目次

2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 4
2.4.1.1 薬理試験 4
2.4.1.2 薬物動態試験 4
2.4.1.3 毒性試験 4
2.4.1.4 GLP 及びガイドライン 5
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 5
2.4.2.1.1 クロバリマブの標的に対する結合親和性 5
2.4.2.1.2 補体活性により誘導される赤血球溶血に対するクロバリマブの阻害活性 5
2.4.2.1.3 クロバリマブ投与による補体活性の評価 5
2.4.2.1.4 副次的薬理試験 6
2.4.2.1.4.1 Fc 領域の結合相互作用 6
2.4.2.1.4.2 C1q への結合相互作用 7
2.4.2.1.5 安全性薬理試験 7
2.4.2.1.6 薬力学的薬物相互作用 7
2.4.3 薬物動態試験 8
2.4.3.1 分析法 8
2.4.3.2 吸収 8
2.4.3.3 標的捕捉率と補体活性との関連性評価 8
2.4.3.4 分布，代謝及び排泄 8
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用 9
2.4.4 毒性試験 9
2.4.4.1 単回投与毒性試験 9
2.4.4.2 反復投与毒性試験 9
2.4.4.3 遺伝毒性試験 9
2.4.4.4 がん原性試験 9
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 10
2.4.4.6 局所刺激性試験 10
2.4.4.7 その他の毒性試験 10
2.4.4.8 幼若毒性試験 10
2.4.4.9 新添加剤の安全性評価 11
2.4.4.10 動物からヒトへの外挿（曝露量，臨床との関連性） 11
2.4.5 総括及び結論 12
2.4.6 参考文献一覧 13

表一覧

表 2.4.4.10-1 毒性試験においてヒトのリスク評価に影響する毒性学的所見が認められなかった最高投与量における曝露量と，申請用法用量におけるヒト曝露量との比較..... 11

略語一覧

略語	英名	和名
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
C_0	initial plasma concentration at time 0 calculated by extrapolation	外挿により算出した時間0における初期血漿中濃度
C1q	complement component 1q	補体第1成分 C1q サブユニット
C5	complement component 5	補体第5成分
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CH50	50% hemolytic complement activity	補体価
CL	total clearance	クリアランス
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
DTDC	drug-target-drug complex	薬物-標的-薬物複合体
ECLIA	electro-chemiluminescence immunoassay	電気化学発光免疫測定法
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
ePPND	enhanced pre- and postnatal development	拡張型出生前及び出生後の発生
F	bioavailability	生物学的利用率
Fc	fragment crystallizable	結晶化フラグメント
FcRn	neonatal Fc receptor	胎児性 Fc 受容体
FcγR	Fc gamma receptor	Fcγ 受容体
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
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
K_D	disassociation constant	解離定数
LIA	liposome immunoassay	リポソーム免疫測定
MAC	membrane attack complex	膜侵襲複合体
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PD	pharmacodynamics	薬力学
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PNH	paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	発作性夜間ヘモグロビン尿症
rh	recombinant human	遺伝子組換えヒト
SEC	size exclusion chromatography	サイズ排除クロマトグラフィー
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
$t_{1/2}$	half-life	半減期
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	time to reach maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態分布容積

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

クロバリマブ（遺伝子組換え）（以下，本薬）は中外製薬株式会社が創製し，F. Hoffmann-La Roche, Ltd と共同開発を行っている，新規のヒト化抗補体第5成分（C5）モノクローナル抗体であり，発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）を予定する適応疾患としている。新規治療薬としての本薬の妥当性を評価するため，その薬効薬理，薬物動態及び毒性に関する特性を以下の非臨床試験により確認した。

2.4.1.1 薬理試験

本薬の標的に対する結合親和性，特異性及び生物活性を検討するため，*in vitro* 及び *in vivo* の薬理試験を実施した。*In vitro* 試験では，表面プラズモン共鳴（SPR）による測定を用いて，C5 に対する本薬の結合性を評価した。ヒト及びカニクイザル血清を用いた溶血アッセイを用いて，補体活性に対する阻害活性を評価した。また，SPR 測定において，各種 Fcγ 受容体（FcγR），胎児性 Fc 受容体（FcRn）及び補体第1成分 C1q サブユニット（C1q）との結合性を評価した。*In vivo* 試験では，カニクイザルを用いた単回投与試験及び反復投与試験において，補体活性に対する効果を検討した。安全性薬理試験は，中枢神経系，呼吸系及び心血管系に及ぼす影響を，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験の結果から評価した。

2.4.1.2 薬物動態試験

本薬の薬物動態（PK）を評価するため，単回及び反復投与試験を実施した。単回及び反復投与試験では，交差反応性を示し毒性試験で選択した動物種であるカニクイザルを用いて評価した。投与経路は，臨床投与経路である静脈内及び皮下投与とした。反復投与後の PK は，カニクイザルを用いた2週間静脈内及び皮下投与毒性試験，4週間静脈内及び21週間皮下投与毒性試験，並びに26週間皮下及び静脈内投与毒性試験のトキシコキネティクス（TK）パラメータから評価した。拡張型出生前及び出生後の発生（ePPND）試験における TK についても評価した。なお，PK／TK 評価はノンコンパートメント解析により得られたパラメータを用いて実施した。

