第 2 部　CTD の概要

一般名：ニルセビマブ（遺伝子組換え）

版番号：[redacted]

2.6.1　緒言
ニルセビマブ（遺伝子組換え）

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

標題ページ 1
目次 2
略語及び専門用語一覧表 3
2.6.1.1 緒言 4
2.6.1.1.1 ニルセビマブの一般情報 5
2.6.1.1.1.1 名称 5
2.6.1.1.1.2 ニルセビマブの一般特性 5
2.6.1.1.1.3 申請効能又は効果並びに用法及び用量 5
2.6.1.2 参考文献 6

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
1G7	non-YTE version of nirsevimab (MEDI8897)：ニルセビマブ（MEDI8897）の非 YTE 置換バージョン
CHD	congenital heart disease：先天性心疾患
CLD	chronic lung disease：慢性肺疾患
F	fusion：融合
Fc	fragment crystallisable：結晶性フラグメント
FcRn	neonatal Fc receptor：胎児性 Fc 受容体
HCl	hydrochloride：塩酸塩
IgG	immunoglobulin G：免疫グロブリン G
IgG1κ	immunoglobulin G1 kappa：免疫グロブリン G1κ
IM	intramuscular(ly)：筋肉内
K_D	equilibrium dissociation constant(s)：平衡解離定数
LRTI	lower respiratory tract infection：下気道感染
mAb	monoclonal antibody：モノクローナル抗体
PFS	pre-filled syringe：プレフィルドシリンジ
RSV	respiratory syncytial virus：RS ウイルス
w/v	weight/volume：重量体積比
wGA	weeks gestational age：妊娠週数
YTE	M257Y/S259T/T261E triple amino acid substitution：M257Y/S259T/T261E の 3 アミノ酸置換

2.6.1.1 緒言

ニルセビマブ（MEDI8897）は、RS ウイルス（RSV）融合（F）タンパク質の融合前の高次構造に対する遺伝子組換えヒト免疫グロブリン G1κ（IgG1κ）中和モノクローナル抗体（mAb）であり、mAb の半減期を延長させるために Fc 領域に 3 アミノ酸置換（YTE）が施されている。ニルセビマブは、融合前のタンパク質の抗原部位∅における高度に保存されたエピトープに結合し、RSV サブタイプ A 及び B 株に対する平衡解離定数（K_D）はそれぞれ 0.12 及び 1.22 nM であった。ニルセビマブは、ウイルス侵入過程に必須の膜融合段階を阻害することにより、ウイルスを中和し、細胞同士の融合を阻止する。ニルセビマブは、生後初めて RSV 流行期間を迎えるすべての乳児を対象とした、RSV による下気道疾患の予防薬として開発が進められている。

RSV 下気道感染（LRTI）の負担は 1 歳未満で大きく、RSV LRTI はこの年齢群における入院の最も一般的な理由である（Hall 2001、Hall 2012、Murray et al 2014、Rha et al 2020）。米国における 1 歳未満の乳児の RSV 感染による平均入院率は、インフルエンザウイルス感染による入院率の 16 倍であった（Zhou et al 2012）。最近の公表文献において、欧州 7 か国での小児の RSV に関連した入院に関する定期的な保健統計調査に基づくと、気道感染による年間入院率は、1 歳未満の乳児 1000 人当たり 41.3～112.0 人であり、原因病原体のコードが記載されている症例のうち 62%～87%が RSV によるものであったと報告されている（Reeves et al 2020）。英国で RSV 確定症例数が最も多かったのは 1 歳未満の乳児であり、RSV による総合的低度治療室への入院の 46%（1331/2903）及び RSV による集中治療室／健康依存性治療室への入院の 64%（96/150）を占めた（PHE 2020）。6 か月未満の乳児では、急性呼吸器病態による入院の半数超が RSV によるものと推定され、入院の 70%超が一般的な RSV 流行期間に発生している（Cromer et al 2017、Kuhdari et al 2018）。慢性肺疾患（CLD）又は先天性心疾患（CHD）を基礎疾患として有する乳児や早産で生まれた乳児では、リスクがより高くなる（Chaw et al 2020a、Chaw et al 2020b）。これらのリスク因子に関連する肺の未成熟並びに血管及び肺機能障害により、RSV LRTI の病態が悪化し、疾患重症度が増加する場合がある（Carpenter and Stenmark 2004、Ruckwardt et al 2019、Yamagishi 2020）。しかし、すべての乳児に重症 RSV LRTI のリスクがあり、RSV LRTI で入院する乳児の大半は健康な正期産児で、素因となる既知のリスク因子を有していない（Bont et al 2016、Hall 2012、Murray et al 2014、Rha et al 2020）。

重症 RSV 疾患に対する既承認の治療薬は吸入用リバビリンのみであり、欧州連合の数か国、英国及び米国で承認されている（EMA 2018、Martindale 2021、PHE 2021、Virazole 2019）。リバビリンは、RSV の複製を抑制する合成グアノシンヌクレオシドアナログであり、疾患の早期に投与を開始する必要がある。リバビリンには、長時間のエアロゾル投与が必要である、曝露される医療従事者（HCP）に有害な影響を及ぼす可能性がある及びコストが高いといった多くの制限がある。さらに重要なこととして、臨床試験のデータが限られているため、有効性が確立されておらず（Hoover et al 2018）、使用が推奨されていない。重篤な RSV 疾患の小児に対して、明らかに治療様式の改善が必要である。

すべての乳児で RSV 疾患を予防することは、公衆衛生上の重要な優先事項である（Giersing et al 2019）が、ワクチン開発に 60 年超が費やされている（Ruckwardt et al 2019）にもかかわらず、既承認のワクチンはない。現在承認されている唯一の RSV 予防薬はシナジス®（パリビズマブ；米国で 1998 年に、欧州連合で 1999 年に承認）であり、重症 RSV 疾患のリスクが最も高い乳幼児（wGA が 35 週以下の早産で生まれた乳児や、未熟児 CLD 又は血行動態に異常がある CHD を有する 2 歳未満の乳幼児等）のみを対象として承認されている（Synagis 2020、Synagis 2021）。パリビズマブは RSV の F タンパク質に対するヒト化 mAb である（Johnson et al 1997）。半減期が約 1 か月であることから、パリビズマブは RSV 流行期間を通じて毎月投与［筋肉内（IM）投与］する必要がある。流行期間中、毎月来院しなくてはならないという負担は、服薬コンプライ

アンスの障害となる場合があり、パリビズマブのベネフィットを減少させ、重篤な RSV 疾患のリスクを増加させる可能性がある（Wong et al 2018）。パリビズマブは高リスクの乳児の比較的小さな集団における使用のみを適応としているため、RSV 感染の総疾病負荷を低下させる効果は限定的である。

より広範な健康乳児集団に対する既承認の RSV 予防薬はなく、推奨される RSV 治療薬もない。したがって、大半の乳児では RSV に対する予防策がなく、新たな選択肢の必要性が示されている。

2.6.1.1.1 ニルセビマブの一般情報

2.6.1.1.1.1 名称

ニルセビマブ（BEYFORTUS®）は MEDI8897（開発コード）とも称する。BEYFORTUS®はサノフィのグループ会社の商標である。

2.6.1.1.1.2 ニルセビマブの一般特性

ニルセビマブ並びにその前駆抗体 1G7 及び D25（Kwakkenbos et al 2010）は、RSV F タンパク質の融合前の高次構造を特異的に標的とするヒト IgG1κ mAb である（McLellan et al 2013）。D25 はヒト B 細胞から直接単離されたものであり（Kwakkenbos et al 2010）、*in vitro* での RSV 中和活性を最適化することにより 1G7 が得られた。ニルセビマブは mAb の結晶性フラグメント（Fc）ドメインの重鎖 CH2 定常領域に「YTE」と称される 3 アミノ酸置換 M257Y/S259T/T261E（欧州連合の付番方式に従うと M252Y/S254T/T256E）を有している（Dall'Acqua et al 2006）。Fc 領域の YTE アミノ酸置換を除くと、ニルセビマブと 1G7 のタンパク質配列は同一である。

ニルセビマブは総質量が約 149 kDa のヒト IgG1κ mAb であり、pI は 6.4～6.7 である。インタクトタンパク質の質量及びペプチドマップの評価結果は、DNA 配列から予想された一次構造に一致していた。ニルセビマブは、主に N-結合型の二分岐複合型糖鎖を有しており、これらが各重鎖の Asn-306 に結合している。ニルセビマブの生物活性は、細胞生存アッセイにおいて RSV による細胞死に対する抑制能を指標として測定した。

ニルセビマブはチャイニーズハムスターの卵巣細胞に発現させ、3 段階のクロマトグラフィー工程、[redacted] ウイルス不活化工程及びウイルス除去ろ過工程により精製する。

市販用ニルセビマブ製剤は、無菌の溶液の製剤である。プレフィルドシリンジ（PFS）に充填して供給され、HCP により IM 投与される。PFS には 0.5 mL（50 mg）投与用と 1.0 mL（100 mg）投与用の 2 種類がある。製剤は、100 mg/mL ニルセビマブ、30 mM L-ヒスチジン／L-ヒスチジン塩酸塩、80 mM L-アルギニン塩酸塩、120 mM 精製白糖及び 0.02 w/v%ポリソルベート 80 を含有する pH 6.0 の溶液である。使用する添加剤はいずれも薬局方に準拠しており、予測される小児に対する曝露量において安全性上の問題を生じないと考えられる。

ポリソルベート 80 の濃度が 0.04 w/v%であることを除き、同様の組成のバイアル製剤を用いて毒性試験を実施した。

2.6.1.1.1.3 申請効能又は効果並びに用法及び用量

効能又は効果

下記の新生児、乳児及び幼児における RS ウイルス感染による下気道疾患の発症抑制又は予防

1. 生後初回の RS ウイルス感染流行期を迎える全ての新生児及び乳児

2. 生後 2 回目の RS ウイルス感染流行期を迎える以下の乳児及び幼児
   - 過去 6 カ月以内に慢性肺疾患の治療を受けた 24 カ月齢以下の乳児及び幼児
   - 24 カ月齢以下の血行動態に異常のある先天性心疾患の乳児及び幼児
   - 24 カ月齢以下のダウン症候群の乳児及び幼児
   - 24 カ月齢以下の免疫不全を伴う乳児及び幼児
   - 24 カ月齢以下の嚢胞性線維症の乳児及び幼児
   - 24 カ月齢以下の神経筋疾患の乳児及び幼児
   - 24 カ月齢以下の先天性気道異常を有する乳児及び幼児

用法及び用量

生後初回の RS ウイルス感染流行期を迎える新生児及び乳児には、体重 5kg 未満の場合 1 回 50mg を、体重 5kg 以上の場合 1 回 100mg を筋肉内注射する。

生後 2 回目の RS ウイルス感染流行期を迎える乳児及び幼児には、1 回 200mg を筋肉内注射する。

2.6.1.2 参考文献

Bont et al 2016

Bont L, Checchia PA, Fauroux B, Figueras-Aloy J, Manzoni P, Paes B et al. Defining the epidemiology and burden of severe respiratory syncytial virus infection among infants and children in western countries. Infectious Diseases and Therapy. 2016;5(3):271-98.

Carpenter and Stenmark 2004

Carpenter TC, Stenmark KR. Predisposition of infants with chronic lung disease to respiratory syncytial virus-induced respiratory failure: a vascular hypothesis. Pediatr Infect Dis J. 2004;23(1):S33-40.

Chaw et al 2020a

Chaw PS, Hua L, Cunningham S, Campbell H, Mikolajczyk R, Nair H. Respiratory syncytial virus-associated acute lower respiratory infections in children with bronchopulmonary dysplasia: systematic review and meta-analysis. J Infect Dis. 2020a;222(Suppl 7):S620-7.

Chaw et al 2020b

Chaw PS, Wong SWL, Cunningham S, Campbell H, Mikolajczyk R, Nair H. Acute lower respiratory infections associated with respiratory syncytial virus in children with underlying congenital heart disease: systematic review and meta-analysis. J Infect Dis. 2020b;222(Suppl 7):S613-9.

Cromer et al 2017

Cromer D, van Hoek AJ, Newall AT, Pollard AJ, Jit M. Burden of paediatric respiratory syncytial virus disease and potential effect of different immunisation strategies: a modelling and cost-effectiveness analysis for England. Lancet Public Health. 2017;2(8):e367-e74.

Dall'Acqua et al 2006

Dall'Acqua WF, Kiener PA, Wu H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn) J Biol Chem. 2006 Aug 18;281(33):23514-24.

EMA 2018

European Medicines Agency, guideline on the clinical evaluation of medicinal products indicated for the prophylaxis or treatment of respiratory syncytial virus (RSV) disease. EMP 2018:1-20 CRA.

Giersing et al 2019

Giersing BK, Karron RA, Vekemans J, Kaslow DC, Moorthy VS. Meeting report: WHO consultation on Respiratory Syncytial Virus (RSV) vaccine development, Geneva, 25-26 April 2016. Vaccine. 2019;37(50):7355-62.

Hall 2012

Hall CB. The burgeoning burden of respiratory syncytial virus among children. Infect Disord Drug Targets. 2012 Apr;12(2):92-7.

Hall 2001

Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. N Engl J Med. 2001;344(25):1917-28.

Hoover et al 2018

Hoover J, Eades S, Lam WM. Pediatric Antiviral Stewardship: Defining the Potential Role of Ribavirin in Respiratory Syncytial Virus-Associated Lower Respiratory Illness. J Pediatr Pharmacol Ther. 2018;23(5):372-8.

Johnson et al 1997

Johnson S, Oliver C, Prince GA, Hemming VG, Pfarr DS, Wang SC et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. J Infect Dis. 1997;176(5):1215-24.

Kuhdari et al 2018

Kuhdari P, Brosio F, Malaventura C, Stefanati A, Orsi A, Icardi G et al. Human respiratory syncytial virus and hospitalization in young children in Italy. Ital J Pediatr. 2018;44(1):50.

Kwakkenbos et al 2010

Kwakkenbos MJ, Diehl SA, Yasuda E, Bakker AQ, van Geelen CM, Lukens MV, et al. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. Nat Med. 2010 Jan;16(1):123-8.

Martindale 2021

Martindale: The Complete Drug Reference. Ribavirin (Varizole) preparations. [Internet]. 2021 [cited 27 August 2021]. Available from: https://about.medicinescomplete.com/publication/martindale-the-complete-drug-reference/.

