目　次

目　次 2
表 一 覧 3
図 一 覧 3
略号一覧 4
1 まとめ 7
2 効力を裏付ける試験 9
2.1 *In vitro* 活性及び選択性 9
2.2 *In vitro* 細胞活性 10
2.2.1 PNH 患者由来赤血球の溶血及び C3 沈着の阻害作用 10
2.2.2 C3G，MPGN，及び aHUS 患者由来血清での AP 制御異常の抑制作用 13
2.2.3 aHUS 患者変異型 FB への結合及び阻害作用 14
2.3 *In vivo* 薬理作用 15
2.3.1 機序検討モデル（マウス） 15
2.3.2 病態モデル（マウス，ラット） 17
2.4 その他の薬理試験 20
2.4.1 薬物動態と薬力学の関連性 20
2.5 作用機序 22
3 副次的薬理試験 23
3.1 *In vitro* 副次的薬理試験 24
3.1.1 *In vitro* 選択性 24
3.1.2 莢膜形成細菌の *in vitro* 殺菌作用への影響 24
3.2 *In vivo* 副次的薬理試験 30
3.2.1 DNP-KLH に対する B 細胞応答（マウス） 31
3.2.2 ヒツジ赤血球に対する B 細胞応答（ラット） 32
4 安全性薬理試験 32
4.1 心血管系に及ぼす影響 33
4.1.1 *In vitro* 試験 33
4.1.2 *In vivo* 試験 36
4.2 ラットを用いた呼吸系に関する安全性薬理試験 44
4.3 ラットを用いた中枢神経系に関する安全性薬理試験 44
5 薬力学的薬物相互作用試験 45
6 考察及び結論 45
7 参考文献 48

表一覧

Table 2-1 LNP023 の AP 及び CP に対する阻害活性....10
Table 2-2 PNH サロゲートアッセイにおける溶血阻害の IC50 及び IC90 値....13
Table 2-3 マウス LPS 誘発 AP 活性化モデル：LNP023 単回経口投与による AP 活性化阻害作用の IC50 及び IC90 値....17
Table 2-4 毒性試験での血漿中トラフ濃度と *in vitro* 薬理試験での IC50 及び IC90 値との比較....21
Table 4-1 イヌを用いた反復投与毒性試験における心血管系の評価....39

図一覧

Figure 2-1 PNH 患者由来赤血球：LNP023 の溶血及び C3 沈着阻害作用....12
Figure 2-2 C3G（C3GN 及び DDD），aHUS，及び MPGN 患者由来血清：LNP023 の SRBC 溶血阻害作用....14
Figure 2-3 マウス LPS 誘発 AP 活性化モデル：LNP023 の AP 活性化阻害作用....16
Figure 2-4 マウス K/BxN 血清移入関節炎モデル：LNP023 の関節炎抑制作用....18
Figure 2-5 ラット受動的ヘイマン腎炎モデル：LNP023 の発症予防及び治療効果....20
Figure 2-6 LNP023 の作用機序：補体第二経路及び増幅回路の阻害作用....23
Figure 3-1 髄膜炎菌：ワクチン接種前後の血清での生存率に及ぼす補体阻害薬の影響....26
Figure 3-2 肺炎球菌：補体阻害薬存在下での殺菌作用と抗体濃度の相関....28
Figure 3-3 インフルエンザ菌 b 型：ワクチン接種前後の血清での生存率に及ぼす補体阻害薬の影響....29

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
aHUS	atypical hemolytic uremic syndrome	非典型溶血性尿毒症症候群
AP	alternative complement pathway	補体第二経路
AUC	area under the drug plasma concentration-time curve	血漿中薬物濃度-時間曲線下面積
Ba, Bb	fragment of factor Ba or Bb	-
b.i.d.	twice daily (bis in die)	1 日 2 回
bpm	beat / min (beat per minutes)	-
C1	complement component 1	補体成分 1
C3	complement component 3	補体成分 3
C3a, C3b, C3d	fragment of C3	-
C3bBb, $C3(H_2O)Bb$, C4b2b	C3 convertase	C3 転換酵素
C3bBb3b, C4b2b3b	C5 convertase	C5 転換酵素
C3G	C3 glomerulopathy	C3 腎症
C3GN	C3 glomerulonephritis	C3 腎炎
C3Nef	C3 nephritic factor	-
C5	complement component 5	補体成分 5
C5a	fragment of C5	-
CD	cluster of differentiation	分化抗原群
CFU	colony forming unit	コロニー形成単位
CM	cardiomyocyte	心筋細胞
Cmax	maximal drug plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
CP	classical complement pathway	補体古典経路
DAF	decay-accelerating factor	-
DDD	dense deposit disease	デンスデポジット病
DNP	dinitrophenyl	ジニトロフェニル
DNP-KLH	dinitrophenyl-keyhole limpet hemocyanin	ジニトロフェニル結合キーホールリンペットヘモシアニン
EC50, EC90	50% or 90% effective concentration	50%又は 90%有効濃度
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
EF	ejection fraction	駆出率
EGTA	ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	エチレングリコールビス(β-アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
ESV	end systolic volume	左室収縮末期容量
FAS	fractional area shortening	左室面積縮小率
FB	complement factor B	補体 B 因子
Fc	crystallizable fragment	-
FD	complement factor D	補体 D 因子
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
FITC	fluorescein isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアネート
FS	fractional shortening	左室内径短縮率
Fx1A	fraction 1A	-
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
GPI	glycosylphosphatidylinositol	グリコシルホスファチジルイノシトール
H&E	hematoxylin and eosin	ヘマトキシリン-エオジン
HEK	human embryonic kidney (cell)	ヒト胎児腎臓（細胞）
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
Hib	*Haemophilus influenzae* type b	インフルエンザ菌 b 型
IC	immune complex	免疫複合体
iC3b	inactivated C3b	C3b 不活性化体
IC50, IC90	50% or 90% inhibitory concentration	50%又は 90%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IC-MPGN	immune complex associated membranoproliferative glomerulonephritis	免疫複合体型膜性増殖性糸球体腎炎
IgA	immunoglobulin A	免疫グロブリン A
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	immunoglobulin M	免疫グロブリン M
Kd	dissociation constant	解離定数
KLH	keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
LP	lectin complement pathway	補体レクチン経路
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
LVAs	left ventricular end systolic area	左室収縮末期面積
LVIDs	left ventriclar internal diameter in systole	収縮期左室内径
MAC	membrane attack complex (C5b-9)	膜侵襲複合体（C5b-9）
MASP-2	mannose-binding protein-associated serine protease 2	マンノース結合タンパク質関連セリンプロテアーゼ 2
MPGN	membranoproliferative glomerulonephritis	膜性増殖性糸球体腎炎
mTOR	mammalian target of rapamycin	哺乳類ラパマイシン標的タンパク質
n.d.	not determined	-
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	no observed effect level	無作用量
NT-proANP	N-terminal pro-atrial natriuretic peptide	心房性ナトリウム利尿ペプチド前駆体 N 端フラグメント
NT-proBNP	N-terminal pro-brain natriuretic peptide	脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体 N 端フラグメント
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PE	phycoerythrin	フィコエリスリン
PG	proteoglycan	プロテオグリカン
PIGA	phosphatidylinositolglycan-class A	ホスファチジルイノシトールグリカンクラ

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
		ス A
PNH	paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	発作性夜間ヘモグロビン尿症
PRP	polyribosyl-ribitol-phosphate	ポリリボシルリビトールリン酸
QTc	QT interval corrected for heart rate	心拍数補正 QT 間隔
SD	standard deviation	標準偏差
SEM	standard error of the mean	標準誤差
SRBC	sheep red blood cell	ヒツジ赤血球
T3	triiodothyronine	トリヨードサイロニン
T4	thyroxine	サイロキシン
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
Tmax	time to reach the maximum drug plasma concentration following drug administration	最高血漿中薬物濃度到達時間
TR-FRET	time-resolved fluorescence resonance energy transfer	時間分解蛍光共鳴エネルギー移動
UCREA	urinary creatinine	尿クレアチニン
UTP	urinary total protein	尿中総タンパク質

1 まとめ

補体系は液性免疫のひとつであり，プロテアーゼによって連鎖的にカスケード反応が生じて病原体を排除する主要な自然免疫システムである。補体系には古典経路（CP），レクチン経路（LP），及び第二経路（AP）の 3 種類の活性化経路が存在することが知られている。補体系のカスケード反応は，CP では抗原と抗体が結合した免疫複合体を，LP では病原体表面を認識することによって開始される。AP では常時，低レベルで活性化状態にあり，3 種類の活性化経路の増幅回路としても機能する。

補体系の活性化により生成される補体成分のフラグメントは炎症誘導タンパク質として機能し，自然免疫エフェクター細胞の遊走及び活性化，標的細胞のオプソニン化及び貪食作用誘導，並びに標的細胞の溶解等，多様な作用を示す。補体の制御異常は遺伝子変異や何らかの要因によって二次的に生じ，発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH），C3 腎症（C3G），非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS），IgA 腎症，及び加齢黄斑変性等の深刻な疾患の発症要因となる（Schubart et al. 20233）。

イプタコパン（LNP023）は新規作用機序を持つ経口投与可能な低分子の補体阻害薬であり，強力かつ選択的に補体 B 因子（FB）を阻害する。FB は C3 及び C5 転換酵素の触媒作用に重要であり，AP の主要なプロテアーゼである（Figure 2-6）。FB を阻害することにより C3 転換酵素が阻害され，C3 の増幅回路の活性化，C3 フラグメントによる細胞のオプソニン化，C5 転換酵素及び膜侵襲複合体（MAC）の形成，並びにカスケード反応に伴って生じるアナフィラトキシン C3a 及び C5a の生成が阻害される（Schubart et al. 2019）。LNP023 は CP 及び LP のカスケード反応に直接影響しないため，LNP023 治療下において CP 及び LP による生体防御機構は機能する。したがって，LNP023 は，AP の制御異常によって生じる疾患に対して有用な治療薬になることが期待される。

PNH はホスファチジルイノシトールグリカンクラス A（*PIGA*）遺伝子の体細胞変異により，補体制御因子 CD55［decay-accelerating factor（DAF）］及び CD59 の発現が細胞表面で欠損することで発症する（特発性造血障害に関する調査研究班 2020）。CD55 及び CD59 はそれぞれ C3 転換酵素及び MAC 形成を制御することから，これらの制御因子の欠損により，PNH 患者の赤血球（PNH 型赤血球）は補体介在性の溶血（血管内溶血）が極めて生じやすい状態になり，血栓症の要因となる。抗 C5 抗体薬（エクリズマブ及びラブリズマブ）は多くの国で PNH の標準治療に用いられている。抗 C5 抗体薬は MAC 形成を阻害することで血管内溶血を強力に抑制し，PNH 患者で血栓塞栓リスクを低減させ，死亡率を著明に低下させた。しかしながら，C5 阻害は補体活性化の上流を抑制しない。その結果，PNH 型赤血球は C5 阻害下でも生存するが，C3 フラグメントでオプソニン化され，肝臓や脾臓において貪食作用が誘発される（血管外溶血）。そのため，多くの患者では，C5 阻害下にもかかわらず貧血が残存する。LNP023 は血管内溶血の抑制に加え，

C3 フラグメントによる PNH 型赤血球のオプソニン化を抑制することから，PNH 患者にとって有用な治療薬になる可能性がある。

LNP023 の効力を裏付ける試験として，*in vitro* 活性及び選択性，ヒト患者由来の生体試料を用いた細胞活性，並びに 3 種類の動物モデルを用いた *in vivo* 薬理作用の各試験を実施した。副次的薬理試験として，*in vitro* では標的外分子に対する選択性及び FB 阻害による莢膜形成細菌の殺菌作用への影響について検討し，*in vivo* では 2 種類のげっ歯類モデルを用いて T 細胞依存性 B 細胞応答に対する影響を検討した。安全性薬理試験として，中枢神経系，呼吸系，及び心血管系に対する影響を *in vitro* 及び *in vivo* で実施した。

効力を裏付ける試験から，LNP023 は *in vitro* においてヒト FB に高い選択性及び結合性を示し，AP 活性化を強力に抑制した。PNH 型赤血球の溶血と C3 沈着を阻害し，C3G，膜性増殖性糸球体腎炎（MPGN），及び aHUS 由来血清での AP 制御異常を抑制した。*In vivo* の検討では 2 種のげっ歯類病態モデルにおいて病態の発症及び進行を抑制した。

副次的薬理試験では，各種莢膜形成細菌のワクチン接種により抗体価が得られていれば，これら菌への殺菌作用に対する LNP023 の影響は限定的であり，*in vivo* T 細胞依存性 B 細胞応答への影響は認められなかった。

LNP023 の安全性薬理試験では，臨床用量［200 mg，1 日 2 回（b.i.d.）］投与時のヒト Cmax より十分に高い曝露量で心血管系，中枢神経系，及び呼吸系に対する安全性を評価した。

In vitro 試験では，hERG（human ether-à-go-go related gene）チャネルに対する LNP023 の IC50 値は 414.9 μM であり，ヒトにおける非結合型 LNP023 の Cmax と比較して約 230 倍であった。検討したいずれの心筋イオンチャネルに対する影響もみられなかった。サルでは，ヒトにおける総 LNP023 の Cmax と比較して 21 倍以上に相当する曝露量で用量依存的な QTc 延長が認められたが，イヌでは同等以上の血漿中濃度でも影響はみられなかった。イヌでは，ヒトにおける総 LNP023 の Cmax と比較して 3 倍以上の曝露量で心拍数の増加，8 倍以上の曝露量で血圧の低下が用量依存的に認められたが，ラット及びサルでは同等の血漿中濃度でも影響はみられなかった。イヌを用いた詳細な検討では，ヒトにおける総 LNP023 の Cmax と比較して約 13 倍の曝露量で心収縮力の増加及び血行動態への影響も認められ，幼若イヌ（約 8 週齢）では若齢成熟イヌ（8 ヵ月齢）と比較してこれらの影響がより顕著であった。ラットでは，ヒトにおける総 LNP023 の Cmax と比較して約 12 倍の曝露量まで中枢神経系への影響はみられず，約 10 倍まで呼吸系への影響はみられなかった。

以上，一連の非臨床薬理試験成績から，PNH 患者に対する LNP023 投与のベネフィット・リスクバランスは良好であり，添付文書案に規定した用法・用量での使用は支持されると判断した。

2 効力を裏付ける試験

2.1 *In vitro* 活性及び選択性

LNP023 の FB（活性型 Bb 及び不活性型 FB）への結合性及びプロテアーゼ活性の阻害作用を各種 *in vitro* アッセイで検討した。

時間分解蛍光共鳴エネルギー移動（TR-FRET）法により，ヒト FB の触媒ドメインに対する LNP023 の競合結合アッセイを実施した。その結果，LNP023 は標識リガンドの FB への結合を阻害し，50%阻害濃度（IC50）は 9.6 nM（4 ng/mL）であった[Table 2.6.3.1-RD-2015-00230]。

LNP023 の AP 活性化に対する阻害作用を血清又は血液を用いたアッセイで検討した。血清及び血液にはすべての補体成分が含まれており，ザイモザン（酵母の細胞壁の構成成分）で刺激することにより補体系を活性化できる。AP 活性化の阻害作用を評価するため，CP 及び LP の阻害薬である EGTA を緩衝液に添加して測定を行った。その結果，LNP023 はザイモザン刺激により誘導された AP 活性化を阻害した。LNP023 は，50%マウス血清でザイモザンへの C3 沈着を阻害し，IC50 値は 110 nM（50 ng/mL）であった[Table 2.6.3.1-RD-2015-00152]。他の動物種血清を用いて MAC 沈着量を指標として LNP023 の AP 活性化阻害作用を検討した結果，LNP023 はいずれも阻害作用を示し，MAC 形成阻害の IC50 値は，50%ラット血清で 560 nM（240 ng/mL）[Table 2.6.3.1-RD-2017-00357]，50%ウサギ血清で 110 nM（50 ng/mL）[Table 2.6.3.1-RD-2017-00003]，50%イヌ血清で 410 nM（170 ng/mL）[Table 2.6.3.1-RD-2014-00521]，及び 50%カニクイザル血清で 80～400 nM（33～170 ng/mL）[Table 2.6.3.1-RD-2014-00605]，[Table 2.6.3.1-RD-2015-00152]であった。

LNP023 は，50%ヒト血清又は 50%ヒト全血でザイモザン刺激により誘導した MAC 形成を阻害し，IC50 値は，50%ヒト血清で 120 nM（50 ng/mL）[Table 2.6.3.1-RD-2015-00228]又は 130 nM（50 ng/mL）[Table 2.6.3.1-RD-2015-00152]，50%ヒト全血で 220 nM（93 ng/mL）であった[Table 2.6.3.1-RD-2015-00153]。また，50%ヒト血清アッセイでの MAC 形成阻害の IC90 値は 450 nM（190 ng/mL）であった[Table 2.6.3.1-RD-2015-00228]。得られた IC50 及び IC90 値を Table 2-1 に示す。

さらに，市販のアッセイ系（Wieslab）用いて，LNP023 とヒト CP の C3 転換酵素（C4b2b）との交差反応性を調べ，CP 活性化への影響を検討した。本アッセイ系は，100 倍希釈した血清を使用すること及び抗体により CP を活性化すること以外は，上記の AP 活性化アッセイ系と同様であり，CP 活性化により形成される MAC を指標として評価している。本アッセイにおいて，LNP023 は構造的に関連性があるプロテアーゼ C2（CP の C3 転換酵素 C4b2b で C3 を分解する触媒部位を有する）とは交差反応性を示さず，100 µM（42200 ng/mL）の濃度まで CP 活性化に対する作用を示さなかった[Table 2.6.3.1-RD-2022-00256]。このことから，LNP023 は，高い選択性で FB を阻害することが示された。

Table 2-1 LNP023 の AP 及び CP に対する阻害活性

試験方法	種	測定試料	IC50 nM ± SD	IC90 nM ± SD	n	試験番号
TR-FRET	ヒト	生化学分析	10 ± 3	n.d.	6	RD-2015-00230
AP アッセイ：ザイモザン誘発 MAC 形成（マウスでは C3 沈着）	マウス	6%血清	16 ± 12	n.d.	16	RD-2015-00152
	マウス	50%血清	110 ± 13	n.d.	4	RD-2015-00152
	マウス	50%血清	120 ± 110	350 ± 300	6	RD-2014-00605
	ラット	6%血清	190 ± 90	680 ± 330	12	RD-2017-00357
	ラット	50%血清	560 ± 230	1230 ± 1150	12	RD-2017-00357
	ウサギ	50%血清	110 ± 20	n.d.	4	RD-2017-00003
	イヌ	50%血清	410 ± 270	1550 ± 1030	7	RD-2014-00521
	カニクイザル	50%血清	400 ± 80	n.d.	2	RD-2015-00152
	カニクイザル	50%血清	80 ± 0	460 ± 210	2	RD-2014-00605
	ブタ	50%血清	120 ± 60	n.d.	2	RD-2014-00605
	ヒト	6%血清	32 ± 19	n.d.	16	RD-2015-00152
	ヒト	50%血清	120 ± 40	450 ± 210	6	RD-2015-00228
	ヒト	50%血清	130 ± 61	n.d.	6	RD-2015-00152
	ヒト	50%全血	220 ± 93	n.d.	18	RD-2015-00153
CP Wieslab アッセイ	ヒト	1%血清	> 100000	n.d.	3	RD-2022-00256

Source：Table 2.6.3.1-RD-2015-00230，Table 2.6.3.1-RD-2015-00152，Table 2.6.3.1-RD-2014-00605，Table 2.6.3.1-RD-2017-00357，Table 2.6.3.1-RD-2017-00003，Table 2.6.3.1-RD-2014-00521，Table 2.6.3.1-RD-2015-00228，Table 2.6.3.1-RD-2015-00153，Table 2.6.3.1-RD-2022-00256

IC50 及び IC90 値は，AP 又は CP の補体活性をそれぞれ 50%及び 90%阻害する LNP023 の濃度（nM）を示す。3 種類の方法を用いて阻害活性を測定した：TR-FRET（時間分解蛍光共鳴エネルギー移動）法，ザイモザン誘発 MAC 形成及び CP Wieslab アッセイ。n.d.：not determined。

2.2 *In vitro* 細胞活性

LNP023 の対象疾患での薬理作用を評価して臨床開発をサポートするために，患者由来の生体試料を用いた *in vitro* 試験を実施した。

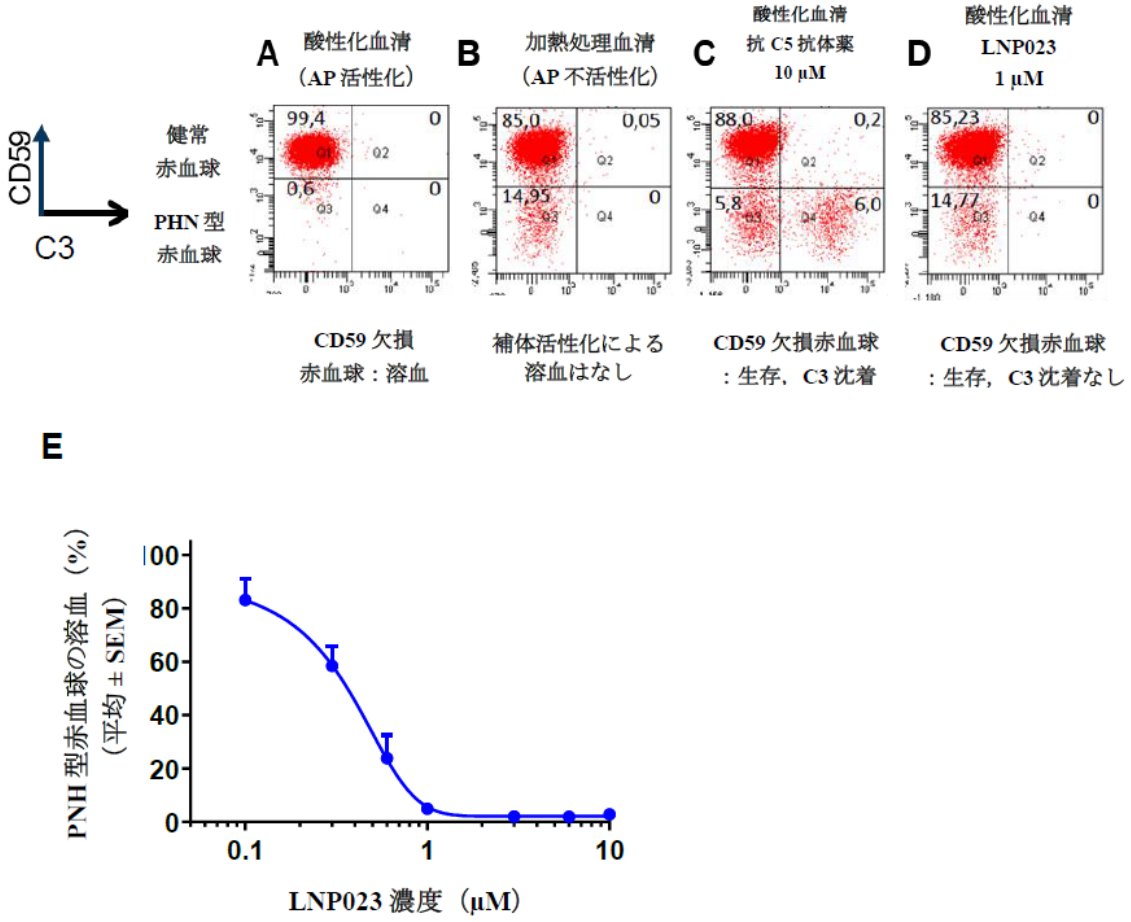
2.2.1 PNH 患者由来赤血球の溶血及び C3 沈着の阻害作用

PNH 患者由来赤血球の溶血に対する LNP023 の阻害作用を検討した（Schubart et al. 2019）。PNH は造血幹細胞での *PIGA* 遺伝子の体細胞変異により，補体制御因子（CD55 及び CD59）の細胞膜への局在に必要な GPI アンカータンパク質が欠損している。このため，PNH 型赤血球では CD55 及び CD59 による補体制御が機能せず，補体介在性の溶血に対して感受性が高くなっている。また，通常，有核細胞では補体制御因子である CD46 が発現し C3 活性化を阻害して C3 増幅回路を抑制するが，核を持たない成熟赤血球ではこの CD46 が発現していない（Thielen AJF et al. 2018）。CD46 に加え，PNH 型赤血球では *PIGA* 遺伝子変異により CD55 及び CD59 が欠損していることから，補体活性化及び溶血が極めて生じやすい状態になっている。

