ケサンラ点滴静注液 350 mg

2.6.1　緒言

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.1　緒言 1

2.6.1　緒言

第 2.2 項参照

ケサンラ点滴静注液 350 mg

2.6.2　薬理試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.2　薬理試験の概要文 1
2.6.2.1　まとめ 1
2.6.2.2　効力を裏付ける試験 3
2.6.2.2.1　背景：AD のアミロイド仮説 3
2.6.2.2.2　マウス及びヒト化抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体の作製及び特性 5
2.6.2.2.3　Ex vivo 貪食試験 7
2.6.2.2.4　Ex vivo 及び in vivo 標的結合試験 8
2.6.2.2.5　高齢 PDAPP マウスを用いたプラーク減少試験（種々の抗 Aβ 抗体を用いた検討） 11
2.6.2.2.6　血漿中 Aβ 増加試験 12
2.6.2.2.7　高齢 PDAPP マウスを用いたプラーク減少試験（用量依存性の検討） 13
2.6.2.2.8　Aβ 量減少の薬物動態／薬力学モデル 14
2.6.2.2.9　PDAPP マウスを用いたプラーク減少試験（予防的効果の検討） 16
2.6.2.3　副次的薬理試験 17
2.6.2.4　安全性薬理試験 17
2.6.2.4.1　心血管系 18
2.6.2.4.2　中枢神経系 18
2.6.2.4.3　呼吸系 19
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用 19
2.6.2.6　考察及び結論 19
2.6.2.7　参考文献 19

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

ドナネマブ（LY3002813）は、アルツハイマー病（Alzheimer's disease：AD）の治療を目的としたヒト化抗アミロイドβ（amyloid-beta：Aβ）モノクローナル抗体である。ドナネマブはマウス抗 Aβ モノクローナル IgG1 抗体（mE8）を基に作製された。マウスでのエフェクター機能を最大化するため、マウス IgG2a アイソタイプ（mE8c）も作製された。ドナネマブは、ヒトでのエフェクター機能を最大化するために、ヒト化 IgG1 抗体として作製された。これらの抗体は、Aβ のうち、アミノ末端（N 末端）の 2 つのアミノ酸が欠落しピログルタミン酸修飾を受けた Aβ ペプチド（$Aβ_{p3-X}$）を高い親和性（1 nM 未満）で認識する（本承認申請資料中で $Aβ_{p3-X}$ は N3pG Aβ、N3pGlu Aβ、又は N3pE Aβ とも称されている。それらに対応して、抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体であるドナネマブ及びそのマウスサロゲート抗体は抗 N3pG Aβ 抗体などと称されている場合もある）。

抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体は、脳に沈着したアミロイドプラークを貪食作用で除去することを目的として開発された。治療用抗体を用いて貪食作用によりアミロイドプラークを除去するためには、抗 Aβ 抗体が中枢神経系（central nervous system：CNS）に到達し、CNS での沈着標的に結合し、かつミクログリアにより沈着プラークの貪食が促進されることが必要と考えられている（Schenk 2002）。可溶性 Aβ を認識する治療用抗 Aβ 抗体は、CNS で可溶性 Aβ に結合することにより、抗体が可溶性のモノマーAβ で飽和するため、沈着 Aβ への結合が低下する可能性が報告されている（DeMattos et al. 2012）。一方、$Aβ_{p3-X}$ は、AD 患者及びアミロイド前駆体タンパク質（amyloid precursor protein：APP）トランスジェニックマウスの脳内沈着アミロイドプラークに選択的に認められるため、貪食作用を介した免疫療法的アプローチの最適な標的と考えられる。

抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体の組織学的な結合プロファイル（CTD 第 2.6.2.2.4 項）並びにオプソニン化能及びミクログリアによる貪食促進能（CTD 第 2.6.2.2.3 項）を検討する ex vivo 試験を実施した。組織学的試験から、抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体（トランスジェニックマウスの組織には mE8 を、AD 患者の組織にはドナネマブを使用）は沈着プラークに速やかに結合することが示された。高濃度の外因性抗 Aβ 抗体を用いて実施した ex vivo 貪食実験から、AD 患者由来脳切片の沈着 Aβ に強く結合する抗体のみが、ミクログリアによるプラーク除去を促進することが示された。また、m3D6（抗 $Aβ_{1-X}$ 抗体、IgG2b）及び mE8c（抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体、IgG2a）では同程度かつ強度のプラーク貪食が認められたが、エフェクター機能がより弱い mE8（抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体、IgG1）ではプラークが中等度にしか除去されなかった。この所見から、貪食作用のメカニズムにエフェクター機能が重要であることが示唆される。これらの ex vivo 試験から、ドナネマブ及びそのマウスサロゲート抗体 mE8c は沈着アミロイドプラークに結合し、ミクログリアによるプラーク貪食を誘発することが示された。

In vivo での標的結合及び有効性試験は、APP^{V717F} トランスジェニックマウス（別名：PDAPP マウス）を用いて実施した。PDAPP マウスはヒト変異型 APP（APP^{V717F}）を過剰発現しており、加齢により脳内に領域特異的な Aβ 沈着が生じることが示されている（Games et al. 1995; Johnson-Wood et al. 1997）。高齢 PDAPP マウスの沈着 Aβ を生化学的に評価したところ、$Aβ_{p3-X}$ の量は AD 患者の脳で見られるレベルに極めて近かった（DeMattos et al. 2012）。In vivo 標的結合試験（CTD 第 2.6.2.2.4 項）では高齢 PDAPP マウスを使用し、ドナネマブ及び mE8 並びに可溶性 Aβ 及び沈着 Aβ の両方に結合する抗 $Aβ_{1-X}$ 抗体 m3D6 の評価を行った。これらの試験から、PDAPP マウスにドナネマブ及び mE8 を非経口投与すると、これらの抗体が脳内沈着プラークに強く結合

