒における曝露量比は低い値を示した。

表 2.6.2.4- 1 患者の片眼に本剤 8mg を反復硝子体内投与後の遊離型アフリベルセプトの血漿中濃度に対する各種動物における遊離型アフリベルセプトの血漿中濃度の曝露量比

Study / Endpoint	Dose	Free C_{max} (µg/mL)	Safety margins / exposure ratios based on free C_{max}
Human exposure			
Model-prediction exposures ($C_{max,8\text{-}12weeks}$) after IVT injections of 8 mg aflibercept in study eye on weeks 0, 4, and 8 in patients with nAMD or DME[a] Module 5.3.3.5.2, R-14327, Quantitative Pharmacology Simulation PK Report, VGFT-PK-22159-SR-01V1, Table 21	8 mg IVT unilateral	0.154	NA
Safety Pharmacology studies:	***Testing integrated in an IVT toxicology study in monkeys on the new aflibercept 8 mg formulation***		
NOEL for cardiovascular, respiratory & central nervous system function tested in a toxicological IVT monkey study utilizing the aflibercept 8 mg formulation[b] (Module 4.2.3.2.1 R-13513, VGFT-TX-18169)	7 mg IVT bilateral (every 4 weeks)	20.7	134
Safety Pharmacology studies:	***Testing in systemic nonclinical studies in rats, rabbits and monkeys***		
NOEL for respiratory [1)]& central nervous system function tested in a toxicological IV monkey study (AMD CTD 4.2.3.2-15 VGFT-TX-05009)	30 mg/kg BW IV (once weekly up to 15 weeks, then every 2 weeks)	653	4240
NOEL for the potential of thrombosis formation in the rabbit (AMD CTD 4.2.1.3-5 VGFT-TX-06012)	30 mg/kg BW IV (day -6, -3 and 1)	1060	6883
Blood pressure in telemetered mice & rats NOEL rat LOAEL mouse* (↑ by 14/12 mmHg syst./diast.) (AMD CTD 4.2.1.3-9 VGFT-MX-08018)	Single dose 0.15 mg/kg BW SC 2.5 mg/kg BW SC	 1.00 11.6	 6.50 75
Incisional / excisional wound healing in the rabbit LOAEL (delays in wound healing)* (AMD CTD 4.2.1.3-7 VGFT-TX-06010, AMD CTD 4.2.1.3-8 VGFT-TX-06011)	0.3 mg/kg BW IV (4 treatment occasions, once weekly)	6.11	39.7

BW = body weight; IV = intravenous; LOAEL = lowest observed adverse effect level; MoEs = multiples of exposure; NA = not applicable; NOAEL = no observed adverse effect level; NOEL = no observable effect level; SC = subcutaneous. *: No NOAEL identified. [1)] : evaluated by clinical observation in VGFT-TX-05009

[a] In the Phase 2b study CANDELA and the two Phase 3 studies PHOTON and PULSAR the initial three IVT doses were given at an interval of 4 weeks as a loading dose, while longer treatment intervals were applied later. As a conservative approach, the PopPK model-predicted exposures for free aflibercept following three initial IVT doses of aflibercept in participants with nAMD or DME after the third dose was used for the calculation of exposure multiples. For details see: Module 5.3.3.5.2 R-14327, Quantitative Pharmacology Simulation PK Report, VGFT-PK-22159-SR-01V1,Table 21.

[b] The mean C_{max} at 7 mg/eye in Module 4.2.3.2.1 R-13513, VGFT-TX-18169, Appendix 9.5 Toxicokinetic Report, Table 1; after the 2nd dose (exposure after the 2nd dose was selected for calculation of exposure multiples in safety pharmacology and toxicology, since after the 7th dose the dosing interval extended into the recovery period and there was no 28 day sample taken. Therefore, AUC_{tau} was an extrapolated $AUC_{0\text{-}28}$.).