McLellan et al 2013

McLellan JS, Chen M, Leung S, Graepel KW, Du X, Yang Y, et al. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. Science. 2013 May 31;340(6136):1113-7.

Murray et al 2014

Murray J, Bottle A, Sharland M, Modi N, Aylin P, Majeed A et al. Risk factors for hospital admission with RSV bronchiolitis in England: a population-based birth cohort study. PloS one. 2014;9(2):e89186.

Paramore et al 2010

Paramore LC, Mahadevia PJ, Piedra PA. Outpatient RSV lower respiratory infections among high-risk infants and other pediatric populations. Pediatr Pulmonol. 2010;45(6):578-84.

PHE 2020

PHE. Public Health England. Surveillance of influenza and other respiratory viruses in the UK. Winter 2019 to 2020. https://webarchive.nationalarchives.gov.uk/ukgwa/20220401012139mp_/https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/895233/Surveillance_Influenza_and_other_respiratory_viruses_in_the_UK_2019_to_2020_FINAL.pdf Published 2020. Accessed September 2020.

PHE 2021

PHE. Public Health England Guidance: Respiratory syncytial virus (RSV): symptoms, transmission, prevention, treatment. https://www.gov.uk/government/publications/respiratory-syncytial-virus-rsv-symptoms-transmission-prevention-treatment/respiratory-syncytial-virus-rsv-symptoms-transmission-prevention-treatment. Published 2021. Accessed 26 August 2021.

Reeves et al 2020

Reeves RM, van Wijhe M, Tong S, Lehtonen T, Stona L, Teirlinck AC et al. Respiratory syncytial virus-associated hospital admissions in children younger than 5 years in 7 european countries using routinely collected datasets. J Infect Dis. 2020;222(Suppl 7):S599-605.

Rha et al 2020

Rha B, Curns AT, Lively JY, Campbell AP, Englund JA, Boom JA et al. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among young children: 2015-2016. Pediatrics. 2020;146(1):e20193611.

Ruckwardt et al 2019

Ruckwardt TJ, Morabito KM, Graham BS. Immunological lessons from respiratory syncytial virus vaccine development. Immunity. 2019;51(3):429-42.

Synagis 2020

Synagis (palivizumab) [package insert]. Waltham, MA: Sobi Inc.; 2020.

Synagis 2021

Synagis (palivizumab) [summary of product characteristics]. Sodertalje, Sweden: AstraZeneca AB.; 2021.

Virazole 2019

Virazole (ribavirin for inhalation solution, USP) [package insert]. Bridgewater, NJ: Bausch Health US, LLC; 2019.

Wong et al 2018

Wong SK, Li A, Lanctot KL, Paes B. Adherence and outcomes: a systematic review of palivizumab utilization. Expert Rev Respir Med. 2018;12(1):27-42.

Yamagishi 2020

Yamagishi H. Respiratory syncytial virus infection in infants with heart and lung diseases. Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension. Singapore: Springer Singapore; 2020. p. 215-20.

Zhou et al 2012

Zhou H, Thompson WW, Viboud CG, Ringholz CM, Cheng PY, Steiner C, et al. Hospitalizations associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States, 1993-2008. Clin Infect Dis. 2012 May;54(10):1427-36.

第 2 部　CTD の概要

一般名：ニルセビマブ（遺伝子組換え）

版番号：[redacted]

2.6.2　薬理試験の概要文
ニルセビマブ（遺伝子組換え）

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

標題ページ 1
目次 2
略語及び専門用語一覧表 4
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.2.1 ニルセビマブの開発 7
2.6.2.2.2 作用機序 8
2.6.2.2.2.1 RSV F タンパク質の融合前の高次構造に対するニルセビマブ／1G7 の結合親和性 8
2.6.2.2.2.2 ニルセビマブはヒト気道上皮組織における RSV の侵入及び伝播を阻害する 9
2.6.2.2.2.3 RSV F タンパク質の融合前の高次構造におけるニルセビマブの結合部位の検討 10
2.6.2.2.2.4 ヒト及びカニクイザルの胎児性 Fc 受容体（FcRn）に対するニルセビマブの結合親和性 11
2.6.2.2.2.5 ヒト Fcγ受容体（FcγR）に対するニルセビマブの結合親和性 12
2.6.2.2.2.6 *In vitro* におけるニルセビマブの Fc を介したエフェクター機能の評価 13
2.6.2.2.3 抗ウイルス活性 13
2.6.2.2.3.1 *In vitro* における抗ウイルス活性 13
2.6.2.2.3.1.1 培養細胞における RSV A 及び B 実験室株に対するニルセビマブ／1G7 の中和効力 13
2.6.2.2.3.1.2 培養細胞における RSV A 及び B 臨床分離株に対するニルセビマブ／1G7 の中和活性 14
2.6.2.2.3.2 *In vivo* における抗ウイルス活性 15
2.6.2.2.3.2.1 コットンラットにおける RSV A 及び B 実験室株に対するニルセビマブ／1G7 の中和効力 15
2.6.2.2.4 抗ウイルス薬耐性 18
2.6.2.2.4.1 耐性関連変異を特定するための *in vitro* でのニルセビマブ中和エスケープ変異株の選択 18
2.6.2.2.4.2 *In vivo* でのコットンラットにおけるニルセビマブの耐性関連変異を有する RSV B9320 に対するウイルス活性 20
2.6.2.2.5 RSV 感染の抗体依存性感染増強 21
2.6.2.3 副次的薬理試験 23
2.6.2.4 安全性薬理試験 23
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 23
2.6.2.6 考察及び結論 23
2.6.2.7 参考文献 25

表目次

表 1　ニルセビマブの非臨床薬理試験の一覧 6
表 2　RSV A F タンパク質及び RSV B F タンパク質の融合前の高次構造に対する 1G7 の結合反応速度 8
表 3　ヒト及びカニクイザル FcRn に対するニルセビマブの結合親和性 12
表 4　ヒト FcγR に対するニルセビマブの結合親和性 12
表 5　ニルセビマブの機能活性の要約 13
表 6　培養細胞における RSV A 及び B 感染に対する *in vitro* 効力の値 14
表 7　コットンラットの肺における RSV A 及び B 感染に対する *in vivo* 効力の値 17
表 8　中和エスケープ変異株で特定されたニルセビマブの結合部位の置換を有する RSV A 及び B 変異株並びに F タンパク質に対するニルセビマブ／IG7 の中和作用及び結合反応速度のデータ 19
表 9　コットンラットに 1G7 及びパリビズマブを予防的に投与し、ニルセビマブの耐性関連変異 K65Q:S211N を有する rRSV B9320 を鼻腔内に接種した 4 日後の肺のウイルス量及び血清中抗体濃度 21

図目次

図 1　ヒト気道上皮組織における RSV の侵入及び伝播に対するニルセビマブ及びパリビズマブの阻害作用 9
図 2　RSV A F タンパク質及び RSV B F タンパク質におけるニルセビマブの結合部位の構造及び定義 11
図 3　RSV A 及び B 臨床分離株に対するニルセビマブ／1G7 の *in vitro* 効力値の分布 15
図 4　コットンラットに 1G7 及び 1G7-TM を予防的に投与し、RSV A2 を鼻腔内に接種した 4 日後の肺及び鼻甲介におけるウイルス量 16
図 5　感染コットンラットにおける血清中 1G7 濃度と肺の RSV A 及び B ウイルス量との相関性 17
図 6　中和エスケープ変異株で特定されたニルセビマブの耐性関連変異を有する RSV A 及び B の増殖速度 20
図 7　コットンラットにおけるウイルス接種前（Day 76）の RSV A2 中和抗体価 22
図 8　IG7 を予防的に投与したコットンラットにおける RSV A2 の鼻腔内接種 4 日後（Day 81）の肺及び鼻甲介のウイルス量 22

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
1G7	non-YTE version of nirsevimab (MEDI8897)：ニルセビマブ（MEDI8897）の非 YTE 置換バージョン
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害
ADCD	antibody-dependent complement deposition：抗体依存性補体沈着
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis：抗体依存性細胞貪食
ADE	antibody-dependent enhancement：抗体依存性増強
ADNKA	antibody-dependent NK cell activation：抗体依存性 NK 細胞活性
ADNP	antibody-dependent neutrophil phagocytosis：抗体依存性好中球貪食
EC_{90}	90% effective concentration：90%有効濃度
F	fusion：融合
Fc	fragment crystallizable：結晶性フラグメント
FcRn	neonatal Fc receptor：胎児性 Fc 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
IgG	immunoglobulin G：免疫グロブリン G
IgG1κ	immunoglobulin G1 kappa：免疫グロブリン G1κ
IM	intramuscular(ly)：筋肉内
IV	intravenous(ly)：静脈内
K_D	equilibrium dissociation constant(s) ：平衡解離定数
mAb	monoclonal antibody：モノクローナル抗体
PK	pharmacokinetic(s)：薬物動態
RSV	respiratory syncytial virus：RS ウイルス
$t_{1/2}$	terminal half-life：終末相における消失半減期
YTE	M257Y/S259T/T261E triple amino acid substitution：M257Y/S259T/T261E の 3 アミノ酸置換

2.6.2.1 まとめ

ニルセビマブ（別名 MEDI8897）は、RS ウイルス（RSV）融合（F）タンパク質の融合前の高次構造に結合する遺伝子組換えヒト免疫グロブリン G1κ（IgG1κ）モノクローナル抗体（mAb）である。ニルセビマブは、ヒト B 細胞から直接単離されたヒト mAb D25 に由来し（Kwakkenbos et al 2010）、RSV F タンパク質の融合前の高次構造に結合する（McLellan et al 2013）。*In vitro* での RSV 中和効力を指標として D25 の親和性を最適化することにより 1G7 が得られた。ニルセビマブは mAb の結晶性フラグメント（Fc）における重鎖 CH2 定常領域に「YTE」と称される（Dall'Acqua et al 2006）3 アミノ酸置換 M257Y/S259T/T261E（欧州連合の付番方式に従うと M252Y/S254T/T256E）を有している点が 1G7 と異なっている。YTE 置換は、ヒトにおける mAb の終末相における消失半減期（$t_{1/2}$）を延長させる（Griffin et al 2020、Robbie et al 2013）ために導入した。

ヒトでは $t_{1/2}$ の延長が見られるが、げっ歯類では YTE 置換によって抗体曝露量が著しく減少するため、天然のヒト Fc と比較して血清中抗体濃度が減少する（Dall'Acqua et al 2002）。ニルセビマブと 1G7 は *in vitro* での培養細胞における抗ウイルス活性が同程度であることから、GLP 非適用の非臨床薬理試験は、ニルセビマブ又はその親 mAb の 1G7 を用いて実施した。

ニルセビマブの YTE 置換により、低 pH でのヒト胎児性 Fc 受容体（FcRn）に対する親和性が増加した（K_D = 161 nM）。ニルセビマブと 1G7 は、Fc 領域における YTE 置換を除き、同じタンパク質配列を有し、マイクロ中和アッセイにおける RSV 中和効力は同程度であったことから、YTE 置換による中和効力への影響はないことが確認された。

D25 と RSV F タンパク質の共結晶構造から、D25 は RSV F タンパク質三量体の頂点に位置する抗原部位∅内の四次エピトープに結合することにより、RSV F タンパク質を融合前の高次構造に固定することが明らかになった（McLellan et al 2013）。抗体競合試験において、ニルセビマブ、1G7 及び D25 は抗原部位∅内の同じ領域に結合し、その結合部位は過去に報告された抗 RSV F mAb の結合部位とは重なっていないことが確認された。*In vitro* の結合反応速度から、1G7 は、DS-Cav1 により融合前の高次構造で安定化させた三量体型の RSV A2 及び B9320 F タンパク質に高い親和性で結合することが示された（K_D はそれぞれ 0.12 及び 1.22 nM）。最後に、三次元培養ヒト気道上皮（HAE）組織を用いた更なる試験において、ニルセビマブはウイルス侵入過程に必須の膜融合段階を抑制することにより、ウイルスを中和し、細胞同士の融合を阻害することが示された。

融合前の高次構造で安定化させた DS-Cav1 RSV F タンパク質三量体と複合体を形成させたニルセビマブ Fab の結晶構造解析から、RSV A F タンパク質及び RSV B F タンパク質においてよく保存された 25 アミノ酸残基からなる不連続な結合部位が明らかになり、これらは主に F2 サブユニットの 62～69 位及び F1 サブユニットの 196～212 位のアミノ酸残基で構成されていた。

ニルセビマブは *in vitro* で固定化ヒト FcγR（FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB 及び FcγRIII）に結合し、中和活性は親 mAb の 1G7 及び 1G7-TM（FcR 結合能及びエフェクター機能を低下させるために Fc 領域を改変したもの）と同程度であった。コットンラット RSV 感染モデルにおいて、1G7 及び 1G7-TM は肺及び鼻甲介の RSV 複製を同程度かつ用量依存的に減少させたことから、RSV 感染防御は Fc 介在性エフェクター機能ではなく中和活性によるものであることが強く示唆された。

Fc 活性はコットンラットの RSV 感染防御に必要ではないが、ニルセビマブがヒト細胞株と初代培養細胞において Fc を介した活性を誘導するかを評価するために *in vitro* 試験を実施した。ニルセビマブは融合前 F タンパク質と免疫複合体を形成してマクロファージ細胞株である THP-1 に

よる ADCP 活性を誘導し、また、融合前 F タンパク質と精製した補体成分 C3 と作用して ADCD 活性も誘導した。加えて、ニルセビマブの ADNP、ADNKA 及び ADCC 活性はパリビズマブと同等であり、ネガティブコントロール抗体よりも高値であったが、アッセイにおけるドナー間の差が大きかったことから統計学的な活性の差はなかった。

培養 HEp-2 細胞を用いた濃度反応モデルにおいて、*in vitro* での RSV に対するニルセビマブの抗ウイルス活性を測定した。RSV A2 及び B9320 実験室株に対するニルセビマブの *in vitro* での効力（IC_{50} 値、それぞれ 1.6～2.4 ng/mL 及び 1.8～2.2 ng/mL）は、1G7（それぞれ 1.7～2.2 ng/mL 及び 1.8～2.1 ng/mL）と同程度であり、RSV の予防目的で承認されている mAb のパリビズマブと比較すると、RSV A2 及び B9320 のいずれに対する中和作用も 150 倍超強力であった。2003 年から 2017 年の間に世界中で採取された RSV A（70 例）及び RSV B（49 例）臨床分離株の多様なパネルに対して、1G7 は非常に強力かつ広範な抗ウイルス活性を示し、IC_{50} 中央値はそれぞれ 3.2 ng/mL（範囲：0.48～15 ng/mL）及び 2.9 ng/mL（範囲：0.3～59.7 ng/mL）であった。