することが示された。m3D6 は in vivo での沈着プラークにおける標的結合が極めて限定的であることが示され、これは主に m3D6 が可溶性 Aβ で飽和されることが原因と考えられた（DeMattos et al. 2012）。

In vivo プルーフ・オブ・コンセプト有効性試験（CTD 第 2.6.2.2.5 項）では、高齢 PDAPP マウスに mE8、mE8c、及び m3D6 を 12.5 mg/kg の用量で 3 ヵ月間投与した。その結果、mE8 及び mE8c は、陰性対照抗体投与群と比較して、脳内に沈着した Aβ を有意に減少させた。また、最大のエフェクター機能を有する mE8c は、沈着 Aβ を、試験開始時に屠殺した群で得られたレベルよりも低いレベル（約 30%低値）まで有意に減少させたことから、沈着したプラークに直接作用することが示された。最大のエフェクター機能を有する mE8c（IgG2a）は、エフェクター機能がより弱いバリアント（mE8、IgG1）と比較して、有意ではないものの、より強いプラーク減少作用を示す傾向が認められた。一方、m3D6（抗 $Aβ_{1-X}$ 抗体）はプラーク減少作用を有しないことが示され、この結果は上述の in vivo 標的結合試験（CTD 第 2.6.2.2.4 項）の成績及び m3D6 のヒト化抗体 bapineuzumab の第 3 相臨床試験で標的結合が認められなかったこと（Vandenberghe et al. 2016）に一致していた。高齢 PDAPP マウスを用いた 6 ヵ月投与プラーク減少試験において、mE8c は脳内の沈着 Aβ を有意かつ用量依存的に減少させることが示された（CTD 第 2.6.2.2.7 項）。本試験の薬物動態／薬力学（Pharmacokinetic/pharmacodynamic：PK／PD）モデリングで、マウスにマウスサロゲート抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体を 12.5 mg/kg/週の用量で週 1 回、6 ヵ月間投与した際の阻害作用の最大効果（maximum effective level：E_{max}）は、ほぼ最大（89%～94%）であった（CTD 第 2.6.2.2.8 項）。最後に、若齢 PDAPP マウスを用いて実施したプラーク抑制試験（CTD 第 2.6.2.2.9 項）において、マウスサロゲート抗体 mE8c は Aβ の沈着を有意に抑制しないが、可溶性及び不溶性両方の Aβ に結合する m3D6 は強い抑制作用を示すことが明らかになった。

以上、in vitro 及び ex vivo 試験において、ドナネマブ並びにそのマウスサロゲート抗体 mE8 及び mE8c は以下の結果を示した。

- $Aβ_{p3-X}$ に選択的に高い親和性で結合した（bTDR128 試験）。
- PDAPP マウス及び AD 患者の脳切片の沈着アミロイドプラークに結合した（NDG74 試験）
- AD 患者脳切片由来沈着プラークに対するミクログリアの貪食を促進した（NDG73 試験）。

In vivo 試験から以下のことが示された。

- ドナネマブ及び mE8 は末梢投与後に脳内沈着 Aβ に結合したが、m3D6（可溶性及び不溶性両方の Aβ に結合する抗 $Aβ_{1-X}$ 抗体）は明らかな in vivo 標的結合を示さなかった（NDG75 試験）。
- 高齢 PDAPP マウスを用いた 3 ヵ月投与治療的プラーク減少試験において、mE8c は脳内に沈着した Aβ を有意に減少させたが、m3D6 は効果を示さなかった（NDG77 試験）。
- 若齢 PDAPP マウスにドナネマブ又は mE8c を投与した際に血漿中 $Aβ_{1-40}$ 濃度の上昇は認められなかった（NDG76 試験）。
- 高齢 PDAPP マウスを用いた 6 ヵ月投与治療的プラーク減少試験において、mE8c は脳

内に沈着した Aβ を用量依存的に減少させた（NDG78 試験）。マウスに 12.5 mg/kg/週の用量で投与した際の阻害作用の E_{max} はほぼ最大（89%～94%）であった。

- 若齢 PDAPP マウスを用いた試験において、Aβ 沈着に対する mE8c の明らかな抑制作用は認められなかった（NDG79 試験）。
- サル 6 週間反復投与毒性試験で安全性薬理評価を実施したところ、ドナネマブは心血管系、呼吸系、及び CNS の機能に影響を及ぼさないと考えられた（8242713 試験）。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　背景：AD のアミロイド仮説

AD は、2 つの特徴的な病変（細胞外アミロイドプラーク及び細胞内神経原線維変化）が見られる進行性の神経変性疾患である。遺伝学的及び生化学的な強いエビデンスにより、AD の発症にアミロイド経路が中心的な役割を果たしていることが示されている（Hardy and Selkoe 2002）。「アミロイド仮説」では、アミロイド沈着が神経変性カスケード（炎症、グリオーシス、神経障害、シナプス消失、及び細胞消失）を開始する原因因子であると考えられている。早期発症家族性 AD の大半は、Aβ の合成を $Aβ_{1-42}$ の量が増加する方へと変化させる遺伝子突然変異が原因であるが、特発性 AD の大部分（95%超）では、ペプチドのクリアランス減少／沈着が原因と考えられている（Saido 1998）。