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用

AMD CTD 2.6.2.5 参照

2.6.2.6　考察及び結論

アフリベルセプト 8mg 投与による血管漏出抑制作用やその作用時間を検討するために、DL-α-AAA 誘発 RNV モデルを用いて *in vivo* 試験を実施した。ウサギに投与したアフリベルセプト 0.5 及び 2mg/eye の用量は、硝子体容積比で外挿すると、ヒトでは約 2 及び 8mg/eye の用量に相当する。血管漏出の完全な抑制は、アフリベルセプト 0.5mg/eye 投与群では投与後 15 日目（2 週目）まで認められた一方で、アフリベルセプト 2mg/eye 投与群では投与後 30 日目（4 週目）まで認められた。よって、患者に本剤 8mg を硝子体内投与することで網膜血管漏出抑制期間の延長が可能であり、1 年あたりの投与回数を減らすことができると考えられる。

本承認申請にあたり追加実施した安全性薬理エンドポイントを含むカニクイザル 6 ヵ月反復硝子体内投与試験において、高用量のアフリベルセプトを投与しても心血管系機能（脈拍数、血圧及び心電図）、中枢神経系機能及び呼吸器系機能（呼吸数及びパルスオキシメトリー評価）への影響は認められなかった（4.2.3.2.1 R-13513）。

初回承認申請時に既提出の安全性薬理試験及び追加実施したカニクイザル 6 ヵ月反復硝子体内投与試験における各種動物の遊離型アフリベルセプトの血漿中濃度と本剤 8mg を nAMD 又は DME 患者の片眼に反復硝子体内投与後の遊離型アフリベルセプトの血漿中濃度（国外第Ⅱ相 CANDELA 試験、国際共同第Ⅲ相 PHOTON 及び PULSAR 試験の母集団薬物動態解析：5.3.3.5.2 Table 21）との曝露量比を算出した。

アフリベルセプトを全身投与（静脈内及び皮下投与）した既提出の安全性薬理試験において、呼吸器系機能、中枢神経系機能及び血栓形成に関する曝露量比は 4240 倍以上（サル及びウサギの NOEL と比較）であった。収縮期及び拡張期血圧に関する曝露量比は 6.5 倍（ラットの NOEL と比較）、切開創及び切除創治癒モデルに関する曝露量比は 39.7 倍（ウサギの LOAEL と比較）であった。呼吸器系機能、中枢神経系機能及び血栓形成における曝露量比と比較すると、収縮期及び拡張期血圧、並びに切開創及び切除創治癒における曝露量比は低い値を示した。

収縮期及び拡張期血圧については、PULSAR 試験（2.7.4.A.2.1.6.9.1）、CANDELA 試験（2.7.4.A.2.1.6.9.2）及び PHOTON 試験（2.7.4.B.2.1.6.9）において、高血圧の発現割合は各試験の群間（アフリベルセプト 2mg 投与群と 8mg 投与群との比較）でほぼ同程度であった。

2.6.2.7　　図表

図表は本文中に配置した。

引用文献一覧

該当なし

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表

試験一覧表は、2.6.3.2 を参照。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test Article : **Aflibercept**

Primary Pharmacodynamics – *in vivo* studies – Overview

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Study Number Location in CTD
The Duration of Inhibition of Pathological Retinal Vascular Leak by Intravitreal Aflibercept is Dose-Dependent	Rabbit, Male New Zealand (white)	IVT	[redacted], [redacted], US	R-13499	VGFT-PH-19050-SR-01V1 4.2.1.1.1

Test Article： **Aflibercept**

Primary Pharmacodynamics – *in vivo* studies –

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number Location in CTD (Report Number)
The Duration of Inhibition of Pathological Retinal Vascular Leak by Intravitreal Aflibercept is Dose-Dependent	Rabbit, Male New Zealand (white)	IVT, single	0.5 or 2 mg per eye (bilateral treatment)	• Aflibercept 0.5 or 2 mg per eye resulted in significant and initial complete suppression of vascular leak. • All eyes remained leak-free out to 2 weeks after 0.5 mg/eye aflibercept, with 3/7 eyes starting to show some retinal vascular leak again at 4 weeks. In the 2 mg/eye group all eyes were leak-free out to 4 weeks and 1/8 eyes showed some return of leak at week 6. • Complete leak suppression was dose dependent and greater in the 2 mg aflibercept dose group	VGFT-PH-19050-SR-01V1 4.2.1.1.1 (R-13499)

以降の項番号は、記載なしのため省略。