In vivo における抗ウイルス活性及び RSV 感染に対する即時防御能を、コットンラット RSV 感染モデルで 1G7 を用いて評価した。RSV A2 又は B9320 接種 1 日前に 1G7 を筋肉内（IM）投与したところ、上及び下気道におけるウイルス複製が完全に予防された。1G7 はパリビズマブと比較して、RSV A2 及び B9320 感染コットンラットの肺におけるウイルス量を 1000 分の 1 未満に減少させる効力がそれぞれ 11 及び 9 倍強かった。コットンラット RSV 感染モデルにおける RSV A2 及び B9320 に対する 1G7 の EC_{90} 値に基づき、5 か月間の RSV 流行期間を通じて防御効果が得られるニルセビマブの標的血清中濃度は 6.8 μg/mL と予測された。

In vitro で選択されたニルセビマブの中和エスケープ変異株を解析したところ、中和作用に対する感受性の低下に関与する重要な残基は RSV F タンパク質の 68、201 及び 208 位の残基であることが明らかになった。これらの F タンパク質配列変異はいずれも、結晶構造解析で決定されたニルセビマブの結合部位に位置していた。これらの残基の置換により RSV F タンパク質に対するニルセビマブの結合には影響が見られたものの、*in vitro* でのウイルス複製に対する明らかな影響は認められなかった。

最後に、RSV 感染の抗体依存性増強（ADE）の有無を、コットンラット RSV 感染モデルで 1G7 を用いて評価した。検討したいずれの用量（有効用量から RSV A2 では 0.125 mg/kg、RSV B9320 では 0.03125 mg/kg まで）においても RSV 感染の増強を示すエビデンスは認められなかった。また、1G7 を予防的に投与した動物に RSV を接種したところ機能的な免疫応答が誘導され、1G7 消失後の更なる RSV 感染に対しても防御効果が得られた。これらの試験においても RSV 感染の増強を示すエビデンスは認められなかった。

ニルセビマブ／1G7 の非臨床薬理試験の概要を表 1 に示す。

表 1　　ニルセビマブの非臨床薬理試験の一覧

Study Number	Study Type	Study Title	GLP
ID8897-0001	*In vitro*	In Vitro Antiviral Activity of MEDI8897 and its Precursor, 1G7, Against Respiratory Syncytial Virus A and B Laboratory Strains	No
ID8897-0008	*In vitro*	RSV F mAb Competition Studies	No
ID8897-0010	*In vitro*	Characterization of the MEDI8897 Binding Site: Crystallographic and Sequence Conservation Analysis	No
ID8897-0005	*In vitro*	Determination of MEDI8897 Binding Affinity for Human and Cynomolgus Monkey FcRn Receptors	No

Study Number	Study Type	Study Title	GLP
ID8897-0002	*In vitro*	In Vitro Antiviral Activity of the MEDI8897 Precursor, 1G7, Against Respiratory Syncytial Virus Clinical Isolates and Recombinant Variants	No
ID8897-0031	*In vitro* / *In vivo*	Protection From RSV Infection is Dependent on Nirsevimab (MEDI8897) Neutralization Activity Rather Than Fc-Mediated Effector Function	No
ID8897-0033	*In vitro*	In Vitro Characterization of Nirsevimab Fc-Mediated Effector Functions	No
ID8897-0003	*In vitro*	Generation and Characterization of MEDI8897 Monoclonal Antibody-Resistant Mutant Viruses	No
ID8897-0011	*In vitro*	In Vitro MEDI8897 Neutralisation Activity Against RSV Variants Containing Polymorphic Amino Acid Changes in the MEDI8897 Binding Site, Contemporary Clinical Isolates and Characterization of Recombinant RSV Variants Encoding Mutations Identified in MEDI8897 MARMs	No
ID8897-0006	*In vivo*	Antiviral Activity of the MEDI8897 Precursor, 1G7, in a Cotton Rat Model of Respiratory Syncytial Virus A Infection	No
ID8897-0007	*In vivo*	Antiviral Activity of the MEDI8897 Precursor, 1G7, in a Cotton Rat Model of Respiratory Syncytial Virus B Infection	No
ID8897-0032	*In vivo*	The Nirsevimab Precursor, 1G7, Does Not Interfere with RSV Immunogenicity in the Cotton Rat Model	No

1G7 = non-YTE version of nirsevimab; Fc = fragment crystallisable; GLP = Good Laboratory Practice; mAb = monoclonal antibody; RSV = respiratory syncytial virus; wt = wild-type

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 ニルセビマブの開発

ニルセビマブ（MEDI8897）並びにその親抗体の D25（Kwakkenbos et al 2010）及び 1G7（Zhu et al 2017）は、RSV F タンパク質の融合前の高次構造に特異的に結合するヒト IgG1κ mAb である（McLellan et al 2013）。

D25 は機能的スクリーニングによりヒトドナーのメモリーB 細胞から直接単離されたものであり（Kwakkenbos et al 2010）、相補性決定領域における 5 アミノ酸の最少突然変異により、RSV A 及び B 実験室株に対する *in vitro* での RSV 中和活性が改善するよう *in vitro* で最適化を行い、1G7 が得られた。また、ヒト T 細胞エピトープの *in silico* 予測に基づき、免疫応答を誘導する可能性があると考えられた D25 のフレームワーク領域における 4 つの非生殖細胞系列の残基は、1G7 において生殖細胞系列の塩基に戻した（Zhu et al 2017）。

最後に、1G7 の Fc における重鎖 CH2 定常領域に 3 アミノ酸置換［M257Y/S259T/T261E（YTE）、欧州連合の付番方式に従うと M252Y/S254T/T256E］を導入し、ニルセビマブ（MEDI8897）が得られた（Dall'Acqua et al 2006）。ニルセビマブでは、YTE 置換によって低 pH でのヒト FcRn に対する抗体の親和性が増加しているため、抗体のリサイクリングの促進及びヒトにおける血清中消失半減期の延長が認められる（Robbie et al 2013、Griffin et al 2017）。

ニルセビマブと 1G7 は、Fc 領域における YTE 置換を除き、同じタンパク質配列を有する。ニルセビマブと 1G7 は *in vitro* マイクロ中和アッセイにおける効力が同程度であったことから、YTE 置換による中和活性への影響はないことが確認された（2.6.2.2.3.1.1 項；試験 ID8897-

0001）。YTE 置換を施した抗体では、ヒトにおいて消失半減期の延長が見られるが、げっ歯類では YTE 置換によって抗体曝露量が著しく減少するため、天然のヒト Fc を有する抗体と比較して血清中抗体濃度が減少する（Dall'Acqua et al 2002）。したがって、げっ歯類を用いた非臨床薬理試験は、親 mAb の 1G7 を用いて実施した。

2.6.2.2.2 作用機序

2.6.2.2.2.1 RSV F タンパク質の融合前の高次構造に対するニルセビマブ／1G7 の結合親和性

成熟 RSV F タンパク質は、F1 及び F2 サブユニットがジスルフィド結合で結合したヘテロ二量体の三量体である。この高度に保存されたタンパク質は、ビリオンの表面に、融合前の高次構造で発現しており、安定な融合後の高次構造へと不可逆的に変化することにより、ウイルスと宿主細胞膜とを融合させる（Chang and Dutch 2012）。D25 と RSV F タンパク質の共結晶構造から、D25 は RSV F タンパク質三量体の頂点に位置する抗原部位∅内の四次エピトープに結合することにより、RSV F タンパク質を融合前の高次構造に固定することが明らかになった（McLellan et al 2013）。

ニルセビマブ／1G7 及び D25 が RSV F タンパク質上の同じ抗原部位に結合することを確認するため、ビオチン標識した 1G7、D25 並びに抗原部位 II、I 及び IV に結合する mAb（それぞれパリビズマブ、131-2A 及び 1331H）を用いて抗体競合試験を実施した（試験 ID8897-0008）。予想されたように、D25 は RSV 感染 2 型ヒト上皮（HEp-2）細胞の抗原部位∅に対してビオチン標識 1G7 と競合的に結合した。一方、過去に報告されている RSV F タンパク質上の抗原部位 I、II 及び IV に結合する mAb はいずれも RSV 感染 HEp-2 細胞に対するビオチン標識 1G7 の結合を阻害しなかった。

これらの結果から、ニルセビマブ／1G7 及び D25 は RSV F タンパク質上の抗原部位∅内の同じ領域に結合し、パリビズマブ、131-2A 及び 1331H が標的とする過去に報告された結合部位とは重なっていないことが確認された。

また、DS-Cav1 により融合前の高次構造で安定化させた三量体型の RSV A2 及び B9320 F タンパク質に対する 1G7 の結合反応速度を、Octet QK384 装置を用いてバイオレイヤー干渉法により測定した（2.7.2 項参照、試験 ID8897-0011；Zhu et al 2017）。全体として、1G7 は RSV A F タンパク質及び RSV B F タンパク質両方の融合前の高次構造に高い親和性で結合した（表 2）。

表 2 RSV A F タンパク質及び RSV B F タンパク質の融合前の高次構造に対する 1G7 の結合反応速度

RSV Subtype	Antigen	1G7		
		k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
RSV A2	RSV pre-F DS Cav1	3.11×10^5	3.74×10^{-5}	0.12
RSV B9320	RSV pre-F DS Cav1	4.69×10^5	5.71×10^{-4}	1.22

Binding kinetics were measured using biolayer interferometry. mAb binding affinities for the RSV prefusion A F and B F trimer proteins were determined by capturing F trimer and measuring binding of 1G7 titrated mAb
k_a = association constant; k_d = dissociation constant; K_D = steady-state dissociation constant; M = moles; s = seconds; mAb = monoclonal antibody; Pre-F = prefusion; RSV = respiratory syncytial virus
Source: Report ID8897-0011

2.6.2.2.2.2　ニルセビマブはヒト気道上皮組織における RSV の侵入及び伝播を阻害する

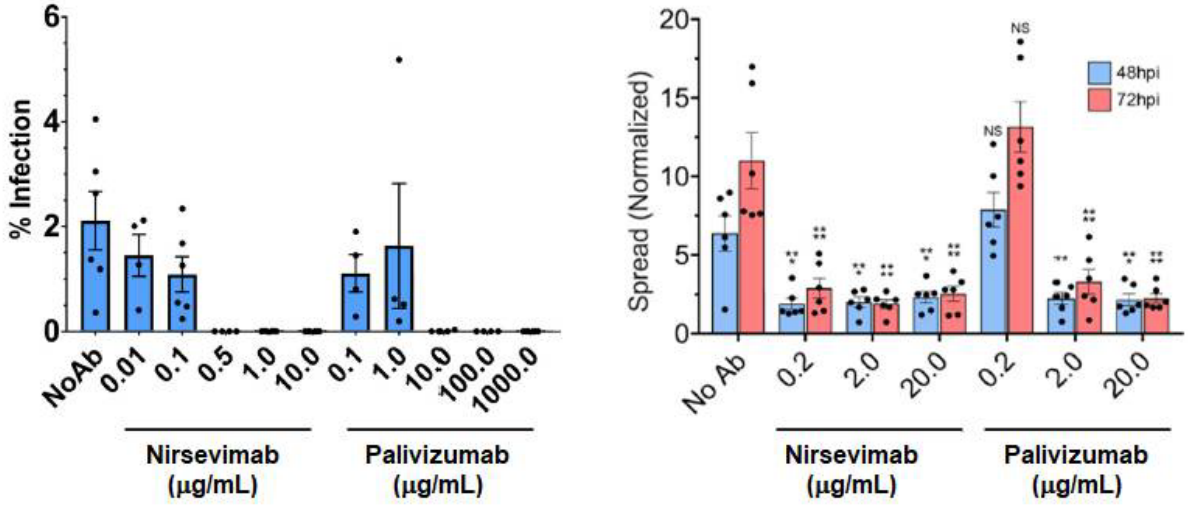
ニルセビマブが RSV F タンパク質の融合前の高次構造に結合した後、どのようにして抗ウイルス活性が発揮されるのかをさらに明らかにするため、三次元培養ヒト気道上皮（HAE）組織を用いて、遺伝子組換え緑色蛍光タンパク質（GFP）発現 RSV A2 の侵入及び伝播に対する阻害作用を評価した（Kinder et al 2020）。

最初に、マイクロ中和アッセイにおいて、HAE 組織の RSV A2-GFP に対するニルセビマブ及びパリビズマブの中和活性を比較した。RSV A2-GFP を様々な濃度のニルセビマブ及びパリビズマブとともに 1 時間プレインキュベートした後、組織の頂端面に播種し、48 時間後に蛍光顕微鏡で測定した。ニルセビマブ及びパリビズマブはそれぞれ 0.5 及び 10 µg/mL の濃度で RSV A2-GFP の侵入を完全に阻害した（図 1）。

次に、RSV A2-GFP 感染後の組織の頂端面における伝播に対するニルセビマブ及びパリビズマブの活性を検討した。HAE 組織の頂端面に RSV A2-GFP を播種し、6 時間後にニルセビマブ及びパリビズマブで処理した後、蛍光顕微鏡で 24 時間毎に感染 72 時間後まで測定した。ニルセビマブ及びパリビズマブはいずれも RSV A2-GFP 感染後 24 時間毎の伝播を用量依存的に阻害した（図 1）。

これらの結果を総合すると、ニルセビマブは HAE 組織において、ウイルス侵入過程に必須の膜融合段階を抑制することにより、ウイルスを中和し、細胞同士の融合を阻害することが示され、*in vitro* での活性はパリビズマブと比較してウイルスの侵入阻害活性は 20 倍、細胞同士の融合阻害活性は 10 倍強かった。

図 1　　ヒト気道上皮組織における RSV の侵入及び伝播に対するニルセビマブ及びパリビズマブの阻害作用



Left panel: Inhibition of viral entry. RSV A2-GFP (multiplicity of infection = 1.0) was preincubated with nirsevimab or palivizumab for 1 h prior to inoculation of HAE tissues at the apical surface, followed by fluorescence microscopy at 48 h post-infection.