アミロイド仮説を支持するものとして、遺伝学的試験から、Aβ のトラフィッキング及び異化が本疾患の発症に最も重要であり、ペプチドの産生増加及びクリアランス減少のいずれかが生じることにより、ペプチドの蓄積、凝集、及び沈着が引き起こされることが示されている。ペプチドの産生が発症に関連する例として、常染色体優性遺伝性 AD 患者は、APP 及びプレセニリン遺伝子に変異を有し、$Aβ_{1-42}$ ペプチドアイソフォームを過剰に産生することが知られている（Duff et al. 1996; Citron et al. 1997）。これらの患者では、$Aβ_{1-42}$ の過剰産生により、アミロイド形成性のより高い $Aβ_{1-42}$ が不溶性 Aβ プラークに過剰に沈着し、特徴的な脳脊髄液中 $Aβ_{1-42}$ 濃度の低下が引き起こされ、AD が必ず発症する（Hampel et al. 2004）。一方、APP 遺伝子多型を有するため Aβ 産生が少ないアイスランド人集団は、疾患発症リスクが低い（Jonsson et al. 2012）。クリアランスに関しては、末梢及び CNS での Aβ の除去にアポリポ蛋白 E（apolipoprotein E：ApoE）が関与している（Deane et al. 2008）。このタンパク質の特定の対立遺伝子（ApoE ε4）を有する患者は、有しない患者よりも早期により重度の Aβ 病変を示すことから、Aβ クリアランスが減少していることが示唆される。ApoE ε4 の保有者は、ApoE ε3 又は ApoE ε2 対立遺伝子を発現しているヒトと比較して、孤発性 AD のリスクも高い（Liu et al. 2013）。

どの型の Aβ（モノマー、可溶性オリゴマー、又はフィブリル）が神経毒性に関わるかは明確にされていないが、神経病理学的所見から、AD 型の神経変性に先立ってアミロイド沈着が生じることが示されている。モノマーAβ とフィブリルは平衡状態にある（DeMattos et al. 2002; Tseng et al. 1999）ことから、沈着プラークは可溶性 Aβ のリザーバーとして働いている可能性が高く、沈着を除去すると、潜在的に有害なすべての型の Aβ（モノマー、可溶性オリゴマー、及びフィブリル）の濃度が低下することにより、大きな効果が得られる可能性がある。また、生物物理学的検討により、フィブリル化 Aβ は 2 次核形成（その結果、潜在的に有害な可溶性 Aβ が形成される）の鋳型として必要であることが示されている（Cohen et al. 2013）。これまでの知見から、

ADは、発症の10～20年前からアミロイドプラークの蓄積及び生物学的構造変化が連続的に起こり続けた結果生じると考えられている（Jack et al. 2011; Bateman et al. 2012）。したがって、Aβの沈着を抑制する又は沈着 Aβ の除去を促進させる治療法は、本疾患の進行を抑制すると考えられる。

Aβ 免疫療法は、抗体を利用して Aβ の除去を促進させる治療アプローチである。Aβ 免疫療法の 3 つの主な作用機序は、可溶型の平衡に対する作用、貪食に対する作用、及びアミロイドシード形成抑制作用と考えられている。可溶型の平衡に対する作用機序は、抗体により可溶性 Aβ を中和し、平衡を溶解の方へ移動させる（DeMattos et al. 2001）。この作用機序は、末梢及び中枢両方のコンパートメントで起こると考えられている（DeMattos et al. 2001; Yamada et al. 2009）。貪食に対する作用機序には CNS に移行する抗体が必要であり、CNS で抗体が沈着アミロイドに結合し（オプソニン化）、ミクログリアによるプラーク貪食を促進させる（Bard et al. 2000）。アミロイドシード形成抑制作用は、早期のアミロイドシードの量が少ない時点で、抗体をアミロイドシードに結合させ、アミロイド伝播を抑制することにより、アミロイド沈着を抑制する（Golde 2003）。これまで、プラークを標的にする抗体として、主に、可溶性又は不溶性のAβに結合する非選択的なN末端認識抗体に焦点が当てられてきた（Pul et al. 2011）。トランスジェニック APP マウスに能動的免疫療法又は N 末端認識抗体を用いた受動的免疫療法を予防的に行ったとき、アミロイド沈着抑制効果が得られたが、既存の沈着を有する高齢トランスジェニックマウスにこれらの免疫療法を実施した場合では効果が弱い（Levites et al. 2006）又は認められなかった（Das et al. 2001）。N 末端認識抗体で既存のプラークを除去できなかった理由は、抗体がCNS に入るとすぐに可溶性 Aβ で飽和されるためと考えられた。したがって、非選択的抗体では、沈着プラークに対して十分な標的結合が得られず、意図する標的を効率的にオプソニン化することができないと推測される。

ADで認められる沈着プラークは、Aβの不均一な混合物で構成される（Saido et al. 1996）。大半の Aβ では 42 番目のアミノ酸が末端となっているが、N末端側には高度の不均一性が認められる。過去に特定された切断型の1つが $A\beta_{p3\text{-}42}$ である（Iwatsubo et al. 1996; Kuo et al. 1997; Saido et al. 1995）。$A\beta_{p3\text{-}42}$ は、N末端プロテアーゼにより末端の2つのアミノ酸がペプチドから切断された後、官能基の環化により N 末端にピロール環（ピログルタミン酸）が形成された Aβ である。この後者の修飾は、自然に又はグルタミニルシクラーゼの作用によって生じる（Chelius et al. 2006; Cynis et al. 2006）。早期の試験から、$A\beta_{p3\text{-}42}$ は沈着カスケードの早期に蓄積することが示されており（Iwatsubo et al. 1996; Saido et al. 1995）、$A\beta_{p3\text{-}42}$ の生物物理学的評価から、このペプチドが急激に凝集する特性を有することが示されている（Schilling et al. 2006; Schlenzig et al. 2009）。生理液中に検出可能な $A\beta_{p3\text{-}42}$ が存在することを報告した研究はないため（Bibl et al. 2012）、この修飾型の Aβ はプラーク特異的である可能性が高いことから、免疫療法の理想的な標的と考えられる。