カニクイザルにおける単回及び反復投与試験では遊離型，総 C5濃度及び補体活性を測定し，本薬の標的捕捉率と補体活性との関係性から PK と薬力学（PD）との関連性について検討した。

分布に関しては，本薬が遺伝子組み換えヒト化免疫グロブリン G（IgG）モノクローナル抗体であることを考慮し，放射性標識体を用いた一般的な分布試験は実施していない。代謝及び排泄試験は本薬が他のヒト化 IgG モノクローナル抗体医薬と同じ IgG フレームを有し，代謝及び排泄の経路は内因性 IgG と同様であると判断したことから実施していない。IgG は乳汁中に移行することが知られていることから，乳汁中排泄試験についても実施していない。なお，分布，代謝及び排泄試験の実施・評価に関する方針決定には，医薬品規制調和国際会議（ICH）S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」に準拠した。

2.4.1.3 毒性試験

本薬はげっ歯類に交差反応性を示さず，カニクイザルではヒトと同様の薬理作用を示す（2.4.2.1.1及び2.4.2.1.2参照）ことから，非臨床安全性評価における適切な動物種としてカニクイザルを選択した。反復投与毒性試験は，当初予定されていた臨床投与経路を考慮し，静脈内及び皮下投与で実施し，投与頻度は臨床投与頻度以上である週1回又は2週に1回を設定した。最終的な臨床投与経路としては，初回用量を静脈内投与（1日目）した後に反復皮下投与（2，8，15及び22日目に1回，29日目以降4週ごとに1 回）を行った。ePPND 試験は，初回は静脈内投与をした後，反復皮下投与で実施した。

以下に，実施した主要な毒性試験を示す。
·カニクイザルを用いた2週間静脈内及び皮下投与毒性試験（用量設定試験）
·カニクイザルを用いた4週間静脈内及び21週間皮下投与毒性試験
·カニクイザルを用いた26週間皮下及び静脈内投与毒性試験
·カニクイザルを用いた ePPND 試験
·カニクイザル及びヒト組織を用いた組織交差反応性試験
·ヒト血液適合性試験
·*In vitro* サイトカイン放出試験

ICH S6(R1)ガイドラインに従い，遺伝毒性及びがん原性試験は実施しなかった。単回投与毒性，雌雄受胎能に対する影響，局所刺激性及び安全性薬理は反復投与毒性試験の中で評価した。

2.4.1.4 GLP 及びガイドライン

本薬の非臨床試験は ICH ガイドラインに従い，主要な毒性試験及び安全性薬理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）を遵守して，経済協力開発機構（OECD）のデータ相互受入（Mutual Acceptance of Data）プログラムの加盟国で実施された。また，GLP 非適合の薬理試験，薬物動態試験，毒性試験についても，科学的な信頼性をもって実施された。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 クロバリマブの標的に対する結合親和性

C5に対する本薬のカイネティクスを SPR 測定により評価した。クロバリマブは濃度依存的にヒト C5及びカニクイザル C5に結合した。ヒト C5及びカニクイザル C5に対する本薬の解離定数（K_D）値は，pH 7.4ではそれぞれ1.72×10^{-10} mol/L 及び2.00×10^{-10} mol/L であった。本薬のヒト C5及びカニクイザル C5からの解離速度は，ともに pH 7.4よりも pH 6.0の条件下でより速かった。これらの結果より，本薬はヒト C5及びカニクイザル C5に同程度の親和性で結合すること，また，その結合が pH 依存的であることが示唆された。

マウス C5及びラット C5に対する本薬の結合についても同様に検討した。本薬の K_D 値は，マウス C5に対しては pH 7.4で1.46×10^{-8} mol/L であり，ラット C5に対しては K_D 値が決定できないほど結合が弱かった。この結果より，マウス C5及びラット C5に対する本薬の結合はヒト C5に対する結合よりはるかに弱いことが示唆された。

2.4.2.1.2 補体活性により誘導される赤血球溶血に対するクロバリマブの阻害活性

補体活性化は，ある動物種の赤血球を別の動物種の血清に添加することにより誘導でき，ニワトリ赤血球溶血アッセイを用いて，本薬の補体活性の阻害を評価した。ヒト及びカニクイザル血清において，本薬は用量依存的に抗体感作ニワトリ赤血球の溶血を阻害し，50%阻害濃度（IC_{50}）値はそれぞれ0.834 µg/mL 及び0.958 µg/mL であった。本薬は，ヒト及びカニクイザル血清中では高濃度で赤血球溶血を完全に阻害した一方で，ウサギ又はラット血清中で誘導した赤血球溶血の阻害は，検討した最高濃度である301 µg/mL でも50%未満であった。IC_{50}値に基づくと，ウサギ又はラット血清中での本薬による補体活性の阻害は，ヒト血清中での阻害の1/360以下であった。