Right panel: Inhibition of viral spread. HAE tissues were infected at the apical surface with RSV A2-GFP (multiplicity of infection = 0.3), treated with nirsevimab or palivizumab 6 h later, and followed by fluorescence microscopy every 24 h through 72 h post-infection. In both viral entry and spread experiments threshold analyses of inverted fluorescence microscopy images were quantified using ImageJ adaptive threshold analysis.

GFP = green fluorescent protein; HAE = human airway epithelial; hpi = hours post-infection; RSV = respiratory syncytial virus
Source: (Kinder et al 2020)

2.6.2.2.2.3 RSV F タンパク質の融合前の高次構造におけるニルセビマブの結合部位の検討

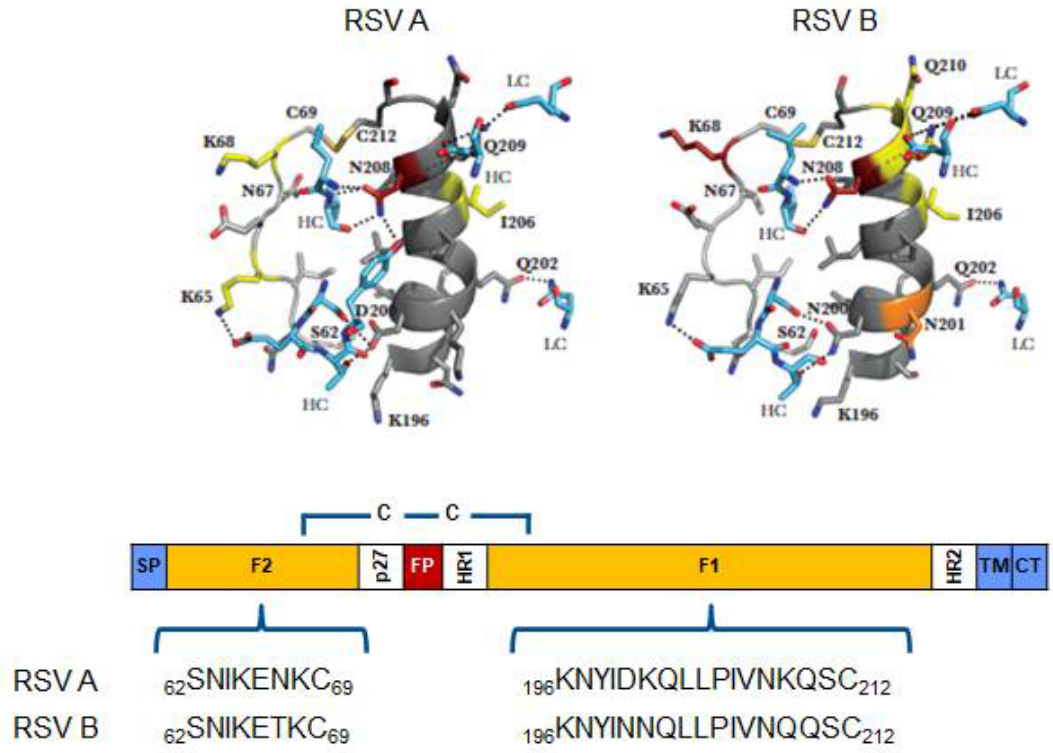
RSV F タンパク質の融合前の高次構造におけるニルセビマブの結合部位及びニルセビマブと接触する可能性のある残基を決定するため、融合前の高次構造で安定化させた A2 及び B9320 株由来 DS-Cav1 RSV F タンパク質三量体と複合体を形成させたニルセビマブ Fab の共結晶構造を解析した（試験 ID8897-0010；Zhu et al 2017）。2 種類の構造［ニルセビマブ Fab 3 分子と RSV A F タンパク質三量体との複合体（分解能：3.3 Å、PDB 5UDC）及びニルセビマブ Fab 2 分子と RSV B F タンパク質三量体との複合体（分解能：4.3 Å、PDB 5UDD）］を解析した。

これらの成熟タンパク質の細胞外ドメインにおける配列一致率は約 94%であることから予想されたように、RSV A F タンパク質の融合前の高次構造は RSV B F タンパク質と類似しており、ニルセビマブ Fab の RSV A F タンパク質に対する結合は RSV B F タンパク質に対する結合と類似していた。RSV A F タンパク質及び RSV B F タンパク質におけるニルセビマブの結合部位は、水素結合又は塩橋を介してニルセビマブの重鎖又は軽鎖と直接接触するアミノ酸残基並びに直接接触する残基に近接した（ニルセビマブ Fab フラグメントの重鎖又は軽鎖から半径 5 Å 以内）アミノ酸残基と定義した。ニルセビマブと水素結合又は塩橋を形成する側鎖を有するアミノ酸残基の位置は、65、200、202、208 及び 209 位であった（図 2）。全体として、この解析から、RSV A F タンパク質及び RSV B F タンパク質において 25 アミノ酸残基からなるニルセビマブの不連続な結合部位が明らかになり、これらは主に F2 サブユニットの 62～69 位及び F1 サブユニットの 196～212 位のアミノ酸残基で構成されていた（図 2）。

2015 年以降、ニルセビマブの結合部位（62～69 位及び 196～212 位）のアミノ酸残基は、大半（RSV A F タンパク質では 25 残基すべて、RSV B F タンパク質では 25 残基中 22 残基）が高度（>99%）に保存されている。RSV B の残り 3 残基のうち、1 残基の配列保存率は 98%超であったが、2 残基については I206M:Q209R 置換を有する変異株の出現及び流行により配列保存率が 31%超であった（2.7.2 項参照、試験 ID8897-0102）。

さらに、培養細胞で選択した中和エスケープ変異株（試験 ID8897-0003、2.6.2.2.4.1 項）及び最近（2015～2021 年）の RSV 流行株で特定された中和エスケープ変異株（試験 ID8897-0102、2.7.2 項）の遺伝子型解析を行ったところ、ニルセビマブの中和作用に対するウイルスの感受性を 5 分の 1 以下に著しく低下させる RSV A F タンパク質及び RSV B F タンパク質の重要な残基がさらに明らかになった（それぞれ K68、N208 及び S275 残基並びに K68、N201、I206 及び N208 残基）。

図 2　　RSV A F タンパク質及び RSV B F タンパク質におけるニルセビマブの結合部位の構造及び定義



Top panel: Structural mapping of nirsevimab binding site residues in contact with RSV A F (PDB 5UDC) and RSV B F (PDB 5UDD) and/or associated with key residues *in vitro* susceptibility to nirsevimab (in cell culture, red; in recent circulating strains, yellow; in both cell culture and recent circulating strains, orange. RSV F protein residues are shown in cartoon with side chain in sticks. Nirsevimab residues making polar contact to RSV F are shown in cyan sticks. Dashed lines indicate polar contacts between the heavy chain or light chain nirsevimab residues and side chains of RSV F residues. Nitrogen and oxygen atoms are colored blue and red, respectively.

Bottom panel: Major structure features of full-length RSV F protein (AA 1-574), including extracellular region of mature F (F2: AA 24-109 and F1: AA 137-524) with alignment of RSV A and B strain consensus nirsevimab binding site sequences (AA 62-69 and 196-212)

AA = amino acids; CT = carboxy terminus; FP = fusion protein; HR = heptad repeats; RSV = respiratory syncytial virus; SP = signal peptide; TM = transmembrane

Source: Adapted from (Zhu et al 2018)

2.6.2.2.2.4　ヒト及びカニクイザルの胎児性 Fc 受容体（FcRn）に対するニルセビマブの結合親和性

mAb の Fc における重鎖 CH2 定常領域に YTE 置換（M257Y/S259T/T261E）を導入すると、低 pH であるエンドソーム内での FcRn に対する抗体の親和性が増加するため、抗体のリサイクリングが促進され、カニクイザル及び健康な成人のいずれにおいても血清中消失半減期が延長する（Dall'Acqua et al 2002, Griffin et al 2017,Robbie et al 2013）。

固定化ヒト及びカニクイザル FcRn に対するニルセビマブの結合親和性を表面プラズモン共鳴法（SPR）で定量した。ニルセビマブは低 pH（pH = 6.0）においてヒト及びカニクイザル両方の FcRn に結合し、K_D 値はそれぞれ 161 及び 253 nM であった（表 3）（試験 ID8897-0005）。ヒト

及びカニクイザル FcRn に対するこれらの結合親和性の値は、Fc 領域に YTE 置換を有する他の mAb（Dall'Acqua et al 2006）と同程度であった。

表 3　　ヒト及びカニクイザル FcRn に対するニルセビマブの結合親和性

Neonatal Fc Receptor	Nirsevimab
	K_D (nM)
Human FcRn	161
Cynomolgus monkey FcRn	253

Binding affinities were measured by surface plasmon resonance with mAb immobilized and titrated binding of human and cynomolgus monkey FcRns at pH 6.0
FcRn = neonatal Fc receptor; Fc = fragment crystallizable; K_D = equilibrium dissociation constant
Source: Report ID8897-0005

2.6.2.2.2.5　ヒト Fcγ受容体（FcγR）に対するニルセビマブの結合親和性

ニルセビマブは、RSV 表面に発現している RSV F タンパク質の融合前の高次構造に結合し（2.6.2.2.2.1 項）、ウイルス侵入過程に必須の膜融合段階を抑制することにより、ウイルスを中和し、細胞同士の融合を阻害する（2.6.2.2.2.2 項）。

中和活性に加えて、抗体の Fc 領域と自然免疫細胞の FcγR との相互作用によって誘導される下流の免疫エフェクター機能も *in vivo* でウイルスの複製及び伝播を阻害することが報告されている（van Erp et al 2019）。ヒト FcγR に対する本 mAb の Fc 領域の結合親和性は、Fc 介在性の抗体のエフェクター機能反応の性質及び程度を決定づける因子の 1 つである。

ニルセビマブが FcγR に結合することを確認するため、固定化ヒト FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB 又は FcγRIII A-158V に対するニルセビマブの結合親和性を SPR で定量した（試験 ID8897-0031）。ニルセビマブは、検討したすべての FcγR に結合し、K_D 値は 8.94×10^{-9} M（FcγRI）～5.30×10^{-4} M（FcγRIIB）の範囲であった（表 4）。これらのデータから、ニルセビマブが FcγR に結合することが確認され、Fc を介してエフェクター機能を誘導する可能性が示唆された。

コットンラット RSV 感染モデルにおいて、1G7 及び 1G7-TM（FcR 結合能及びエフェクター機能を低下させるために 1G7 を改変したもの（Oganesyan et al 2008））は、肺及び鼻甲介の RSV 複製を同程度かつ用量依存的に減少させた（図 4、2.6.2.2.3.2.1 項）。ニルセビマブ、1G7 及び 1G7-TM の *in vitro* での中和活性は同程度である（表 6、2.6.2.2.3.1.1 項）ことを考慮すると、これらのデータから、RSV 感染防御は Fc を介したエフェクター機能ではなくニルセビマブの中和活性によるものであることが強く示唆された。

表 4　　ヒト FcγR に対するニルセビマブの結合親和性

Fcγ Receptor	Nirsevimab
	K_D (M)
FcγRI	8.94×10^{-9}
FcγRIIA	1.87×10^{-5}
FcγRIIB	5.30×10^{-4}
FcγRIIIA-158V (CD16)	1.67×10^{-5}

Binding affinities were measured by surface plasmon resonance with mAb immobilized and titrated binding of human FcγRns at pH 6.0.

Fc = fragment crystallizable; K_D = equilibrium dissociation constant
Source: Report ID8897-0031

2.6.2.2.2.6 *In vitro* におけるニルセビマブの Fc を介したエフェクター機能の評価

ニルセビマブと融合前 F タンパク質の免疫複合体における Fc 領域が Fc を介したエフェクター機能、すなわち抗体依存性細胞貪食（ADCP）、抗体依存性好中球貪食（ADNP）、抗体依存性補体沈着（ADCD）、抗体依存性 NK 細胞活性（ADNKA）及び抗体依存性細胞傷害（ADCC）を *in vitro* で誘導出来得るか評価した（試験 ID8897-0033）。ニルセビマブは融合前 F タンパク質と免疫複合体を形成してマクロファージ細胞株である THP-1 による ADCP 活性を誘導し、また、融合前 F タンパク質と精製した補体成分 C3 と作用して ADCD 活性も誘導した。加えて、ニルセビマブの ADNP、ADNKA 及び ADCC 活性はパリビズマブと同等であり、ネガティブコントロール抗体よりも高値であったが、アッセイにおけるドナー間の差が大きかったことから統計学的な活性の差はなかった。ニルセビマブの *in vitro* でのエフェクター機能に関する結果を表 5 に示す。

表 5　　ニルセビマブの機能活性の要約

	Nirsevimab	Palivizumab	R347
ADCP	++	++	-
ADNP	+	+	-
ADCD	++	++	-
ADNKA	+	+	-
ADCC	+	+	-

ADCC = antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCD = antibody-dependent complement deposition; ADCP = antibody-dependent cellular phagocytosis; ADNKA = antibody-dependent NK cell activation; ADNP = antibody-dependent neutrophil phagocytosis
- = no activity observed; + = activity observed with level trending over negative control without reaching statistical significance; ++ = activity observed with level significantly above negative control.
Source: Report ID8897-0033

2.6.2.2.3 抗ウイルス活性

2.6.2.2.3.1 *In vitro* における抗ウイルス活性

2.6.2.2.3.1.1 培養細胞における RSV A 及び B 実験室株に対するニルセビマブ／1G7 の中和効力

ニルセビマブ／1G7 では、D25 並びに対照 mAb のパリビズマブ及び motavizumab と比較して、中和活性が改善していることが、HEp-2 細胞を用いたマイクロ中和アッセイで確認された（試験 ID8897-0001）。実験室株 RSV A2 及び B9320 に対する 1G7 の IC_{50} 値はそれぞれ 1.7～2.2 及び 1.8～2.1 ng/mL であった（表 6）。一方、D25 の IC_{50} 値は、RSV A2 に対して 10.8 ng/mL、RSV B9320 に対して 7.1 ng/mL であり、motavizumab 及びパリビズマブの IC_{50} 値は、RSV A2 に対してそれぞれ 45.4 及び 200.9～416.8 ng/mL、RSV B9320 に対して 39.2 及び 155.9～309.3 ng/mL であった（Zhu et al 2017）。