非臨床薬効薬理試験は、動物モデルとヒトの間でのバイオマーカー及び作用機序の外挿性に焦点を当てて実施した。PDAPP マウスは、非臨床試験で広く使用されてきた AD モデルであり（Games et al. 1995）、ヒト家族性 AD で見られる変異（717位のバリンからフェニルアラニンへの置換）を有する cDNA ミニ遺伝子コンストラクト（PDGF-β 鎖プロモータで駆動される）を過剰発現している（Games et al. 1995）。このマウスの脳には、APP 遺伝子の 3 つの主なアイソフォ

ーム（695、751、及び770）のすべてのmRNAが発現しており、加齢により領域依存的にヒトAβが発現し、神経突起を伴う Aβ 沈着物／プラークが形成され、それに伴って AD に関連する脳領域（皮質及び海馬）でアストログリオーシス及びミクログリオーシスが形成される。沈着 Aβ の主な型はカルボキシル末端（C 末端）が 42 番目のアミノ酸となっている Aβ（$Aβ_{1-42}$）である。PDAPP マウスで見られる大量の沈着 $Aβ_{1-42}$ は、AD 患者の脳で見られる既知の Aβ 病変を再現するものである（Naslund et al. 2000）。このマウスはタウタンパク質による神経原線維変化及び顕著な神経変性は発症しないが、Aβ 沈着物の産生、沈着、及び除去を検討する適切なモデルとして使用され続けている（DeMattos et al. 2001; DeMattos et al. 2004; May et al. 2011）。このマウスの CNS 及び末梢での可溶性 Aβ 濃度は、定常状態で維持されており、ヒトで見られる濃度に極めて類似している（DeMattos et al. 2003）。また、高齢 PDAPP マウスから採取した沈着 Aβ の生化学的評価により、$Aβ_{p3-42}$ 量が AD 患者の脳で見られる量に極めて類似していることも示されており（DeMattos et al. 2012）、これらの特性は、非臨床試験と臨床試験の間での抗 $Aβ_{p3-42}$ 抗体の外挿性に極めて重要である。

2.6.2.2.2　マウス及びヒト化抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体の作製及び特性

bTDR128 試験（4.2.1.1.1）：NS49 試験（4.2.1.1.9）

標的結合及び貪食作用を最大化するため、AD 患者の脳内沈着プラークを選択的に標的とする抗体を開発した。この抗体は、沈着アミロイドプラークのみに見られる、N 末端が切り詰められたピログルタミン酸修飾 Aβ3-42（$Aβ_{p3-42}$ 又は N3pE Aβ）で FVB トランスジェニックマウスを免疫し、N3pE Aβ を特異的に認識する Fab をスクリーニングすることによって得られた。N3pE Aβ に特異的であると特定された Fab の 1 つについて、親和性の最適化を行い、高親和性抗体（mE8）を作製した。In vivo でのプラーク除去及び関連する潜在的毒性に対するエフェクター機能の影響を検討するため、mE8 はマウス IgG1（mE8）及び IgG2a（mE8c）の両方のアイソタイプで作製した。ドナネマブは、マウス親抗体（mE8）を基に作製されたヒト化 IgG1 抗体である。ヒト IgG1 アイソタイプは、ヒトでのエフェクター機能を最大化するために選択した。特記すべきこととして、これらの IgG アイソタイプの最大エフェクター機能はヒトとマウスの間で異なっていた（マウスでのエフェクター機能は IgG1 が最小で IgG2a が最大であった）。

ドナネマブはヒト N3pE Aβ に特異的に結合し、結合親和性（Kd）は 1 nM 未満であった（bTDR128 試験）。ドナネマブと mE8c の結合エピトープは類似しており、N3pE Aβ の 3～10 位の間のアミノ酸残基にマッピングされた。エピトープ残基（アミノ酸の略語表記及び完全長 $Aβ_{1-40}$ と比較したときのペプチド内の位置で表す）の親和性への相対的な影響の大きさは、F4～R5 > pE3 > D7 > H6 >> Y10 であった（表 2.6.2.1）。これらの抗体は可溶性ヒト $Aβ_{1-40}$ 及び $Aβ_{1-42}$ ペプチド並びにマウス及びラット N3pE Aβ をいずれも認識しなかった。Aβ の配列はヒトとカニクイザルの間で保存されていることから、これらの抗体はカニクイザル N3pE Aβ に結合すると考えられる。

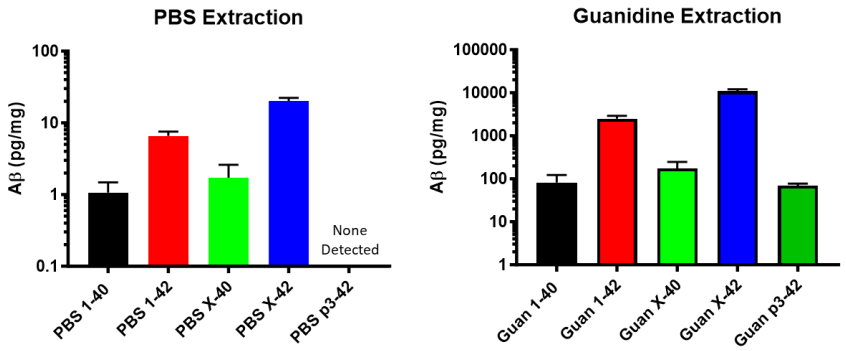
表 2.6.2.1. Biacore によるドナネマブ及び mE8c の結合親和性及びエピトープ決定 [a]

	結合親和性（nM）	
Aβ[b]	**ドナネマブ**	**mE8c**
$Aβ_{1-40}$	検出可能な結合は認められない	検出可能な結合は認められない
N3pE Aβ	0.82 ± 0.05	<0.2
pE3-16	3 ± 2	0.6
E3-16	420	185～466
pEG4	検出可能な結合は認められない	検出可能な結合は認められない
マウス pE3-16	検出可能な結合は認められない	検出可能な結合は認められない
pEG6	111 ± 22	45
pEG7	157	33
pEG8	3 ± 1	1.1
pEF10	7 ± 0.7	2.7