2.4.2.1.3 クロバリマブ投与による補体活性の評価

カニクイザルに本薬を投与した，2週間反復静脈内及び皮下投与毒性試験（GLP 非適合，用

量設定試験）及び単回投与 PK／PD 試験では，抗体感作ニワトリ赤血球溶血アッセイにより血漿中の補体活性を測定した。

2週間毒性試験の回復期間，GLP 適合の4週間静脈内及び21週間皮下投与毒性試験，26週間皮下及び静脈内投与毒性試験，並びに ePPND 試験では，市販の全自動のリポソーム免疫測定（LIA）法を用いて補体価（CH50）を定量した。

雄カニクイザルに本薬を0.8，4又は20 mg/kg の用量で単回静脈内投与，若しくは4 mg/kg の用量で単回皮下投与した。ニワトリ赤血球溶血アッセイを用いて，投与動物の血漿試料中の補体活性を評価した。0.8 mg/kg の静脈内単回投与では，補体活性の有意な阻害は認められなかった。4 mg/kg の単回静脈内投与では，投与終了後の補体活性はベースライン値の18.6%であった。4及び20 mg/kg を単回投与したとき，補体活性をベースライン値の約20%以下に抑制した期間は，14日から35日まで用量依存的に延長した。4 mg/kg の単回皮下投与及び20 mg/kg の単回静脈内投与のそれぞれ約35及び84日後に本薬が血漿から完全に消失し，補体活性は完全に回復した。本薬の静脈内及び皮下による投与で，補体活性が阻害されることを確認した。

2週間静脈内及び皮下投与毒性試験では，検討した投与量で完全に補体活性が阻害されることが予想されたため，投与期間中の補体活性を評価するためにニワトリ赤血球溶血アッセイを使用した。休薬期間中はより高感度の LIA 法を用いて補体活性を評価した。本試験では，カニクイザルに，本薬を4，100 mg/kg で2週間に1回（計2回）静脈内投与した後，その内雌雄各1例について4 mg/kg では最終投与後8週間，100 mg/kg では28週間の回復期間を設けた。また，雌雄各1例に4, 40 mg/kg で週1回（計3回）皮下投与する群も設けた。抗体感作ニワトリ赤血球を用いた溶血アッセイにより評価したところ，補体活性はすべての投与群で阻害された。100 mg/kg（静脈内投与）群では，休薬期間中に LIA 法により測定した CH50が低値を示した。4 mg/kg（静脈内投与）群の雌雄及び100 mg/kg（静脈内投与）群の雄1例では，8週間又は28週間の回復期間終了時までに，補体活性は回復又は回復傾向を示した。

GLP 適合の4週間静脈内及び21週間皮下投与毒性試験では，本薬を10，40，160 mg/kg で週1回4週間静脈内投与した後，その内雌雄各3例については最終投与後17週間の回復期間を設けるとともに，雌雄各3例に40 mg/kg で週1回21週間皮下投与する群も設けた。LIA 法による評価では，投与期間中にすべての群で CH50が低値となることが確認された。10 mg/kg 静脈内投与群の雌雄各2例以上及び40 mg/kg 静脈内投与群の雄1例では，補体活性は休薬119日目までに回復又は回復傾向を示したが，その他の動物では休薬期間中も低値で推移した。

GLP 適合の26週間反復投与毒性試験では，カニクイザルに本薬を10，40，100 mg/kg で週1回26週間皮下投与及び160 mg/kg で2週に1回26週間静脈内投与した。皮下投与群については初回に100 mg/kg を静脈内投与した後，2回目から皮下投与を行った。LIA 法による評価では，投与期間中にすべての群で CH50の低下が認められた。10 mg/kg 群の雄1例及び雌2例，並びに40 mg/kg 群の雌2例では，回復期間の182日目までに CH50は回復又は回復傾向を示した。

2.4.2.1.4 副次的薬理試験

2.4.2.1.4.1 Fc 領域の結合相互作用

抗体の Fc（結晶化フラグメント）領域と FcγR との結合は抗体のエフェクター機能と関連し，抗体の Fc 領域と FcRn との結合は抗体の血漿中半減期と関連する。本薬の Fc 領域はヒト IgG1 をベースとして設計されており，FcγR との相互作用を低減するとともに，FcRn との相互作用を増強するために，いくつかのアミノ酸残基が改変されている。

pH 7.4におけるヒト FcγR 及びカニクイザル FcγR に対する本薬の結合活性を SPR 法により評価した。ヒト FcγR 及びカニクイザル FcγR に対する本薬の親和性は，対照としたトラスツズマブ（天然のヒト IgG1 Fc 領域を有する）と比べるとほとんど認められなかった。これらの結果は，本薬の有効性をもたらす主要な機序が C5を含む免疫複合体と FcγR の結合，すなわち貪食作用による免疫複合体の消失に依存していないことを示唆すると同時に，本薬が C5と相互作用して立体障害により C5から C5a 及び C5b への開裂を阻止することを裏付けている。