これらの結果から、*in vitro* での RSV A 及び B 実験室株に対する 1G7 の作用は D25 よりも約 4 倍強力であり、motavizumab 及びパリビズマブよりもそれぞれ 20 及び 150 倍強力であることが示

された。1G7 と D25 の間の RSV 中和活性の差は、小さかったものの、複数の実験で一貫して認められ、統計学的に有意であった（P<0.0001）（Zhu et al 2017）。

さらに、RSV A2 及び B9320 実験室株に対する 1G7（ニルセビマブの非 YTE 置換バージョンの親抗体）、1G7-TM（FcR 結合能及びエフェクター機能を低下させるために 1G7 を改変したもの）及びニルセビマブの抗ウイルス活性をマイクロ中和アッセイで比較した（試験 ID8897-0001、ID8897-0003、ID8897-0031 及び ID8897-0011）。予想されたように、RSV A2 及び B9320 に対するニルセビマブの IC_{50} 値（それぞれ 1.6～2.4 及び 1.8～2.2 ng/mL）は、1G7 の IC_{50} 値（それぞれ 1.7～2.2 及び 1.8～2.1 ng/mL）と同程度であった。1G7-TM も RSV A2 に対してニルセビマブ及び 1G7 と同程度の IC_{50} 値（2.0 ng/mL）を示した（表 6）。

これらの結果から、1G7 及び 1G7-TM と比較して、ニルセビマブの YTE 置換による中和活性への影響はないことが確認された。

表 6　　培養細胞における RSV A 及び B 感染に対する *in vitro* 効力の値

	IC_{50} (ng/mL) [a]	
Monoclonal Antibody	RSV A2	RSV B9320
Palivizumab	200.9 – 416.8	155.9 – 309.3
Motavizumab	45.4	39.2
D25	10.8	7.1
1G7	1.7 – 2.2	1.6 – 2.1
1G7-TM	2.0	ND
Nirsevimab	1.6 – 2.2	1.8 – 2.4

[a] Range of half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) of mAb required for a 50% reduction in infection as reported in different studies using the same research-based RSV neutralisation susceptibility assay (AstraZeneca, Gaithersburg, MD, USA)

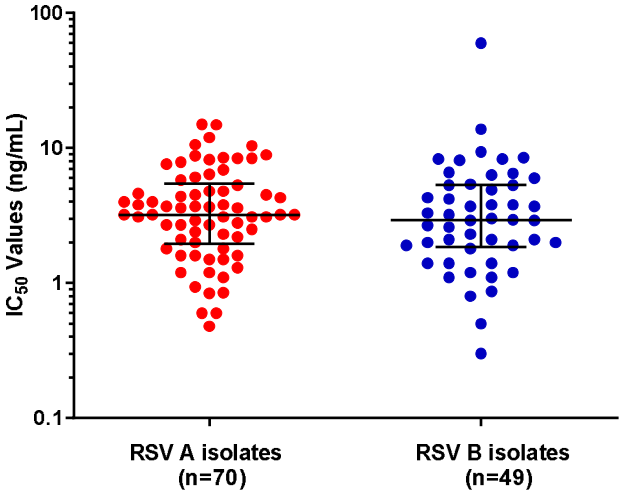
1G7 = parental non-YTE version of nirsevimab; 1G7-TM = 1G7 with modifications to reduce FcR binding and effector function; D25 = non-optimized version of nirsevimab/1G7; IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration; ND = not determined; RSV = respiratory syncytial virus; YTE = triple amino acid substitution, M257Y/S259T/T261E

Source: Adapted from Report ID8897-0001, ID8897-0003, ID8897-0011, ID8897-0031, (Zhu et al 2017), and (Zhu et al 2018)

2.6.2.2.3.1.2　培養細胞における RSV A 及び B 臨床分離株に対するニルセビマブ／1G7 の中和活性

2003 年から 2017 年の間に米国、オーストラリア、オランダ、イタリア、中国及びイスラエルの被験者から採取され、流行株で最も一般的な RSV F タンパク質配列多型をコードしている RSV A（70 例）及び RSV B（49 例）臨床分離株のパネルを用いた HEp-2 細胞の一連の *in vitro* マイクロ中和アッセイにおいて、ニルセビマブ／1G7 の抗ウイルス活性をさらに評価した（試験 ID8897-0002 及び D8897-0011、2.7.2 項 試験 ID8897O-1516、ID8897O-1617 及び MDMN-20140127 を参照、Zhu et al 2018）。1G7 は検討したすべてのウイルスを中和し、RSV A 及び B 分離株に対する EC_{50} 中央値は 3.2 ng/mL（範囲：0.48～15 ng/mL）及び 2.9 ng/mL（範囲：0.3～59.7 ng/mL）であった（図 3）。これらの試験を総合すると、ニルセビマブ／1G7 は RSV A 及び B 臨床分離株の多様なパネルに対して非常に強力かつ広範な抗ウイルス活性を示すことが示された。

図 3　　RSV A 及び B 臨床分離株に対するニルセビマブ／1G7 の *in vitro* 効力値の分布



Viral replication was monitored by measuring the expression of RSV F protein in infected HEp-2 cells using an ELISA research-based RSV neutralisation susceptibility assay (AstraZeneca, Gaithersburg, MD, USA). 1G7 half maximal inhibition (IC_{50}) values were calculated against a panel of 70 RSV A and 49 RSV B clinical isolates collected between 2003 and 2017. The IC_{50} value of each individual isolate is plotted as a function of its subtype. Medians and the interquartile range are indicated for each data set.

1G7 = parental non-YTE version of nirsevimab; IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration; RSV = respiratory syncytial virus; YTE = triple amino acid substitution, M257Y/S259T/T261E

Source: Adapted from Report ID8897-0002, ID8897-0011, ID8897O-1516, ID8897O-1617, MDMN-20140127, (Zhu et al 2018)

2.6.2.2.3.2　*In vivo* における抗ウイルス活性

2.6.2.2.3.2.1　コットンラットにおける RSV A 及び B 実験室株に対するニルセビマブ／1G7 の中和効力

コットンラット RSV 感染モデルは、中和抗体の予防的投与後の抗ウイルス活性を評価する目的で広く使用されており、その結果がパリビズマブの臨床試験における予防的投与量の予測に用いられた（Johnson et al 1997、Johnson et al 1999）。

In vitro でニルセビマブ／1G7 により示された RSV に対する効力が、*in vivo* での抗ウイルス活性の増加に反映されるか否かを検討するため、コットンラットに 1G7 又はパリビズマブを IM 投与し、1 日後に RSV A2 又は B9320 を接種した。すなわち、用量 0.125～6 mg/kg の 1G7 を IM 投与し、1 日後に RSV A2 を鼻腔内に接種した（試験 ID8897-0006、ID8897-0031 及び ID8897-0032、Zhu et al 2017）。別の実験では、用量 0.03125～1.5 mg/kg の 1G7 を IM 投与し、1 日後に RSV B9320 を鼻腔内に接種した（試験 ID8897-0007、Zhu et al 2017）。比較のため、並行する実験で用量 0.25～8 mg/kg のパリビズマブを評価した。接種の 4 日後に肺及び鼻を採取し、プラークアッセイで RSV 量を測定した。

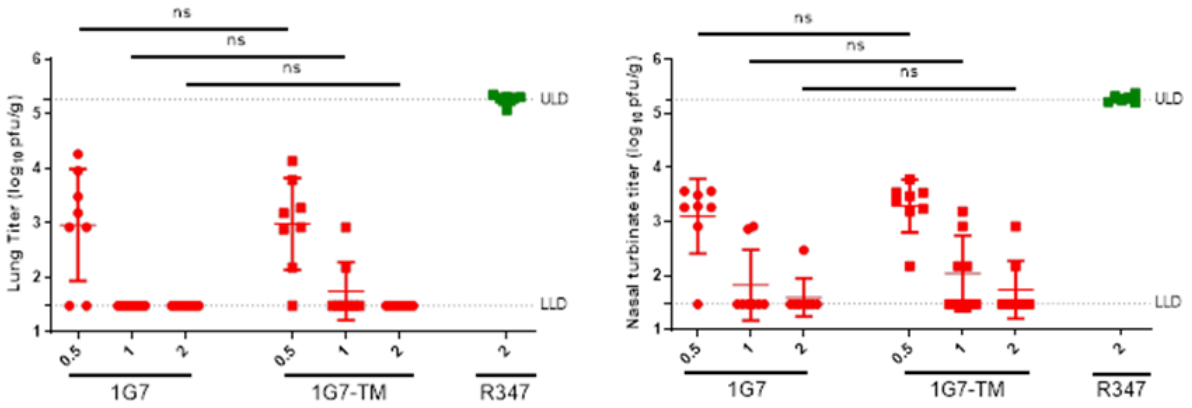
RSV A2 又は B9320 を感染させたコットンラットの肺での RSV 複製の予防において、1G7 及びパリビズマブはいずれも用量依存的な抗ウイルス活性を示したが、1G7 の方がウイルス複製阻害作用が有意（P<0.001）に強かった（Zhu et al 2017）。また、1G7 は感染コットンラットの鼻及び鼻甲介におけるウイルス量に対して強い減少作用を示したが、パリビズマブは高用量でも上気道

におけるウイルス複製阻害作用を示さなかった（試験 ID8897-0031 及び ID8897-0032、Zhu et al 2017）。

RSV 感染防御に Fc を介したエフェクター機能が必要か否かを検討するため、コットンラット RSV 感染モデルにおいて、1G7 及び 1G7-TM（FcR 結合能及びエフェクター機能を低下させるために 1G7 を改変したもの）の RSV 感染防御効果を評価した（試験 ID8897-0031）。1G7 又は 1G7-TM を 2 mg/kg の用量で予防的に投与したとき、RSV A2 感染 4 日後の肺及び鼻甲介における平均ウイルス量は、対照 mAb の R347 投与時と比較して対数値で 3.5 分の 1 未満に減少した。さらに、投与した各用量で 1G7 と 1G7-TM とを比較したとき、肺及び鼻甲介のウイルス量に有意差は認められなかった（図 4）。

非臨床コットンラットの有効性データを総合すると、曝露の 1 日前にニルセビマブ／1G7 を投与すると、RSV 複製に対して速やかかつ完全な防御効果が得られることが示され、この防御効果は Fc を介したエフェクター機能ではなく中和活性によるものであることが強く示唆された。

図 4　　コットンラットに 1G7 及び 1G7-TM を予防的に投与し、RSV A2 を鼻腔内に接種した 4 日後の肺及び鼻甲介におけるウイルス量



Viral titers in lung homogenates (left) and nasal turbinates (right) of cotton rats prophylaxed with IG7, IG7-TM, or R347 negative control mAb were determined by plaque assay at 4 days post-intranasal challenge with RSV A2. Values are the mean and SD of 6-8 animals per group. The horizontal dashed lines represent the upper and lower limits of detection. Significance determined by one-way ANOVA.

1G7 = parental non-YTE version of nirsevimab; 1G7-TM = 1G7 with modifications to reduce FcR binding and effector function; ns = non-significant; LLD = lower limit of detection, 30 pfu/g; ns = not significant; pfu/g = RSV plaque forming unit per gram of tissue; R347 = negative control mAb, an HIV gp120 specific IgG used as a control; ULD = upper limit of detection

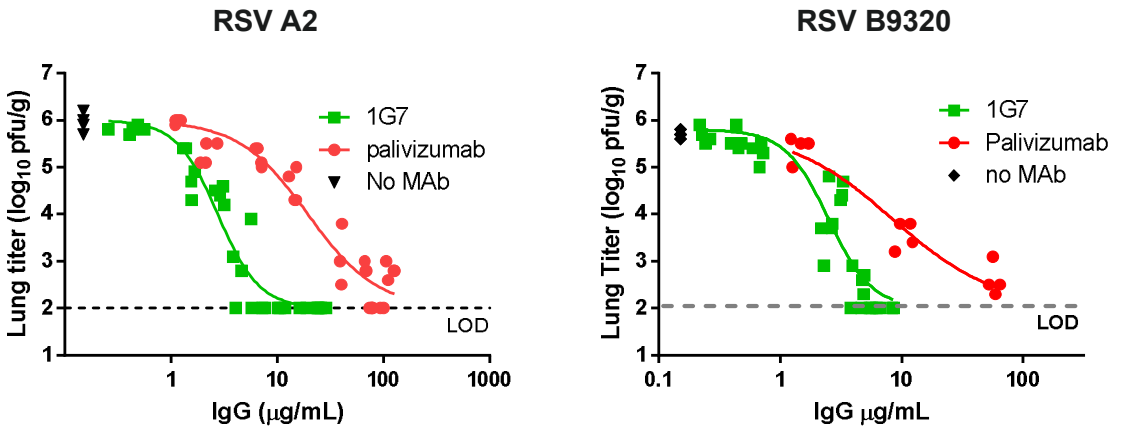
Source: Report ID8897-0031

RSV 複製に対するニルセビマブ／1G7 の防御効果が臨床で有用であるか否かをさらに検討するため、1G7 及びパリビズマブについて、感染コットンラットの肺における RSV 量を、対照と比べて平均で 100 分の 1 及び 1000 分の 1 未満に減少させる血清中濃度（それぞれ EC_{50} 及び EC_{90}）を算出した（試験 ID8897-0006 及び ID8897-0007；Zhu et al 2017；図 5 及び表 7）。RSV A2 及び B9320 に対する 1G7 の平均 EC_{90} 値はそれぞれ 6.8 及び 5.6～5.8 µg/mL であり、パリビズマブのそれぞれの EC_{90} 値（76.4 及び 51.1～51.4 µg/mL）と比較して著しく低かった。これらの結果から、1G7 とパリビズマブとを同程度の血清中濃度で比較すると、1G7 は、RSV A 及び RSV B 感染

コットンラットの肺におけるウイルス量を 1000 分の 1 未満に減少させる効力がパリビズマブよりもそれぞれ約 11 及び 9 倍強いことが示された。

RSV 流行期間中に乳幼児への月 1 回投与を必要とするパリビズマブの薬物動態を考慮し、より強力で消失半減期の長いニルセビマブが、1 回の IM 投与で 5 か月間の RSV 流行期間を通じて乳児の RSV 疾患を予防するか否かをモデルで評価した（Zhu et al 2017）。コットンラット RSV 感染モデルにおける RSV A2 及び B9320 に対する 1G7 の EC_{90} 値に基づき、5 か月間の RSV 流行期間を通じて防御効果が得られるニルセビマブの標的血清中濃度は 6.8 μg/mL と予測された。

図 5　　感染コットンラットにおける血清中 1G7 濃度と肺の RSV A 及び B ウイルス量との相関性



Viral titers from the lungs of infected cotton rats were determined 4 days after infection using a plaque assay and are represented as log pfu per gram of lung tissue. Serum concentrations of each mAb were determined 4 days after dosing. The dashed line represents the limit of detection for the viral titer quantification.