[a] 結合は、25°C の 150 mM 塩化ナトリウム、3 mM EDTA、0.005%（w/v）ポリソルベート P-20、及び 10 mM HEPES 含有溶液（pH 7.4）中で測定した。結合パラメータ（平均値 ± 標準偏差）は 3 回の実験から算出した。

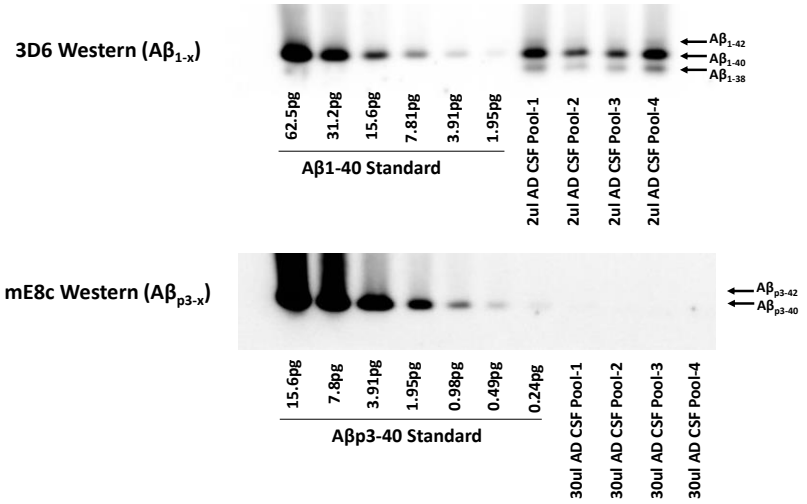
[b] pE はピログルタミン酸を表す。pE3-16 = pEFRHDSGYEVHHQK-ビオチン、E3-16 = EFRHDSGYEVHHQK-ビオチン、pEG4 = pEGRHDSGYEVHHQK-ビオチン、マウス pE3-16 = pEFGHDSGFEVHHQK-ビオチン、pEG6 = pEFRGDSGYEVHHQK-ビオチン、pEG7 = pEFRHGSGYEVHHQK-ビオチン、pEG8 = pEFRHDGGYEVHHQK-ビオチン、pEF10 = pEFRHDGGFEVHHQK-ビオチン

Biacore 試験で使用した Aβ の形態は可溶性モノマーであったことから、ドナネマブ及び mE8c は可溶性の $Aβ_{p3-X}$ に結合可能であることが示された。しかしながら、AD 患者の脳抽出物の可溶性画分で $Aβ_{p3-42}$ は検出されず、脳抽出物の不溶性画分でのみ検出された（NS49 試験）（図 2.6.2.1）。また、AD 患者の脳脊髄液（CSF）中に $Aβ_{p3-40}$ 又は $Aβ_{p3-42}$ は検出されなかった（NS49 試験）（図 2.6.2.2）。



略語：AD = アルツハイマー病、ELISA = 酵素免疫測定法、Guan = グアニジン、PBS = リン酸緩衝生理食塩液
AD 患者の前頭皮質（N = 10）を PBS（可溶性 Aβ）と 5M グアニジン（不溶性/沈着 Aβ）で抽出し、得られた抽出物中の Aβ ペプチド（$Aβ_{1-40}$、$Aβ_{1-42}$、$Aβ_{X-40}$、$Aβ_{X-42}$ 及び $Aβ_{p3-42}$）を ELISA で分析した。グアニジン抽出物に $Aβ_{X-42}$（10,495 pg/mg）と比較して、$Aβ_{p3-42}$ は低濃度（66.9 pg/mg）で存在していたが、PBS 抽出物では検出されなかった。値は平均値 ± 標準誤差で示す。

図 2.6.2.1 アルツハイマー病患者の脳抽出物中における各種 Aβ ペプチド



略語：AD = アルツハイマー病、CSF = 脳脊髄液
AD 患者の CSF 中の可溶性 Aβ をウェスタンブロッティング法で分析した。3～4 人の AD 患者の CSF で構成される 4 つの CSF プールを用いて評価した。完全長 Aβ の評価（上図）では 2 µL の CSF プールを用いて、3D6（抗 $Aβ_{1-X}$ 抗体）でウェスタンブロッティングを行った。最も多く検出された完全長 Aβ は $Aβ_{1-40}$（9 ng/mL）で $Aβ_{1-42}$ の算出値は 2.4 ng/mL であった。$Aβ_{p3-X}$ の評価（下図）には 30 µL の CSF プールを用いたが、mE8c（抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体）によるウェスタンブロットでは $Aβ_{p3-40}$ 又は $Aβ_{p3-42}$ は検出されなかった。CSF 中での $Aβ_{p3-40}$ 及び $Aβ_{p3-42}$ の検出限界は 8 pg/mL であった。