健常人由来血清に PNH 患者（3 例）から採取した赤血球及び補体阻害薬（LNP023 又は抗 C5 抗体薬）を添加した後，酸性条件下で 37°C，24 時間インキュベーションした。酸性化することで血清の AP は活性化される。蛍光標識した抗体（PE 標識抗 CD59 抗体及び FITC 標識抗 C3 抗体）を用いて，フローサイトメトリーにより生存赤血球を検出し，溶血の有無及び C3 フラグメントの沈着を評価した。対照として，阻害薬非存在下で，AP を不活化させる目的で加熱処理した血清及び酸性化処理した血清を用いた。

対照の阻害薬未添加血清では，血清を酸性化して AP を活性化した条件下では CD59 欠損の PNH 型赤血球はほぼ完全に溶血したが（Figure 2-1A），加熱処理により AP を不活性化させた条件下では溶血は観察されなかった（Figure 2-1B）。抗 C5 抗体薬（10 μM）の添加により，PNH 型赤血球の溶血は阻害されたが，C3 フラグメントの赤血球表面への沈着（オプソニン化）が認められた（Figure 2-1C）。このオプソニン化により赤血球は貪食されやすい状態になり，PNH 患者では血管外溶血が生じる。LNP023（1 μM）の添加により，PNH 型赤血球の溶血が阻害され，赤血球表面への C3 フラグメントの沈着も阻害された（Figure 2-1D）。LNP023 は濃度依存的に溶血を阻害し，その IC50 値は 400 nM であった（Figure 2-1E）。このことから，LNP023 は血管内溶血及び血管外溶血の両方を抑制し，PNH 患者での溶血を良好にコントロールできることが示唆された。

Figure 2-1　　PNH 患者由来赤血球：LNP023 の溶血及び C3 沈着阻害作用



Source：Schubart et al. 2019

（A～D）健常人由来血清に PNH 患者（3 例）から採取した赤血球及び阻害薬（LNP023 又は抗 C5 抗体薬）を添加した後，AP 活性化の目的で血清を酸性化し，37°C，24 時間インキュベーションした。蛍光標識した抗体（PE 標識抗 CD59 抗体及び FITC 標識抗 C3 抗体）を用いて，フローサイトメトリーにより生存赤血球を検出し，溶血の有無及び C3 フラグメントの沈着を評価した。対照として，阻害薬非存在下で，AP を不活化させる目的で加熱処理した血清及び酸性化処理した血清を用いて同様に検討した。図は赤血球上の C3 沈着量（横軸）及び CD59 発現量（縦軸）をパラメータとしたドットプロットを示す。各ドットは検出された生存赤血球を示す。（A）酸性化血清（AP 活性化），阻害薬の添加なし（B）加熱処理血清（AP 不活性化），阻害薬の添加なし（C）酸性化血清（AP 活性化），抗 C5 抗体薬添加（D）酸性化血清（AP 活性化），LNP023 添加

（E）（D）の測定条件下における LNP023 の用量反応曲線。縦軸はインキュベーション前のベースラインからの生存赤血球の変化率（%）を示す。平均値 ± SEM（n = 3）。

同様の結果が PNH のサロゲートアッセイでも得られた[Table 2.6.3.1-RD-2015-00232]。本アッセイでは，PNH 型赤血球と類似させるために健康被験者由来赤血球を CD55 及び CD59 に対するブロッキング抗体とインキュベーションし，さらに CP 及び LP を阻害するために EGTA を加えた。その結果，LNP023 は赤血球の溶血を阻害し，100%血清での IC50 値は 110 nM（50 ng/mL）及び IC90 値は 740 nM（310 ng/mL）であった（Table 2-2）。

Table 2-2 PNH サロゲートアッセイにおける溶血阻害の IC50 及び IC90 値

試験方法	種	測定試料	IC50 nM ± SD	IC90 nM ± SD	n	試験番号
PNH サロゲートアッセイ	ヒト	50%血清	100 ± 40	340 ± 120	7	RD-2015-00232
	ヒト	100%血清	110 ± 80	740 ± 70	5	

Source：Table 2.6.3.1-RD-2015-00232

IC50 及び IC90 値は，AP の補体活性をそれぞれ 50%及び 90%阻害する LNP023 の濃度（nM）を示す。

これらの結果から，LNP023 は AP 介在性の溶血を強力に阻害するだけでなく，抗 C5 抗体薬で認められる C3 フラグメントによるオプソニン化も阻害することから，LNP023 治療は C5 阻害薬の臨床効果を改善できると期待される。

2.2.2 C3G，MPGN，及び aHUS 患者由来血清での AP 制御異常の抑制作用

AP 関連の腎疾患として，C3G 及び aHUS が知られている（Schubart et al. 2023）。C3G は液相中の AP の制御異常が特徴的に認められ，その原因として補体制御タンパク質の変異，C3 転換酵素を認識して安定化させる自己抗体（C3Nef），又は AP の制御因子である補体 H 因子に対する中和抗体等が報告されている。C3G は C3 腎炎（C3GN）及びデンスデポジット病（DDD）の総称であり，これらは腎生検での電子顕微鏡所見で鑑別される（Goodship et al. 2017，Schubart et al. 2023）。C3G の典型的な腎病理像は MPGN である。なお，MPGN のうち免疫複合体（IC）沈着を伴う免疫複合体型 MPGN（IC-MPGN）が報告されており，C3G では免疫グロブリンの沈着が少ないのに対して，IC-MPGN では C3 及び免疫グロブリンの両方の沈着がみられる（Fakhouri et al. 2010，Goodship et al. 2017）。C3G と同様に IC-MPGN でも AP の制御異常が病態形成に関与すると考えられている（Fakhouri et al. 2010）。aHUS は，補体制御因子及び補体活性化因子の遺伝子変異や補体 H 因子に対する自己抗体により，血管内皮細胞や血小板の細胞表面での AP の制御異常によって引き起こされる（Goodship et al. 2017，Schubart et al. 2023）。

C3G（C3GN 及び DDD），MPGN，及び aHUS の病態を反映する条件下で LNP023 の *in vitro* 薬理作用を検討するために，それぞれの患者由来血清を用いてヒツジ赤血球（SRBC）の溶血に対する LNP023 の阻害作用を評価した[Table 2.6.3.1-RD-2020-00407]。

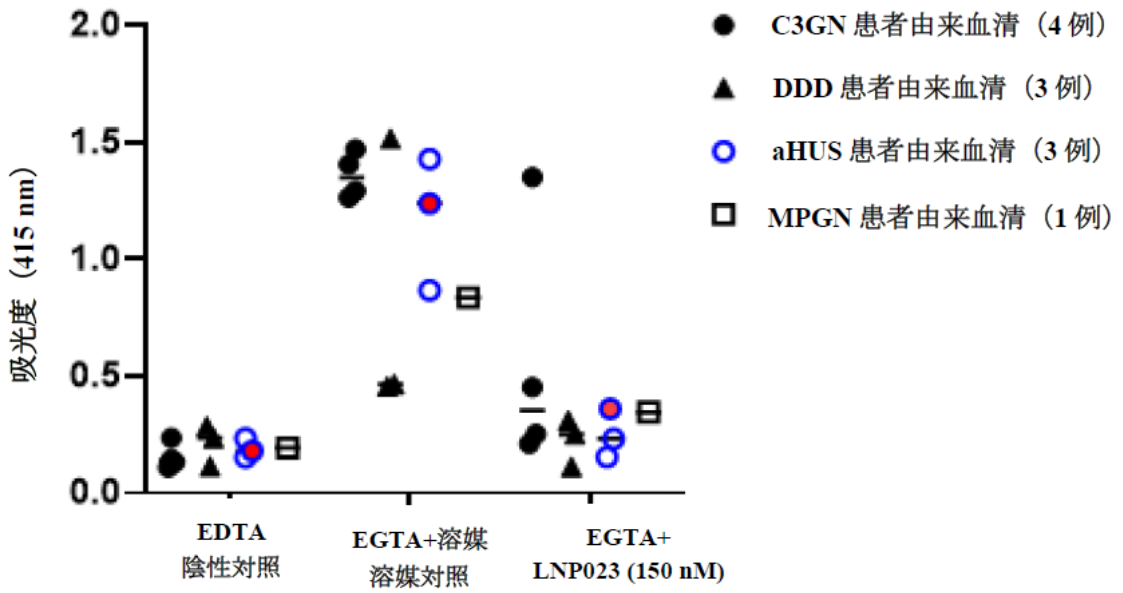
CP 及び LP を不活性化するために EGTA を添加した緩衝液に，溶媒（0.1%ジメチルスルホキシド）又は LNP023（150 nM，aHUS 由来血清の 1 例では 120 nM）を添加して，各患者由来の血清とともに氷冷下で 10 分間プレインキュベーションし，その後に SRBC を添加して 37°C，30 分間インキュベーションした。SRBC の溶血は 415 nm での吸光度の増加を指標に測定した。陰性対照として，CP，LP，及び AP すべてを不活性化するために EDTA を添加した緩衝液を用いた。

SRBC と患者由来血清［C3G（4 例の C3GN，3 例の DDD），aHUS（3 例），又は MPGN（1 例）］をインキュベーションしたとき，溶媒対照では SRBC の溶血が認められた。しかしながら，LNP023 では，ほぼすべての患者由来血清で陰性対象と同様の吸光度まで低下し，SRBC の溶血は完全に阻害された（Figure 2-2）。また，LNP023 は，SRBC 膜上で形成させ，さらに C3G 患者

由来 C3Nef で安定化させた C3 転換酵素の活性を阻害し，SRBC の溶血を抑制した。さらに，試験に供した C3G 患者血清のほとんどで C3 分解を阻害した（Schubart et al. 2019）。

これらの結果から，LNP023 は PNH のみならず C3G，MPGN，及び aHUS といった AP 制御異常を伴う疾患に対しても治療効果を示す可能性がある。

Figure 2-2　C3G（C3GN 及び DDD），aHUS，及び MPGN 患者由来血清：LNP023 の SRBC 溶血阻害作用



Source：Table 2.6.3.1-RD-2020-00407

CP 及び LP を不活性化するために EGTA を添加した緩衝液に，溶媒（0.1%ジメチルスルホキシド）又は LNP023［150 nM，aHUS 由来血清の 1 例では 120 nM（赤の〇シンボルで示す）］を添加して，各患者由来の血清とともに氷冷下で 10 分間プレインキュベーションし，その後に SRBC を添加して 37°C，30 分間インキュベーションした。SRBC の溶血は 415 nm での吸光度の増加を指標に測定した。陰性対照として，CP，LP，及び AP を不活性化するために EDTA を添加した緩衝液を用いた。本試験のうち，C3G（C3GN 及び DDD）のデータは Schubart et al.（2019）に示されているが，aHUS 及び MPGN は示されていない。各ポイントは患者の個々のデータを，横線は平均値を示す。

2.2.3　aHUS 患者変異型 FB への結合及び阻害作用

aHUS は補体制御異常により発症し，先天性及び後天性の補体関連遺伝子変異が主にみられる（非典型溶血性尿毒症症候群診断基準改訂委員会 他 2015）。原因遺伝子の一つとして *FB* 遺伝子があり，これまでに 18 種類の点突然変異が報告され，aHUS 患者のうち約 3%～5%にこのいずれか一つの変異がみられる。18 種類の変異型 FB のうちのいくつかは C3 転換酵素活性の上昇をもたらすことから，このような変異型 FB に対する LNP023 の阻害活性を検討した[Table 2.6.3.1-RD-2022-00012]。

検討した変異型 FB について，LNP023 は Bb ドメインの酵素活性部位に結合してその活性を阻害することから，Bb ドメイン以外に変異があるもの及び公表文献において野生型 FB よりも活性が低いと報告されているものを 18 種類から除外し，残った 8 種類を検討した。遺伝子組換え技

術により得たこれらの変異型 FB を用いて，LNP023 の作用をいくつかの方法で評価した。まず，蛍光活性部位結合プローブ（NVP-CKJ036-DA-1）との置換を指標として，野生型 FB 及び変異型 FB に対する LNP023 の結合親和性を検討した。次に，野生型 FB 又は変異型 FB で構成されるサロゲート C3 転換酵素に対する LNP023 の阻害活性について C3a を ELISA 法で測定することにより検討した。サロゲート C3 転換酵素にはコブラ毒因子（C3 ホモログ）を用いた。さらに，*in vitro* での機能性評価試験により LNP023 の AP 阻害活性を検討した。FB を除去したヒト血清に野生型 FB 又は変異型 FB を添加し，ザイモザンコーティングプレート上で刺激した。阻害活性は MAC 形成量を ELISA 法で測定することにより検討した。

その結果，LNP023 は，野生型 FB 及び検討したすべての変異型 FB に対して同程度の親和性で結合した［解離定数（Kd）：野生型 FB 111 nM，変異型 FB 61～86 nM］。サロゲート C3 転換酵素の検討及び *in vitro* 機能性評価試験では，野生型 FB と同等以上の酵素活性を示した変異型 FB で，LNP023 による AP 活性化阻害が示された。なお，サロゲート C3 転換酵素の検討では 1 種類の変異 FB，*in vitro* 機能性評価試験では 2 種類の変異 FB で AP 活性化が認められない又は非常に低かったため，LNP023 の AP 活性化阻害作用が評価できなかった。

これらの結果は，*FB* 変異を有する aHUS 患者に対する治療法として，LNP023 の使用を支持するものと考えられた。

2.3 *In vivo* 薬理作用

2.3.1 機序検討モデル（マウス）

2.3.1.1 マウス LPS 誘発 AP 活性化モデル

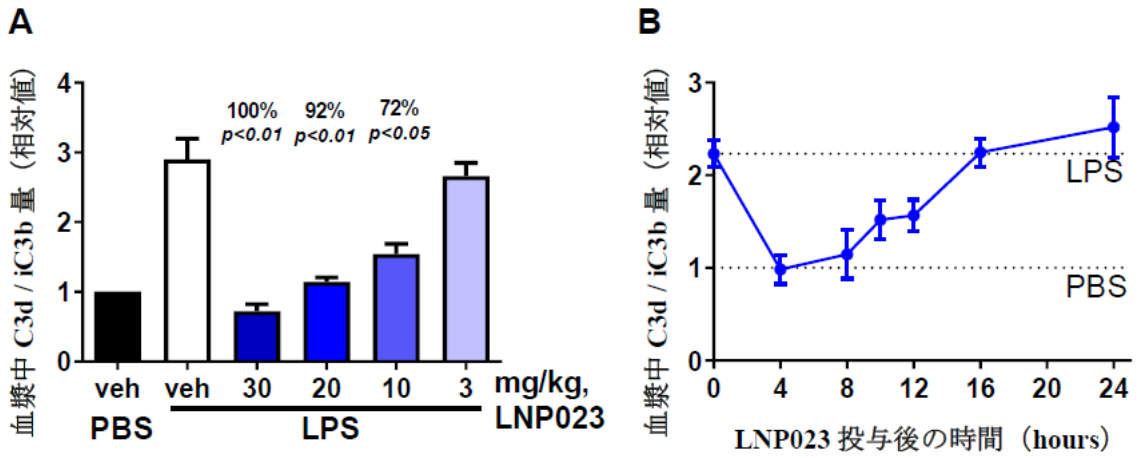
マウスにリポ多糖（LPS）を腹腔内投与すると AP 活性化を含む免疫応答が刺激され，用量及び時間依存的に血漿中で C3 フラグメント量の増加が生じる。本マウスを用いて *in vivo* における LNP023 の AP 阻害作用を検討した（[Table 2.6.3.1-RD-2015-00210]，Schubart et al. 2019）。

雌 C57BL/6 マウス（7 週齢，4～5 例／群）に LPS（50 µg）を腹腔内投与し，LPS 投与後 3.5 時間に 3，10，20，及び 30 mg/kg の LNP023 を強制経口投与し，さらに LNP023 投与後 4 時間（LPS 投与後 7.5 時間）に血漿を採取して LNP023 の用量反応性を評価した。また，作用持続時間を評価するために LNP023 曝露時間の異なる群（4～5 例／群）を設定し，各群それぞれ LNP023 30 mg/kg 投与後 4，8，10，12，16，又は 24 時間に血漿を採取した。いずれの群も LPS 投与は血漿採取から 7.5 時間前に行った。対照として，LPS の代わりにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を腹腔内投与し LNP023 の代わりに溶媒（0.5%メチルセルロース，0.5% Tween 80）を投与した陰性対照群（PBS／溶媒群）と LPS 及び溶媒を投与した陽性対照群（LPS／溶媒群）を設定し，同様に評価した。採取した血漿中の C3d 及び C3b の切断フラグメントである iC3b をウェスタンブロット法により検出し，蛍光強度を測定して AP 活性化の阻害作用を評価した。結果は PBS／溶媒対照群の蛍光強度との相対値で示した。

用量反応性の評価において，LPS／溶媒対照群の血漿中 C3d 及び iC3b（C3d / iC3b）量は，PBS／溶媒対照群と比較して約 2.8 倍増加した。LNP023 は血漿中 C3d / iC3b 量の増加を用量依存的に抑制し，10 mg/kg 以上の用量群で LPS／溶媒対照群と比べて有意差が認められた（Figure 2-3A）。最高用量の 30 mg/kg では血漿中 C3d / iC3b 量は PBS／溶媒対照群と同程度であり，LPS により誘発される血漿中 C3d / iC3b の生成は完全に阻害された（Figure 2-3A）。

作用持続時間を LNP023 30 mg/kg の用量で投与後 24 時間まで評価した結果，投与後 4 時間に最大抑制作用が認められ，血漿中 C3d / iC3b 量は PBS／溶媒対照群と同程度であり LPS／溶媒対照群に対する LNP023 投与群での阻害率は 101%であった。この阻害率は投与後 8 時間で 80%以上を維持しており，投与後 16 時間にはベースラインに戻った（阻害率：0%）（Figure 2-3B）。これらの結果を基に LNP023 の血漿中濃度から算出した AP 活性化阻害作用の EC50（IC50）値は 560 nM（236 ng/mL）及び EC90（IC90）値は 1120 nM（472 ng/mL）であった（Table 2-3）。

Figure 2-3　　マウス LPS 誘発 AP 活性化モデル：LNP023 の AP 活性化阻害作用



Source：Table 2.6.3.1-RD-2015-00210，Schubart et al. 2019

（A）LPS 腹腔内投与後 3.5 時間に 3，10，20，及び 30 mg/kg の LNP023 を経口投与し，LNP023 投与後 4 時間（LPS 投与後 7.5 時間）に血漿を採取した。対照群には，LPS の代わりにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を腹腔内投与し LNP023 の代わりに溶媒（0.5%メチルセルロース，0.5% Tween 80）を経口投与した陰性対照（PBS／溶媒）群と LPS 及び溶媒を投与した陽性対照（LPS／溶媒）群を設定し，LNP023 投与群と同じ時間に血漿を採取した。血漿中 C3d / iC3b はウェスタンブロット法により検出して蛍光強度を測定した。縦軸は PBS／溶媒を投与した対照群の蛍光強度に対する相対値を示した。結果は平均値 ± SEM（n = 4～5）で示した。検定方法：Student's t-test。veh：溶媒。

（B）LNP023 の作用持続時間を 30 mg/kg の経口投与後 24 時間まで検討した。LPS 投与から血漿採取までの時間を全群ですべて 7.5 時間になるようにして，LNP023 投与後 4，8，10，12，16，及び 24 時間に血漿を採取した。対照群の設定，血漿中 C3d / iC3b の測定，及び縦軸の表記は（A）と同様。PBS の点線：陰性対照群（PBS／溶媒群）の基準値：1 を示す。LPS の点線：陽性対照群（LPS／溶媒群）の相対値を示す。結果は平均値 ± SEM（n = 4～5）で示した。

Table 2-3 マウス LPS 誘発 AP 活性化モデル：LNP023 単回経口投与による AP 活性化阻害作用の IC50 及び IC90 値

試験方法	種	測定試料	IC50 nM ± SD	IC90 nM ± SD	試験番号
LPS 腹腔内投与	マウス	血漿 *in vivo*	560 ± 60	1120 ± 380	RD-2015-00210

Source：Table 2.6.3.1-RD-2015-00210

AP 活性化（血漿中 C3d / iC3b 生成量）を 50%（IC50）及び 90%（IC90）阻害する LNP023 の血漿中濃度。

2.3.2 病態モデル（マウス，ラット）

LNP023 の *in vivo* での効果を確認するために，疾患発症の主要因が補体活性化である 2 つのげっ歯類病態モデルを用いて検討した。

なお，PNH での検討は行わなかった。げっ歯類では *PIGA* 遺伝子を欠損させても赤血球の強い溶血は生じない。これはげっ歯類の赤血球表面にはヒトにはない補体制御因子［Crry（Molina et al. 1992）及び膜貫通ドメインを有する第二の CD55 アイソフォーム（Spicer et al. 1995）］が存在するためと考えられている。このため，薬理試験に適した PNH のげっ歯類モデルは存在しない。

2.3.2.1 マウス K/BxN 血清移入関節炎モデル

K/BxN マウスは関節炎を自然発症し，このマウス血清を健常マウスに移入すると関節炎が惹起される。このため，マウス K/BxN 血清移入関節炎モデルは，関節リウマチの動物モデルとして使用されている。本モデルの病態発症には AP 活性化が必須の要因であることから（Ji et al. 2002），本モデルを用いて LNP023 の *in vivo* での効果を検討した（Schubart et al. 2019）。

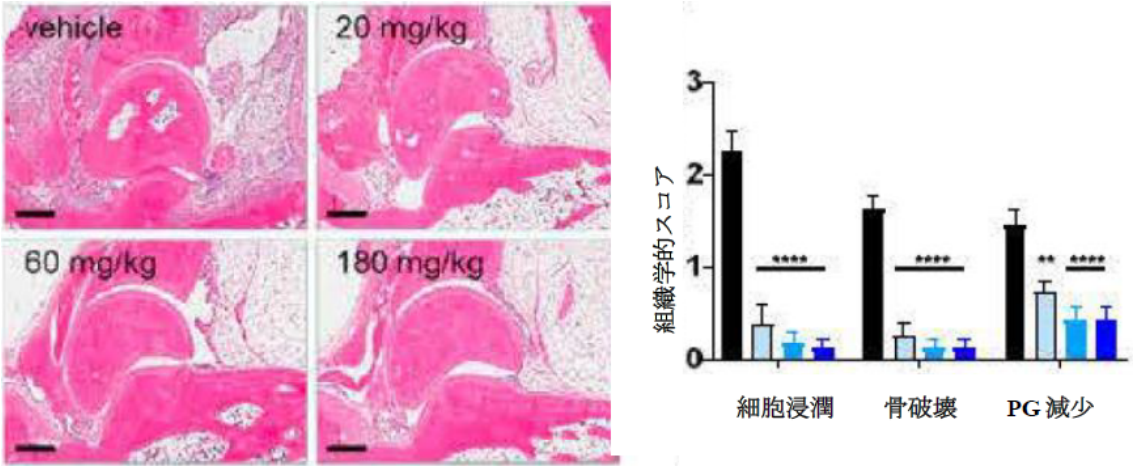
K/BxN マウスの血清（150 µL）を C57BL/6 マウスに静注して関節炎を惹起させた。溶媒（0.5%メチルセルロース，0.5% Tween 80）及び LNP023（20，60，及び 180 mg/kg）を 1 日 2 回，12 時間間隔で強制経口投与した（8 例／群）。溶媒及び LNP023 の投与は K/BxN 血清投与前 1 時間から開始し，6 日目（試験終了日）まで継続した。LNP023 投与 1，4，5，及び 6 日目に後肢の炎症症状を観察してスコア化した（関節炎スコア，後肢中足部及び関節について，0：所見なし，1：発赤を伴う軽度の腫脹，2：より広範囲の腫脹，3：強直又は重度の腫脹の 4 段階評価）。6 日目に後肢を採取して切片化し病理組織学的解析を行った。組織切片を用いてヘマトキシリン-エオジン（H&E）染色及びサフラニン O 染色を行い，炎症性細胞浸潤，骨破壊，及びプロテオグリカン（PG）の減少をスコア化した（組織学的スコア，0：所見なし～3：重度の変化）。関節炎及び組織学的スコアを基に LNP023 による関節炎の抑制作用を評価した。また，6 日目に前肢を採取して関節内の Ba，C3d，及び C5a 量を測定し，補体活性化への影響を検討した。