Data points represent measurements from individual animals. The EC_{50} and EC_{90} values were calculated using a nonlinear regression analysis.

1G7 = non-YTE version of nirsevimab; EC_{50} = effective concentration 50%; EC_{90} = effective concentration 90%; IgG = immunoglobulin G; LOD = limit of detection; MAb = monoclonal antibody; pfu = plaque-forming units; RSV = respiratory syncytial virus; YTE = triple amino acid substitution, M257Y/S259T/T261E

Source: Report ID8897-0006 and ID8897-0007

表 7　　コットンラットの肺における RSV A 及び B 感染に対する *in vivo* 効力の値

	EC_{50} (μg/mL)		EC_{90} (μg/mL)	
Monoclonal Antibody	RSV A2	RSV B9320	RSV A2	RSV B9320
1G7	2.9	1.8	6.8	5.6 – 5.8
Palivizumab	18.7	6.9	76.4	51.1 – 51.4

1G7 = non-YTE version of nirsevimab; EC_{50} = effective concentration 50%; EC_{90} = effective concentration 90%; RSV = respiratory syncytial virus; YTE = triple amino acid substitution, M257Y/S259T/T261E

Source: Report ID8897-0006, ID8897-0007, and (Zhu et al 2017).

2.6.2.2.4　抗ウイルス薬耐性

2.6.2.2.4.1　耐性関連変異を特定するための *in vitro* でのニルセビマブ中和エスケープ変異株の選択

ニルセビマブの中和作用からウイルスを回避させる可能性のあるアミノ酸変異を特定するため、*in vitro* での耐性株選択試験を実施した。培養細胞において RSV A2 及び B9320 株をニルセビマブ存在下で 3 回継代し、エスケープ変異株を選択した（試験 ID8897-0003）。これらの RSV 変異株の F タンパク質の配列を解析したところ、RSV A 分離株の 6 株すべてにおいて、N67I 細胞培養適応変異を含む 1 種類の独特な配列変異（N67I:N208Y）が、RSV B 分離株 9 株で 4 種類の独特な配列変異（N208D、N208S、K68N:N201S 及び K68N:N208S）が認められた。RSV A2 及び B9320 の親株と比較して、クローン精製されたすべての RSV 変異株でニルセビマブの中和作用に対する感受性が著しく低下していたが、パリビズマブの中和作用に対する感受性は保持されていた。予想されたように、これらの中和エスケープ変異株で特定されたアミノ酸置換はいずれも、過去に構造決定により定義されたニルセビマブの結合部位（62～69 位及び 196～212 位のアミノ酸残基）内に位置していた（図 2、2.6.2.2.2.3 項）。

中和エスケープ変異株の表現型に対する各アミノ酸置換の寄与を遺伝子組換え RSV（rRSV）マイクロ中和アッセイで評価した（試験 ID8897-0011）。N208D 又は N208S を有する rRSV B9320 及び N67I:N208Y を有する rRSV A2 は、ニルセビマブの中和作用に対する感受性が著しく低下していたが（それぞれ 90,000 分の 1 未満、24,619 分の 1 及び 102.5 分の 1）、個々の置換である N67I 又は N208Y を有する rRSV A2 はニルセビマブに対する感受性を保持していた（表 8）。F タンパク質に認められた配列変異 K68N:N201S 又は K68N:N208S を有する rRSV B9320 もニルセビマブの中和作用に対する感受性が著しく低下しており（それぞれ 13,439 分の 1 及び 90,000 分の 1 未満）、それらの個々の置換 K68N、N201S 又は N208S を有する rRSV B9320 も同様に感受性が低下していた（それぞれ 3.8 分の 1、64.5 分の 1 及び 24,618 分の 1）。

次に、監視試験で特定された個々の K68N 及び N201S 置換を、バリデートされた rRSV マイクロ中和感受性アッセイで評価したところ、ニルセビマブの中和作用に対する感受性が著しく低下していることが明らかになった（それぞれ 29.9 分の 1 及び 126.7 分の 1）（試験 ID8897-0102、2.7.2 項）。この同じ試験において、1956 年以降に採取された RSV 分離株にニルセビマブの耐性関連変異（RSV A：N67I:N208Y、RSV B：N208S、N208D、K68N:N208S 及び K68N:N201S）は認められなかったが、個々の K68N 及び N201S 置換は、2015 年以降に採取された RSV 分離株でまれに検出された（<0.05%）。

抗 RSV 抗体耐性の機序を検討するため、耐性関連変異を有する固定化 rRSV A2 又は B9320 DS-Cav1 F タンパク質の融合前の立体構造に対する 1G7 の結合反応速度をさらに測定した（試験 ID8897-0011）。測定結果から、抗体結合とウイルスの中和との関連性が示され、ウイルス耐性の主な機序が、アミノ酸変異の獲得により、抗体結合が妨げられるか弱められ、ニルセビマブの中和作用からのウイルスの回避がもたらされるためであることが示唆された（表 8）。

最後に、ニルセビマブの中和作用に対するエスケープ変異株では増殖性が変化しているか否かを検討するため、ニルセビマブの耐性関連変異を有する rRSV の増殖速度を RSV A2 及び B9320 の親株と比較した（Zhu et al 2018）。図 6 に示すように、N67I:N208Y を有する rRSV A2 では、親株の RSV MI-A2 N67I と比較して、培養細胞における増殖速度の増加は認められず、N208S、N208D、K68N:N201S 又は K68N:N208S を有する rRSV B でも親株の RSV B9320 と比較して増殖速度の増加は認められなかった。

これらの結果を総合すると、ニルセビマブの中和作用からの回避の機序及び耐性関連変異のモニタリングの複雑性に関する知見が得られた。

表 8　中和エスケープ変異株で特定されたニルセビマブの結合部位の置換を有する RSV A 及び B 変異株並びに F タンパク質に対するニルセビマブ／IG7 の中和作用及び結合反応速度のデータ

RSV Subtype	Region in F Subunit	Amino Acid Changes(s) [a]	IC_{50} (ng/mL)	Fold Reduction in IC_{50} [b]	K_D (nM)	Fold Reduction in K_D [c]
			Nirsevimab	Nirsevimab	IG7	IG7
RSV A	–	None	1.7	1.0	0.12	1.0
	F2 and F1	N67I:N208Y	174.3	102.5	6.67	55.6
	F2	N67I	2.6	1.5	0.098	0.8
	F1	N208Y	1.8	1.1	0.552	4.6
RSV B	–	None	2.2	1.0	1.22	1.0
	F1	N208D	>200,000	>90000	<LOD	NA
	F1	N208S	54,161	24619	<LOD	NA
	F2 and F1	K68N:N201S	29,565	13439	<LOD	NA
	F2	K68N	8.3	3.8	14.4	11.8
	F1	N201S	142	64.5	35.4	29.0
	F2 and F1	K68N:N208S	>200,000	>90000	<LOD	NA

[a] Recombinant RSV variants containing amino acid substitution(s) engineered into A2 and B9320 full-length antigenomic cDNA and DS Cav1 pre-F protein constructs. Amino acid changes identified in the nirsevimab (AA 62–69 and AA 196–212) were engineered and tested in their observed context with and without other binding site substitutions (left justified). Individual amino acid substitutions, not observed on their own without other binding site substitutions, were additionally tested (right justified)

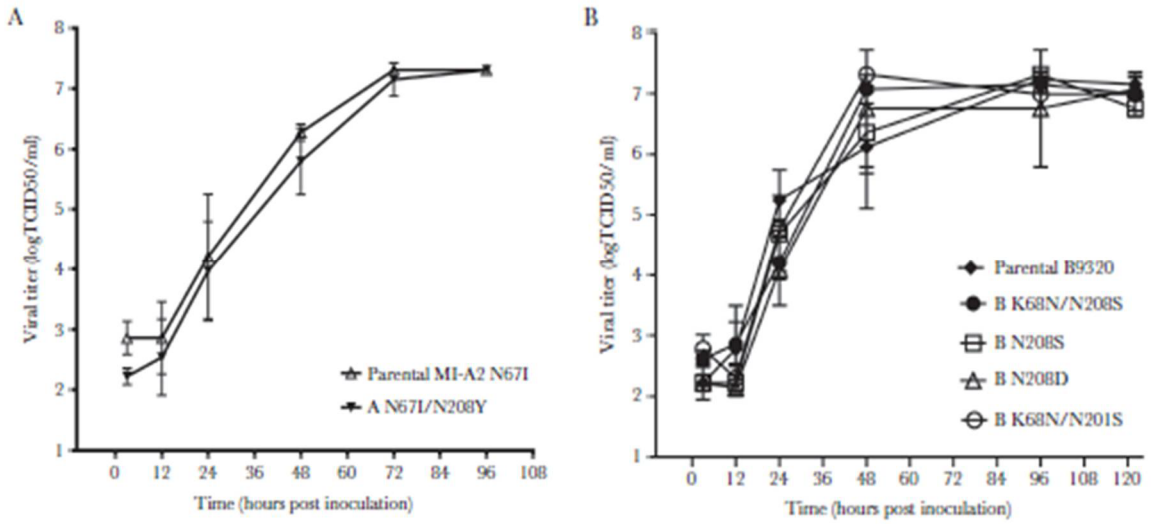
[b] Fold change in half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of mAb required for a 50% reduction in infection compared to reference strain tested in two independent experiments using a research-grade neutralisation susceptibility assay (AstraZeneca, Gaithersburg, MD, USA).

[c] Fold change in steady-state dissociation constant (K_D). Binding kinetics were measured using biolayer interferometry. IG7 binding affinities for the RSV prefusion A F and B F trimer proteins were determined by capturing F trimer and measuring binding of 1G7 titrated mAb

F2 = subunit, extracellular region, AA 24-109; F1 = subunit, extracellular region, AA 137-524, IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; K_D = steady-state dissociation constant; LOD = limit of detection; NA = not applicable; RSV = respiratory syncytial virus

Source: Adapted from Report ID8897-0011

図 6　　中和エスケープ変異株で特定されたニルセビマブの耐性関連変異を有する RSV A 及び B の増殖速度



HEp-2 cells were inoculated at a multiplicity of infection of 0.01 pfu/cell for RSV A and 0.1 pfu/cell for RSV B strains. Cell culture supernatant was sampled daily for 5 days and titered in the presence of virus on HEp-2 cells using a $TCID_{50}$ assay. Growth capacity is represented as a log value of $TCID_{50}$ units per milliliter on the y-axis
Pfu = plaque-forming units; RSV = respiratory syncytial virus; $TCID_{50}$ = 50% tissue culture infectious dose
Source: Adapted from (Zhu et al 2018)

2.6.2.2.4.2　*In vivo* でのコットンラットにおけるニルセビマブの耐性関連変異を有する RSV B9320 に対するウイルス活性

In vitro での RSV 中和作用に対する感受性のデータが臨床効果にどの程度関連するかについては不明である。しかし、*in vitro* においてニルセビマブ／1G7 で認められた RSV 耐性関連変異に対する効力の減少が *in vivo* での抗ウイルス活性の減少に反映されるか否かを評価するため、コットンラットに 1G7 又はパリビズマブを IM 投与し、1 日後に、ニルセビマブ結合部位に K65Q:S211N を有する rRSV B9320 を接種した。K65Q:S211N は、1956 年から 2014 年の間に採取された RSV B 分離株の 0.7%で最初に特定された変異であり、K65Q:S211N を有する rRSV ではニルセビマブの中和作用に対する *in vitro* での感受性が低下していた（35.7 分の 1）（試験 ID8897-0013、2.7.2 項）。用量 0.3～6 mg/kg の 1G7 を IM 投与し、1 日後に K65Q:S211N を有する rRSV B9320 を鼻腔内に接種した。接種の 4 日後に肺を採取し、RSV 量をプラークアッセイで測定した。K65Q:S211N を有する rRSV B9320 を感染させたコットンラットの肺での RSV 複製の予防において、1G7 及びパリビズマブはいずれも用量依存的な抗ウイルス活性を示したが、1G7 のウイルス複製阻害効力（24.65 µg/mL）は、変異を有さない RSV B9320 に対する阻害効力（5.6 µg/mL）よりも約 4.4 分の 1 に低下していた（表 9；Zhu et al 2017）。

全体として、*in vitro* において耐性関連変異を有する RSV に対する効力が減少すると *in vivo* での効果が減少すると予想されるが、その減少の程度は様々であると考えられた。ニルセビマブの *in vitro* 効力が著しく減少した RSV 中和エスケープ変異株に対する予防的投与での防御期間及び薬力学的作用は、現時点では不明である。

表 9 コットンラットに 1G7 及びパリビズマブを予防的に投与し、ニルセビマブの耐性関連変異 K65Q:S211N を有する rRSV B9320 を鼻腔内に接種した 4 日後の肺のウイルス量及び血清中抗体濃度

Anti-RSV F mAb	Viral Lung Reduction Relative to Isotype Control (log_{10})				Antibody Serum Concentrations (μg/mL)			
	6 mg/kg	3 mg/kg	1 mg/kg	0.3 mg/kg	6 mg/kg	3 mg/kg	1 mg/kg	0.3 mg/kg
IG7	> 3.00	> 3.00	2.30	1.90	70.96	24.65	6.73	1.95
Palivizumab	> 3.00	1.93	1.58	0.50	52.36	14.80	5.28	1.56

Viral titers from the lungs of infected cotton rats were determined 4 days after infection using a plaque assay and are represented as log pfu per gram of lung tissue. Serum concentrations of each mAb were determined 4 days after dosing. Data points represent mean measurements from 4 animals per group. IG7 at a dose of 3 mg/kg with a mean serum concentration of approximately 25 μg/mL at the time of infection was associated with a 3-log_{10} reduction in lung viral load or effective concentration yielding a 90% protection (EC_{90})
1G7 = non-YTE version of nirsevimab; mAb = monoclonal antibody; pfu = plaque-forming units; RSV = respiratory syncytial virus
Source: Adapted from (Zhu et al 2017)