図 2.6.2.2 アルツハイマー病患者の脳脊髄液中における各種 Aβ ペプチド

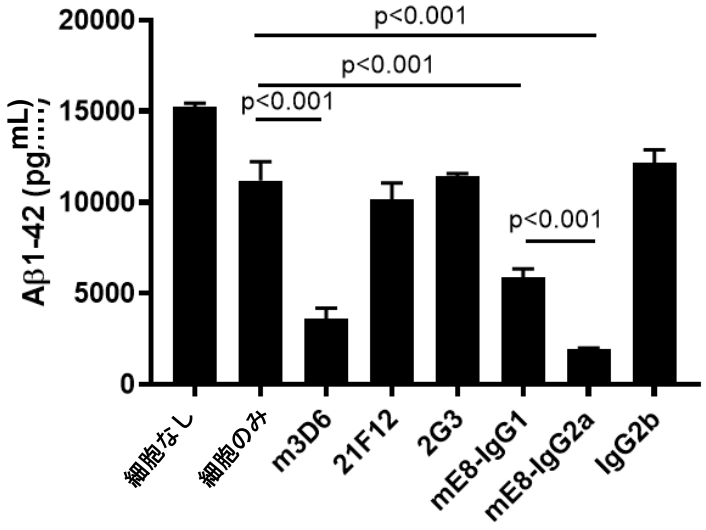
2.6.2.2.3　Ex vivo 貪食試験

NDG73 試験（4.2.1.1.2）

Aβ の N 末端を標的とするマウス抗体の m3D6（抗 $Aβ_{1-X}$ 抗体、IgG2b）、mE8（抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体、IgG1）、又は mE8c（抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体、IgG2a）がミクログリアによるアミロイドプラーク貪食を促進するか否かを検討した（NDG73 試験）。本試験では数種類の対照抗体を用いて貪食の特異性を評価した。Aβ の C 末端を標的とするマウス抗体 21F12（抗 $Aβ_{X-42}$ 抗体、IgG1）及び 2G3（抗 $Aβ_{X-40}$ 抗体、IgG1）は、可溶性 Aβ には強く結合するにもかかわらず、沈着 Aβ にはほとんど結合しないことが示されている。

AD 患者の脳の凍結切片を 10 µg/mL（65 nM）の抗体とともにプレインキュベートした後、初代培養マウスミクログリアを添加し、24 時間インキュベーションを行った。組織切片に残存している $Aβ_{1-42}$ の量を分析したところ（図 2.6.2.3）、N 末端認識抗体（m3D6、mE8、及び mE8c）は沈着プラークの除去を有意に促進させることが示された（$p<0.001$）。さらに、最大のエフェクター機能を有する抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体（mE8c、IgG2a）は、最小のエフェクター機能を有する抗 $Aβ_{p3-X}$ 抗体（mE8、IgG1）よりも有意に多くのプラークを除去した（$p<0.001$）。沈着標的への結合能を有しない抗体（21F12、2G3、又はマウス IgG2b 対照抗体）は、ミクログリアのみの場合と比較し Aβ の量に変化を及ぼさなかった。これらの結果から、m3D6、mE8、又は mE8c のいずれの N 末端認識抗体を外因性に添加したときも、ミクログリアのプラーク標的化が促進されること（オプソニン化）により、Aβ が著しく除去されることが示された。興味深いこととして、N 末端認識

抗体のうち、抗 $A\beta_{1\text{-}X}$ 抗体 m3D6 と抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体 mE8c とを比較したとき、$A\beta_{1\text{-}X}$ は $A\beta_{p3\text{-}X}$ よりも約 30～60 倍多く存在している（AD プラークの約 30%が完全長／非修飾型であり、$A\beta_{p3\text{-}42}$ は約 0.6%にすぎない）にもかかわらず、プラークオプソニン化能は同程度であった。これらの結果から、プラークの微量成分を標的とした場合でも有効性が得られる可能性があることが示唆された。



略語：AD = アルツハイマー病、ELISA = 酵素免疫測定法、IgG = 免疫グロブリン G
AD 患者の脳の凍結切片（20 μm）を 24 ウェルプレートに入れ、各抗体（10 μg/mL、1 群 4 ウェル）とともに 37ºC で 1 時間インキュベートした。インキュベーション終了時に、各切片の上に初代培養マウスミクログリア（C57/BL6、8x10^5 細胞）を乗せ、更に 24 時間インキュベーションを続けた。インキュベーション後に細胞及び組織切片を 5.2 M グアニジン緩衝液中でホモジナイズし、$A\beta_{1\text{-}42}$ の量を ELISA で測定した。値は平均値 ± 標準誤差で示す。無細胞対照（35 ウェル）を除き、1 群 4 ウェルとした。データは一元配置 ANOVA 及び Newman-Keuls 事後検定で解析した。