K/BxN 血清投与 1 日目から溶媒対照群で関節炎スコアの上昇がみられ，5 日目にピークに達した。LNP023 のすべての用量群で 4 日目以降の関節炎スコアは低く，溶媒対照群との比較で有意差が認められた。60 及び 180 mg/kg の用量群では投与期間を通して関節炎スコアの変化はほぼ認められず，関節炎の進行は完全に抑制された。さらに，6 日目の前肢関節内 Ba，C3d，及び C5a

量は，LNP023 のすべての用量群で溶媒対照群と比べて低く，補体活性化の抑制が確認された。後肢関節の病理組織学的解析（Figure 2-4A）では，LNP023 のすべての用量群で組織学的スコアが低く，炎症性細胞の浸潤，骨破壊，及び PG の減少を有意に抑制することが示された（Figure 2-4B）。

これらの結果から，AP 活性化が発症に必須の要因である本関節炎モデルにおいて，LNP023 は炎症組織での補体活性化を強力に抑制し，病態進行を抑制することが示された。

Figure 2-4　　マウス K/BxN 血清移入関節炎モデル：LNP023 の関節炎抑制作用



Source：Schubart et al. 2019

（左図）LNP023 経口投与後 6 日目の関節の H&E 染色組織像の代表例（スケールバー：400 µm）

（右図）LNP023 経口投与後 6 日目の関節における炎症性細胞浸潤，骨破壊，及び PG の減少（サフラニン O 染色組織像で評価）を評価した組織学的スコア。組織学的スコアは 0（正常）～3（重度の変化）を基準として盲検下で評価した。■：溶媒対照群，■：LNP023（20 mg/kg b.i.d.），■：LNP023（60 mg/kg b.i.d.），■：LNP023（180 mg/kg b.i.d.）。平均値 ± SEM （8 例／群）を示す。

溶媒対照群に対する有意差，**$p < 0.01$，****$p < 0.0001$（Dunnett の多重比較検定）

2.3.2.2　ラット受動的ヘイマン腎炎モデル

受動的ヘイマン腎炎モデルは，病因抗体である抗 Fx1A（腎皮質から採取した尿細管上皮画分）抗体をラットに投与することで誘導され，膜性腎症及び糸球体腎炎の病態モデルとして用いられており，この腎炎発症には補体活性化が必須である（Cybulsky et al. 1986）。本モデルを用いて，LNP023 の *in vivo* での効果を検討した（[Table 2.6.3.1-DIS R1720571]，[Table 2.6.3.1-DIS R1820106a]）。本検討では病因抗体としてヒツジ抗ラット Fx1A 血清を用いた。

雄 Sprague-Dawley 系ラット（7 週齢，9 例／群）にヒツジ抗ラット Fx1A 血清（5 mL/kg）を静脈内投与した（day 0）。溶媒（0.5%メチルセルロース，0.5% Tween 80）又は LNP023 を 1 日 2 回，12 時間間隔で強制経口投与した。投与は day 0 の抗 Fx1A 血清投与前 1 時間，又は day 6 から開始して day 14（試験終了日）まで継続し，発症前から投与したとき（予防的投与，LNP023 20 及び 60 mg/kg）の LNP023 の腎炎発症に対する予防効果，及び発症後から投与を開始したとき

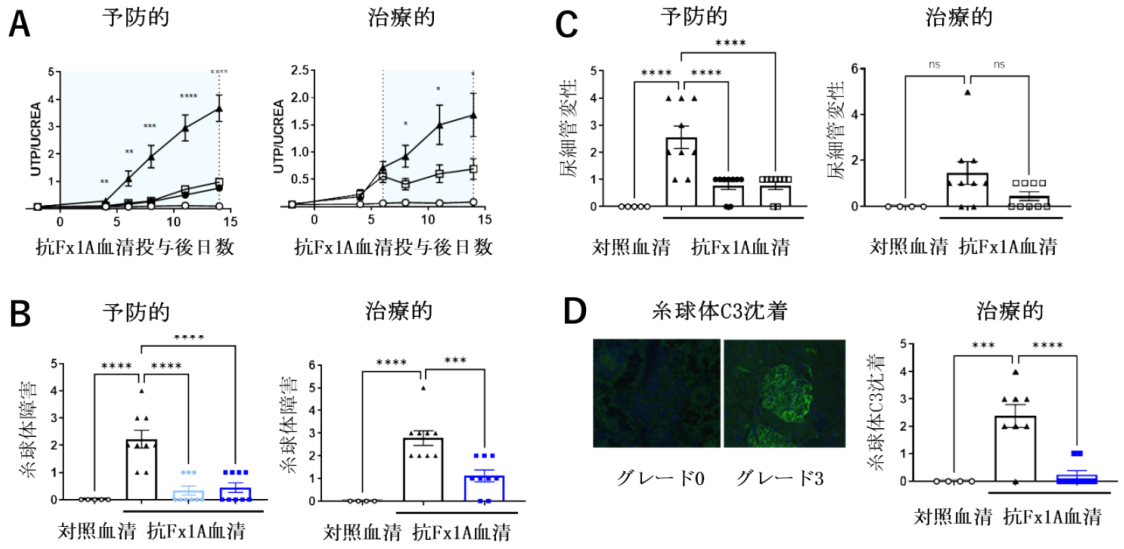
（治療的投与，LNP023 60 mg/kg）の LNP023 の治療効果を評価した。腎炎を発症しない陰性対照として対照血清を静脈内投与し同様に評価した（4～5 例）。抗 Fx1A 血清投与 2 日前及び投与後 day 4，6，8，11，及び 13（治療的投与）又は day 14（予防的投与）に尿を採取し，クレアチニン，アルブミン，及び総タンパク質を測定し，タンパク尿の発現を尿中総タンパク質（UTP）と尿クレアチニン（UCREA）の比率で示した。治療的投与では抗 Fx1A 血清投与後 day 14，予防的投与では抗 Fx1A 血清投与後 day 15 に腎臓を摘出して切片化し病理組織学的解析を行った。H&E 染色した組織切片から腎炎の重症度［糸球体障害（糸球体肥大，基底膜及びボーマン嚢の肥厚，並びにポドサイト肥大／円形化）及び尿細管変性］をスコア化して評価した。また，抗 C3 抗体で免疫染色した組織切片から糸球体への C3 沈着を Figure 2-5D の左図に示したグレードを基準に評価した。

予防的投与の検討において，溶媒対照群では陰性対照群と比べて抗 Fx1A 血清投与後 day 4 に UTP / UCREA 比のわずかな上昇が認められ，day 6 で明らかな上昇になり，その後 day 14 まで上昇し続けた。LNP023 20 及び 60 mg/kg の予防的投与により，抗 Fx1A 血清投与後 day 4 から UTP / UCREA 比の上昇抑制が認められ，タンパク尿の発現は強く抑制され，day 4 から day 14 にかけて有意差が認められた（Figure 2-5A 左）。治療的投与において，溶媒対照群では UTP / UCREA 比は予防的投与の試験と同様の推移で上昇した。タンパク尿発現が明らかに認められた抗 Fx1A 血清投与後 day 6 から 60 mg/kg を治療的に投与すると，抗 Fx1A 血清投与後 day 8 から UTP / UCREA 比の上昇が持続的に有意に抑制され，病態進行は投与後直ちに抑制された（Figure 2-5A 右）。

病理組織学的解析において，溶媒対照群では，陰性対照群と比べて糸球体障害及び尿細管変性のスコアが上昇した（Figure 2-5B 及び Figure 2-5C）。LNP023 の予防的（20 及び 60 mg/kg）及び治療的（60 mg/kg）投与により，糸球体障害及び尿細管変性のスコアは溶媒対照群と比べて低下し，予防的投与での糸球体障害及び尿細管変性スコア，並びに治療的投与での糸球体障害スコアで有意差が認められた（Figure 2-5B 及び Figure 2-5C）。さらに，治療的投与の溶媒対照群では，陰性対照群と比べて糸球体への有意な C3 沈着が認められたが，LNP023（60 mg/kg）投与により糸球体への C3 沈着は溶媒対照群と比べて有意に減少した（Figure 2-5D）。LNP023 投与群では，ほとんどの動物で糸球体への C3 沈着がみられなかったことから，LNP023 投与により補体活性化がほぼ完全に抑制されたものと考えられた。

これらの結果から，自己抗体誘発ラットモデルにおいて，LNP023 は腎臓での AP 活性を阻害し，糸球体疾患の進行を抑制したと考えられる。

Figure 2-5　　ラット受動的ヘイマン腎炎モデル：LNP023 の発症予防及び治療効果



Source：Table 2.6.3.1-DIS R1720571，Table 2.6.3.1-DIS R1820106a

NP023 を抗 Fx1A 血清投与前 1 時間から予防的に，又は抗 Fx1A 血清投与後 day　6 午前中から治療的に 1 日 2 回，12 時間間隔で経口投与した。○：陰性対照群（対照血清投与），▲：溶媒対照群，水色のバー／●シンボル：LNP023（20 mg/kg b.i.d.），青色のバー／□シンボル：LNP023（60 mg/kg b.i.d.）。

（A）LNP023 の予防的及び治療的投与でのタンパク尿の発現の抑制。縦軸は尿中総タンパク質（UTP）と尿クレアチニン（UCREA）の比率を示す。横軸は抗 Fx1A 血清投与後の日数を示す。水色で示したエリアは投与期間を示す。

（B）LNP023 の予防的及び治療的投与での糸球体障害の抑制。治療的投与では抗 Fx1A 血清投与後 day 14，予防的投与では抗 Fx1A 血清投与後 day 15 に腎臓を摘出して切片化し，H&E 染色して病理組織学的解析を行った。糸球体障害（糸球体肥大，基底膜及びボーマン嚢の肥厚，並びにポドサイト肥大／円形化）をスコア化して評価した（1：軽微，2：軽度，3：中程度，4：顕著，5：重度の 5 段階評価）。縦軸は糸球体障害のスコアを示す。

（C）LNP023 の予防的及び治療的投与での尿細管変性の抑制。方法及び評価は（B）に同じ。縦軸は尿細管変性のスコアを示す。

（D）LNP023 の治療的投与での糸球体への C3 沈着の抑制。左：糸球体への C3 沈着の組織学的染色像の代表例（グレード 0 及び 3）。右：治療的投与後 day 14 における糸球体への C3 沈着の抑制。抗 Fx1A 血清投与後 day 14 に腎臓を摘出して切片化し，抗 C3 抗体で免疫染色して病理組織学的解析を行った。糸球体への C3 沈着を左図に示したグレードを基準にスコア化して評価した。

結果は平均値 ± SEM で示した（n = 4～9／群）。シンボルは個別値を示す。

溶媒対照群に対する有意差，*p < 0.05，**p < 0.01，***p < 0.001，****p < 0.0001（Dunnett の多重比較検定）

これら 2 つの病態モデルの結果から，LNP023 は異なる標的臓器において AP を強力に阻害し，AP 関連疾患の進行又は発症を強く抑制することが示唆された。

2.4　その他の薬理試験

2.4.1　薬物動態と薬力学の関連性

反復投与毒性試験期間中の AP 阻害作用について検討した。

2.4.1.1 毒性試験での血漿中トラフ濃度と *in vitro* 薬理試験における IC50 及び IC90 値との比較

毒性試験に供した動物で LNP023 投与期間中に AP が阻害されていた状態であったかを検討するために，反復投与毒性試験における最終投与後 24 時間の血漿中 LNP023 曝露量と，*in vitro* 薬理試験におけるザイモザンアッセイ（各動物種の 50%血清存在下）で得られた IC50 及び IC90 値とを比較した（Table 2-4）。

ラット（13 及び 26 週間）及びイヌ（13 及び 39 週間）の反復投与毒性試験において，2 つの高用量群（ラット：150 及び 500 又は 750 mg/kg/日，イヌ：30 及び 150 mg/kg/日）での血漿中 LNP023 トラフ濃度は，それぞれの動物種での IC90 値を上回っていた。最低用量（ラット：50 mg/kg/日，イヌ：5 mg/kg/日）でのトラフ濃度は，概ね IC90 値を下回っていた。

これら IC90 値との比較から，ラットでは 150 mg/kg/日以上及びイヌでは 30 mg/kg/日以上の投与量で，試験期間を通して AP は完全に阻害されていると考えられた。

Table 2-4 毒性試験での血漿中トラフ濃度と *in vitro* 薬理試験での IC50 及び IC90 値との比較

試験	試験期間（週）	投与量（mg/kg/日）	24 時間後トラフ濃度（ng/mL）平均値 ± SD	*In vitro* IC90 / IC50 値（ng/mL）平均値 ± SD	トラフ濃度での予測阻害レベル
(1570195)	13	50 mg	180 ± 45		< 20%
TK in male rat	13	150 mg	790 ± 120		> 90%
(Crl:WI(Han))	13	500 mg	1300 ± 370		> 90%
(1570193)	26	50 mg	930 ± 670		> 50%
TK in male rat	26	150 mg	1000 ± 40	ラット	> 90%
(Crl:WI(Han))	26	750 mg	4450 ± 1560	IC90 値：520 ± 490	> 90%
(1570195)	13	50 mg	280 ± 200	IC50 値：240 ± 100	> 50%
TK in female rat	13	150 mg	540 ± 160		> 90%
(Crl:WI(Han))	13	500 mg	1450 ± 330		> 90%
(1570193)	26	50 mg	240 ± 40		~ 50%
TK in male rat	26	150 mg	540 ± 210		> 90%
(Crl:WI(Han))	26	750 mg	2550 ± 530		> 90%
(1570194)	13	5 mg	580 ± 380		> 50%
TK in male dog (Beagle)	13	30 mg	1990 ± 460		> 90%
	13	150 mg	8550 ± 3500		> 90%
(1570192)	39	5 mg	650 ± 40		~ 90%
TK in male dog (Beagle)	39	30 mg	2290 ± 900	イヌ	> 90%
	39	150 mg	8430 ± 3750	IC90 値：650 ± 430	> 90%
(1570194)	13	5 mg	580 ± 310	IC50 値：170 ± 110	> 50%
TK in female dog	13	30 mg	1780 ± 450		> 90%
(Beagle)	13	150 mg	5710 ± 1610		> 90%
(1570192)	39	5 mg	420 ± 150		> 50%
TK in female dog	39	30 mg	1830 ± 770		> 90%
(Beagle)	39	150 mg	4780 ± 3180		> 90%

ラットの 13 及び 26 週間反復投与毒性試験（それぞれ Table 2.6.7.7B-1570195 及び Table 2.6.7.7C-1570193），並びにイヌの 13 及び 39 週間反復投与毒性試験（それぞれ Table 2.6.7.7E-1570194 及び Table 2.6.7.7F-1570192）における最終投与 24 時間後のトラフ濃度を使用した。これらのトラフ濃度を *in vitro* 試験（Table 2.6.3.1-RD-2014-00521 及び Table 2.6.3.1-RD-2017-00357）から得られた IC50 及び IC90 値と比較した。

2.4.1.2 毒性試験で採取した血清を用いた *ex vivo* での補体阻害作用

ラットの 26 週間反復投与毒性試験[Table 2.6.7.7C-1570193]，成熟イヌの 39 週間反復投与毒性試験[Table 2.6.7.7F-1570192]，及び幼若イヌの 52 週間反復投与毒性試験[Table 2.6.7.15B-1870009]において，LNP023 の最終投与後 24 時間における血清中の AP 阻害作用をザイモザン刺激で誘導される MAC 形成の阻害を指標に *ex vivo* で測定した。

測定法確立中にラット血清で安定した結果が得られたが，ラット 26 週間反復投与毒性試験での溶媒投与群の血清では明らかな AP 活性化は認められず，評価ができなかった。これは，サンプリング，貯蔵，又は輸送中に何らかの刺激が加わり検体中で補体系が活性化して補体成分が枯渇したためと考えられたが，原因は不明であった[Table 2.6.3.1-RD-2019-00023]。

成熟イヌにおいて，溶媒投与群の血清での AP は *ex vivo* で効率的に活性化され，30 mg/kg/日以上の LNP023 投与群では AP 活性化は完全に阻害されたことから，試験を通して AP は完全に阻害されていたことが示唆された[Table 2.6.3.1-RD-2018-00505]。一方，5 mg/kg/日の LNP023 投与群では，AP 活性化は部分的な阻害に留まっていた。幼若イヌの 52 週間反復投与毒性試験においても同様に，30 及び 150 mg/kg/日の LNP023 投与群で AP 活性化はほぼ完全に阻害され，5 mg/kg/日では部分的な阻害であったことが確認された[Table 2.6.3.1-RD-2020-00544]。

これらの結果は，イヌ反復投与毒性試験における 30 mg/kg/日以上の LNP023 投与群において，AP 活性は 24 時間の投与間隔を通して完全に阻害されていたと考えられ，Table 2-4 にまとめた *in vitro* 試験から予想された AP 阻害作用と一致するものであった。このイヌの結果から，*in vitro* で測定された IC90 値は，サンプリング手順や検体保存の影響を受けやすい *ex vivo* アッセイの代用として有効であると考えられた。上述のとおり，ラット 26 週間反復投与毒性性試験の検討では評価ができなかったが，LNP023 の血漿中トラフ濃度と *in vitro* 試験で得た IC90 値との比較に基づくと，ラット反復投与毒性試験において，LNP023 により AP が完全に阻害されていたと推測できる（Table 2-4）。

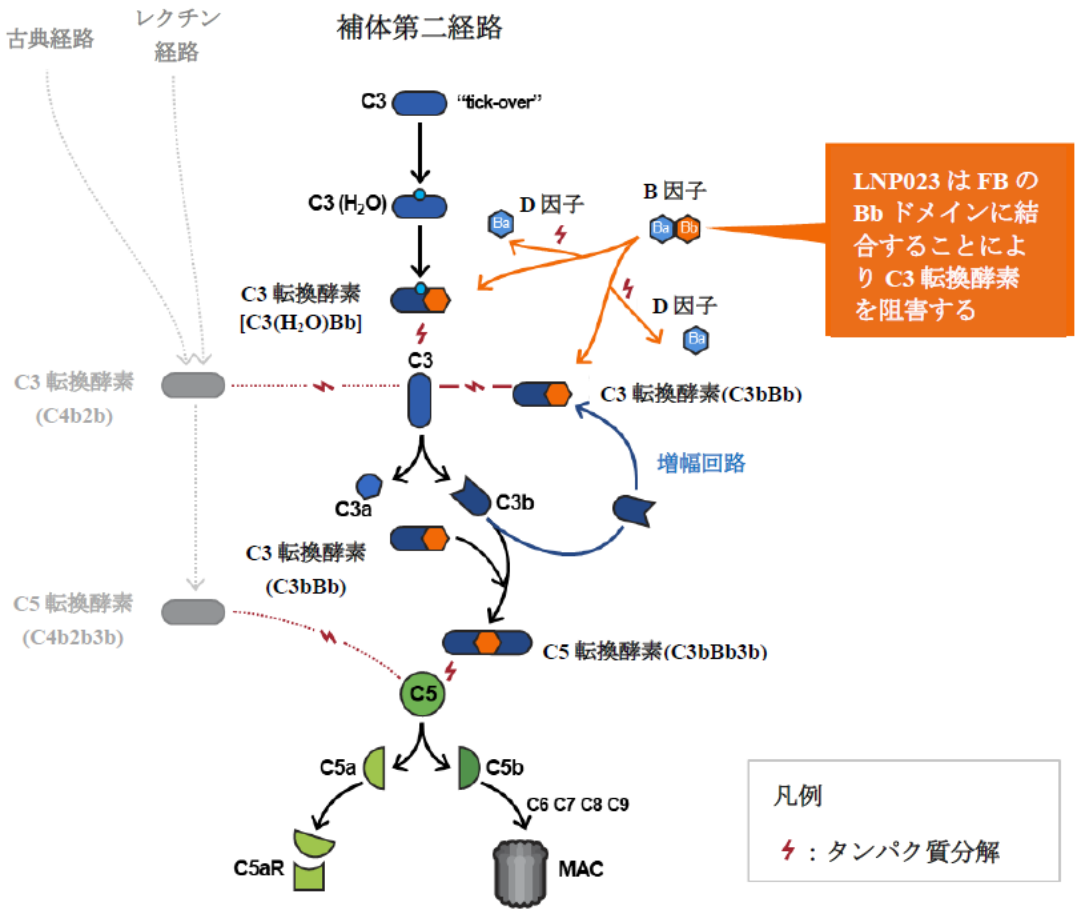
2.5 作用機序

LNP023 の作用機序を Figure 2-6 に示した。

LNP023 は，強力かつ選択的な FB 阻害剤である。上述のとおり FB は AP の主要なプロテアーゼであり，Bb ドメインにその活性を有している。FB はまず C3b 又は C3(H_2O)に結合するがこの状態では不活性型である。補体 D 因子（FD）により C3b 又は C3(H_2O)に結合した FB がタンパク質分解を受け Bb となり，活性型である C3 転換酵素（C3bBb 又は C3(H_2O)Bb）が生成される。LNP023 は FB 及び Bb の活性部位に結合してその活性を阻害することにより，C3 転換酵素を阻害し C3 の C3a 及び C3b への分解を抑制する。これにより，C3 の増幅回路の活性化，C3 フラグメ

ントによる細胞のオプソニン化，C5 転換酵素及び MAC（C5b-9）の形成，並びにアナフィラトキシンである C3a 及び C5a の生成が阻害される（Schubart et al. 2019）。LNP023 は CP と LP の増幅も抑制するが，これらのカスケード反応に直接影響しない。

Figure 2-6　　LNP023 の作用機序：補体第二経路及び増幅回路の阻害作用



3 つの補体経路と FB 及び C3 の増幅回路について示す。LNP023（Iptacopan）は FB 及び Bb（オレンジ色の六角形）の活性部位に結合して C3 転換酵素（3bBb，C3(H_2O)Bb）を阻害するが，古典経路とレクチン経路のカスケード反応に直接影響しない。

3　　副次的薬理試験

In vitro 試験では，LNP023 の選択性プロファイル，FB 阻害による細菌感染リスク及び B 細胞応答への影響について検討した。*In vivo* 試験では，T 細胞依存性 B 細胞応答に対する LNP023 の影響を 2 種類のげっ歯類モデルを用いて検討した。

In vitro 試験の結果は，LNP023 濃度を µM だけでなく ng/mL の値を併記し，臨床試験で得られた LNP023 の Cmax と比較した。*In vitro* 選択性試験は無血清／無血漿の条件下で実施したことか

ら，比較には臨床用量である 200 mg を 1 日 2 回投与したときの非結合型 LNP023 の Cmax に換算した値（763 ng/mL，1.8 µM）を用いた[DMPK R2200449]。