pH 6.0におけるヒト FcRn 及びカニクイザル FcRn に対する本薬の結合も SPR 測定により評価した。ヒト FcRn 及びカニクイザル FcRn に対する本薬の平均 K_D 値は，それぞれ1.70×10^{-7} mol/L 及び1.78×10^{-7} mol/L で，対照としたトラスツズマブのヒト FcRn 及びカニクイザル FcRn に対する平均 K_D 値は，それぞれ1.73×10^{-6} mol/L 及び1.98×10^{-6} mol/L であった。ヒト FcRn 又はカニクイザル FcRn に対する本薬の親和性はトラスツズマブの約10倍高く，それにより本薬の血漿中曝露が延長する可能性が示唆された

2.4.2.1.4.2 C1q への結合相互作用

ヒト C1q に対する本薬の結合活性を酵素免疫測定法（ELISA）により評価し，陽性対照抗体であるリツキシマブ（ヒト IgG1）及び陰性対照抗体であるナタリズマブ（ヒト IgG4）と比較した。その結果，C1q に対するリツキシマブの結合活性は用量依存的であったが，本薬及びナタリズマブの結合活性はリツキシマブよりも著しく弱かった。これらの結果から，本薬が補体依存性細胞傷害（CDC）を誘導する可能性は低いと考えられる。

2.4.2.1.5 安全性薬理試験

本薬はバイオテクノロジー医薬品（以下，バイオ医薬品）であることから，ICH S6(R1)ガイドライン及び ICH M3(R2)ガイドライン「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」を参考に，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験（2週間静脈内及び皮下投与毒性試験，4週間静脈内及び21週間皮下投与毒性試験，26週間皮下及び静脈内投与毒性試験）の中で，中枢神経系，呼吸系及び心血管系に及ぼす影響を評価した。その結果，本薬投与に関連した毒性は，各試験の最高用量（静脈内投与で最大160 mg/kg/週又は160 mg/kg/2週，皮下投与で最大100 mg/kg/週）まで認められなかった。

2.4.2.1.6 薬力学的薬物相互作用

本薬は PNH の治療薬として開発中である。PNH 患者では，補体活性の完全阻害を維持することが重要である。その結果，エクリズマブなどの既承認の C5阻害薬から本薬への切り替え又は本薬から別の C5阻害薬への切り替えは，前に投与された薬剤を休薬せずに実施しなければならないと考えられた。これにより，限られた期間，患者の血清中に本薬と他の C5阻害薬が同時に循環することになる。

本薬とエクリズマブは異なるエピトープを認識するため[1)]，エクリズマブ及び本薬の1つ又は複数の分子が C5を介して架橋結合する薬物-標的-薬物複合体（DTDC）が形成される可能性がある。エクリズマブはヒト以外の動物種に交差反応性を示さないため，pH 7.4又は pH 6.0の SEC（排除クロマトグラフィー）緩衝液を用いた SEC により DTDC の特性を *in vitro* で評価した。DTDC 形成は，本薬以外のエピトープに結合する他の C5阻害薬（すなわちラブリズマブ）でも予想される。

DTDC を構成する本薬と C5のモル数の比は本薬の濃度に依存して変化した。予備的な試験の結果から，DTDC は，本薬とは異なるエピトープを認識する抗 C5抗体，遺伝子組換えヒト C5（rhC5）及び本薬の混合比がほぼ等モルの場合に最大となり，8つの抗体及び8つ以上の rhC5 分子からなると推定された。本薬は pH 6.0（リソソームにおける pH）で rhC5-本薬複合体だけでなく，pH 7.4で生成した DTDC（本薬とは異なるエピトープを認識する抗 C5抗体-rhC5-本薬複合体）からも解離することから，DTDC の生成は本薬のリサイクリング特性を損なわないことが示唆される。

DTDC に関連する III 型過敏症反応や DTDC 形成が本薬の安全性プロファイルに及ぼす影響については，2.7.4臨床的安全性の概要で考察する。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

カニクイザル血漿中の本薬濃度測定用に酵素免疫測定法（ELISA）を開発し，バリデーション試験を実施した。カニクイザル血漿中の抗薬物抗体（ADA）測定用に電気化学発光免疫測定法（ECLIA）及び ELISA を開発し，バリデーション試験を実施した。カニクイザル血漿中の総 C5濃度及び遊離型 C5濃度測定用に ECLIA 及び ELISA を開発し，バリデーション試験を実施した。

2.4.3.2 吸収

雄カニクイザルに本薬を0.8，4及び20 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき，血漿中濃度推移は二相性を示し，薬物クリアランス（CL）は2.66～2.86 mL/day/kg，消失半減期（$t_{1/2}$）は約12～20日であった。定常状態分布容積（V_{ss}）は69.5～71.8 mL/kg であり，サル血漿容量[2)] を上回り一部は組織に分布していることが示唆された。雄カニクイザルに本薬を4 mg/kg の用量で単回皮下投与したとき，最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）は1～3日で吸収は緩やかであり，生物学的利用率（F）は69.1%（4 mg/kg 投与時）であった。