2.6.2.2.5 RSV 感染の抗体依存性感染増強

単球細胞株、末梢血単核細胞、胎児及び成人の NK 細胞並びに初代培養マウス及びコットンラット免疫細胞において、*in vitro* で mAb 及び RSV 免疫血清による RSV 感染の ADE が認められている。しかし、*in vitro* での RSV 感染の ADE と乳児の疾患重症度との間に相関は認められていない。種々のウイルス感染後の ADE 疾患の発症機序についてはほとんど解明されていないが、免疫複合体が FcγR 発現免疫細胞に結合することにより、免疫応答が変化し、炎症が促進される可能性がある。すなわち、低濃度の防御抗体の存在下で感染すると、ウイルスの複製が起き、かつ Fc 介在性免疫応答が誘導され得ることにより、抗体非存在下での感染と比較して防御効果が見られる場合もあれば、より重度の疾患が引き起こされる場合もある（van Erp et al 2019）。

ニルセビマブが RSV 感染の ADE を誘導するか否かを、コットンラット RSV 感染モデルで 1G7（ニルセビマブの非 YTE 置換バージョン）を用いて検討した（2.6.2.2.3.2.1 項）。体重に基づく用量の 1G7 を IM 投与し、1 日後に RSV A2（試験 ID8897-0006）又は RSV B9320（試験 ID8897-0007）を鼻腔内に接種した。4 日後に、対照と比較した感染コットンラットの肺中ウイルス量の減少作用における EC_{50} 及び EC_{90} に対応する 1G7 の血清中濃度を求めた。検討したいずれの用量（有効用量から RSV A2 では 0.125 mg/kg、RSV B9320 では 0.03125 mg/kg まで）においても RSV 感染の増強を示すエビデンスは認められなかった（図 5）。

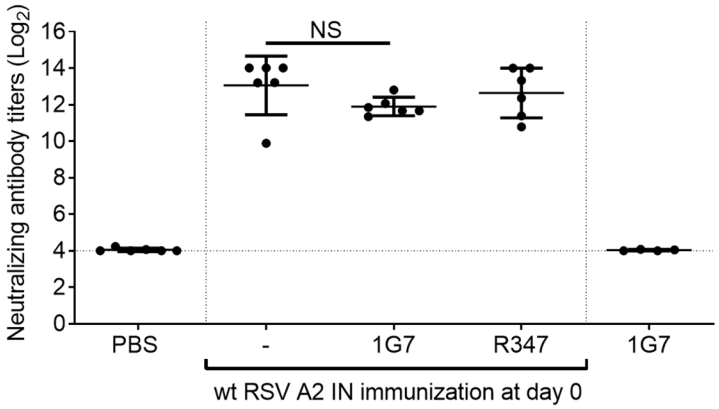
コットンラットを用いた別の試験において、血清中 1G7 が完全に消失した後の Day 77 に RSV A2 を再接種し、抗 RSV 免疫記憶の発現及びその後の免疫応答に対する 1G7 の作用を検討した（試験 ID8897-0032）。Day 81 に動物を屠殺し、肺及び鼻甲介のホモジネートにおけるウイルス量を測定した。1G7、mock 又は R347（対照として使用した HIV gp120 特異的 IgG）のいずれを投与したときも、最初のウイルス接種で誘導された免疫記憶及び抗 RSV 中和抗体価（図 7）により、すべての動物で肺及び鼻甲介の検出可能な RSV 複製が完全に防御された（図 8）。

以上をまとめると、ニルセビマブ／1G7 の予防的投与は、抗 RSV 免疫記憶の発現及びニルセビマブ／1G7 が消失した後の RSV 感染に対する防御的免疫応答を低下させないことが示された。したがって、これらのデータから、ニルセビマブ／1G7 は上及び下気道の RSV 複製を検出

下限未満に抑制する用量においても殺菌免疫を誘導せず、その結果として、RSV 抗原が免疫系で検出されることが示された。加えて、有効用量以下において感染時の ADE は見られなかった。

これらの結果から、ニルセビマブは、自然免疫細胞の FcγR に対する Fc 介在性結合によって誘導される ADE のリスクは最小限であることが裏付けられた。

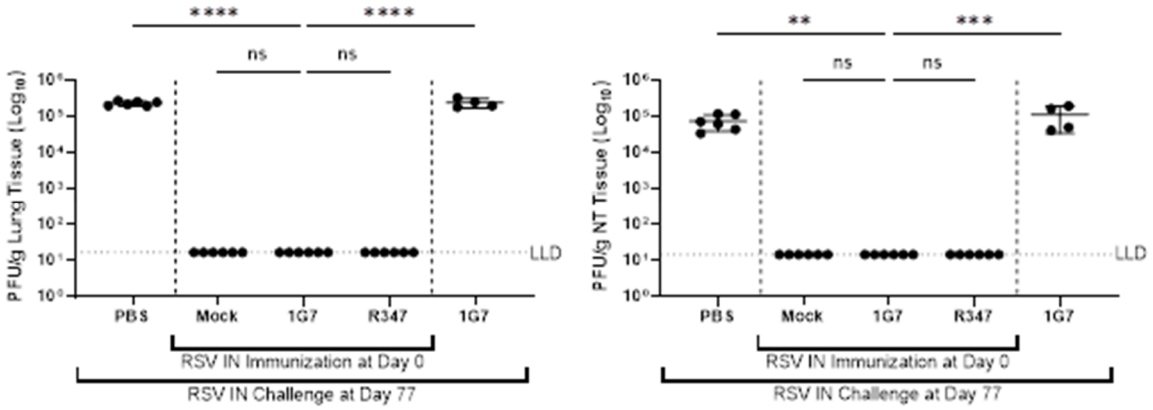
図 7　　コットンラットにおけるウイルス接種前（Day 76）の RSV A2 中和抗体価



Serum RSV neutralisation titers were determined from animals at Day 76, prior to the second RSV challenge. Titers are presented as the log2 dilution of serum that provides 50% reduction of RSV A2 virus in HEp-2 cells. The mean of individual results +/- SD are shown. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test was applied to compare untreated and 1G7-treated groups. The horizontal dashed line represents the lower limit of detection. N=6 animals for PBS (buffer) group that was not challenged on Day 0. N=6 animals for mock, 1G7 and R347 groups that were challenged IN on Day 0 with RSV. N=4 animals for 1G7 group that was not challenged on Day 0.

- = mock-prophylaxed; IN = intranasal; LLD = lower limit of detection; NS = non-significant; wt = wildtype
Source: Report ID8897-0032

図 8　　IG7 を予防的に投与したコットンラットにおける RSV A2 の鼻腔内接種 4 日後（Day 81）の肺及び鼻甲介のウイルス量



Viral titers were determined in lung homogenates and nasal turbinate by plaque assay at Day 81, 4 days post-intranasal challenge with RSV A2. The mean of individual results +/- SD are shown. The horizontal dashed line represents the lower limit of detection (LLD; 16.7 pfu/g of tissue and 14.6 pfu/g of tissue for lung and NT, respectively). Significance determined by one-way ANOVA. N=6 animals for PBS (buffer) group that was not challenged on Day 0. N=6 animals for mock, 1G7 and R347 groups that were challenged IN on Day 0 with RSV. N=4 animals for 1G7 group that was not challenged on Day 0.

**p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

IN = intranasal; LLD = lower limit of detection; ns = not significant; NT = nasal turbinates

Source: Report ID8897-0032

2.6.2.3 副次的薬理試験

ニルセビマブの副次的薬理試験は実施しなかった。ニルセビマブは、健康な動物及びヒトの組織には内因性に発現していないウイルス標的に対する抗体である。ICH S6(R1)に従い、非臨床安全性試験プログラムとして、GLP 適用 TCR 試験 2 試験（1 試験は成人及び成獣カニクイザルの組織、もう 1 試験はヒト胎児組織）及びカニクイザルを用いた GLP 適用反復投与毒性試験を実施した。成人及び成獣カニクイザル組織並びにヒト胎児組織に対する結合は認められなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

ニルセビマブの安全性薬理評価は、カニクイザルを用いた GLP 適用 1 か月間反復投与毒性試験（試験 1468-038）の一環として実施した。結果は 2.6.6 項及び 2.6.7 項に要約する。この試験において、50 mg/kg IV、300 mg/kg IV 又は 300 mg IM の用量で週 1 回、合計 5 回投与を行い、ECG パラメータを Day 1 及び 29 の投与前及び投与 24 時間後、並びに回復期間終了時の剖検前に評価したところ、ニルセビマブに関連した有害な影響は認められなかった。また、サルにおいて、ニルセビマブに関連する中枢神経系及び呼吸系への影響を示唆する一般状態の変化及び病理組織学的所見は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

ニルセビマブの薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。ニルセビマブの高い親和性、選択性及び特異性に基づき、更なる薬力学的薬物相互作用試験は必要ないと考えられた。ニルセビマブは健康な動物及びヒトの組織には内因性に発現していないウイルス標的に対する抗体である。

2.6.2.6 考察及び結論

RSV F タンパク質は RSV 疾患に対する免疫予防薬の標的であることが臨床で確認されている。非臨床薬理試験において、遺伝子組換えヒト IgG1κ mAb のニルセビマブは、RSV F タンパク質の融合前の高次構造に高い親和性で結合し、ウイルス侵入過程に必須の膜融合段階を抑制することにより、ウイルスを中和し、細胞同士の融合を阻害することが示された。ニルセビマブは親 mAb の 1G7 及び D25 に由来し、*in vitro* でパリビズマブよりも 150 倍超強い効力を示すよう最適化されており、抗体の分解の抑制、リサイクリングの促進及びヒトにおける血清中消失半減期の延長を目的として、リソソームの酸性条件下で FcRn への結合が増強するよう、遺伝子組換えにより Fc 領域に 3 アミノ酸置換［M252Y/S254T/T256E（YTE）］が施されている。

RSV A2 及び B9320 の F タンパク質と複合体を形成させたニルセビマブ Fab の結晶構造解析から、ニルセビマブは抗原部位∅内の保存された不連続な結合部位に結合することが明らかにな

り、これらは主に F2 サブユニットの 62～69 位及び F1 サブユニットの 196～212 位のアミノ酸残基で構成されていた。

ニルセビマブ、1G7 及び 1G7-TM（FcR 結合能及びエフェクター機能を低下させるために Fc 領域を改変したもの）は、いずれも同じ Fab 配列を有しており、予想どおり培養細胞において RSV A 及び B 実験室株に対して同程度の強力な抗ウイルス活性を示した。さらに、ニルセビマブ／1G7 は、RSV A（70 例）及び RSV B（49 例）の臨床分離株のパネルに対しても広範な抗ウイルス活性を示した。

ニルセビマブは *in vitro* で固定化ヒト FcγR に結合することが示された。しかし、コットンラット RSV 感染モデルにおいて、1G7 及び 1G7-TM は肺及び鼻甲介の RSV 複製を同程度かつ用量依存的に減少させたことから、RSV 感染防御は Fc 介在性エフェクター機能ではなく中和活性によるものであることが強く示唆された。

ニルセビマブは融合前 F タンパク質と免疫複合体を形成してマクロファージ細胞株である THP-1 による ADCP 活性を誘導し、また、融合前 F タンパク質と精製した補体成分 C3 と作用して ADCD 活性も誘導した。加えて、ニルセビマブの ADNP、ADNKA 及び ADCC 活性はパリビズマブと同等であり、ネガティブコントロール抗体よりも高値であったが、アッセイにおけるドナー間の差が大きかったことから統計学的な活性の差はなかった。

RSV 感染の発症と防御機構における Fc エフェクター機能の役割は未だ定かではなく（van Erp et al 2019）、また、ニルセビマブの Fab による中和活性が RSV 感染に対する主な防御機構ではあるが、ニルセビマブがヒト細胞及び細胞株において Fc エフェクター機能を誘導出来ることは重要な点である。

培養細胞において RSV A2 及び B9320 株をニルセビマブ存在下で 3 回継代し、ニルセビマブのエスケープ変異株を選択した。*In vitro* で選択された中和エスケープ変異株で特定された 68、201 及び 208 位における耐性関連変異はいずれもニルセビマブの結合部位に位置しており、RSV F タンパク質への結合親和性を低下させることが示されたが、*in vitro* でのウイルス複製に対する明らかな影響は認められなかった。

1G7 はコットンラット RSV A 及び RSV B 感染モデルで上及び下気道のウイルス複製を完全に予防した。1G7 はパリビズマブと比較して、RSV A 及び RSV B 接種コットンラットの肺におけるウイルス量を 1000 分の 1 未満に減少させる効力がそれぞれ 11 及び 9 倍強かった。また、検討したいずれの用量（有効用量から RSV A2 では 0.125 mg/kg、RSV B9320 では 0.03125 mg/kg まで）においても RSV 感染の ADE を示すエビデンスは認められなかった。過去に 1G7 を予防的に投与しウイルスを接種したコットンラットにおいて、1G7 が血清中に認められなくなった後の更なる RSV 感染に対しても防御効果が得られた。1 回目及び 2 回目の感染の両方において、RSV 感染の増強を示すエビデンスは認められなかった。

カニクイザルを用いた GLP 適用 1 か月間反復投与毒性試験において、評価した ECG パラメータに、ニルセビマブに関連した有害な影響は認められず、ニルセビマブに関連する中枢神経系及び呼吸系への影響を示唆する一般状態の変化及び病理組織学的所見も認められなかった。

これらのデータと PK 予測モデルとを総合すると、ニルセビマブの「YTE」による消失半減期延長技術を組み合わせた有効性により、生後初回の RS ウイルス感染流行期を迎える全ての新生児及び乳児または生後 2 回目の RS ウイルス感染流行期を迎える投与対象となる乳児及び幼児において、流行期間中 1 回の投与で重篤な RS ウイルス疾患の予防効果が得られると考えられる。

全体として、ニルセビマブ／1G7 の薬力学的及び薬理学的評価の結果から、ニルセビマブを推奨用量で使用するときの効果及び安全性が裏付けられた。

2.6.2.7 参考文献

Chang and Dutch 2012

Chang A, Dutch RE. Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end. Viruses. 2012 Apr;4(4):613-36.