3.1 *In vitro* 副次的薬理試験

3.1.1 *In vitro* 選択性

主要なプロテアーゼファミリーを含むヒトプロテアーゼアッセイパネルを用いて，LNP023 の選択性を検討した[Table 2.6.3.1-RD-2015-00230]，[Table 2.6.3.1-DIS R1720165]。LNP023 は，ヒト FB に対して高い親和性を示し，レポーターリガンドの FB への結合阻害を指標とした IC50 値は 0.0096 µM（4 ng/mL）であり，ヒト FD に対しては 100 µM（42200 ng/mL，ヒト非結合型 Cmax の 55 倍）までの濃度でも阻害活性は認められなかった。42 種類のプロテアーゼ（メタロプロテアーゼ，アスパラギン酸プロテアーゼ，システインプロテアーゼ，及びセリンプロテアーゼ）に対する LNP023 の IC50 値は 100 µM より高く，阻害活性を示さなかった。

さらに 100 以上の標的外分子（G タンパク質共役受容体，トランスポーター，イオンチャネル，核内受容体，及び酵素）に対する活性について標識リガンド結合試験等で検討した。LNP023 は，少なくとも 30 µM（12660 ng/mL，ヒト非結合型 Cmax の約 17 倍）の濃度まで，いずれの分子にも明らかな活性を示さなかった。多くの分子に対して 100 µM まで濃度を上げて検討したが，有意な活性はみられなかった[Table 2.6.3.1-RD-2015-00689]，[Table 2.6.3.1-RD-2020-00450]。

また，31 種類のキナーゼパネルを用いた TR-FRET 法等で *in vitro* 活性を検討した[Table 2.6.3.1-RD-2019-00018]。その結果，ATP 結合部位を有する哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mTOR，IC50 = 9.9 µM，4178 ng/mL，ヒト非結合型 Cmax の約 5 倍）以外のキナーゼに対しては，10 µM まで影響はみられなかった。mTOR はホスファチジルイノシトール 3 リン酸キナーゼ関連タンパク質キナーゼであり，栄養状態や成長因子に応答した細胞増殖の制御に関与している（Yang et al. 2013）。しかしながら，非臨床毒性試験で認められた変化と *in vitro* での mTOR 阻害作用との関連は明らかではなかった。

3.1.2 莢膜形成細菌の *in vitro* 殺菌作用への影響

AP を構成する成分を遺伝的に欠損するヒトでは，莢膜形成細菌の感染リスクが増加する（Schröder-Braunstein and Kirschfink 2019，Gauthier et al. 2021，Langereis et al. 2021）。そこで，莢膜形成細菌として知られる 3 種類の細菌［髄膜炎菌：*Neisseria meningitidis*，肺炎球菌：*Streptococcus pneumoniae*，インフルエンザ菌 b 型（Hib）：*Haemophilus influenzae* type b］について，これらワクチンの接種前後の被験者血清又は血液を用いて細菌への補体による殺菌作用に及ぼす LNP023 の影響を，FD 阻害薬［ノバルティス社内で合成（Schubart et al. 2019）］，C3 阻害薬（CP-40），抗 C5 抗体薬（tesidolumab），及び抗 MASP-2 抗体薬と比較検討した（Ispasanie et al. 2021，Muri et al. 2021，Muri et al. 2022）。なお，MASP-2 は LP の主要なプロテアーゼであり，抗 MASP-2 抗体薬により LP 活性化が阻害される。

3.1.2.1 髄膜炎菌

髄膜炎菌の検討では，髄膜炎菌ワクチン（Menveo）の接種前及び接種後（接種後 2 週間及び 2 ヵ月）に採取した 5 例の被験者の血清を用いて，髄膜炎菌に対する血清殺菌作用への補体阻害薬の影響を検討した（Ispasanie et al. 2021）。髄膜炎菌は通常，菌体表面に形成された MAC により溶菌され，この無細胞系アッセイでも同様に MAC 形成を介して殺菌される。なお，Menveo は血清型 A，C，Y，及び W-135 の 4 価髄膜炎菌ワクチンであり，本邦では未承認である。

髄膜炎菌ワクチン接種前後の 20%血清，並びに髄膜炎菌を含有する反応混液に各種補体阻害薬を添加して，37°C，60 分間インキュベーションした後に，生菌数をコロニー形成単位（CFU）で測定した。阻害薬とインキュベーションしていないときの生菌数を基準に細菌の生存率を算出した。補体阻害薬として LNP023（0.05～25 µM），FD 阻害薬（0.05～25 µM），C3 阻害薬（1～100 µg/mL），抗 C5 抗体薬（1～100 µg/mL），及び抗 MASP-2 抗体薬（1～200 µg/mL）を用いた。試験はワクチン接種前後の各血清を用いて 4 種の血清型それぞれに対して評価を行い，結果には得られた個別値を各阻害薬別にまとめて示した。

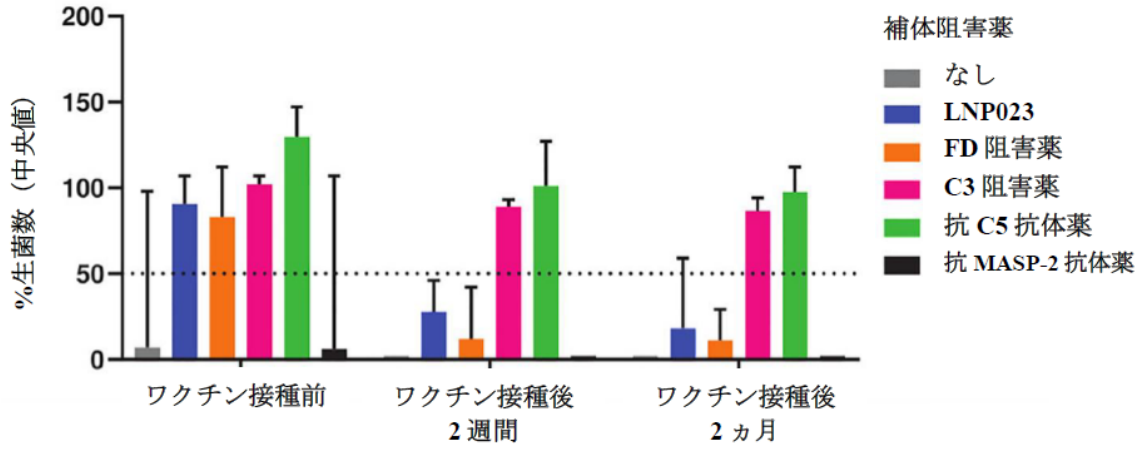
ワクチン接種前の血清において，補体阻害薬非存在下では殺菌作用が働き，60 分間のインキュベーションで 90%以上の髄膜炎菌が死滅した（Figure 3-1，左，灰色のバー）。LNP023，FD 阻害薬，及び C3 阻害薬の存在下では殺菌作用が示されず，髄膜炎菌の生存率にほとんど変化はなかった（それぞれ青色，オレンジ色，及び赤色のバー）。抗 C5 抗体薬では殺菌作用が減弱し，生存率が約 30%増加した（緑色バー）。抗 MASP-2 抗体薬では，阻害薬非存在下のときと同様に殺菌作用が働き髄膜炎菌が死滅した（黒色のバー）。ワクチン接種後 2 週間及び 2 ヵ月に採取した血清では（Figure 3-1，中央図及び右図）殺菌作用が認められ，補体阻害薬非存在下及び抗 MASP-2 抗体薬存在下で髄膜炎菌はほぼ完全に死滅した（灰色及び黒色のバー）。LNP023 存在下においても殺菌作用が認められ，ワクチン接種後 2 週間及び 2 ヵ月にそれぞれ約 75%及び 85%の髄膜炎菌が死滅し（中央図及び右図の青色バー），FD 阻害薬も同様であった。一方，C3 阻害薬及び抗 C5 抗体薬の存在下では，殺菌作用は認められなかった（中央図及び右図の赤色及び緑色バー）。

また，各被験者血清を用いて 4 種の血清型に対する抗体価をそれぞれ測定したところ，ワクチン接種により概ね抗体価が上昇していたものの，いくつかの血清型に対してワクチン接種後であっても抗体価が低かった。このワクチン接種後でも抗体価が低い血清で，LNP023 は血清殺菌作用を減弱させた。

以上の結果から，LNP023 は，ワクチン未接種血清において髄膜炎菌に対する血清殺菌作用を減弱させた。しかしながら，ワクチン接種により抗体価が得られていれば，LNP023 により AP が阻害された状態においても血清殺菌作用は保たれた。これは菌に対する特異的抗体が CP を活性化して MAC 形成を誘導することで髄膜炎菌を殺菌するためと考えられた。一方，C3 及び C5 の阻害では，抗体価にかかわらず髄膜炎菌を殺菌できなかった。これは，C3 阻害では C3 転換酵素及び C5 転換酵素の生成が阻害されることにより，C5 阻害では C5 の分解が阻害されることに

より，MAC 形成が抑制されるためと考えられた。なお，抗 MASP-2 抗体薬の結果から，髄膜炎菌に対する血清殺菌作用には LP は重要でないと考えられた。

Figure 3-1　　髄膜炎菌：ワクチン接種前後の血清での生存率に及ぼす補体阻害薬の影響



Source：Ispasanie et al. 2021

髄膜炎菌ワクチンの接種前及び接種後（接種後 2 週間及び 2 ヵ月）に採取した 5 例の被験者の血清（20%），並びに髄膜炎菌を含有する反応混液に各種補体阻害薬を添加して，37°C，60 分間インキュベーションした後に生菌数を測定した。阻害薬とのインキュベーションなしのときの生菌数を基準に細菌の生存率を算出した。

結果は，3 回の試行で得られた 5 例のデータの中央値を示す。水平の点線は，37°C，60 分間インキュベーション後の細菌の 50%生存率を示す。

3.1.2.2　肺炎球菌

肺炎球菌の検討では，13 価肺炎球菌結合型ワクチン（販売名：プレベナー13，ファイザー社）の未接種又は接種済みの被験者から採取した血清を用いて，肺炎球菌に対する殺菌作用への補体阻害薬の影響を検討した（Muri et al. 2021）。肺炎球菌は C3b が菌体表面に沈着しオプソニン化されて貪食作用を受け殺菌される。本検討においてもこのオプソニン化による殺菌作用を評価した。

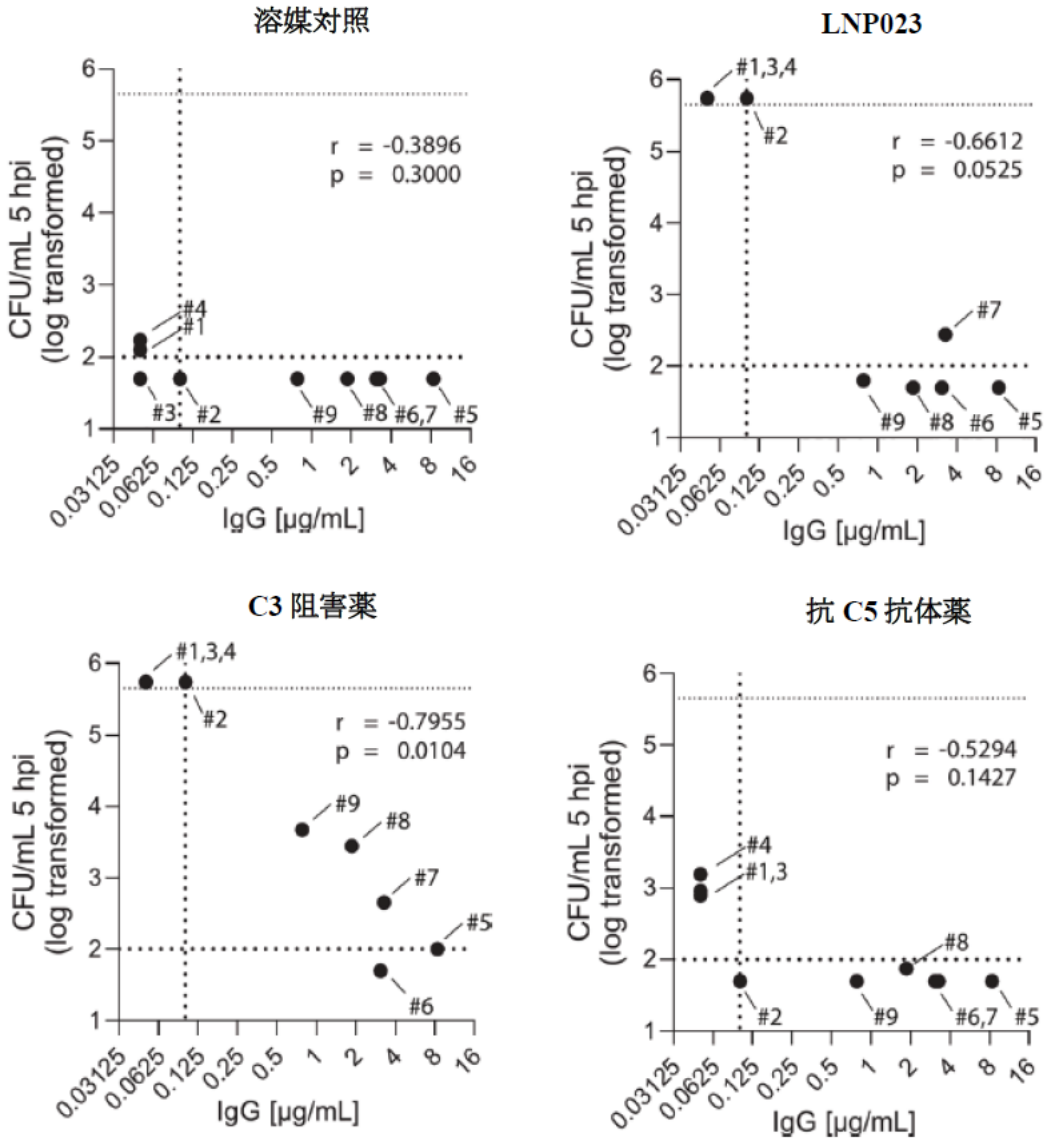
健常被験者から採取した血液から血球を分離し，これとワクチン未接種又は接種済みの被験者から採取した血清及び各種補体阻害薬を加え，さらに肺炎球菌を添加して 5% CO_2 存在下で 37°C，5 時間インキュベーションした。生菌数（CFU）を測定して，オプソニン化による殺菌作用への各種補体阻害薬の影響及び血清中の莢膜特異的 IgG 濃度との相関性を評価した。健常被験者由来血球は貪食細胞の供給源として添加している。補体阻害薬として，LNP023（10 µM），C3 阻害薬（50 µg/mL），抗 C5 抗体薬（50 µg/mL），FD 阻害薬（10 µM），及び抗 MASP-2 抗体薬（50 µg/mL）を用い，溶媒対照として PBS を用いた。

溶媒対照群では，被験者血清と肺炎球菌を 5 時間インキュベーションしたとき，ワクチン未接種（被験者番号#1～4）及びワクチン接種（被験者番号#5～9）いずれの血清でも生菌数は検出下限以下に減少し，殺菌作用が認められた（Figure 3-2，溶媒対照）。LNP023 又は C3 阻害薬の存

在下では，ワクチン未接種血清では殺菌作用が示されず，肺炎球菌の増殖を抑制できなかった（Figure 3-2，LNP023 及び C3 阻害薬）。このことから，オプソニン化による肺炎球菌の殺菌は AP に依存していると考えられた。一方，ワクチン接種血清では，肺炎球菌に対する抗体価が得られており，LNP023 存在下でも肺炎球菌は殺菌された（Figure 3-2，LNP023）。しかしながら，C3 阻害薬存在下では，抗体価の低いワクチン接種血清では肺炎球菌は完全に殺菌されず，抗体価と殺菌作用の間に相関性が認められた（Figure 3-2，C3 阻害薬）。抗 C5 抗体薬では，ワクチン未接種血清で殺菌作用のわずかな減弱がみられたものの，ワクチン接種血清では殺菌作用への影響はみられなかった（Figure 3-2，抗 C5 抗体薬）。なお，Figure 3-2 には示されていないが，FD 阻害薬存在下での結果は LNP023 と同様であった。また，抗 MASP-2 抗体薬存在下では，ワクチン接種状況にかかわらず概ね殺菌された。

以上の結果から，LNP023 はワクチン未接種のとき，肺炎球菌のオプソニン化による貪食作用を阻害した。しかしながら，ワクチン接種により抗体価が得られていれば，LNP023 存在下においても，この作用は保たれていた。これは菌に対する特異的抗体が CP を活性化して，若しくは貪食細胞の Fc 受容体を介して，貪食作用を誘導するためと考えられた。一方，C3 阻害では抗体価が高いほど貪食作用は高く，抗体価が低ければ作用は減弱した。上述のとおり，C3 阻害では C3 転換酵素及び C5 転換酵素生成が阻害されることから CP 活性化の関与はなく，菌特異的抗体と貪食細胞の Fc 受容体との結合を介して貪食作用が誘導されるためと考えられた。また C5 阻害では作用への影響はない，若しくは限定的であった。C5 阻害では MAC 形成が阻害されるが，C3 フラグメント生成は保たれることから，肺炎球菌の殺菌には C3 フラグメント生成が重要であることが確認された。なお，抗 MASP-2 抗体薬の結果から，肺炎球菌の殺菌には LP は重要でないと考えられた。

Figure 3-2　　肺炎球菌：補体阻害薬存在下での殺菌作用と抗体濃度の相関



Source：Muri et al. 2021

健常被験者の血液から血球を分離し，これに肺炎球菌に対するワクチン未接種又は接種済みの被験者から採取した血清及び各種補体阻害薬を添加して室温で 5 分間インキュベーションした。さらに肺炎球菌を添加して 5% CO_2 存在下で 37°C，5 時間インキュベーションした後，生菌数（CFU）を測定して，貪食作用への各種阻害薬の影響及び被験者由来血清中の莢膜特異的 IgG 濃度との相関性を評価した。補体阻害薬として LNP023，C3 阻害薬（CP-40），抗 C5 抗体薬（tesidolumab），FD 阻害薬，及び抗 MASP-2 抗体薬を用い，溶媒対照として補体阻害薬の代わりに PBS を用いた。なお，FD 阻害薬及び抗 MASP-2 抗体薬の結果は示していない。

縦軸は菌添加後 5 時間の対数変換した生菌数［CFU/mL，5 hpi（hours post inoculation）］を示す。横軸は血清中莢膜特異的 IgG 濃度を示す。横破線は生菌数の測定限界の上限と下限を，縦破線は IgG 濃度の定量下限を示す。図中のドットは各被験者の個別値を示す。被験者番号#1～4：ワクチン未接種，被験者番号#5～9：血液採取の 4 ヵ月～6.5 年前にワクチンを接種。統計解析：Two-tailed unpaired t-test（p 値）及び Pearson’s correlation（r 値）。

3.1.2.3 インフルエンザ菌 b 型

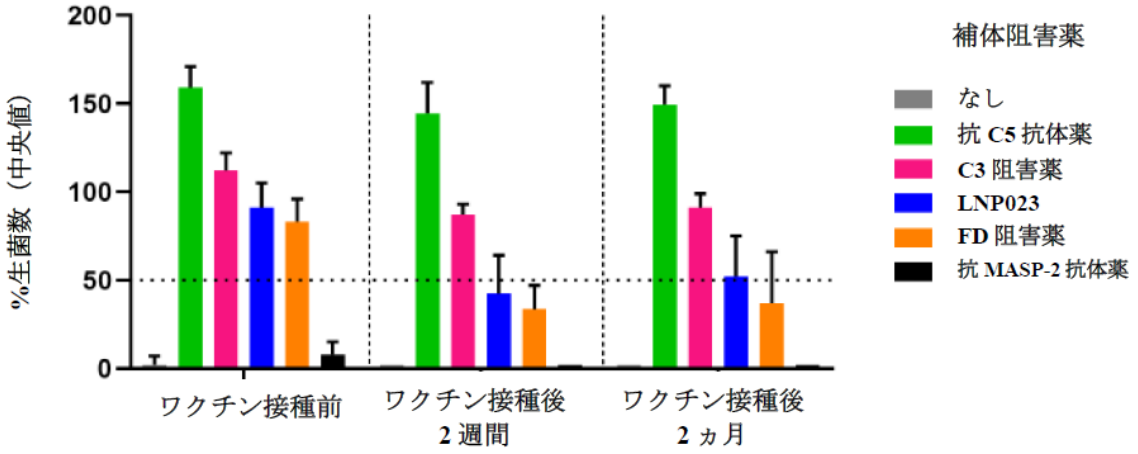
Hib の検討では，Hib ワクチン（販売名：アクトヒブ，サノフィ社）の接種前及び接種後（接種後 2 週間及び 2 ヵ月）に採取した 6 例の成人被験者の血清を用いて，Hib に対する血清殺菌作用への補体阻害薬の影響を検討した（Muri et al. 2022）。Hib ワクチン接種で産生される抗 Hib 莢膜抗原［ポリリボシルリビトールリン酸（PRP）］IgG は，補体存在下で殺菌的に働くだけでなく，多形核白血球の貪食作用を誘導する。しかしながら，Hib の排除機構に，血清殺菌作用とオプソニン化による貪食作用のいずれの寄与が大きいかは不明である。このため，本検討では血清殺菌作用及び貪食作用による殺菌作用の両方を評価した。なお，アクトヒブは本邦で「Hib による感染症の予防」の効能又は効果で承認を取得している。

血清殺菌作用の検討法は上述の髄膜炎菌の検討に準じた。また，健常被験者由来の血球を用いて貪食作用による殺菌作用を検討したが，その方法は肺炎球菌の検討に準じた。

ワクチン接種により 6 例全例で血清中に抗 Hib PRP IgG が検出され，6 例中 5 例でその抗体価は接種 2 週間後にピークを迎え，2 ヵ月後にはやや低下した。これに応じて各血清の血清殺菌作用は顕著に増強した。

血清殺菌作用の検討では，ワクチン接種前の血清において（Figure 3-3，左図），補体阻害薬非存在下では 90%以上の Hib が死滅した。LNP023，FD 阻害薬，及び C3 阻害薬の存在下では，インキュベート開始前と比べて Hib の生存率にほとんど変化はなく，抗 C5 抗体薬存在下で約 50%増加した。抗 MASP-2 抗体薬存在下では補体阻害薬非存在下のときと同様であった。ワクチン接種後 2 週間及び 2 ヵ月に採取した血清では（Figure 3-3，中央図及び右図），補体阻害薬非存在下及び抗 MASP-2 抗体薬存在下でほぼ完全に Hib が死滅した。LNP023 存在下においても殺菌作用が認められ，ワクチン接種後 2 週間又は 2 ヵ月に各々ほぼ 50%の Hib が死滅し，FD 阻害薬も同様であった。一方，C3 阻害薬及び抗 C5 抗体薬の存在下では，殺菌作用は認められなかった。

Figure 3-3　インフルエンザ菌 b 型：ワクチン接種前後の血清での生存率に及ぼす補体阻害薬の影響



Source：Muri et al. 2022

Hib ワクチンの接種前及び接種後（接種後 2 週間及び 2 ヵ月）に採取した 6 例の成人被験者の血清（20%）並びに Hib を含有する反応混液に各種補体阻害薬を添加して，37°C，60 分間インキュベーションした後に生菌数を測定した。インキュベーションなしのときの生菌数を基準に細菌の生存率を算出し，結果として示した。補体阻害薬として LNP023（25 µM），FD 阻害薬（25 µM），C3 阻害薬（CP-40：100 µg/mL），抗 C5 抗体薬（tesidolumab：100 µg/mL），及び抗 MASP-2 抗体薬（100 µg/mL）を用いた。
結果は，3 回の試行で得られた 6 例のデータの中央値（95%信頼区間）を示す。水平の点線は，37°C，60 分間インキュベーション後の細菌の 50%生存率を示す。