本薬の反復投与後の TK は，カニクイザルの反復静脈内及び反復皮下投与毒性試験として実施した3試験で評価した（静脈内投与：最高用量160 mg/kg/週，皮下投与：最高用量40 mg/kg/週）。いずれの毒性試験においても本薬の初期血漿中濃度（C_0）又は最高血漿中濃度（C_{max}）及び血漿中濃度−時間曲線下面積（AUC）は，概ね用量比例的に増加した。21週間反復皮下投与試験（用量：40 mg/kg，週1回投与）では，投与回数を重ねるごとに C_{max} 及び AUC は増加し，投与11回目までに定常状態に到達した。いずれの TK パラメータにも明らかな性差は認められなかった。ePPND 試験においては，出生児の血漿中に本薬が検出されたことから本薬の妊娠動物における胎盤通過性が確認された。

本薬のカニクイザルにおける単回及び反復投与後の PK 評価は，曝露量が ADA の影響を受けなかった個体の結果に基づいている。ADA は大部分の動物で認められ，CL の上昇及び補体活性阻害の消失を引き起こす例が認められた。カニクイザルで認められた免疫原性はヒトにおける免疫原性を予測するものではない。

2.4.3.3 標的捕捉率と補体活性との関連性評価

カニクイザルを用いて単回及び反復投与試験を実施し，PK／PD の統合評価を行った。血漿中総 C5濃度及び遊離型 C5濃度を測定することにより，本薬の C5に対する標的捕捉率（target engagement）を間接的に評価した。更にニワトリ赤血球溶血試験を実施し，投与動物の血漿試料で補体活性を評価した。PK／PD 評価を通じて投与量に関わらず4～160 mg/kg の用量範囲において投与期間中及び休薬期間の一部で完全な補体活性阻害が認められた。すべての投与群において，本薬投与後に遊離型 C5濃度の急激な低下が認められた。遊離型 C5濃度の阻害の程度と持続時間は投与量に依存した。本薬反復投与後に総 C5濃度の蓄積が認められたが，特に低用量投与群においては休薬期間中に遊離型 C5濃度の上昇に伴って総 C5濃度は徐々に減少した。

2.4.3.4 分布，代謝及び排泄

分布に関しては，本薬が遺伝子組み換えヒト化 IgG モノクローナル抗体であることを考慮し，放射性標識体を用いた一般的な分布試験は実施していない。代謝及び排泄試験は本薬が他のヒト化 IgG モノクローナル抗体医薬と同じ IgG フレームを有し，代謝及び排泄の経路は内因性 IgG と同様であると判断したことから実施していない。IgG は乳汁中に移行することが知られていることから，乳汁中排泄試験についても実施していない。なお，分布，代謝及び排泄試験の実施・評価に関する方針決定には，ICH S6(R1)ガイドラインに準拠した。

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

本薬の薬物動態学的薬物相互作用試験（例：チトクローム P450との相互作用）は実施していない。IgG 分子の消失経路は低分子化合物のそれとは明確に異なる[3)] こと，又，本薬はサイトカイン調節物質ではないことから，本薬と低分子化合物との間で薬物間相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

独立した単回投与毒性試験は実施していない。本薬の急性毒性に関しては，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験（2週間静脈内及び皮下投与毒性試験，4週間静脈内及び21週間皮下投与毒性試験，26週間皮下及び静脈内投与毒性試験）の初回投与後の評価において，各試験の最高用量（静脈内投与で最大160 mg/kg/週又は160 mg/kg/2週，皮下投与で最大100 mg/kg/週）まで本薬投与に関連した毒性変化は認められなかった。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験として，2週間静脈内及び皮下投与毒性試験，4週間静脈内及び21週間皮下投与毒性試験，並びに26週間皮下及び静脈内投与毒性試験を実施した。各試験の投与経路，頻度及び最高用量は，計画治験における投与レジメン及び想定最大曝露をもとに設定した。予想される薬理作用と一致して，各試験の全投薬群で補体活性の可逆的な阻害が認められた。皮下投与部位に軽微から軽度の炎症性変化が認められたが，これは蛋白質製剤の皮下投与による一般的な投与部位反応であると考えられ，回復期間後の回復性が認められた。全試験の投薬群の複数用量の一部個体において，複数の組織で軽微から中等度の動脈炎が認められ，26週間試験の1例では糸球体腎炎も併発した。全試験の投薬群において血中で ADA 及び／又は本薬と ADA の免疫複合体が検出された。また，4週間静脈内及び21週間皮下投与毒性試験における動脈炎が認められた組織を用いた免疫組織化学染色により，本薬と ADA を含む免疫複合体の沈着が示されたことから，これらの変化は本薬と ADA との免疫複合体による III 型過敏症反応を介した組織傷害である可能性が高いと考えられた。蛋白質の構造には種差があり，抗ヒト C5 抗体である本薬の構造はカニクイザルでは異物として認識されることから，カニクイザルでみられた免疫原性及び免疫複合体によるものと考えられる変化は，ヒトの免疫反応を予測するものではないと考えられる。以上のことから，カニクイザルを用いた4週間静脈内及び21週間皮下投与毒性試験における無毒性量（NOAEL）は10 mg/kg/週未満，また，26週間皮下及び静脈内投与毒性試験における NOAEL は10 mg/kg/週であったものの，ヒトのリスク評価に影響する毒性変化は各試験の検討した最高用量（静脈内投与で最大160 mg/kg/週又は160 mg/kg/2週，皮下投与で最大100 mg/kg/週）まで認められていないと判断された。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