図 2.6.2.3 アルツハイマー病患者由来脳切片の沈着アミロイドプラーク貪食に対する抗体の促進作用（Ex vivo）

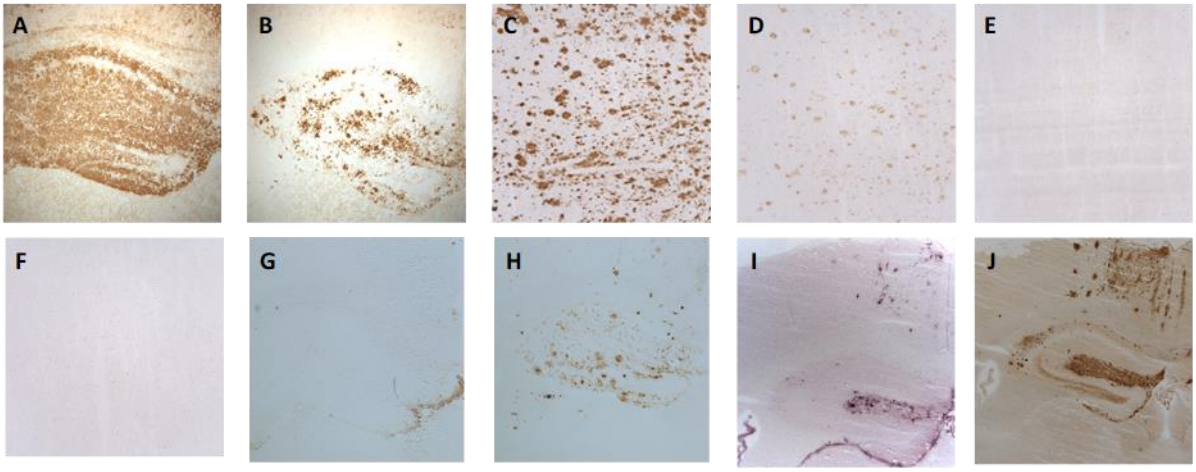
2.6.2.2.4　Ex vivo 及び in vivo 標的結合試験

NDG74 試験（4.2.1.1.3）：NDG75 試験（4.2.1.1.4）

Ex vivo での標的結合を評価するため、抗 Aβ 抗体を外因性に添加して免疫組織化学的分析を実施した（図 2.6.2.4、パネル A～F、NDG74 試験）。陽性対照のビオチン化 m3D6（bapineuzumab のマウスサロゲート抗体、抗 $A\beta_{1\text{-}X}$ 抗体）は、雄 PDAPP マウスの海馬に大量に沈着した Aβ を強く標識した（パネル A）が、ビオチン化 mE8（抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体）は沈着物の一部を標識したのみであった（パネル B）。特記すべきこととして、PDAPP マウスの脳では、AD 患者の脳とは異なり、大半の沈着 Aβ が完全長の非修飾型である。陰性対照抗体（マウス及びヒト IgG）では特異的なプラーク標識は認められなかった（データは示さず）。PDAPP マウスの脳に沈着した Aβ の組成（おそらく構造も）は AD 患者とは大きく異なっていることから、ビオチン化していないヒト化抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体ドナネマブが AD 患者の新鮮凍結脳切片の沈着 Aβ に結合するか否かを検討した。陽性対照抗体（ビオチン化 m3D6）は AD 患者の脳内の多くの Aβ プラークを強く標識した（パネル C）が、陰性対照抗体（マウス及びヒト IgG）は検出可能な結合を示さなかった（それぞれパネル E 及び F）。ドナネマブは AD 患者の脳内沈着 Aβ に結合することが示された（パネル D）。

以上、これらの組織学的試験から、マウスサロゲート抗体 mE8 及びヒト化抗体ドナネマブは ex vivo で沈着 Aβ に結合することが示された。なお、ビオチン化した m3D6 による染色と、ビオチン化していないドナネマブによる染色の強度を比較することは、組織化学的分析に使用した二次試薬が異なっているため、不可能である。

マウス抗 Aβ 抗体又はドナネマブが in vivo で沈着標的に結合するか否かを評価する試験を実施した（パネル G～J、NDG75 試験）。高齢雄 PDAPP マウスにビオチン化マウス抗体 m3D6（抗 $A\beta_{1\text{-}X}$ 抗体）又は mE8（抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体）を 40 mg/kg の用量で週 1 回、計 4 回、腹腔内投与した。最終投与 72 時間後に脳を採取し、組織学的分析により標的結合レベルを評価した。興味深いこととして、ビオチン化 m3D6 を投与した動物では、海馬溝に沿ったプラーク標識のみが認められた（パネル G）が、ビオチン化 mE8 を投与した動物では、海馬及び皮質領域全体に強いプラーク標識が見られた（パネル H）。これらの結果は、可溶性及び不溶性両方の Aβ に結合する m3D6 は、可溶性 Aβ で飽和されるため、望ましい沈着標的に結合することができないという仮説に一致していた。一方、マウス抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体 mE8 は、両方の脳領域で意図する標的への一貫した結合を示した。マウスサロゲート抗体 mE8 と同様に、高齢雌 PDAPP マウスにドナネマブを 40 mg/kg の用量で単回投与し、72 時間後に剖検したとき、脳に強い標的結合が認められた（パネル I）。



略語：AD = アルツハイマー病、DAB = 3,3'-ジアミノベンジジン、HRP = ホースラディッシュペルオキシダーゼ、IgG = 免疫グロブリン G

高齢 PDAPP マウス由来凍結冠状断脳切片を 10 µg/mL のビオチン化マウス抗体 m3D6（A）又はビオチン化 mE8（B）とともにインキュベートした。また、AD 患者由来凍結冠状断脳切片を 3 µg/mL のビオチン化マウス抗体 m3D6（C）、ドナネマブ（D）、ビオチン化マウス IgG 対照抗体（E）、又はヒト IgG 対照抗体（F）とともにインキュベートした。ビオチン又はヒト IgG に特異的な二次 HRP 試薬を使用し、沈着プラークを DAB-Plus で可視化した。

高齢 PDAPP マウスを用いたビオチン化抗体（m3D6［抗 $A\beta_{1\text{-}X}$ 抗体］、mE8［抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体］、IgG 対照抗体）の 3 週間亜慢性投与試験を実施した。1 群 4 例のマウスに各抗体を 40 mg/kg の用量で週 1 回（計 4 回）腹腔内投与し、最終投与 3 日後に in vivo での標的結合を組織学的（ストレプトアビジン-HRP での標識後に DAB で染色）に評価した。代表的な染色像から、m3D6 は海馬溝に沿った沈着プラークのみに結合する（G）が、抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体 mE8 は海馬及び皮質領域全体の沈着プラークに結合する（H）ことが示された。IgG 対照抗体を投与した動物では、プラーク特異的な染色は認められなかった（データは示さず）。高齢 PDAPP マウス（1 群 5 例）にドナネマブを 40 mg/kg の用量で投与したときの in vivo での標的結合を測定した。単回投与 3 日後に、切片を HRP 標識抗ヒト IgG 抗体で染色することにより、ドナネマブの標的結合を評価した。沈着 Aβ の総量は、姉妹切片に抗 Aβ 抗体（m3D6）を外因性に添加して染色することにより評価した。抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体ドナネマブの標的結合（I）及び m3D6 で検出された総沈着 Aβ（J）を示す代表的な染色像を示す。