血清殺菌作用の検討で血清との 60 分間のインキュベーションで抵抗性を示した Hib 分離株を用いて，オプソニン化による貪食作用を検討した。本検討では Hib とのインキュベーション時間を 60 分から 5 時間に延長して評価した。まず，血球を添加せずに血清のみで殺菌作用を検討したところ，血清はワクチン接種前及び接種後のいずれでも殺菌作用を示した。血球をそれらの血清に添加しても殺菌作用の増強はみられなかった。また，熱処理により補体を失活させた血清を用いたところ，熱処理後のワクチン接種前血清添加では Hib の顕著な増殖がみられ，ワクチン接種後の血清でも殺菌作用は弱かった。血球を添加した場合では，熱処理後のワクチン接種後血清のみで生菌数は著明に減少した。このことから，血清抵抗株でも血清殺菌作用が主要な排除機構であり，オプソニン化による貪食作用は補体系が機能しないときに働く二次的な排除機構であると示唆された。本貪食作用は C3 阻害薬及び抗 C5 抗体薬で抑制されたが，LNP023 や FD 阻害薬による抑制は弱かった。

以上の結果から，Hib の排除には血清殺菌作用が重要であり，LNP023 は Hib ワクチン接種前では本作用を減弱させたが，接種後では影響は限定的であった。また，Hib の排除における貪食作用の寄与は二次的なものであり，LNP023 による貪食作用の抑制も C3 阻害薬及び抗 C5 抗体薬より弱かった。ワクチン接種により細菌に対する免疫が得られていれば LNP023 治療による殺菌作用への影響は限定的であると考えられる。C3 阻害及び C5 阻害下では，ワクチン接種状況にかかわらず Hib に対する血清殺菌作用は認められなかった。また，抗 MASP-2 抗体薬の結果から，Hib の殺菌に LP は重要でないと考えられた。

以上，髄膜炎菌，肺炎球菌，及び Hib の検討から，莢膜形成細菌のワクチン接種により抗体価が得られている場合では，AP 阻害下であっても抗体が機能することにより，莢膜形成細菌の増殖を抑制し得ることが示唆された。

3.2 *In vivo* 副次的薬理試験

補体系の活性化後，C3 の活性化フラグメントである C3b は，iC3b と C3d に順次切断され，iC3b と C3d は補体受容体 2（CD21）に結合する。CD21 は B 細胞受容体と協調して働く共刺激分子であり（Merle et al. 2015），T 細胞依存性 B 細胞応答を増強する（Hebell et al. 1991）。LNP023 は C3b 及びそのフラグメント量を低下させることから，T 細胞依存性 B 細胞応答に対する LNP023 の影響を 2 種類のげっ歯類モデルを用いて検討した。

3.2.1 DNP-KLH に対する B 細胞応答（マウス）

ハプテンであるジニトロフェニル（DNP）は担体であるキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と複合体を形成することで免疫原性を示し，アジュバントとしてアルミニウム塩とともにマウスに投与すると T 細胞依存性 B 細胞応答が誘導される。そこで，本モデルを用いて，T 細胞依存性 B 細胞応答に対する LNP023 の影響を検討した[Table 2.6.3.1-RD-2018-00517]。

一次免疫として，LNP023 の投与開始後 1 時間に水酸化アルミニウムゲルに吸着させた DNP-KLH を雌 C57BL/6 マウスに腹腔内投与し（12 例／群），一次免疫後 8 日目に血液を採取し，また，各群 6 例のマウスから脾臓を採取し，一次応答の検討に供した。二次免疫として，同日に残りのマウスに追加免疫（6 例／群）をした後，11 日目（一次免疫後 19 日目）に血液及び脾臓を採取し，二次応答の検討に供した。溶媒及び LNP023（30 及び 100 mg/kg）は 1 日 2 回，12 時間間隔で経口投与した。血液検査では，血清での DNP 特異的抗体価（IgM 及び IgG）を測定し，ウェスタンブロット法で血漿中 C3 及び FB フラグメント量を解析して LNP023 の AP 活性化抑制作用を評価した。脾臓は採取後直ちに脾臓細胞に調製し，フローサイトメトリーにより細胞集団のポピュレーション解析を行った。

一次応答の検討では，溶媒対照群と LNP023（30 又は 100 mg/kg）投与群で DNP 特異的抗体の誘導が認められたが，溶媒対照群と LNP023 投与群で抗体価に有意な差は認められなかった。二次応答の検討でも同様であり，溶媒対照群と LNP023 投与群で抗体価に有意な差は認められなかった。LNP023 トラフ濃度での血漿中 C3 及び FB フラグメント量の解析から，30 mg/kg 投与群では LNP023 による AP 活性化抑制作用は部分的であり，100 mg/kg 投与群では，一次応答及び二次応答のいずれにおいても AP 活性化が強力に抑制されていることが確認された。採取した脾臓細胞を用いたフローサイトメトリー解析で溶媒対照群と LNP023（30 又は 100 mg/kg）投与群を比較したとき，一次応答及び二次応答のいずれにおいても，すべての投与量で T 細胞及び B 細胞集団，胚中心 B 細胞，濾胞性 T 細胞，$CD138^{+}$形質芽球，濾胞性 B 細胞，及び辺縁帯 B 細胞の割合に有意な変化はみられず，胚中心反応に影響は認められなかった。

また，上述の検討と同様にマウスで一次応答及び二次応答を誘導して，LNP023 による脾臓リンパ組織胚中心への影響を検討した[Table 2.6.3.1-DIS R1820029]，[Table 2.6.3.1-DIS R1820030]。本検討では一次応答の検討として一次免疫後 10 日目に脾臓を採取，二次応答の検討として一次免疫後 10 日目に追加接種しさらに一次免疫後 20 日目に脾臓を採取した（5～6 例／群）。作製した組織切片を増殖細胞のマーカーである Ki67 で免疫組織染色し，胚中心での Ki67 染色細胞の出現及び染色強度を顕微鏡下でスコア化して評価した。

溶媒対照群と LNP023（30 又は 100 mg/kg）投与群を比較したとき，一次応答及び二次応答のいずれにおいても，すべての投与量で胚中心での Ki67 染色細胞のスコアに有意な変化はみられず，胚中心反応に影響は認められなかった[Table 2.6.3.1-DIS R1820029]，[Table 2.6.3.1-DIS R1820030]。これは，上述のフローサイトメトリー解析の結果と一致するものであった。

このことから，LNP023 は DNP-KLH に対する抗体応答の発現に影響を及ぼさないことが確認された。

3.2.2 ヒツジ赤血球に対する B 細胞応答（ラット）

静脈注射した SRBC に対する一次免疫応答として抗体が産生されるが，この抗体産生はヒトの T 細胞依存性抗体応答を予測する評価系として有用である。アジュバントを必要としないため，DNP-KLH 投与モデルよりも B 細胞応答の変化を高感度に検出することができる。そこで，ラットに SRBC を静脈内投与したときの一次 T 細胞依存性 B 細胞応答に対する LNP023 の影響を検討した[Table 2.6.3.1 RD-2018-00519]。

LNP023 の投与開始後 2 時間に SRBC（1×10^8 cells）を雌 Wistar ラット（5 例／群）に静脈内投与で免疫し，免疫後 4 及び 7 日目に血液を採取し一次応答の検討に供した。溶媒及び LNP023（6，20，60，及び 120 mg/kg）は 1 日 2 回，12 時間間隔で経口投与した。薬物濃度測定には全血，SRBC 特異的 IgM 価の測定には血清を用いた。

全血中 LNP023 濃度の測定において，ピーク濃度（2 時間後）及びトラフ濃度（12 時間後）は概ね投与量に比例して上昇し，6，20，60，及び 120 mg/kg の 1 日 2 回経口投与で，ピーク濃度はそれぞれ 1.7 µM（720 ng/ml），4.3 µM（1810 ng/ml），14.1 µM（5950 ng/ml），及び 32.9 µM（13880 ng/ml）であり，トラフ濃度はそれぞれ 0.2 µM（80 ng/ml），1.5 µM（630 ng/ml），4.8 µM（2030 ng/ml），及び 7.8 µM（3290 ng/ml）であった。得られた LNP023 濃度を踏まえると，20 mg/kg 以上の LNP023 投与群では 90%以上の AP 阻害が 24 時間にわたり維持されていたと考えられた。SRBC 特異的 IgM 価は，LNP023 投与のすべての用量群で溶媒対照群と同様の推移を示し，LNP023 投与による有意な影響はみられなかった。

また，イヌ 39 週間反復投与毒性試験の LNP023 投与群での検討で，KLH で惹起したときの液性免疫応答（IgM 及び IgG 抗体価）に対する影響は軽微であり，本検討での結果と一致していた[2.6.6-8.2 項]。

これらの結果から，LNP023 は T 細胞依存性 B 細胞応答を抑制しないことが示唆された。

4 安全性薬理試験

安全性薬理試験では，LNP023 の心血管系，呼吸系，及び中枢神経系に及ぼす影響を評価した。心血管系に及ぼす影響は，*in vitro* 試験（電気生理学的試験及び機序検討試験），並びにラット，イヌ，及びサルを用いた *in vivo* テレメトリー試験を実施して評価した。また，ラットを用いて呼吸系及び中枢神経系に及ぼす影響を検討した。主要な試験は，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）並びに医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン S7A 及び S7B に準拠して実施した。

In vivo 安全性薬理試験では血漿中薬物濃度を測定しなかったため，曝露量は動物種，性，及び投与量が同じ毒性試験の試験 1 日の曝露量を外挿した。非臨床試験の Cmax と，臨床用量

（200 mg，1 日 2 回）におけるヒト Cmax（総 LNP023 濃度として 4120 ng/mL，推定非結合型 LNP023 濃度として 763 ng/mL）[2.7.2-2.2.2 項]，[2.6.4-4.1 項]を用いて曝露量比を算出した。

4.1 心血管系に及ぼす影響

4.1.1 *In vitro* 試験

4.1.1.1 心筋イオンチャネルに関する試験

hERG チャネルに及ぼす LNP023 の影響を，hERG 遺伝子を発現させたヒト胎児腎臓（HEK293）細胞を用いてパッチクランプ法により検討した。GLP 非適用で実施した予備試験では，最大で 10 又は 300 µM までの LNP023 を処理した結果，いずれの試験においても hERG 電流阻害の IC50 値を決定することはできなかった[Table 2.6.3.4-1414526]，[Table 2.6.3.4-1414561]。したがって，GLP 適用試験では最高濃度を 1000 µM と設定し，処理濃度は 100，300，600，及び 1000 µM とした[Table 2.6.3.4-1470561]。試験の結果，LNP023 による hERG 電流阻害は 100，300，600，及び 1000 µM でそれぞれ 8.9 ± 0.5%，32.1 ± 1.2%，68.8 ± 3.0%，及び 86.3 ± 1.2%であり，IC50 値は 414.9 µM（175303 ng/mL，ヒト非結合型 Cmax の約 230 倍）と算出された。

サルで QTc 延長が認められたことから（5 項），hERG チャネルの HEK293 細胞表面での発現に対する LNP023 の影響について GLP 非適用下で検討した。hERG チャネルの細胞膜移行（トラフィッキング）阻害作用は，LNP023 の遊離塩基を用いて 100 µM まで検討し[Table 2.6.3.4-1415101]，さらに塩酸塩を用いて最高濃度 300 µM まで検討した[Table 2.6.3.4-1415103]。これらの試験において，0.1～100 又は 300 µM までの LNP023（臨床用量 200 mg b.i.d.でのヒト非結合型 Cmax の 166 倍まで）で処理した結果，溶媒対照と比較して hERG チャネルの細胞表面発現量に有意な低下はみられなかった。したがって，LNP023 はトラフィッキング阻害作用を有さないと考えられた。

心筋活動電位に関与する 4 種の心筋イオンチャネル（内向き整流カリウム電流 I_{K1} を形成する hKir2.1，緩徐活性化遅延整流カリウム電流 I_{Ks} を形成する hKvLQT1/hminK，一過性外向きカリウム電流 I_{to} を形成する hKv4.3，及び電位依存性 L 型カルシウム電流 $I_{Ca,L}$ を形成する hCav1.2）に対する LNP023 の影響を GLP 非適用下で検討した。遊離塩基を用いて 10 µM まで検討し[Table 2.6.3.4-1415004]，次に塩酸塩を用いて 300 µM まで検討した[Table 2.6.3.4-1415008]。これらの試験において，最高濃度の 10 又は 300 µM まで，4 種のチャネルに対する 50%以上の阻害はみられなかった。したがって，これらのイオンチャネルに対する IC50 値はいずれも 300 µM 超と推定された（臨床用量 200 mg b.i.d.でのヒト非結合型 Cmax の 166 倍超）。

心筋ナトリウムチャネル hNav1.5（活動電位の立ち上がりと伝導を担う）に対する LNP023 の影響を，*in vitro* 副次的薬理試験の一環として[redacted]により検討した（3.1.1 項，試験番号：RD-2015-00689）。50 µM までの LNP023 による Nav1.5 電流の 50%以上の阻害は認め

られず，IC50 値は 50 µM 超と推定された（臨床用量 200 mg b.i.d.でのヒト非結合型 Cmax の 28 倍超）。

以上，検討した心筋イオンチャネルに対する LNP023 の阻害作用は高濃度まで認められなかったことから，ヒト臨床用量では電気生理学的な影響及び催不整脈が発現するリスクは低いことが示唆された。

4.1.1.2 ヒト初代培養心筋細胞を用いた心筋収縮力及び細胞内カルシウムトランジェントに関する試験

LNP023 の心拍数増加作用及び心収縮力の増加作用は，成熟イヌと比較して幼若イヌで顕著に認められた（4.1.2.2.4 項）。これらの作用の発現機序を検討する目的で，心筋細胞（CM）を用いた *in vitro* 試験を GLP 非適用で実施した。本試験では，若年ドナー（10 歳以下）及び成人ドナー（17 歳以上 60 歳以下）の心臓由来の初代培養 CM を用いて，CM の心筋収縮力[Table 2.6.3.4-2120033-a]及び細胞内カルシウムトランジェント[Table 2.6.3.4-2120033-b]に対する LNP023 の直接作用を検討した。

実験のバリデーションに関して，成人ドナー由来 CM を用いた短時間処理（5 分間）での心筋収縮力アッセイは，心筋収縮力及び催不整脈リスクの評価に対してバリデートされている（Nguyen et al. 2017，Abi-Gerges et al. 2020）。一方，若年ドナー由来 CM を用いた実験は探索的な位置づけの検討である。また，成人及び若年ドナー由来 CM を用いた長時間処理（24 時間）での心筋収縮力アッセイも探索的な検討であり，24 時間処理時点での収縮力を検討する目的で実施した。さらに，成人及び若年ドナー由来 CM を用いた短時間（5～10 分間）及び長時間処理（24 時間）でのカルシウムイメージングを実施した。

入手できた若年ドナーの心臓が 2 例にとどまることから，3 例の成人ドナー及び 2 例の若年ドナーの心臓から単離した CM を用いて試験を実施した。以下に，短時間処理での心筋収縮力アッセイ及びカルシウムイメージングの結果を示す。

4.1.1.2.1 心筋収縮力に対する影響

成人ドナー由来 CM を用いた検討では，LNP023 の処理濃度を 3，10，30，及び 100 µM とし，3 例の成人ドナー（4[redacted] 歳女性，1[redacted] 歳男性，及び 4[redacted] 歳女性）由来の CM を短時間（5 分間）処理して収縮力への影響を検討した。対照薬として陽性変力薬（イソプロテレノール，レボシメンダン，及びミルリノン）及び陰性変力薬（ベラパミル及びラノラジン）を用い，少なくとも 1 例の成人ドナー由来 CM で検討した。いずれの対照薬も，心筋収縮力，並びに収縮／弛緩キネティクスに対して既知の報告と一致した影響を示した（Nguyen et al. 2017，Abi-Gerges et al. 2020）。陽性変力薬により，収縮トランジェントの振幅は溶媒対照と比較して 200%～400%増加した。LNP023 は，30 及び 100 µM の濃度で収縮トランジェントの振幅を軽度に増加させ（溶媒対照に対してそれぞれ 26%及び 31%増加），EC50 値は 100 µM 超（臨床用量 200 mg b.i.d.でのヒト非結合型 Cmax の約 55 倍）と推定された。一方，LNP023 はピーク到達時間及び 90%弛緩時間へ影響

を及ぼさず，CM の収縮／弛緩キネティクスに対する影響はみられなかった。LNP023 の催不整脈リスクは確認されなかった。

若年ドナー（10 歳以下）由来 CM を用いて同様に LNP023 及び対照薬の影響を検討した。陽性変力薬により，収縮トランジェントの振幅は溶媒対照と比較して 150%～300%増加した。収縮力に対する LNP023 の作用にはばらつきがみられ，1 例のドナー（1[redacted] 歳男性）由来 CM の収縮トランジェントの振幅は 150%増加したが，もう 1 例のドナー（[redacted] 歳女性）由来 CM における収縮トランジェントの振幅は，検討した最高濃度でも 35%の増加であった。2 例の若年ドナー由来 CM において，収縮／弛緩キネティクスに LNP023 の影響はみられず，催不整脈リスクは確認されなかった。

4.1.1.2.2 カルシウムトランジェントに対する影響

成人及び若年ドナー由来の CM を LNP023 で短時間（5～10 分間）及び長時間（24 時間）処理し，カルシウムイメージングを実施した。対照薬として，カルシウムトランジェントに影響を及ぼすことが知られている陽性変力薬のレボシメンダン及びミルリノンを使用した。

成人ドナー由来 CM（n = 2）では，LNP023 は既知の陽性変力薬とは異なり，短時間（5～10 分間）及び長時間（24 時間）処理後のカルシウムトランジェントの振幅及びキネティクスに影響を及ぼさなかった。また，成人ドナー由来 CM において，LNP023 による催不整脈のリスクは認められなかった。

若年ドナー由来 CM では，1[redacted] 歳男性由来 CM において 10 µM の LNP023 の 24 時間処理後にカルシウムトランジェントの 50%ピーク幅がわずかに増加したことを除き，LNP023 は短時間（5～10 分間，n = 1）及び長時間（24 時間，n = 2）処理後のカルシウムトランジェントの振幅及びキネティクスに影響を及ぼさなかった。また，若年ドナー由来 CM において，LNP023 による催不整脈のリスクは認められなかった。

以上，成人ドナー由来 CM を用いて，臨床用量 200 mg b.i.d.でのヒト非結合型 Cmax の約 55 倍までの濃度範囲で試験を実施した結果，収縮トランジェントの振幅が軽度に増加したが，カルシウムトランジェントに対する影響はみられなかった。これらの影響は既知の陽性変力薬と比較すると軽度であり，LNP023 は完全に成熟したヒト心臓では心筋収縮力及び不整脈に対して臨床的意義のある影響を及ぼさないと考えられた。若年ドナー由来 CM を用いた検討では，2 例の間で LNP023 に対する反応にばらつきが認められた。

4.1.1.3 ラット及びイヌ動脈リング標本を用いた血管反応性に関する試験

LNP023 の血圧低下作用はイヌで認められた（4.1.2.2.4 項）が，ラットでは観察されなかった。本試験では，ラット及びイヌの胸部大動脈及び腸間膜動脈のリング標本を用いて，リング標本を前収縮させた後に LNP023 を添加して血管拡張作用を検討した[Table 2.6.3.4-1520203]。

LNP023 の処理濃度を 1，3，10，30，及び 100 µM とした結果，ラット及びイヌの胸部大動脈及び腸間膜動脈リング標本に弛緩反応はみられなかった。一方，陽性対照薬ニトロプルシドナトリウムを 0.3 µM の濃度で添加した結果，ラットの胸部大動脈及び腸間膜動脈リング標本に，それぞれ 91%～104%及び 92%～100%の弛緩反応が認められた。イヌの胸部大動脈及び腸間膜動脈リング標本にそれぞれ 0.3 及び 10 µM のニトロプルシドナトリウムを添加した結果，それぞれ 84%～115%及び 59%～82%の弛緩反応が認められた。

以上，100 µM（臨床用量 200 mg b.i.d.でのヒト非結合型 Cmax の約 55 倍）までの濃度で検討した結果，LNP023 はラット及びイヌの動脈（胸部大動脈及び腸間膜動脈）に対して直接的な血管拡張作用を示さなかった。

4.1.2 *In vivo* 試験

In vivo 心血管系安全性薬理試験として，テレメトリー装置を埋め込んだラット及びイヌを用いて，LNP023 の心拍数，心電図，及び血圧に及ぼす影響を検討した。また，幼若イヌを用いた 52 週間反復投与毒性試験で観察された心臓重量の増加及び大動脈流出路の鉱質沈着の発現機序を検討する目的で，幼若及び若齢成熟イヌを用いた 14 日間反復投与による心血管系安全性薬理試験を実施した。さらに，イヌの反復投与毒性試験及びサルの用量漸増投与試験に心拍数及び心電図測定を組み入れた。

4.1.2.1 ラットを用いた心血管系に関する安全性薬理試験

ラットに LNP023 を単回経口投与したときの心血管機能に及ぼす影響を，テレメトリー法により GLP 非適用で検討した[Table 2.6.3.4-1570154]。

8 例の雄ラットに溶媒及び 1000 mg/kg の LNP023 をクロスオーバー法で単回経口投与し，投与前約 2 時間から投与後約 24 時間まで，血圧，心拍数，及び体温を測定した。

本試験では，LNP023 の単回経口投与により死亡及び一般状態の変化は認められず，血圧，心拍数，及び体温にも変化はみられなかった。

本試験では血漿中 LNP023 濃度は測定しなかったが，ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験では，雄ラットにおける 1000 mg/kg/日群の試験 1 日の平均総 Cmax は 42900 ng/mL であった。

以上，本試験では臨床用量 200 mg b.i.d.でのヒト総 Cmax の約 10 倍と推定される総 Cmax において，血圧，心拍数，及び体温への影響は認められなかった。

4.1.2.2 イヌを用いた心血管系の安全性評価

4.1.2.2.1 イヌを用いた心血管系に関する安全性薬理試験

イヌに LNP023 を単回経口投与したときの心血管機能に及ぼす影響を，テレメトリー法により GLP 非適用で検討した[Table 2.6.3.4-1470817]。

試験 1 及び 3 日に，3 例の雄イヌ（約 1 歳齢）に溶媒及び 600 mg/kg の LNP023 を単回経口投与し，投与前約 2 時間から投与後約 24 時間まで，血圧，心拍数，及び体温を測定した。

LNP023 投与により，血圧低下と同時に心拍数増加が認められたが，いずれの影響も投与後 16～18 時間以内にベースラインまで回復した。LNP023 投与時の平均血圧は，溶媒投与時と比較して最大 26 mmHg（23%）低下し，心拍数は溶媒投与時と比較して最大 40 bpm（43%）増加した。PR 又は QT 間隔の短縮が認められたが，これらは心拍数増加による二次的な影響と考えられた。また，QTc 間隔のわずかな短縮が認められたが，これは心拍数増加の状態下で QT 間隔が補正された結果と考えられた。

本試験では血漿中 LNP023 濃度は測定しなかったが，イヌを用いた 2 週間反復投与毒性試験の用量漸増投与試験相では，雄イヌにおける 600 mg/kg 投与後の平均総 Cmax は 205000 ng/mL であった。

以上，本試験では臨床用量 200 mg b.i.d.でのヒト総 Cmax の約 50 倍と推定される総 Cmax において血圧低下及び心拍数増加が認められたが，QTc 間隔には影響はみられなかった。