Dall'Acqua et al 2006

Dall'Acqua WF, Kiener PA, Wu H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn) J Biol Chem. 2006 Aug 18;281(33):23514-24.

Dall'Acqua et al 2002

Dall'Acqua WF, Woods RM, Ward ES, Palaszynski SR, Patel NK, Brewah YA, et al. Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences. J Immunol. 2002 Nov; 169(9):5171-80.

Griffin et al 2017

Griffin MP, Khan AA, Esser MT, Jensen K, Takas T, Kankam MK et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of MEDI8897, the Respiratory Syncytial Virus Prefusion F-Targeting Monoclonal Antibody with an Extended Half-Life, in Healthy Adults. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(3): e01714-16

Griffin et al 2020

Griffin MP, Yuan Y, Takas T, Domachowske JB, Madhi SA, Manzoni P et al. Single-dose nirsevimab for prevention of RSV in preterm infants. N Engl J Med. 2020;383(5):415-25.

Johnson et al 1997

Johnson S, Oliver C, Prince GA, Hemming VG, Pfarr DS, Wang SC et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. J Infect Dis. 1997;176(5):1215-24.

Johnson et al 1999

Johnson S, Griego SD, Pfarr DS, Doyle ML, Woods R, Carlin D et al. A direct comparison of the activities of two humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibodies: MEDI-493 and RSHZl9. J Infect Dis. 1999;180(1):35-40.

Kinder et al 2020

Kinder JT, Moncman CL, Barrett C, Jin H, Kallewaard N, Dutch RE. Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus Infections in Three-Dimensional Human Airway Tissues Expose an Interesting Dichotomy in Viral Replication, Spread, and Inhibition by Neutralizing Antibodies. J Virol. 2020;94(20): e01068-20

Kwakkenbos et al 2010

Kwakkenbos MJ, Diehl SA, Yasuda E, Bakker AQ, van Geelen CM, Lukens MV, et al. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. Nat Med. 2010 Jan;16(1):123-8.

McLellan et al 2013

McLellan JS, Chen M, Leung S, Graepel KW, Du X, Yang Y, et al. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. Science. 2013 May 31;340(6136):1113-7.

Oganesyan et al 2008

Oganesyan V, Gao C, Shirinian L, Wu H, Dall'Acqua WF. Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2008 Jun;64(Pt 6):700-4.

Robbie et al 2013

Robbie GJ, Criste R, Dall'Acqua WF, Jensen K, Patel NK, Losonsky GA, et al. A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Dec:57(12):6147-53.

van Erp et al 2019

van Erp EA, Luytjes W, Ferwerda G, van Kasteren PB. Fc-Mediated Antibody Effector Functions During Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease. Front Immunol. 2019;10:548.

Zhu et al 2017

Zhu Q, McLellan JS, Kallewaard NL, Ulbrandt ND, Palaszynski S, Zhang J et al. A highly potent extended half-life antibody as a potential RSV vaccine surrogate for all infants. Sci Transl Med. 2017;9eaaj1928.

Zhu et al 2018

Zhu Q, Lu B, McTamney P, Palaszynski S, Diallo S, Ren K et al. Prevalence and Significance of Substitutions in the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Resulting in Neutralisation Escape From Antibody MEDI8897. J Infect Dis. 2018;218(4):572-80.

第 2 部　CTD の概要

一般名：ニルセビマブ（遺伝子組換え）

版番号：[redacted]

2.6.3　薬理試験概要表
ニルセビマブ（遺伝子組換え）

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

標題ページ 1
目次 2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.3.3 副次的薬理試験 7
2.6.3.4 安全性薬理試験 8
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 8

表目次

表 1 ニルセビマブの効力を裏付ける試験 3
表 2 ニルセビマブの *in vitro* 薬理試験 4
表 3 ニルセビマブの *in vivo* 薬理試験 7
表 4 ニルセビマブの安全性薬理試験 8

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表

表 1　　ニルセビマブの効力を裏付ける試験

Type of Study	Study Number	Title	Testing Facility
In vitro activity	ID8897-0001	In Vitro Antiviral Activity of MEDI8897 and its Precursor, 1G7, Against Respiratory Syncytial Virus A and B Laboratory Strains	MedImmune, Gaithersburg, MD, USA
In vitro activity	ID8897-0008	RSV F mAb Competition Studies	MedImmune, Gaithersburg, MD, USA
In vitro activity	ID8897-0010	Characterization of the MEDI8897 Binding Site: Crystallographic and Sequence Conservation Analysis	MedImmune, Gaithersburg, MD, USA [redacted], USA
In vitro activity	ID8897-0005	Determination of MEDI8897 Binding Affinity for Human and Cynomolgus Monkey FcRn Receptors	MedImmune, Gaithersburg, MD, USA
In vitro activity	ID8897-0002	In Vitro Antiviral Activity of the MEDI8897 Precursor, 1G7, Against Respiratory Syncytial Virus Clinical Isolates and Recombinant Variants	MedImmune, Gaithersburg, MD, USA
In vitro / *In vivo* activity	ID8897-0031	Protection From RSV Infection is Dependent on Nirsevimab (MEDI8897) Neutralization Activity Rather Than Fc-Mediated Effector Function	AstraZeneca, Gaithersburg, MD, USA
In vitro activity	ID8897-0033	In Vitro Characterization of Nirsevimab Fc-Mediated Effector Functions	AstraZeneca, Gaithersburg, MD, USA
In vitro activity	ID8897-0003	Generation and Characterization MEDI8897 Monoclonal Antibody-Resistant Mutant Viruses	MedImmune, Gaithersburg, MD, USA
In vitro activity	ID8897-0011	In Vitro MEDI8897 Neutralization Activity against Recombinant RSV Variants Containing Polymorphic Amino Acid Changes in MEDI8897 Binding Site, Contemporary Clinical Isolates, and Characterization of Recombinant RSV Variants Encoding Mutations Identified in MEDI8897 MARMs	MedImmune, Gaithersburg, MD, USA

表 1　　ニルセビマブの効力を裏付ける試験

Type of Study	Study Number	Title	Testing Facility
In vivo activity	ID8897-0006	Antiviral Activity of the MEDI8897 Precursor, 1G7, in a Cotton Rat Model of Respiratory Syncytial Virus A Infection	MedImmune, Gaithersburg, MD, USA
In vivo activity	ID8897-0007	Antiviral Activity of the MEDI8897 Precursor, 1G7, in a Cotton Rat Model of Respiratory Syncytial Virus B Infection	MedImmune, Gaithersburg, MD, USA
In vivo activity	ID8897-0032	The Nirsevimab Precursor, 1G7, Does Not Interfere with RSV Immunogenicity in the Cotton Rat Model	AstraZeneca, Gaithersburg, MD, USA

1G7 = non-YTE version of MEDI8897; FcRn = neonatal Fc receptor; MARM = monoclonal antibody resistant mutant; mAb = monoclonal antibody; RSV = respiratory syncytial virus.

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験

表 2　　ニルセビマブの *in vitro* 薬理試験

Type of Study	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings	Study Number
In vitro activity	Microneutralization assay	Ability of mAb to inhibit infection of Hep-2 cells	Mean 1G7 IC_{50} against RSV laboratory strain A2 = 1.9 ng/mL Mean 1G7 IC_{50} against RSV laboratory strain B9320 = 1.6 ng/mL Nirsevimab equivalent to 1G7 in activity	ID8897-0001
Binding competition	Competition ELISA	Competition assays for 1G7, D25 and palivizumab binding to RSV-infected HEp-2 cells	Nirsevimab/1G7 and D25 bind to the same region within antigenic site Ø on prefusion RSV F and that this binding site does not overlap with previously described binding sites targeted by palivizumab, 131-2A and 1331H.	ID8897-0008
Binding site determination	Co-crystal structure BLAST Sequence Analysis	Crystal structure analysis of nirsevimab Fab in complex with F proteins of RSV A and B; Sequence conservation determination using 1888 RSV A and B F protein sequences	Nirsevimab binding site and contact residues defined as amino acid residues 62-69 in the F2 subunit and amino acid residues 196-212 in the F1 subunit of RSV F. The majority of residues in the binding site are highly conserved with >99% sequence conservation.	ID8897-0010

表 2　　ニルセビマブの *in vitro* 薬理試験

Type of Study	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings	Study Number
Binding to FcRn	Surface plasmon resonance	Nirsevimab binding affinity to immobilized human and cynomolgus monkey FcRns was quantified	K_D for human FcRn is 161 nM K_D for cynomolgus monkey FcRn is 253 nM	ID8897-0005
In vitro activity	Microneutralization Assay	Ability of 1G7 to inhibit infection of Hep-2 cells by clinical isolates	1G7 IC_{50} range for A isolates 0.48 to 15 ng/mL, median 3.15 ng/mL 1G7 IC_{50} range for B isolates 0.8 to 59.7 ng/mL, median 3.0 Palivizumab resistant viruses neutralized by 1G7	ID8897-0002
In vitro and *in vivo* activity	Surface plasmon resonance Microneutralization Assay Cotton rat model of RSV infection	Binding affinity of nirsevimab for FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, and FcγRIIIA-158V (CD16). Nirsevimab, 1G7 and 1G7-TM in microneutralization assays using the wild-type (WT) RSV A2 laboratory strain 1G7 (WT Fc region) and 1G7-TM (Fc-mediated effector function deficient) were evaluated in the cotton rat model of RSV infection.	Nirsevimab exhibited binding to FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, or FcγRIII A158V with K_D values of 8.94×10^{-9}, 1.87×10^{-5}, 5.30×10^{-4}, and 1.67×10^{-5} M, respectively. Nirsevimab, 1G7 and 1G7-TM exhibited comparable IC_{50} values in vitro of 2.2, 2.0 and 2.0 ng/mL, respectively. Fc effector function is not required for 1G7-mediated protection of cotton rats from RSV infection.	ID8897-0031
In vitro Fc-effector function assays	ADCP, ADCD, ADNP, ADNKA, and ADCC *in vitro* assays	Assess nirsevimab Fc-mediated effector functions *in vitro* relative to the anti-RSV control mAb palivizumab and the irrelevant negative control mAb R347, including ADCP, ADNP, ADCD, ADNKA and ADCC.	Nirsevimab demonstrated ADCP activity in the THP-1 macrophage cell line upon formation of immune complexes with pre-F and ADCD activity upon engagement of pre-F and purified complement C3. In addition, nirsevimab mediated ADNP, ANDKA and ADCC activity that was comparable to palivizumab and above levels measured for the negative control antibody; however, the activity was not statistically significant due to high donor-to-donor variability in the assays.	ID8897-0033

表 2　　ニルセビマブの *in vitro* 薬理試験

Type of Study	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings	Study Number
In vitro activity	MARM isolation Microneutralization assay	Production of resistant viruses RSV A2 and RSV B9320 were serially passaged in HEp-2 cells in the presence of nirsevimab 3 times, purified and a microneutralization assay performed	Amino acids at position 68, 201 and 208 identified in the nirsevimab resistant mutants. All clonally purified RSV variants exhibited significant reduced susceptibility to nirsevimab neutralisation and maintained sensitivity to palivizumab neutralisation compared to parental RSV A2 and B9320 strains.	ID8897-0003
In vitro activity	Recombinant virus generation Microneutralization assay	The ability of nirsevimab to neutralize the recombinant viruses or clinical isolates containing polymorphic amino acid changes in the nirsevimab binding site and recombinant virus encoding mutations identified in nirsevimab MARMs	The majority of sequence polymorphisms observed in the nirsevimab binding site did not impact the ability of virus to be neutralized by nirsevimab. The contribution of each resistance-associated mutations (K68N, N208D/S and N201S) to virus susceptibility to nirsevimab varied. These residues are highly conserved.	ID8897-0011

1G7 = non-YTE version of MEDI8897; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; FcRn = neonatal Fc receptor; HEp-2 = human epithelial type 2; IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration; K_D= equilibrium dissociation constant; mAb = monoclonal antibody; MARM = monoclonal antibody-resistant mutant; RSV = respiratory syncytial virus.

表 3　　ニルセビマブの *in vivo* 薬理試験

Type of Study	Strain	Route of Administration	Doses	Gender and Number per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Prophylactic efficacy	Cotton Rat	1G7 IM 1 Day prior to IN challenge with RSV A2	1G7 3, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 mg/kg	4 Females per group	Mean EC_{50} = 2.9 µg /mL Mean EC_{90} = 6.8 µg /mL	ID8897-0006
Prophylactic efficacy	Cotton Rat	1G7 IM 1 Day prior to IN challenge with RSV B9320	1G7 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 mg/kg	4 Females per group	Mean EC_{50} = 1.8 µg /mL Mean EC_{90} = 5.8 µg/mL	ID8897-0007
Prophylactic efficacy Re-challenge	Cotton Rat	IM 1 Day prior to IN challenge with RSV A2 Re-challenged IN on Day 77	1G7 or R347 6 mg/kg	12, 9 (Group 2) or 4 (Group 5) Females per group	Immune memory and anti-RSV neutralizing antibody titers induced by the first challenge were fully protective against detectable RSV replication in the lungs or nasal turbinates of all animals regardless of whether they had been administered 1G7, PBS, or R347. No evidence of ADE of infection was observed at sub-efficacious doses.	ID8897-0032

ADE = antibody-dependent enhancement; EC_{50} = effective concentration 50%; EC_{90} = 90% effective concentration; IM = intramuscular; IN = intranasal; RSV = respiratory syncytial virus.

2.6.3.3　　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。

2.6.3.4　安全性薬理試験

ニルセビマブの安全性薬理評価は、カニクイザルを用いた GLP 適用 1 か月間反復投与毒性試験（1468-038 試験）の一環として実施した。結果を 2.6.6 項に要約する。

表 4　ニルセビマブの安全性薬理試験

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses / ROA	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular	Cynomolgus monkey	IV infusion and IM injection once a week for one month (5 total doses)	Group 1: 0 (IV and IM); Group 2: 50 mg/kg IV; Group 3: 300 mg/kg IV; Group 4: 300 mg (fixed IM)	Groups 1, 3, and 4: 6 per sex Group 2: 3 per sex	There were no adverse local or systemic effects of nirsevimab. ECG parameters assessed predose and 24 hours postdose on Days 1 and 29 and prior to recovery necropsy showed no adverse nirsevimab-related effects.	Yes	1468-038

IM = intramuscular; IV = intravenous; ROA = route of administration.

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。