本薬はバイオ医薬品であることから，ICH S6(R1)ガイドラインで示されている考え方に従って，遺伝毒性試験は実施していない。一般に，高分子である IgG が DNA や他の染色体成分に直接相互作用するとは考えにくいことから，本薬の遺伝毒性の懸念は低いと考えられた。

2.4.4.4 がん原性試験

本薬はバイオ医薬品であることから，ICH S6(R1)ガイドラインで示されている考え方に従って，がん原性を評価した。本薬はカニクイザルに交差反応性を示すがマウスやラットに交差反応性を示さないことから，げっ歯類を用いた標準的ながん原性試験は実施していない。

補体の機能に関する文献情報からの知見，本薬のカニクイザルを用いた26週間反復投与毒性試験において本薬投与に関連した増殖性変化，薬理作用以外の免疫調節作用や免疫毒性又は内

分泌系への影響が認められなかったこと，並びにこれまでに得られた本薬の臨床データにおいて発がん性は示唆されていないことを総合して，本薬の発がんリスクは低いと考えられた。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

ICH S6(R1)ガイドラインで示されている考え方に従って，雌雄の受胎能に対する影響を，性成熟カニクイザルを用いた26週間皮下及び静脈内投与毒性試験における精子検査，月経サイクル，雌雄生殖器官の病理組織学的評価に基づいて評価した。本薬投与に関連した毒性変化は検討した最高用量である静脈内投与160 mg/kg/2週又は皮下投与100 mg/kg/週まで認められなかった。

胚・胎児発生並びに出生前及び出生後の発生に対する影響を評価するために，カニクイザルを用いた ePPND 試験を実施した。妊娠20日目から出産までの本薬の投与は，検討した最高用量である100 mg/kg/週まで，胚・胎児発生，出産，出生後の生存，並びに出産後6カ月の観察期間における形態，身体，機能，免疫学的評価に基づいた出生児の成長及び発達に影響を及ぼさなかった。

2.4.4.6 局所刺激性試験

カニクイザルを用いた本薬の反復投与毒性試験（2週間静脈内及び皮下投与毒性試験，4週間静脈内及び21週間皮下投与毒性試験，並びに26週間皮下及び静脈内投与毒性試験）において，静脈内及び皮下投与後の局所忍容性は良好であった。これらの試験で用いた製剤中の本薬濃度は，臨床製剤及び市販予定の製剤中濃度（いずれも170 mg/mL）以上であった。また，4週間静脈内及び21週間皮下投与毒性試験，並びに26週間皮下及び静脈内投与毒性試験では，第 I／II 相臨床試験用製剤と同処方の製剤を用いた。反復皮下投与後に投与部位に軽微から軽度の可逆的な炎症性変化が認められたが，蛋白質製剤の皮下投与による投与部位反応は一般に認められることから，本薬特異的な変化ではないと考えられた。

2.4.4.7 その他の毒性試験

カニクイザル及びヒトの組織を用いた *in vitro* 組織交差反応性評価において，複数組織の血管壁内又は血管周囲に蛋白性物質の染色が認められ，この染色パターンは血漿中及び細胞外マトリックス中に存在する分泌型 C5蛋白への交差反応性と一致するものと考えられた。

本薬はヒト血液に対して，17.2 mg/mL まで溶血作用を示さず，検討した最高濃度である172 mg/mL まで凝集作用を示さなかった。本試験で用いた製剤中の本薬濃度は，臨床製剤及び市販予定の製剤中濃度（いずれも170 mg/mL）以上であり，また処方は第 I／II 相臨床試験用製剤と同じであった。

ヒト血液を用いた *in vitro* サイトカイン放出試験において，本薬のサイトカイン誘導は，低リスク対照薬として用いたセツキシマブと同程度であった。

2.4.4.8 幼若毒性試験

本薬の幼若毒性試験は実施していない。本薬のカニクイザルを用いた反復投与毒性試験では，薬理作用である補体活性の阻害以外にヒトのリスク評価に影響する毒性学的所見は認められず，カニクイザルを用いた ePPND 試験では，母動物とともに出生児においても補体活性の低下が認められたが，胚・胎児発生，出産，出生後の生存，出生後6カ月までの観察期間における出生児の成長及び発達に影響は認められなかった。C5の欠損や機能異常に関する文献報告から，小児の成長及び発達に関連する影響は示唆されておらず，また，C5の阻害による潜在的な易感染性のリスクは成人と小児に同様に該当すると考えられた。更に，これまでに得られた臨床試験データから，本薬の安全性が小児と成人で異なる可能性は示唆されていない。以上のことから，本薬の毒性は成人と小児で基本的に同等であり，小児特有の安全性の懸念は低いと考え