4.1.2.2.2 イヌを用いた心血管系に関する安全性薬理試験

LNP023 を単回経口投与したときの心血管機能に及ぼす影響を，テレメトリー法により GLP 非適用で検討した[Table 2.6.3.4-1570153]。

試験 4，8，11，及び 15 日に，4 例の雄イヌ（約 18 ヵ月～3 歳齢）にそれぞれ溶媒及び 600，200，100，及び 50 mg/kg の LNP023 を漸減経口投与し，投与前約 2 時間から投与後約 24 時間まで，血圧及び心拍数を測定した。LNP023 の血圧への影響を検討する目的で，1 例のイヌで肺動脈血流及び総末梢血管抵抗を測定した。

LNP023 による用量依存的な血圧低下が認められ，影響は投与後約 2～4 時間でピークであった。100，200，及び 600 mg/kg 投与時の平均血圧は，溶媒投与時と比較すると最大でそれぞれ 15（15%），22（21%），及び 35 mmHg（33%）低下した。100 及び 200 mg/kg 投与時の平均血圧は投与後約 12 時間で回復したが，600 mg/kg 投与時では投与後 24 時間でも回復しなかった。50 mg/kg 投与により 4 例中 1 例で平均血圧の低下が認められ，溶媒投与時と比較して最大で 21 mmHg（22%）低下した。

LNP023 による用量依存的な心拍数の増加が認められ，影響は投与後約 2～3 時間でピークであった。100，200，及び 600 mg/kg 投与時の心拍数は，溶媒投与時と比較すると最大でそれぞれ 36（38%），47（50%），及び 69 bpm（71%）増加した。100，200，及び 600 mg/kg 投与時の心拍数は，それぞれ投与後約 4，8，及び 18 時間で溶媒投与時レベルに回復した。50 mg/kg 投与時には心拍数への影響はみられなかった。

50 mg/kg の投与により血圧が低下した 1 例において，肺動脈の平均血流速度に LNP023 による影響はみられなかった。50，100，200，及び 600 mg/kg の LNP023 を投与したときの総末梢血管抵抗を溶媒投与時と比較すると，最大でそれぞれ 10（19%），21（38%），21（39%），及び 28 mmHg*min/L（51%）低下した。50，100，及び 200 mg/kg 投与時の総末梢血管抵抗は投与後約 6～8 時間で回復したが，600 mg/kg 投与時では投与後 24 時間でも回復はみられなかった。

本試験では血漿中 LNP023 濃度は測定しなかったが，イヌを用いた 4 週間反復投与毒性試験では，雄イヌにおける 50 mg/kg/日群の試験 1 日の平均総 Cmax は 33600 ng/mL であった。また，イヌを用いた 2 週間反復投与毒性試験では，雄イヌにおける 100 mg/kg/日群の試験 1 日の平均総 Cmax は 68700 ng/mL であった。

以上，本試験では臨床用量 200 mg b.i.d.でのヒト総 Cmax の約 8 倍と推定される総 Cmax で血圧低下が，また，ヒト総 Cmax の約 17 倍と推定される総 Cmax で心拍数増加が認められた。また，1 例のイヌでは総末梢血管抵抗の低下が認められたことから，イヌにおける血圧低下には末梢血管拡張が寄与している可能性が示唆された。

4.1.2.2.3 イヌを用いた心血管系に関する安全性薬理試験

イヌに LNP023 を単回経口投与したときの心血管機能に及ぼす影響を，テレメトリー法により GLP 適用で検討した[Table 2.6.3.4-1470565]。

4 例の雄イヌ（約 19～35 ヵ月齢）に溶媒及び 15，50，及び 300 mg/kg の LNP023 を単回経口投与した。各投与の間隔は少なくとも 7 日間とした。投与前約 2 時間から投与後約 24 時間まで，心電図，血圧，心拍数，及び体温を測定した。

LNP023 の 15 及び 50 mg/kg 投与時には，心血管及び血行動態パラメータ，並びに体温に影響はみられなかった。300 mg/kg 投与により統計学的に有意な血圧低下が認められ，それに伴い心拍数増加，並びに RR 及び PR 間隔の短縮が認められた。

300 mg/kg 投与時の血圧測定では，4 例中 3 例で実測値及びベースライン補正値の比較において，収縮期血圧，拡張期血圧，及び平均血圧に統計学的に有意な低下が認められた。収縮期血圧または拡張期血圧の低下は投与後約 0.25～20 時間にわたって認められ，ピークは投与後約 2～5 時間 15 分であった。ベースラインからの低下は，溶媒投与時には最大 1 mmHg であったのに対して，300 mg/kg 投与時では収縮期血圧で最大 33 mmHg，拡張期血圧で最大 18 mmHg であった。平均血圧の低下は投与後約 2～13 時間にわたって認められ，そのピークは投与後約 2 時間 15 分～4 時間 30 分であった。ベースラインからの低下は，溶媒投与時に最大 2 mmHg であったのに対して，300 mg/kg 投与時には最大 21 mmHg であった。

300 mg/kg 投与時に血圧の変化が認められた 4 例中 3 例では，実測値及びベースライン補正値の比較において統計学的に有意な心拍数の増加が認められた。心拍数の増加は投与後約 0.25～17 時間の間に認められ，そのピークは投与後 1 時間 15 分～5 時間であった。ベースラインからの増加は，溶媒投与時に最大 7 bpm であったのに対して，300 mg/kg 投与時には最大 48 bpm であった。

心電図検査では，300 mg/kg 投与時に心拍数の増加に伴う RR 及び PR 間隔の短縮が認められたが，その他の心電図パラメータ及び体温には投薬に関連する影響は認められなかった。

本試験では血漿中 LNP023 濃度は測定しなかったが，イヌを用いた 4 週間反復投与毒性試験では，雄イヌにおける 50 及び 300 mg/kg/日群の試験 1 日の平均総 Cmax は，それぞれ 33600 及び 137000 ng/mL であった。

以上，本試験では臨床用量 200 mg b.i.d. でのヒト総 Cmax の約 8 倍と推定される総 Cmax（50 mg/kg）までは，心血管及び血行動態パラメータに影響はみられなかった。ヒト総 Cmax の約 33 倍と推定される総 Cmax（300 mg/kg）では，血圧低下及び心拍数増加が認められたが，QTc 間隔には影響はみられなかった。

4.1.2.2.4 イヌを用いた反復投与毒性試験における心血管系の評価

成熟及び幼若イヌを用いた反復投与毒性試験で認められた心血管系の変化を Table 4-1 に示す。

Table 4-1　イヌを用いた反復投与毒性試験における心血管系の評価

試験の種類 試験番号 GLP 適用	投与量（mg/kg）	性 例数 開始時の月齢	心血管系の所見 無毒性量（NOAEL）
2 週間反復投与 1470220 GLP 非適用	漸増期：50，100，300，600，1000 反復投与期：0，100，300，1000	雄 漸増期：3 例 反復投与期：3 例／群（1000 mg/kg 群は 2 例） 月齢：11～15	漸増期： ≥ 100 mg/kg：心拍数増加 反復投与期： ≥ 300 mg/kg/日：持続的な心拍数増加（3 及び 13 日目） 1000 mg/kg/日（2 例中 1 例）： 一般状態の異常/死亡，複数の臓器に毒性所見（14 日目） 心電図異常（PR 間隔の短縮，QRS，QT，QTcV，及び QTcI 間隔の延長）（13 日目，1 日目には観察されず） 心筋の変性・壊死 NOAEL：300 mg/kg/日（14 日目の Cmax：200000 ng/mL 及び AUC0-24：2280000 ng*h/mL）
4 週間反復投与＋4 週間回復 1470567 GLP 適用	投与群：0，15，50，300 回復群：0，300	雌雄 投与群：3 例／性／群 回復群：2 例／性／群 月齢：9.5～10	≥ 15 mg/kg/日：心拍数増加（雄，2 日目） 300 mg/kg/日： 心拍数増加（雌雄，2 日目及び 4 週目） 心血管系バイオマーカー（トロポニン I，NT-proANP，及び NT-proBNP）には影響なし 軽微から軽度の心筋の変性・壊死（主に乳頭筋），回復期間終了時に軽微な線維化を伴い部分的に回復 NOAEL：50 mg/kg/日（25 日目の Cmax：38700 ng/mL 及び AUC0-23：238500 ng*h/mL） 心拍数増加：15 mg/kg/日（雄，1 日目の Cmax：11900 ng/mL 及び AUC0-23：83200 ng*h/mL）
13 週間反復投与＋8 週間回復 1570194 GLP 適用	反復投与期：0，5，30，150 回復期：0，150	雌雄 投与群：3 例／性／群 回復群：2 例／性／群 月齢：13～14	150 mg/kg/日：心拍数増加（2 日目のみ，投与期間終了時及び回復期間には認められず） NOAEL（精巣及び肝臓の所見に基づく）： 雄：5 mg/kg/日（13 週目の Cmax：4390 ng/mL 及び AUC0-24：35500 ng*h/mL） 雌：30 mg/kg/日（13 週目の Cmax：22600 ng/mL 及び AUC0-24：149000 ng*h/mL）
39 週間反復投与＋27 週間回	反復投与期：0，5，30，150	雌雄	150 mg/kg/日：心拍数増加（2 日目，時間経過とともに減弱，投与期間終了時及び回復期間には認められず）

試験の種類 試験番号 GLP 適用	投与量 （mg/kg）	性 例数 開始時の月齢	心血管系の所見 無毒性量（NOAEL）
復 1570192 GLP 適用	回復期：0，30，150	投与群：4 例／性／群 回復群：2 例／性／群 月齢：12～14	NOAEL（精巣及び骨髄の所見に基づく）： 雄：5 mg/kg/日（39 週目の Cmax：4580 ng/mL 及び AUC0-24：39300 ng*h/mL） 雌：30 mg/kg/日（39 週目の Cmax：21000 ng/mL 及び AUC0-24：155000 ng*h/mL）
幼若イヌ 8 週間反復投与 1770671 GLP 非適用	0，5，30，150，300，600	雌雄 4～6 例／群（600 mg/kg 群は 1 例） 月齢：1	≥ 150 mg/kg/日：持続的な心拍数増加（2 及び 7 日目及び 8 週目） 300 mg/kg/日：軽微から中程度の心筋の変性・壊死及び線維化（600 mg/kg/日では病理学的検査実施せず） 600 mg/kg/日：瀕死状態のため 2 日目に安楽死 NOAEL：150 mg/kg/日（82 日目の Cmax：73500 ng/mL 及び AUC0-24：686000 ng*h/mL）
幼若イヌ 52 週間反復投与＋27 週間回復 1870009 GLP 適用	反復投与期：0，5，30，150 回復期：0，150	雌雄 5 例／性／群 月齢：1	≥ 30 mg/kg/日：NT-proBNP の増加（主に雌，2 週目以降，回復期間終了時に回復） 心臓重量増加（雌） 大動脈流出路鉱質沈着の頻度及び重症度の増加（雄，回復せず） 150 mg/kg/日： 持続的な心拍数増加（1 日目，2，13，及び 52 週目，回復期間の終わりに回復） 心臓重量増加（雄，回復） 大動脈流出路鉱質沈着の頻度及び重症度の増加（雌，回復せず） 軽微から軽度の心筋の変性・壊死及び線維化（一部回復），心筋細胞の形態計測（直径又は細胞密度）に変化なし NOAEL：5 mg/kg/日（52 週目の Cmax：5865 ng/mL 及び AUC0-24：48100 ng*h/mL）

Source：Table 2.6.7.6-1470220，Table 2.6.7.7D-1470567，Table 2.6.7.7E-1570194，Table 2.6.7.7F-1570192，Table 2.6.7.15A-1770671，Table 2.6.7.15B-1870009

Cmax 及び AUC は総 LNP023 濃度で示す。

4.1.2.2.5 幼若及び若齢成熟イヌを用いた 14 日間反復投与による心血管系安全性薬理試験

幼若イヌを用いた 52 週間反復投与毒性試験で観察された心血管所見（心臓重量増加及び大動脈流出路の鉱質沈着）を踏まえ，本試験ではテレメトリー装置を埋め込んだ幼若イヌ（約 8 週齢）及び若齢成熟イヌ（8 ヵ月齢）を用いて心電図測定，心エコー，ホルモン測定，バイオマーカー（レニン及び NT-proBNP）測定，及び病理組織学的評価を実施し，LNP023 の心血管系に及ぼす影響を GLP 非適用で検討した[Table 2.6.3.4-2170052]。さらに，心臓及び大動脈組織の遺伝子

発現解析を行い[Table 2.6.3.4-DIS R2170052d]，成熟イヌの 2 及び 4 週間反復投与毒性試験における心臓の遺伝子発現の変化と比較検討した。

幼若イヌ（4 例／群）及び若齢成熟イヌ（4 例／群）に 0（溶媒），30，及び 150 mg/kg/日の LNP023 を 14 日間反復投与した。溶媒対照群及び 150 mg/kg/日投与群には回復試験群（3 例／群）を設定し，1 週間の回復期間を設けた。

若齢成熟イヌの 150 mg/kg/日投与群の雌 1 例で，血小板の減少及び皮膚点状出血が認められ，試験 12 日に安楽殺した。剖検では複数の組織に病理組織学的出血が認められた。投与 8 日目から体温上昇がみられ，臨床検査では急性炎症を示唆する変化が，肝臓では多発性肉芽腫性炎がみられたことから，感染症が示唆された。また，若齢成熟イヌの 150 mg/kg/日投与群の雌 3 例で一過性の体温上昇が認められ，血小板減少又はテレメトリー装置埋め込み手術部位の炎症を伴っていた。これらの変化は，一過性であること，テレメトリーイヌにおける炎症や感染症に伴った二次的な変化と考えられることから，LNP023 との直接的な関連はないと考えられた。しかしながら，AP を薬理的に阻害する LNP023 が感染症のリスク増大に寄与した可能性は否定できない。

ベースライン時の心血管系及び心エコーパラメータの平均値について，若齢成熟イヌと比較すると幼若イヌでは，心拍数の高値，収縮力の高値（短い QA 間隔），血圧の低値，及び心拍出量の低値が確認された。これらの週齢・月齢に関連した差は，心臓の発達に関する既知の報告と一致していた。

幼若イヌ及び若齢成熟イヌともに，150 mg/kg/日投与群で心拍数の増加及び収縮力の増加（QA 間隔の短縮），並びに血圧の低下が認められた。心拍数の増加は投与後 1 時間以内に認められ，投与後最大 10 時間まで持続した。心拍数の増加は投与後約 2 時間がピークであり，溶媒対照群と比較するとピーク時には幼若イヌで 40～57 bpm の増加，若齢成熟イヌで 27～40 bpm の増加であった。血圧の低下も概ね投与後 1～8 又は 10 時間後に認められ，心拍数増加と同様の時間経過をたどった。血圧の低下は投与後約 2 時間がピークであり，溶媒対照群と比較するとピーク時の収縮期血圧は幼若イヌで 6.9～16.7 mmHg の減少，若齢成熟イヌで 14.7～28.5 mmHg の減少であった。幼若及び若齢成熟イヌともに，変化の発現時期，持続時間及び程度は試験 1～14 日までの期間で同様であった。LNP023 に関連した心拍数増加，血圧低下，及び QA 間隔短縮について，これらの相対変化（%）は週齢・月齢を問わずすべての動物で同程度であった。しかしながら LNP023 投与時の絶対値は，幼若イヌはより高い心拍数，短い QA 間隔，及び低い血圧であり，幼若イヌと若齢成熟イヌの間で差異が認められた。

150 mg/kg/日投与群のすべての動物において，これらの変化と関連した軽度の心機能変化が試験 1～14 日の Tmax 付近（投与後 2～4 時間）の心エコー検査により認められた［収縮期左室内径（LVIDs），左室収縮末期面積（LVAs），及び左室収縮末期容量（ESV）の減少，並びに左室内径短縮率（FS%），駆出率（EF%），左室面積縮小率（FAS），心拍出量，及び心拍数の増加］。また，30 mg/kg/日投与群では，若齢成熟イヌのみ ESV のわずかな減少と心拍出量の増加が認められ，心エコー検査実施のタイミングで観察された心拍数の増加と関連したものと考えられた。

これらの変化には，心拍数及び血圧の変化と同様，試験 1～14 日にかけて悪化はみられなかった。しかしながら，心エコー検査では，若齢成熟イヌと比較すると幼若イヌにおいてより顕著な変化が認められた。幼若及び若齢成熟イヌの 150 mg/kg/日投与群では，ESV の減少を伴った EF%及び FS%の増加の相対変化（対コントロール%）の程度は同程度であったが，絶対値には週齢・月齢依存的な差が反映されていた。また，心拍出量の増加は週齢・月齢依存的な心拍数の差に関連して幼若イヌではより軽度の変化であった。これらの心エコーの変化は，若齢成熟イヌでは心拍数と強く相関していることが確認された。一方で幼若イヌにおけるこれらの変化は，心拍数にのみ由来するものではなく収縮力の変化も影響していた。また，幼若イヌでは 30 mg/kg/日以上の投与群で拡張期心室中隔厚（IVSd）及び左室後壁厚（LVPWd）の増加，150 mg/kg/日投与群で左室中部での血流の折り返し及び僧帽弁前葉の収縮期前方運動（SAM）が高頻度に認められた。このような心臓の仕事量の増加を示す変化からも，幼若イヌでは心臓への影響がより顕著であったことが確認された。

LNP023 投与後の両齢群において，個体間のばらつきは大きいものの，心血管バイオマーカーである血漿中レニン活性及び NT-proBNP の増加が認められた。若齢成熟イヌの 150 mg/kg/日投与群及び幼若イヌの 30 mg/kg/日以上の群では，個体により試験 1 日からレニン活性の上昇が認められ，LNP023 投与後の血圧低下によりレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系が活性化した可能性が考えられた。若齢成熟イヌの 30 mg/kg/日以上の群では試験 3 日から，幼若イヌの 150 mg/kg/日投与群では試験 11 日から血漿中 NT-proBNP 濃度の上昇が認められ，ナトリウム利尿ペプチド系の活性化及び心筋ストレスの増大を示唆すると考えられた。心エコー検査においても関連した心機能の変化が認められている。

幼若イヌでは 30 mg/kg/日以上の投与群で，若齢成熟イヌでは 150 mg/kg/日投与群で試験 1～14 日に LNP023 投与に関連した血漿中総サイロキシン（T4）濃度の減少が認められたが，血漿中総トリヨードサイロニン（T3）濃度に変化はみられなかった。関連した変化として，幼若イヌ及び若齢成熟イヌのすべての投与量で甲状腺／副甲状腺重量の増加がみられており（関連する病理組織学的所見なし），若齢成熟イヌに比べて幼若イヌでより顕著に認められた。

幼若イヌ及び若齢成熟イヌのいずれにおいても，LNP023 投与に関連した心臓重量の変化，又は心臓及び大動脈の病理組織学的所見は認められなかった。

投与期間終了後 1 週間の回復期間で，心血管系に対する影響（定量的パラメータ及び心エコー検査）の完全な回復が認められ，すべての測定値は投与前値又は溶媒対照群と同レベルであった。幼若イヌ及び若齢成熟イヌともに甲状腺／副甲状腺重量（絶対値及び相対値）の増加がみられたが，関連する病理組織学的所見は認められなかった。

心臓及び大動脈の遺伝子発現解析において，幼若イヌの溶媒対照群における遺伝子発現プロファイルを若齢成熟イヌと比較した結果，既に報告されているように（Hew and Keller 2003，ICH-S7），幼若イヌの心血管系は発達中であることが確認された。若齢成熟イヌでは 150 mg/kg/日投与群の心臓及び大動脈，幼若イヌでは 30 mg/kg/日以上の投与群の心臓及び大動脈において，用

量依存的な遺伝子発現の変化が認められた。成熟イヌを用いた 2 及び 4 週間反復投与毒性試験の心臓では，50 mg/kg/日以下の投与量では遺伝子発現に変化は認められなかったが，100 mg/kg/日以上では遺伝子発現に変化が認められた。14 日間反復投与による安全性薬理試験，並びに 2 及び 4 週間反復投与毒性試験では，成熟イヌ（若齢成熟及び成熟イヌ）及び幼若イヌの心臓及び大動脈において発現が変化した遺伝子の種類は類似していたが，変化の方向性（アップレギュレーションまたはダウンレギュレーション）に差が認められた。遺伝子発現の調節は，若齢成熟及び成熟イヌでは主として適応性の変化を示唆するものであった（持続性頻脈及び心筋細胞変性がみられた 300 mg/kg/日以上の投与群を除く）。一方，幼若イヌでは，代償性又は適応性反応を示唆する遺伝子発現の変化は明らかではなかった。

血漿中 LNP023 濃度は，投与後 3 ± 0.5 時間に実施した心エコー検査終了時に検体を採取して測定した。幼若イヌ（30 及び 150 mg/kg 投与群の試験 1 日で，それぞれ 16700 ng/mL 及び 53400 ng/mL）及び若齢成熟イヌ（30 及び 150 mg/kg 投与群の試験 1 日で，それぞれ 16600 ng/mL 及び 65900 ng/mL）の血漿中 LNP023 濃度はほぼ同等であり，また幼若イヌを用いた 52 週間反復投与毒性試験及び成熟イヌを用いた 39 週間反復投与毒性試験で得られた血漿中 Cmax とも類似していた。

以上，幼若イヌ及び若齢成熟イヌへの 150 mg/kg/日（臨床用量でのヒト総 Cmax の約 13 倍）の LNP023 投与により，心拍数増加，血圧低下，及び心収縮力の増加により示唆される急性の高心拍出量状態が認められた。心拍数及び血圧への影響は，成熟イヌを用いた試験で確認されたものであったが，幼若イヌでは，これらの影響が若齢成熟イヌと比較して顕著であり，また血行動態の異常を伴っていた。これらの影響は時間の経過とともに心筋量を増加させ，また血行動態の変化が血管損傷を誘発し，心臓のリモデリングにつながる可能性が考えられる。イヌは動物種として大動脈鉱質沈着を発症しやすいとの報告（Keenan and Vidal 2006）を考慮すると，幼若イヌを用いた 52 週間反復投与毒性試験で認められた心臓重量増加及び大動脈流出路鉱質沈着にこれらの心血管系への影響が寄与している可能性が考えられた。

4.1.2.3　サルを用いた心血管系の安全性評価

カニクイザルを用いた用量漸増投与試験（GLP 非適用試験）[2.6.6-2.2 項]において，心電図及び心拍数への影響について検討した。

試験 1，8，12，15，及び 20 日に，3 例の雄カニクイザル（約 2～4 歳齢）に LNP023 をそれぞれ 10，50，100，300，及び 600 mg/kg の投与量で漸増経口投与した。投与前及び各投与試験 1～2 日，8～9 日，12～13 日，15～16 日，及び 20～21 日に，すべての動物にジャケット式テレメトリー装置を装着し，心電図及び心拍数を測定した。

心電図検査では，300 mg/kg 以上の投与により用量依存的な QTc 間隔の延長が，300 mg/kg 投与時には投与後 9～17 時間，600 mg/kg 投与時には投与後 9～20 時間の間に認められた。ベースライン補正後の QTc 間隔は，300 mg/kg 投与時に 20 ms（8%），600 mg/kg 投与時に 44 ms（18%）

延長した。QTc 間隔の延長は，300 mg/kg 投与時には 3 例中 2 例，600 mg/kg 投与時には 3 例中 3 例に認められた。その他の心電図間隔には，LNP023 投与による影響はみられず，不整脈は認められなかった。600 mg/kg 投与により，1 例では心室期外収縮が 3 回連続して認められた。低頻度の心室期外収縮はカニクイザルでは一般的であり，正常範囲内の変化と考えられた。心室期外収縮の発生率は極めて低く（全 26 時間の記録で 3 回のみ），また同程度に曝露された他の動物において心室性不整脈は認められなかったことから，心室期外収縮は LNP023 投与に関連した所見ではないと考えられた。

検討したいずれの投与量においても，LNP023 に関連した心拍数への影響は認められなかった。なお，本試験では血圧は測定しなかった。

300 mg/kg 投与時の血漿中平均総 Cmax に基づくと，QTc 間隔の延長は臨床用量 200 mg b.i.d.でのヒト総 Cmax の約 22 倍に相当する 88800 ng/mL 以上の血漿中濃度で観察された。また，無作用量（NOEL）である 100 mg/kg 投与時の血漿中平均総 Cmax は 35600 ng/mL であり，臨床用量投与時のヒト総 Cmax の約 9 倍に相当する。

4.2 ラットを用いた呼吸系に関する安全性薬理試験

ラットを用いて LNP023 の呼吸系に対する影響を GLP 適用で検討した[Table 2.6.3.4-1470566]。

雄 Wistar 系ラット（約 9～12 週齢，6 例／群）に，0（溶媒），100，及び 1000 mg/kg の LNP023 を単回経口投与し，全身プレチスモグラフィーを用いて呼吸パラメータ（呼吸数，1 回換気量，及び分時換気量）を測定した。呼吸パラメータは投与前 1 時間から投与後 6 時間まで，及び投与後 23～25 時間にラットを測定用チャンバーに入れて測定した。

LNP023 投与群の呼吸パラメータには，溶媒対照群と比較して有意な変化はみられなかった。

本試験では血漿中 LNP023 濃度は測定しなかったが，ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験では，雄ラットにおける 1000 mg/kg/日投与群の試験 1 日の平均総 Cmax は 42900 ng/mL であり，臨床用量 200 mg b.i.d.でのヒト総 Cmax の約 10 倍に相当する。

4.3 ラットを用いた中枢神経系に関する安全性薬理試験

ラットを用いて LNP023 の中枢神経系に対する影響を GLP 適用で検討した[Table 2.6.3.4-1470566]。

雄 Wistar 系ラット（約 9～12 週齢，6 例／群）に，0（溶媒），112，及び 770 mg/kg の LNP023（製剤分析の結果に基づいて投与量を調整）を単回経口投与した。投与前，投与後 0.5，1，2，4，6，及び 24 時間に Irwin 変法により行動観察を行った。また，投与前及び行動観察の直後に直腸温を測定した。

LNP023 投与群の行動及び体温には，溶媒対照群と比較して変化はみられなかった。

本試験では血漿中 LNP023 濃度は測定しなかったが，ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験では，雄ラットの 750 mg/kg/日投与群の試験 1 日の平均総 Cmax は 47900 ng/mL であり，臨床用量 200 mg b.i.d.でのヒト総 Cmax の約 12 倍に相当する。

5 薬力学的薬物相互作用試験

LNP023 の薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6 考察及び結論

LNP023 は新規作用機序を持つ経口投与可能な低分子の補体阻害薬であり，強力かつ選択的に FB を阻害する。効力を裏付ける試験から，LNP023 はヒト，ラット，イヌ，及びウサギを含む複数種の FB に対して AP 活性化を阻害し，その IC50 値はナノモル濃度の単位であった。PNH 型赤血球に対し，LNP023 は溶血及び赤血球表面への C3 フラグメント沈着をともに阻害した。一方，抗 C5 抗体薬では C3 フラグメント沈着を阻害できなかった。このことから LNP023 は，抗 C5 抗体薬で効果が認められている血管内溶血に加え，血管外溶血も抑制すると期待される。LNP023 は aHUS 患者で認められる 8 種類の変異 FB に結合性を示しその活性を阻害したことから，LNP023 は変異 FB を有する aHUS 患者に対しても野生型 FB と同様に効力を発揮できると考えられる。LNP023 は C3G 患者血清で C3 分解を阻害し，C3G，aHUS，及び MPGN 患者血清により惹起される SRBC の溶血を阻害した。さらに，C3Nef で安定化させた C3 転換酵素に対しても阻害作用を示した。C3G 及び aHUS の病態として，C3G は液相中，aHUS は細胞表面での AP 活性化異常を特徴とするが，LNP023 はいずれに対しても作用する。*In vivo* の検討で，LNP023 は AP 活性化が病態に寄与する 3 種類のげっ歯類モデルに対し薬理効果を発揮し，マウス LPS 誘発 AP 活性化モデルでは AP 活性化を強力に抑制し，その IC90 値は 1120 nM であった。マウス K/BxN 血清移入関節炎モデル及びラット受動的ヘイマン腎炎モデルではそれぞれ疾患の発症及び進行を抑制した。

副次的薬理試験から，LNP023 は FB に選択性を示し，広範なアッセイパネルを用いて検討した結果，mTOR に対し活性を示したが，それ以外の標的外作用は認められなかった。mTOR での IC50 値は 9.9 μM で，これはヒト非結合型 Cmax の約 5 倍に相当するが，非臨床毒性試験で認められた所見との関連は不明である。LNP023 は莢膜形成細菌（髄膜炎菌，肺炎球菌，及び Hib）のワクチン未接種血清又は血液ではもともと備わっている殺菌作用を減弱させたが，ワクチン接種済みでは殺菌作用に対する影響はない又は限定的であった。C5 又は C3 を阻害したときはこれらの菌に対する殺菌作用への影響が認められた。C5 阻害では，ワクチン接種状況にかかわらず，髄膜炎菌及び Hib に対する殺菌作用が減弱した。一方，肺炎球菌への殺菌作用には影響を及ぼさなかった。C3 阻害では，ワクチン接種状況にかかわらず，髄膜炎菌及び Hib に対する殺菌作用が減弱し，肺炎球菌に対しては抗体価依存的な殺菌作用が認められ，抗体価が低ければ作用が減弱した。このことから，LNP023 治療を受ける患者ではワクチン接種により，抗 C5 抗体薬又は

C3 阻害薬治療の患者に比べ，莢膜形成細菌に対して高い感染防御能を示すと示唆された。なお，髄膜炎菌の検討で，ワクチン接種後でもいくつかの血清型に対し抗体価が得られていない被験者血清が認められた。このような場合，LNP023 投与によりこれらの血清型の髄膜炎菌感染リスクが上昇するおそれがある。この懸念は C5 阻害及び C3 阻害療法でも同じく共通するものである。*In vivo* の検討で，2 種類のげっ歯類モデルを用いて T 細胞依存性 B 細胞応答への影響を評価した結果，LNP023 による影響は認められなかった。

これらの結果から，LNP023 は補体制御異常の病態を反映した *in vitro* 及び *in vivo* モデルで AP 活性化を強力に阻害した。また LNP023 は獲得免疫系に重大な影響を及ぼさないと考えられた。

ラットを用いた安全性薬理試験において，LNP023 は中枢神経系及び呼吸系に対して，それぞれ 770 及び 1000 mg/kg まで影響を示さなかった。このときの総曝露量は，臨床用量 200 mg b.i.d. でのヒト総 Cmax のそれぞれ約 12 倍及び 10 倍に相当する。イヌを用いた 2 週間反復投与毒性試験の高用量（1000 mg/kg/日）群の死亡例 1 例では，中枢神経症状（鎮静・動作緩慢，頭部反転動作，失調性歩行，及び痙攣）が認められた。本例の血漿中，脳組織，及び脳脊髄液では高い曝露が認められたが，他のラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験では中枢神経系への影響は認められていない。以上のことから，予定臨床用量（200 mg b.i.d.）において中枢神経系に対する影響が発現する可能性は低いと考えられた。

In vitro 安全性薬理試験では，LNP023 はヒト非結合型 Cmax の 28 倍以上の濃度までヒト心筋イオンチャネルに対して直接的な作用を示さなかった。hERG 阻害作用の IC50 値はヒト非結合型 Cmax の約 230 倍であった。*In vivo* 安全性薬理試験では，臨床用量 200 mg b.i.d.を上回る血漿中曝露量において，サルでは QTc 間隔の延長が，イヌでは心拍数増加，血圧低下，及び心収縮力増加が認められた。これらの所見は，各動物種に一貫して観察されたものではなかった。

サルを用いた用量漸増投与試験では，LNP023 の単回経口投与により QTc 間隔の延長が認められた。一方，イヌでは，サルと同等以上の血漿中曝露量でも QTc 間隔の延長は認められなかった。サルでみられた QTc 間隔延長の発現機序については，血漿中曝露量と同等の濃度でヒト心筋イオンチャネル又は hERG トラフィッキングに影響はみられなかったことから，イオンチャネルと関連付けることはできなかった。イヌでは 300 mg/kg/日まで QTc 間隔への影響は認められず（総 Cmax：137000 ng/mL），またサルの NOEL は 100 mg/kg（総 Cmax：35600 ng/mL）であった。これらの投与量における血漿中総 Cmax は，臨床用量 200 mg b.i.d.におけるヒト総 Cmax と比較して，イヌで約 33 倍，サルで約 9 倍であった。

イヌでは，15 mg/kg/日以上の投与量で用量依存的な急性の心拍数増加が認められた。この所見は，4 週間反復投与毒性試験では 15 mg/kg/日以上（総 Cmax：≥ 12500 ng/mL，臨床用量でのヒト総 Cmax の約 3 倍）において，また安全性薬理試験では 100 mg/kg 以上の投与量（総 Cmax：≥ 68700 ng/mL，臨床用量でのヒト総 Cmax の約 17 倍）において認められた。テレメトリーイヌでは 50 mg/kg 以上の投与量で血圧の低下が認められた（総 Cmax：≥ 33600 ng/mL，臨床用量でのヒト総 Cmax の約 8 倍）。50 mg/kg 以上の投与によって総末梢血管抵抗の低下が認められており，

血圧低下に寄与している可能性が考えられた。また，イヌの胸部大動脈及び腸間膜動脈リング標本を用いた *in vitro* 試験において，LNP023 は直接的な血管拡張作用を示さなかったことから，イヌでの血圧低下には間接的なメカニズムが関与している可能性が考えられた。成熟イヌを用いた反復投与毒性試験で認められた心拍数増加は，150 mg/kg/日以下の群では Tmax 付近（投与後 4 時間まで）で最大となり，反復投与により経時的に減弱した（39 週間反復投与毒性試験での曝露量に基づくと，臨床用量でのヒト総 Cmax の約 19 倍，総 AUC の約 14 倍）。一方，2 及び 4 週間反復投与毒性試験の 300 mg/kg/日以上の投与量では，心拍数の増加は持続的に認められ，長期的な影響として心臓に病理組織学的所見を伴っていた（4 週間反復投与毒性試験での曝露量に基づくと，臨床用量でのヒト総 Cmax の約 49 倍，総 AUC の約 39 倍）。イヌと同等の血漿中曝露量において，ラットでは心拍数及び血圧への影響は認められず，またサルでも心拍数への影響は認められなかった（サルでは血圧を測定していない）。

幼若（約 8 週齢）及び若齢成熟（8 ヵ月齢）イヌを用いた 14 日間反復投与による心血管系安全性薬理試験の 150 mg/kg 投与群（総 Cmax：53400 ng/mL，臨床用量でのヒト総 Cmax の約 13 倍）では，心拍数増加及び血圧低下に加えて心収縮力の増加及び血行動態の異常が認められ，これらの影響は幼若イヌにおいてより顕著であった。この差は，幼若イヌの心血管系は未発達でベースライン時で既に高心拍出量状態にあり，LNP023 投与に対して適応性が低いことに起因していると考えられた。高心拍出量状態は，成熟イヌでは観察されず幼若イヌを用いた 52 週間反復投与毒性試験で新たに観察された心臓重量増加及び大動脈流出路の鉱質沈着に寄与した可能性が考えられた。

ヒト初代培養 CM を用いた *in vitro* 試験では，成人ドナー由来 CM の収縮力に対する LNP023 の直接作用は，既存の陽性変力薬と比較して軽度であり，収縮／弛緩キネティクス及びカルシウムトランジェントへの影響はみられなかった。したがって，LNP023 は成人の心筋収縮力に対して臨床的意義のある影響を及ぼさないことが示唆された。

健康被験者を対象とした第 I 相臨床試験において，LNP023 を 1200 mg の用量まで単回投与したときの QTc 間隔，心拍数，及び血圧に変化は認められなかった[2.7.6-3.1.1 項]。このときの総 Cmax は 17200 ng/mL であり，臨床用量における総 Cmax の約 4 倍に相当する。非臨床でみられた所見に関しては安全域が保たれていること，第 I 相臨床試験において心血管系への影響が認められなかったことを踏まえると，臨床用量 200 mg b.i.d.において，非臨床試験で認められた心血管系機能の変化が発現する可能性は低いと考えられた。

以上，一連の非臨床薬理試験成績から，PNH 患者に対する LNP023 の有効性及び安全性が確認され，その治療薬として添付文書案に規定した用法・用量で本薬を使用することは支持されると判断した。

7 参考文献

[Abi-Gerges N, Indersmitten T, Truong K, et al. (2020)] Multiparametric mechanistic profiling of inotropic drugs in adult human primary cardiomyocytes. Sci Rep; 10(1):7692.

[Cybulsky AV, Rennke HG, Feintzeig ID, et al. (1986)] Complement-induced glomerular epithelial cell injury. Role of the membrane attack complex in rat membranous nephropathy. J Clin Invest; 77(4):1096-107.

[Fakhouri F, Frémeaux-Bacchi V, Noël LH, et al. (2010)] C3 glomerulopathy: a new classification. Nat Rev Nephrol; 6(8):494-9.

[Gauthier A, Wagner E, Thibeault R, et al. (2021)] A novel case of complement factor B deficiency. J Clin Immunol; 41(1):277-9.

[Goodship THJ, Cook HT, Fakhouri F, et al. (2017)] Atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy: conclusions from a “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO) Controversies Conference. Kidney Int; 91(3):539-51.

[Hebell T, Ahearn JM, Fearon DT (1991)] Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. Science; 254(5028):102-05.

[Hew KW and Keller KA (2003)] Postnatal anatomical and functional development of the heart: a species comparison. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol; 68(4):309-20.

[Ispasanie E, Muri L, Schubart A, et al. (2021)] Alternative complement pathway inhibition does not abrogate meningococcal killing by serum of vaccinated individuals. Front Immunol; 12:747594.

[Ji H, Ohmura K, Mahmood U, et al. (2002)] Arthritis critically dependent on innate immune system players. Immunity; 16(2):157-68.

[Keenan CM and Vidal JD (2006)] Standard morphologic evaluation of the heart in the laboratory dog and monkey. Toxicol Pathol; 34(1):67-74.

[Langereis JD, van der Molen RG, de Kat Angelino C, et al. (2021)] Complement factor D haplodeficiency is associated with a reduced complement activation speed and diminished bacterial killing. Clin Transl Immunology; 10(4):e1256.

[Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, et al. (2015)] Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. Front Immunol; 6:262.

[Molina H, Wong W, Kinoshita T, et al. (1992)] Distinct receptor and regulatory properties of recombinant mouse complement receptor 1 (CR1) and Crry, the two genetic homologues of human CR1. J Exp Med; 175(1):121-9.

[Muri L, Ispasanie E, Schubart A, et al. (2021)] Alternative complement pathway inhibition abrogates Pneumococcal Opsonophagocytosis in vaccine-naïve, but not in vaccinated individuals. Front Immunol; 12:732146.

[Muri L, Schubart A, Thorburn C, et al. (2022)] Inhibition of the different complement pathways has varying impacts on the serum bactericidal activity and opsonophagocytosis against *Haemophilus influenzae* type b. Front Immunol; 13:1020580.

[Nguyen N, Nguyen W, Nguyenton B, et al. (2017)] Adult human primary cardiomyocyte-based model for the simultaneous prediction of drug-induced inotropic and pro-arrhythmia risk. Front Physiol; 8:1073.

[Schröder-Braunstein J and Kirschfink M (2019)] Complement deficiencies and dysregulation: Pathophysiological consequences, modern analysis, and clinical management. Mol Immunol; 114:299-311.

[Schubart A, Anderson K, Mainolfi N, et al. (2019)] Small-molecule factor B inhibitor for the treatment of complement-mediated diseases. Proc Natl Acad Sci U S A; 116(16):7926-31.

[Schubart A, Flohr S, Junt T, et al. (2023)] Low-molecular weight inhibitors of the alternative complement pathway. Immunol Rev; 313(1):339-57.

[Spicer AP, Seldin MF, Gendler SJ (1995)] Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse decay-accelerating factor genes. Duplicated genes encode glycosylphosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms. J Immunol;155(6):3079-91.

[Thielen AJF, Zeerleder S, Wouters D (2018)] Consequences of dysregulated complement regulators on red blood cells. Blood Rev; 32:280-8.

[Yang H, Rudge DG, Koos JD, et al. (2013)] mTOR kinase structure, mechanism and regulation. Nature; 497(7448):217-23.

特発性造血障害に関する調査研究班 (2020) 発作性夜間ヘモグロビン尿症診療の参照ガイド令和 1 年改訂版 (Internet) Available from: <http://zoketsushogaihan.umin.jp/file/2020/06v2.pdf> (Accessed 28 April 2023)

非典型溶血性尿毒症症候群診断基準改訂委員会，日本腎臓学会，日本小児科学会 (2015) 非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）診療ガイド 2015 (Internet) Available from:<https://jsn.or.jp/guideline/pdf/ahus_2016-2.pdf>(Accessed 10 March 2023)

目　次

目　次 2
略号一覧 3
2.6.3.1　薬理試験一覧表 5
2.6.3.2　薬効を裏付ける試験 11
2.6.3.3　副次的薬理試験 11
2.6.3.4　安全性薬理試験 12
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 19

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
aHUS	atypical hemolytic uremic syndrome	非典型溶血性尿毒症症候群
AP	alternative complement pathway	補体第二経路
Bb	fragment of factor B	-
b.i.d.	twice daily (bis in die)	1 日 2 回
C3	complement component 3	補体成分 3
C3a, C3b, C3d	fragment of C3	-
C3G	C3 glomerulopathy	C3 腎症
C3GN	C3 glomerulonephritis	C3 腎炎
CD	cluster of differentiation	分化抗原群
CM	cardiomyocyte	心筋細胞
CNS	central nervous system	中枢神経系
CP	classical complement pathway	補体古典経路
CTD	Common Technical Document	国際共通化資料
CVF-Bb	cobra venom factor bound to Bb	コブラ毒因子結合 Bb
DDD	dense deposit disease	デンスデポジット病
DNP	dinitrophenyl	ジニトロフェニル
DNP-KLH	dinitrophenyl-keyhole limpet hemocyanin	ジニトロフェニル結合キーホールリンペットヘモシアニン
EF	ejection fraction	駆出率
EGTA	ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N’,N’-tetraacetic acid	エチレングリコールビス(β-アミノエチルエーテル)-N,N,N’,N’-四酢酸
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
EP1	prostaglandin E2 receptor EP1	プロスタグランジン E2 受容体 EP1
EP3	prostaglandin E2 receptor EP3	プロスタグランジン E2 受容体 EP3
ESV	end systolic volume	左室収縮末期容量
FAS	fractional area shortening	左室面積縮小率
FB	complement factor B	補体 B 因子
FD	complement factor D	補体 D 因子
FP	prostaglandin F2α receptor	プロスタグランジン F2α 受容体
FS	fractional shortening	左室内径短縮率
Fx1A	fraction 1A	-
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
GPCR	G-protein-coupled receptor	G タンパク質共役受容体
H&E	hematoxylin and eosin	ヘマトキシリン-エオジン
HEK	human embryonic kidney (cell)	ヒト胎児腎臓（細胞）
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
iC3b	inactivated C3b	C3b 不活性化体
IC50	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
IgM	immunoglobulin M	免疫グロブリン M
i.p.	intraperitoneal	腹腔内
i.v.	intravenous	静脈内
IVSd	interventricular septum in diastole	拡張期心室中隔厚
KIM-1	kidney injury molecule-1	-
KLH	keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
LVAs	left ventricular end systolic area	左室収縮末期面積
LVIDs	left ventricular internal diameter in systole	収縮期左室内径
LVPWd	left ventricular posterior wall in diastole	拡張期左室後壁厚
MAC	membrane attack complex (C5b-9)	膜侵襲複合体（C5b-9）
MPGN	membranoproliferative glomerulonephritis	膜性増殖性糸球体腎炎
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
NT-proBNP	N-terminal pro-brain type natriuretic peptide	脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体 N 端フラグメント
PAS	periodic acid-Schiff	過ヨウ素酸シッフ
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
p.o.	per os	経口
SAM	systolic anterior motion of the anterior mitral valve leaflet	僧帽弁前葉の収縮期前方運動
SEM	standard error of the mean	標準誤差
SRBC	sheep red blood cell	ヒツジ赤血球
T3	triiodothyronine	トリヨードサイロニン
T4	thyroxine	サイロキシン
TP	thromboxane A2 receptor	トロンボキサン A2 受容体
TR-FRET	time-resolved fluorescence resonance energy transfer	時間分解蛍光共鳴エネルギー移動

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Type of Study	Test System / Protocol	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
効力を裏付ける試験					
> *In vitro* 薬理試験					
Biochemical assay for binding affinity of LNP023 to the catalytic domain of FB	TR-FRET assay. Dose-titration of LNP023 from 0.0003 µM to 100 µM to determine IC50. LNP023 competitively inhibits binding of an active site reporter ligand (Cy5-labelled NVP-CKJ036-DA-1) to the protease domain of human FB (amino acids 470-764). In addition, LNP023 was tested on a panel of 33 additional human proteases (selected metallo, aspartic, cysteine and serine proteases, including FD, plasmin and thrombin).	*In vitro*	Novartis	[RD-2015-00230]	4.2.1.1-1
In vitro assays for AP inhibition in mouse, human and cynomolgus monkey serum	Zymosan assay. Dose-titration of LNP023 (up to10 µM) to determine the IC50 for AP inhibition on zymosan-coated plates in 6% (mouse and human) or 50% serum (mouse, cynomolgus monkey and human). Assay buffer contained $MgCl_2$ and EGTA to selectively block the classical and lectin pathways, while leaving the AP intact.	*In vitro*	Novartis	[RD-2015-00152]	4.2.1.1-2
In vitro assay for AP inhibition in rat serum	Zymosan assay. Dose-titration of LNP023 (10 µM to 0.005 µM) to determine the IC50 for AP inhibition on zymosan-coated plates in 6% or 50% rat serum. Assay buffer contained $MgCl_2$ and EGTA to selectively block the classical and lectin pathways, while leaving the AP intact. AP activation was quantified by ELISA.	*In vitro*	Novartis	[RD-2017-00357]	4.2.1.1-3
In vitro assay for AP inhibition in rabbit serum	Zymosan assay. Dose-titration of LNP023 (10 µM to 0.00006 µM) to determine the IC50 for AP inhibition on zymosan-coated plates in 50% rabbit serum. Assay buffer contained $MgCl_2$ and EGTA to selectively block the classical and lectin pathways, while leaving the AP intact. AP activation was quantified by ELISA.	*In vitro*	Novartis	[RD-2017-00003]	4.2.1.1-4
In vitro assay for AP inhibition in dog serum	Zymosan assay. Dose-titration of LNP023 (100 µM to 0.001 µM) to determine the IC50 for AP inhibition on zymosan-coated plates in 50% dog serum. Assay buffer contained $MgCl_2$ and EGTA to selectively block the classical and lectin pathways, while leaving the AP intact. AP activation was quantified by ELISA.	*In vitro*	Novartis	[RD-2014-00521]	4.2.1.1-5
In vitro assays for AP inhibition in cynomolgus monkey, mouse	Zymosan assay. Dose-titration of LNP023 (100 µM to 0.001 µM) to determine the IC50 for AP inhibition on zymosan-coated plates in 50%	*In vitro*	Novartis	[RD-2014-00605]	4.2.1.1-6