られる。

2.4.4.9　新添加剤の安全性評価

本薬製剤に含まれる添加物のうち，L-ヒスチジン，L-アルギニン塩酸塩及び L-アスパラギン酸の皮下投与について，簡易相談において新添加物に該当することが確認された。L-ヒスチジン，L-アルギニン塩酸塩及びL-アスパラギン酸に関して，本薬の毒性試験及び臨床試験の結果並びに文献情報に基づき安全性を評価し，本薬製剤に含まれるこれらの添加物の皮下投与時における安全性の懸念は低いと考えられた（1.13.4.1.1-4）。

2.4.4.10　動物からヒトへの外挿（曝露量，臨床との関連性）

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験及び ePPND 試験において，ヒトのリスク評価に影響する毒性学的所見が認められなかった最高投与量における曝露量と，申請用法用量におけるヒトの曝露量を比較した（表 2.4.4.10-1）。申請用法用量として，患者の体重を考慮し，初回（1日目）に1回1,000又は1,500mg を点滴静注し，2，8，15及び22日目に1回340mg，29日目以降4週ごとに1回680又は1,020mg を皮下投与する。

26週間反復投与毒性試験における皮下投与又は静脈内投与条件の最高投与量における曝露量（C_{max} 及び AUC）又は ePPND 試験における最高投与量における曝露量は，申請用法用量におけるヒトの曝露量と比較して，それぞれ16倍及び13倍以上の安全域が確保されている。

表 2.4.4.10-1　毒性試験においてヒトのリスク評価に影響する毒性学的所見が認められなかった最高投与量における曝露量と，申請用法用量におけるヒト曝露量との比較

動物種		カニクイザル		カニクイザル
試験の種類		26週間投与毒性試験		ePPND 試験
投与経路，投与頻度，投与量		100 mg/kg（初回投与，静脈内），その後100 mg/kg/週（週1回，皮下投与）	160 mg/kg/2週（2週に1回，静脈内投与）	100 mg/kg（初回投与，静脈内），その後100 mg/kg/週（週1回，皮下投与）
C_{max} [a] (µg/mL)	雄平均/雌平均	5430/4960	8180/7570	-/4310
	ヒトに対するカニクイザルの曝露量比（雄平均/雌平均）[b]	17.9/16.3	27.0/24.9	-/14.2
AUC [a] (µg•d /mL)	雄平均/雌平均	36100/31600	68300/69100	-/26400
	ヒトに対するカニクイザルの曝露量比（雄平均/雌平均）[b]	18.4/16.1	17.4/17.6	-/13.4

AUC=血漿中濃度-時間曲線下面積; C_{max}=最高血漿中濃度;

[a] 26週間毒性試験については，皮下投与群の26回投与後の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}7d}$ 又は静脈内投与群の13回投与後の C_0及び $AUC_{0\text{-}14d}$ の値を用いて，ADA 陽性の個体を除いて算出した。ePPND 試験については，妊娠139日目の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}7d}$ の値を用いた。

[b] ヒトの曝露については，申請用法用量と同レジメンの国際共同第 III 相試験（BO42162試験のランダム化群）において母集団薬物動態解析により算出した定常状態時の薬物動態パラメータの中央値として，C_{max} (303 µg/mL)及び $AUC_{0\text{-}28d}$ (7830 µg•d /mL)を用いた（2.7.2.2.3.2.1，表2.7.2.2.3.2.1-1）。AUC の曝露量比は投与期間の補正を行って算出した。

2.4.5 総括及び結論

本薬はC5に高い親和性で結合する新規のヒト化抗C5モノクローナル抗体である。本薬はC5に高い親和性で結合することにより，ヒト及びカニクイザルC5がC5aとC5bに開裂する反応を阻害し，終末補体複合体C5b-9（膜侵襲複合体［MAC］）の生成を阻止すると考えられた。本薬はC5にpH依存的に結合し，FcRnとの相互作用が増強しているため，本薬による補体活性の阻害と本薬の血漿中曝露が延長する可能性が示唆された。

本薬は，ヒト及びカニクイザル血清中で抗体感作ニワトリ赤血球の溶血をそれぞれ用量依存的に，かつ同程度に阻害した。カニクイザルを用いた投与試験において，4 mg/kgから160 mg/kgの用量範囲では，補体活性の完全な阻害が全試験を通して一貫して認められ，これは本薬の$t_{1/2}$が延長したことによるものであった。本薬に予想される可逆的な薬理作用，すなわちC5開裂の可逆的阻害及びC5への非共有結合性の可逆的結合を介した補体活性の阻害が確認された。