Type of Study	Test System / Protocol	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
and pig serum	mouse, pig or cynomolgus monkey serum. Assay buffer contained $MgCl_2$ and EGTA to selectively block the classical and lectin pathways, while leaving the AP intact. AP activation was quantified by ELISA.				
In vitro assay for AP inhibition in human serum	Zymosan assay. Dose-titration of LNP023 (100 µM to 0.001 µM) to determine the IC50 for AP inhibition on zymosan-coated plates in 50% human serum. Assay buffer contained $MgCl_2$ and EGTA to selectively block the classical and lectin pathways, while leaving the AP intact. AP activation was quantified by ELISA.	*In vitro*	Novartis	[RD-2015-00228]	4.2.1.1-7
In vitro assay for AP inhibition in human whole blood	Zymosan assay. Dose-titration of LNP023 (100 µM to 0.002 µM) to determine the IC50 for AP inhibition in 50% human whole blood on zymosan-coated plates. Assay buffer contained $MgCl_2$ and EGTA to selectively block the classical and lectin pathways, while leaving the AP intact. AP activation was quantified by ELISA.	*In vitro*	Novartis	[RD-2015-00153]	4.2.1.1-8
In vitro assay for CP inhibition	Wieslab Complement System Classical Pathway assay. Dose-titration of LNP023 (up to 100 µM) to determine the IC50 for CP inhibition in 1% human serum.	*In vitro*	Novartis	[RD-2022-00256]	4.2.1.1-9
PNH surrogate assay for AP inhibition	Dose-titration of LNP023 to determine the IC50 values for C3d and C5b-9 deposition and hemolysis of PNH-like erythrocytes in 50% or 100% acidified human serum. PNH-like erythrocytes were generated from healthy volunteer erythrocytes by incubation with blocking antibodies against CD55 and CD59. Assay buffer contained $MgCl_2$ and EGTA to selectively block the classical and lectin pathways, while leaving the AP intact. Hemolysis was quantified by measuring absorbance in supernatants; deposition of C3d and C5b-9 on erythrocytes was measured by flow cytometry.	*In vitro*	Novartis	[RD-2015-00232]	4.2.1.1-10
Assay for AP inhibition in serum from patients with complement-driven diseases (aHUS, C3GN, DDD, MPGN)	Sheep red blood cell (SRBC) lysis assay. Inhibition of lysis of SRBCs in 20% serum from patients with different diseases (C3G: n = 7, of which n = 4 with C3GN and n = 3 with DDD, aHUS: n = 3 and MPGN: n = 1) at two doses of LNP023 (0.15 µM and 0.6 µM). Assay buffer contained Mg^{2+} and EGTA to selectively block the classical and lectin pathways, while leaving the AP intact.	*In vitro*	[redacted]	[RD-2020-00407]	4.2.1.1-11
Binding and functional inhibtion of FB mutants	Fluorescence polarization assay. Binding affinity of LNP023 to wild-type FB and 8 FB mutants was determined by competitive inhibition of	*In vitro*	Novartis	[RD-2022-00012]	4.2.1.1-12

Type of Study	Test System / Protocol	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
identified in patients with atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS)	binding of an active site reporter ligand (Cy5-labelled NVP-CKJ036-DA-1) to the protease domain of human FB. C3 convertase assay. Inhibition of the C3 convertase CVF-Bb (containing wild-type or mutant FB) by LNP023 (100 µM to 0.000007 µM) was determined by quantification of C3 cleavage (C3a ELISA). Zymosan assay. Dose-titration of LNP023 (1 µM to 0.0014 µM) to determine the IC50 for AP inhibition in 6% human FB-depleted serum, supplemented with recombinant FB (wild-type or mutant) on zymosan-coated plates. The buffer contained $MgCl_2$ and EGTA to selectively block the classical and lectin pathways, while leaving the AP intact. AP activation was quantified by ELISA.				
> *In vivo* 薬理試験					
LPS model in mice (PK / PD)	Female C57BL/6 mice were injected with 50 µg LPS (*S. typhimurium*) i.p.. Dose response: LNP023 (3 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg or 30 mg/kg) or vehicle was administered p.o. 3.5 h post LPS treatment. C3 activation fragments C3d and iC3b were quantified from blood 7.5 h post LPS injection via Western blot. Duration of activity: 30 mg/kg LNP023 was administered at different time points before or after LPS injection. C3 activation fragments C3d and iC3b were quantified from blood 7.5 h post LPS injection via Western blot.	*In vivo,* oral gavage single dose	Novartis	[RD-2015-00210]	4.2.1.1-13
Passive Heymann nephritis model for membranous nephropathy in rats – prophylactic LNP023 treatment	Male Sprague Dawley rats were injected with sheep anti-rat Fx1A serum i.v.. LNP023 (20 mg/kg or 60 mg/kg) or vehicle treatment (p.o., b.i.d.) was initiated prior to anti-Fx1A injection and continued throughout the study. Urine was collected on LabSand® at multiple timepoints to measure creatinine, albumin and total proteins. Rats were sacrificed 15 days post anti-Fx1A injection, kidneys were collected and weighed. Inflammation was determined by hematoxylin & eosin (H&E) and PAS stainings. C3 and C5b-9 complement deposition in glomerulus was determined by immunofluorescent staining. KIM-1 mRNA expression (marker for kidney injury) was determined by *in situ* hybridization.	*In vivo,* oral gavage	Novartis	[DIS R1720571]	4.2.1.1-14

Type of Study	Test System / Protocol	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Passive Heymann nephritis model for membranous nephropathy in rats – therapeutic LNP023 treatment	Male Sprague Dawley rats were injected with sheep anti-rat Fx1A serum i.v.. Vehicle or LNP023 treatment (60 mg/kg p.o., b.i.d.) was initiated 6 days post anti-Fx1A injection and continued until the end of the study. Urine was collected on LabSand® at multiple timepoints to measure creatinine, albumin and total proteins. Rats were sacrificed 14 days post anti-Fx1A injection, kidneys were collected and weighed. Inflammation was determined by H&E staining. C3 and C5b-9 complement deposition in glomerulus was determined by immunofluorescent staining. KIM-1 mRNA expression for kidney injury was determined by *in situ* hybridization.	*In vivo,* oral gavage	Novartis	[DIS R1820106a]	4.2.1.1-15
> PK / PD relationship					
Ex vivo PD in rat 26-week toxicity study	Serum samples were collected 24 h after the last dose of 26-week daily oral treatment with LNP023 at 50, 150 or 750 mg/kg/day or vehicle in the repeated dose toxicity study 1570193. Serum was stimulated at 50% concentration on zymosan-coated wells in gelatin buffer containing $MgCl_2$ and EGTA to selectively block classical and lectin pathways, while leaving the AP intact. AP inhibition was quantified by ELISA.	*In vivo*, oral gavage multiple dose	Novartis	[RD-2019-00023]	4.2.1.1-16
Ex vivo PD in dog 39-week toxicity study	Serum samples were collected 24 h after the last dose of 39-week daily oral treatment with LNP023 at 5, 30 or 150 mg/kg/day or vehicle in the repeated dose toxicity study 1570192. Serum was stimulated at 50% concentration on zymosan-coated wells in gelatin buffer containing $MgCl_2$ and EGTA to selectively block classical and lectin pathways, while leaving the AP intact. AP inhibition was quantified by ELISA.	*In vivo*, oral gavage multiple dose	Novartis	[RD-2018-00505]	4.2.1.1-17
Ex vivo PD in 52-week juvenile dog toxicity study	Serum samples were collected both before treatment initiation and 24 h after the last dose of 52-week daily oral treatment with LNP023 at 0, 5, 30 or 150 mg/kg/day in the repeated dose toxicity study 1870009. Serum was stimulated at 50% concentration on zymosan-coated wells in buffer containing $MgCl_2$ and EGTA to selectively block classical and lectin pathways, while leaving the AP intact. AP inhibition was quantified by ELISA.	*In vivo*, oral gavage multiple dose	Novartis	[RD-2020-00544]	4.2.1.1-18

Type of Study	Test System / Protocol	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
副次的薬理試験					
> *In vitro* 副次的薬理試験					
LNP023 inhibition of human cathepsin proteases	LNP023 was tested at 1, 3, 10, 30, 100 µM on a panel of 11 human cathepsin proteases	*In vitro*	Novartis and [redacted]	[DIS R1720165]	4.2.1.2-1
LNP023 inhibition of human G-protein-coupled receptors (GPCRs), transporters, ion channels, nuclear receptors, and enzymes (off-target panel)	Dose-titration of LNP023 up to 30 µM (or up to 100 µM) to determine IC50 in a panel of radioligand binding and functional assays on 122 GPCRs, ion channels, nuclear receptors, transporters, and enzymes.	*In vitro*	[redacted] and	[RD-2015-00689]	4.2.1.2-2
LNP023 inhibition of human nuclear receptors	LNP023 was tested up to 100 µM in cellular and nuclear receptor functional assays (prostaglandin receptors EP1, EP3, FP and TP).	*In vitro*	[redacted]	[RD-2020-00450]	4.2.1.2-3
LNP023 inhibition of human kinases	LNP023 was tested from 0.003 µM to 10 µM against the activity of 31 protein kinases.	*In vitro*	Novartis	[RD-2019-00018]	4.2.1.2-4
> *In vivo* 副次的薬理試験					
DNP-KLH immunization of mice to determine effects on T cell dependent antibody responses (PK / PD)	Female C57BL/6J mice were immunized with DNP-KLH/alum i.p. and treated with 30 mg/kg or 100 mg/kg LNP023 or vehicle p.o. b.i.d., starting 1 or 2 h prior to immunization. The primary antibody response was analyzed on day 8 or 10, and the secondary antibody response on day 19 or 20 following a second immunization (boost) on day 8 or 9. Readouts: Blood PK, anti-DNP antibody titers (IgG and IgM, ELISA), germinal center response in the spleen (flow cytometry), cell proliferation in the spleen (Ki67 immunohistochemistry) and AP inhibition (Western blot).	*In vivo,* oral gavage	Novartis	[RD-2018-00517] [DIS R1820029] [DIS R1820030]	4.2.1.2-5 4.2.1.2-6 4.2.1.2-7
Sheep red blood cell immunization of rats to determine effects on T cell dependent antibody responses (PK / PD)	Female Wistar rats were injected with $1x10^8$ SRBCs i.v. and treated with 6, 20, 60 or 120 mg/kg LNP023 or vehicle b.i.d. p.o. starting 2 h prior to immunization and continued throughout the study. Blood was sampled on day 4 (2 h post dosing) and day 7 (about 12 h post dosing) to determine SRBC-specific IgM (ELISA), AP inhibition (Western blot) and blood PK.	*In vivo,* oral gavage	Novartis	[RD-2018-00519]	4.2.1.2-8
安全性薬理試験	2.6.3.4 項参照				

Type of Study	Test System / Protocol	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
薬力学的薬物相互作用試験					
実施していない					

2.6.3.2　薬効を裏付ける試験

2.6.3.1 項に記載

2.6.3.3　副次的薬理試験

2.6.3.1 項に記載

2.6.3.4 安全性薬理試験

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)[a]	Gender and No. per Group	Significant Findings	Study Number	Location in CTD
> In vitro							
Cardiovascular	Human ether-à-go-go-related gene (hERG) channel current in human embryonic kidney (HEK) 293 cells	*In vitro* (Patch clamp)	3, 10 µM	4 cells / concentration	hERG current inhibition by (Mean ± SEM) 2.9 ± 0.4% at 3 µM and 4.1 ± 0.6% at 10 µM. IC50 > 10 µM	[1414526]	4.2.1.3-1
Cardiovascular	hERG channel current in HEK293 cells	*In vitro* (Patch clamp)	30, 100, 300 µM	≥ 3 cells / concentration	hERG current inhibition by (Mean ± SEM) 4.0 ± 1.3% at 30 µM, 15.5 ± 0.7% at 100 µM and 30.7 ± 1.5% at 300 µM. IC50 > 300 µM	[1414561]	4.2.1.3-2
Cardiovascular	hERG channel current in HEK293 cells	*In vitro* (Patch clamp)	100, 300, 600, 1000 µM	3 cells / concentration	hERG current inhibition by (Mean ± SEM) 8.9 ± 0.5% at 100 µM, 32.1 ± 1.2% at 300 µM, 68.8 ± 3.0% at 600 µM and 86.3 ± 1.2% at 1000 µM versus 2.8 ± 0.7% in control. IC50 = 414.9 µM	[1470561] [b]	4.2.1.3-3
Cardiovascular	hERG channel expression in HEK293 cells	*In vitro* (Trafficking assay)	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 µM	3 wells / concentration	No effect on hERG trafficking inhibition at all concentrations tested.	[1415101]	4.2.1.3-4
Cardiovascular	hERG channel expression in HEK293 cells	*In vitro* (Trafficking assay)	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 µM	≥ 3 wells / concentration	No effect on hERG trafficking inhibition at all concentrations tested.	[1415103]	4.2.1.3-5
Cardiovascular	hKir2.1, hKvLQT1/hminK, hKv4.3 and hCav1.2 channel current	*In vitro* (Patch clamp)	3, 10 µM	3 cells / concentration	IC50 > 10 µM	[1415004]	4.2.1.3-6

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)[a]	Gender and No. per Group	Significant Findings	Study Number	Location in CTD
	in mammalian cells						
Cardiovascular	hKir2.1, hKvLQT1/hminK, hKv4.3 and hCav1.2 channel current in mammalian cells	*In vitro* (Patch clamp)	100, 300 µM or 100, 180, 300 µM for hKv4.3	≥ 3 cells / concentration	IC50 > 300 µM	[1415008]	4.2.1.3-7
Cardiovascular	Human primary ventricular cardiomyocytes (CMs) from adult donors (≥ 17- and ≤ 60-year old) and young donors (≤ 10-year old)	*In vitro* (Contractility assay)	10, 30, 100 µM	≥ 5 cells / concentration from N = 3 adult donors for acute and 24-hours incubation; from N = 2 young donors for acute incubation and from N = 1 young donor for 24-hours incubation conditions.	Acute contractility: Adult CMs: with control values set to 100%, means of LNP023 effect on contractility amplitude at 3 µM, 10 µM, 30 µM and 100 µM were 102%, 114%, 126% and 131%, respectively. No effects on contractility kinetics. No arrythmias. Juvenile CMs: with control values set to 100%, means of LNP023-induced increase in contractility amplitude at 3 µM, 10 µM, 30 µM and 100 µM were 150%, 178%, 181% and 184%, respectively, with large inter-donor variability. No effects on contractility kinetics. No arrythmias. Note: Juvenile data are highly exploratory, due to lack of historical data and very small N from this study.	[2120033-a]	4.2.1.3-8
Cardiovascular	Human primary ventricular CMs from adult donors (≥ 17- and ≤ 60-year old) and young donors (≤ 10-	*In vitro* (Calcium imaging assay)	10, 30, 100 µM in adult donor CM; 3, 10 µM in young donor CM	≥ 5 cells / concentration from N = 2 adult donors for acute and 24-hours incubation;	No LNP023 effects on calcium transient amplitude or kinetics or arrythmias in either adult or juvenile CMs at all concentrations tested, with the exception of slight increase in the calcium transient kinetics noted at the concentration of 10 µM only after 24-hours incubation in CMs isolated from one young donor (M, 10-yr).	[2120033-b]	4.2.1.3-9

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)[a]	Gender and No. per Group	Significant Findings	Study Number	Location in CTD
	year old)			from N = 1 young donors for acute incubation and from N = 2 young donor for 24-hours incubation conditions.	Note: Juvenile data are highly exploratory, due to lack of historical data and very small N from this study.		
Cardiovascular	Rat and dog aortic and mesenteric artery rings	*In vitro* (Vasoreactivity assay)	1, 3, 10, 30, 100 µM	n ≥ 3 rings / concentration	No direct vasodilatory activity of LNP023 on rat and dog arteries (aorta and mesentery) at all concentrations tested.	[1520203]	4.2.1.3-10
> In vivo							
Cardiovascular	Rat	Oral (gavage) Hydrochloride in 0.5% (w/v) methylcellulose and 0.5% (v/v) Tween 80 (polysorbate 80)	0, 1000 mg/kg	Male, N = 8	No LNP023 effects on heart rate and blood pressure.	[1570154]	4.2.1.3-11
Cardiovascular	Dog / Beagle	Oral (gavage) Hydrochloride in 0.5% (w/v) methylcellulose and 0.5% (v/v) Tween 80 (polysorbate 80)	0, 600 mg/kg	Male, N = 3	600 mg/kg: Emesis (2 out of 3 animals); 50% food consumption (2 out of 3 animals); lower mean arterial blood pressure [up to −26 mmHg (−23%)]; higher heart rate [up to +40 bpm (+43%)].	[1470817]	4.2.1.3-12

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)[a]	Gender and No. per Group	Significant Findings	Study Number	Location in CTD
Cardiovascular	Dog	Oral (gavage) Hydrochloride in 0.5% (w/v) methylcellulose and 0.5% (v/v) Tween 80 (polysorbate 80)	0, 50, 100, 200, 600 mg/kg	Male, N = 4	600 mg/kg: Emesis (3 out of 4 animals); diarrhea (2 out of 4 animals); lower mean arterial blood pressure [up to −35 mmHg (−33%)]; higher heart rate [up to +69 bpm (+71%)]. Lower total peripheral resistance [only measured in one animal (animal no. 1004) with up to −28 mmHg*min/L (−51%)]. 200 mg/kg: lower mean arterial blood pressure [up to −22 mmHg (−21%)]; higher heart rate [up to +47 bpm (+50%)]; Lower total peripheral resistance [only measured in one animal (animal no. 1004) with up to −21 mmHg*min/L (−39%)]. 100 mg/kg: lower mean arterial blood pressure [up to −15 mmHg (−15%)]; higher heart rate [up to +36 bpm (+38%)]; Lower total peripheral resistance [only measured in one animal (animal no. 1004) with up to −21 mmHg*min/L (−38%)]. 50 mg/kg: lower mean arterial blood pressure in one animal (animal no. 1004) only [up to −21 mmHg (−22%)]; lower total peripheral resistance [only measured in one animal (animal no. 1004) with up to −10 mmHg*min/L (−19%)].	[1570153]	4.2.1.3-13
Cardiovascular	Dog / Beagle	Oral (gavage) Monohydrochloride Moda Fine.002 in 0.5% (w/w) methylcellulose and 0.5% (w/w) Tween 80 (polysorbate 80)	0, 15, 50, 300 mg/kg	Male, N = 4	Oral administration of LNP023 at 15 and 50 mg/kg had no test article-related effect on cardiovascular and heamodynamic parameters or body temperature in the dog when compared with the vehicle. Oral administration of LNP023 at 300 mg/kg produced test article-related statistically significant decreases in blood pressure, with secondary increases in heart rate and decreases in RR and PR intervals in the dog when compared with the vehicle.	[1470565][b]	4.2.1.3-14
Cardiovascular	Dog / Beagle	Oral (gavage) Suspension in	0, 30, 150 mg/kg/da	Juvenile phase:	Mortality: one preterminal death in one adult female animal at 150 mg/kg/day on day 12. The animal was	[2170052]	4.2.1.3-15

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)[a]	Gender and No. per Group	Significant Findings	Study Number	Location in CTD
	Juvenile (8-weeks old) and adult (8-months old)	0.5% (w/w) methylcellulose, Type 15 cPs, aqueous solution containing 0.5% (w/w) Tween 80 (polysorbate 80)	y for 14 days + 1 week recovery (0 and 150 mg/kg/day)	Main study: 4F (0 and 30 mg/kg/day), 1M + 3F (150 mg/kg/day) Recovery Study: 1M + 2F (0 mg/kg/day), 3F (150 mg/kg/day) Adult phase: Main study: 4F / dose; Recovery study: 3F (0 and 150 mg/kg/day)	euthanized due to a low platelet count and skin petechia correlating with minimal to mild hemorrhage in multiple tissues. The multiple hemorrhages with regenerative markedly decreased red blood cell mass, severely decreased platelets, and increased megakaryocyte cellularity in the bone marrow and alveolar septa of the lung, were considered consistent with thrombocytopenia. The cause of the thrombocytopenia could not be identified and was not directly associated to the administration of LNP023. Clinical observations: increased incidence of salivation during the dosing phase of the juvenile animals at 150 mg/kg/day. Cardiovascular quantitative assessment: Increases in heart rate and cardiac contractility (as indicated by mild decreases in the QA interval) and decreases in systemic blood pressures were generally noted from 1 to 10 hours postdose in the juvenile and adult animals at 150 mg/kg/day throughout the dosing phase. Echocardiography: Quantitative cardiovascular changes correlated with mild cardiac changes such as decreased left ventricular internal diameter in systole (LVIDs), left ventricular end systolic area (LVAs) and end systolic volume (ESV), and increased fractional shortening (FS), ejection fraction (EF), fractional area shortening (FAS), cardiac output and heart rate from day 1 to 14 in juvenile and adult animals at 150 mg/kg/day. Minimally decreased ESV and increased cardiac output were also noted in adult animals only at 30 mg/kg/day, correlating with increased heart rate. The effects were not progressive throughout days 1 to	(Gene expression: [DIS R2170052d])	

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)[a]	Gender and No. per Group	Significant Findings	Study Number	Location in CTD
					14. More pronounced changes were observed in the juvenile animals. Although both juvenile and adult animals displayed similar percentage increases in EF, FS along with decreased ESV, and increases in cardiac output at 150 mg/kg/day, these changes strongly correlated with heart rate in adults but not in the juvenile animals; suggesting alterations in contractility in younger animals, as opposed to effects being solely heart rate driven. The more pronounced cardiac effect in younger animals was also supported by signs of increased workload such as increased interventricular septum in diastole (IVSd) and left ventricular posterior wall in diastole (LVPWd) thickness at 30 and 150 mg/kg/day, and mid left ventricular aliasing of blood flow and systolic anterior motion of the anterior mitral valve leaflet (SAM) at 150 mg/kg/day. Biomarkers: changes in plasma NT-proBNP concentration and renin activity observed at 30 and 150 mg/kg/day in both juvenile and adult animals (Adult animals: plasma NT-proBNP concentration decreased with plasma renin activity increased at 150 mg/kg/day on day 1; and from day 3 to day 14, plasma NT-proBNP concentration increased in individual animals at 30 and 150 mg/kg/day, or plasma renin activity increased at 150 mg/kg/day. Juvenile animals: plasma renin activity increased at 150 mg/kg/day from day 1, and at 30 and 150 mg/kg/day in individual animals, NT-proBNP concentration increased from day 11). LNP023-related decreases in plasma total T4 concentration were observed from day 1 to 14 at 30 mg/kg/day in juveniles and at 150 mg/kg/day in both juvenile and adult animals, with no concurrent change in plasma		

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)[a]	Gender and No. per Group	Significant Findings	Study Number	Location in CTD
					total T3 concentration. Pathology: Increased thyroid/parathyroid gland weights (absolute and relative) at all doses in the juvenile and adult main study animals at the end of the dosing period. Minimal Kupffer cell pigment in the liver of 2 out of 3 adult main study dogs at 150 mg/kg/day at the end of the dosing phase. Following a 1-week recovery: The thyroid / parathyroid gland weights (absolute and relative) remained increased in the juvenile and adult recovery study animals given 150 mg/kg/day. Minimal Kupffer cell pigment remained in the liver in a single adult recovery study animal, indicating partial recovery. Gene expression: dose-dependently modulated gene signatures in heart and aorta of young adult dogs at 150 mg/kg/day and in immature developing heart and aorta of juvenile dogs at ≥30 mg/kg/day.		
CNS (Modified Irwin) and Respiratory	Rat / Han Wistar	Oral (gavage) Monohydrochloride Moda Fine.002 in 0.5% (w/w) methylcellulose and 0.5% (w/w) Tween 80 (polysorbate 80)	CNS phase: 0, 112, 770 mg/kg[c] Respiratory phase: 0, 100, 1000 mg/kg	Male, N = 6	CNS: Single oral administration of LNP023 to male rats at 112 and 770 mg/kg did not produce test article related behavioral or body temperature changes in the male rat. Respiratory: Single oral administration of LNP023 to male rats at 100 and 1000 mg/kg caused no test article related significant effects on respiratory function.	[1470566][b]	4.2.1.3-16

a = single dose unless specified otherwise

b = GLP study

c = doses adjusted based on formulation analysis results

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

実施していない