FcγRに対する本薬の結合活性をSPR法により評価したところ，ヒト及びカニクイザルFcγRに対する本薬の親和性は，対照としたトラスツズマブ（天然のヒトIgG1 Fc領域を有する）と比べるとほとんど認められなかった。本薬の有効性をもたらす主要な機序がC5を含む免疫複合体とFcγRの結合，すなわち貪食作用による免疫複合体の消失に依存していないことを示唆すると同時に，本薬がC5と相互作用して立体障害によりC5からC5a及びC5bへの開裂を阻止することを裏付けている。

ヒトC1qに対する本薬の結合活性をELISAにより評価したところ，本薬とC1qとの結合は著しく弱く，本薬がCDCを誘導する可能性は低いと考えられた。

これらの非臨床薬理試験の結果から，本薬は，補体の活性に重要な役割を果たすC5を阻害することで，PNHに対して治療効果を発揮すると考えられた。

カニクイザルを用いた単回投与試験において，血漿中濃度推移は二相性を示し，CLは2.66～2.86 mL/day/kg，$t_{1/2}$は約12～20日であった。V_{ss}は69.5～71.8 mL/kgであり，血漿容量を上回り一部は組織に分布していることが示唆された。雄カニクイザルに本薬を4 mg/kgの用量で単回皮下投与したとき，T_{max}は1～3日で吸収は緩やかであり，Fは69.1%（4 mg/kg投与時）であった。

本薬の反復投与後のTK評価において，C_0（又はC_{max}）及びAUCは，用量の増加に概ね比例して増加した。また，本薬の血漿中濃度は反復投与後に定常状態に到達した。いずれのTKパラメータにも明らかな性差は認められなかった。ePPND試験においては，出生児の血漿中に本薬が検出されたことから，本薬の妊娠動物における胎盤移行性が確認された。

本薬のカニクイザルにおける単回及び反復投与後のPK評価は，曝露量がADAの影響を受けなかった個体の結果に基づいている。ADAは大部分の動物で認められ，薬物CLの上昇と補体活性阻害の消失を引き起こす例が認められた。

カニクイザルを用いた単回及び反復投与後のPK／PD評価を通じて，遊離型C5濃度及び補体活性阻害の程度と持続時間は投与量に依存した。本薬投与後に総C5濃度の蓄積が認められたが，低用量投与群においては休薬期間中に遊離型C5濃度の上昇に伴って総C5濃度は徐々に減少した。

本薬の*in vivo*非臨床安全性試験は，適切な動物種であるカニクイザルを用いて，臨床適用経路として計画されていた静脈内及び／又は皮下投与で実施した。最長26週間の反復投与毒性試験において，本薬投与に関連する急性毒性又は安全性薬理評価項目における毒性変化は認められなかった。薬理作用に一致した補体活性の低下及びカニクイザルへの異種蛋白投与による免疫原性に起因した変化が認められ，ヒトのリスク評価に影響する毒性学的所見は最高用量まで認められていないと判断された。本薬は雌雄の受胎能，胚・胎児発生並びに出生前及び出生後の発生に対して影響を及ぼさなかった。26週間反復投与毒性試験又はePPND試験において，ヒトのリスク評価に影響する毒性学的所見が認められなかった最高投与量における曝露量は，申請用法用量におけるヒト曝露量と比較して，それぞれ16倍及び13倍以上の安全域が確保され

ている。

その他の毒性試験として，カニクイザル及びヒト組織を用いた *in vitro* 組織交差反応性評価において，複数組織の血管壁内又は血管周囲に蛋白性物質の染色が認められ，この染色パターンは血漿中及び細胞外マトリックス中に存在する分泌型 C5蛋白への交差反応性と一致するものと考えられた。また，ヒト血液を用いた血液適合性試験において，本薬は17.2 mg/mL まで溶血作用を示さず，検討した最高濃度である172 mg/mL まで凝集作用を示さなかった。ヒト血液を用いた *in vitro* サイトカイン放出試験において，本薬のサイトカイン誘導は，低リスク対照薬として用いたセツキシマブと同程度であった。本薬の幼若毒性試験は実施していないが，補体の機能と発達に関する知見並びにこれまでに得られた非臨床試験結果及び臨床試験結果に基づき，小児特有の安全性の懸念は低いと考えられる。

以上の非臨床試験結果より，本薬は有効性及び適切な使用下での安全性を備えた PNH に対する新規治療薬となり得ると考える。

2.4.6 参考文献一覧

1） Fukuzawa T, Sampei Z, Haraya K, Ruike Y, Shida-Kawazoe M, Shimizu Y, et al. Long lasting neutralization of C5 by SKY59, a novel recycling antibody, is a potential therapy for complement-mediated diseases. Sci Rep 2017;7:1080.

2） Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm Res 1993; 10: 1093-5.

3） Dostalek M, Gardner I, Gurbaxani BM, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies. Clin Pharmacokinet 2013;52(2):83-124.