図 2.6.2.4 Ex vivo での脳内沈着 Aβ の組織学的分析及び in vivo での標的結合

2.6.2.2.5　高齢 PDAPP マウスを用いたプラーク減少試験（種々の抗 Aβ 抗体を用いた検討）

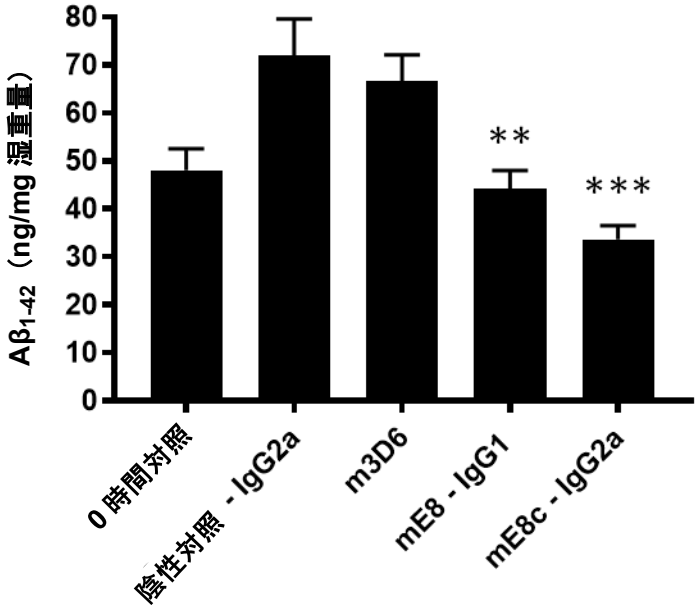
NDG77 試験（4.2.1.1.5）

高齢 PDAPP マウスを用いた治療的プラーク減少試験（薬効評価：NDG77 試験、毒性及び曝露量評価：MB135 試験）において以下の抗体を評価した。

- 陰性対照抗体（IgG2a、マウスでのエフェクター機能が最大）
- m3D6（抗 $A\beta_{1\text{-}X}$ 抗体、IgG2b、マウスでのエフェクター機能が中等度）
- mE8（抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体、IgG1、マウスでのエフェクター機能が最小）
- mE8c（抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体、IgG2a、マウスでのエフェクター機能が最大）

高齢 PDAPP マウス（約 23～24 ヵ月齢）に各抗体を 12.5 mg/kg の用量で週 1 回、3 ヵ月間腹腔内投与した。試験開始時点での脳内プラーク量を測定するため、0 時間対照群のマウスを試験開始時付近の月齢（約 24.5 ヵ月齢）で剖検した。試験終了時の血漿中抗体濃度は、投与群間で同程度であった（m3D6：82.9 ± 9.1 μg/mL、mE8：107.9 ± 13.3 μg/mL、mE8c：82.2 ± 16.2 μg/mL［平均値 ± 標準誤差］）。m3D6 を高齢 PDAPP マウスに投与したとき、プラーク減少作用は認められなかった（NDG77 試験、図 2.6.2.5）。抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体を投与したとき、mE8 又は mE8c のいずれの抗体においても、陰性対照抗体と比較して有意なプラーク減少作用が認められた（それぞれ $p<0.01$ 及び $p<0.001$）。mE8 及び mE8c は、陰性対照抗体と比較して、$A\beta_{1\text{-}42}$ をそれぞれ約 38%及び 53%減少させた。最大のエフェクター機能を有する抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体 mE8c は、最小のエフェクター機能を有する抗体 mE8 よりも効果が強い傾向を示した。重要なこととして、mE8c を投与したマウスでは、24.5 ヵ月齢のマウス（0 時間対照）と比較して、海馬内 $A\beta_{1\text{-}42}$ が約 30%少なかった（t 検定：$p<0.0066$）。mE8c 投与マウスで海馬内 $A\beta_{1\text{-}42}$ が有意に少なかったことは、抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体が、初回投与前に沈着していた凝集 Aβ でさえも除去することを示すものである。皮質組織の評価でも類似した結果が得られた。これらの結果から、高齢 PDAPP マウスに抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体を慢性投与すると、プラーク沈着が有意にかつエフェクター機能に応じて減少することが示された。また、これらの結果から、可溶性及び不溶性 Aβ の両方に結合する抗 Aβ 抗体は沈着 Aβ に対し低度に結合し、プラークを減少させる治療的効果を示さないとの仮説が裏付けられた。

毒性に関する評価（MB135 試験）は CTD 第 2.6.6.8.2 項に示した。抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体が高齢 PDAPP マウスでプラークを減少させる作用機序により、脳アミロイド血管症（cerebral amyloid angiopathy：CAA）関連微小出血が悪化するか否かを組織学的に評価した。高齢 PDAPP マウスに mE8c を 12.5 mg/kg/週の用量（この動物で最大の薬理反応［脳内沈着 Aβ の減少］が得られる用量）で 3 ヵ月間投与したとき、CAA 関連微小出血の悪化は認められなかった。



略語：IgG = 免疫グロブリン G
PDAPP マウス（約 23～24 ヵ月齢）に以下の抗体を 12.5 mg/kg の用量で週 1 回、3 ヵ月間腹腔内投与した。

- m3D6（抗 $A\beta_{1\text{-}X}$ 抗体、IgG2b、N = 30）
- mE8（抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体、IgG1、N = 27）
- mE8c（抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体、IgG2a、N = 23）
- 陰性対照抗体（IgG2a、N = 27）

また、0 時間群として動物（約 24.5 ヵ月齢、N = 15）を試験開始時付近に屠殺した。mE8 及び mE8c を投与した PDAPP マウスでは、陰性対照抗体と比較して、$A\beta_{1\text{-}42}$ 沈着が有意に減少した（それぞれ **p<0.01 及び***p<0.001、一元配置 ANOVA 後に Tukey の事後検定）。マウスに mE8c を投与したとき、海馬内 $A\beta_{1\text{-}42}$ は 0 時間群と比較して約 30%減少した（t 検定、p<0.0066）。値は平均値 ± 標準誤差で示す。

図 2.6.2.5 高齢 PDAPP マウスに抗 Aβ 抗体を治療的に投与した際の海馬内プラーク減少作用

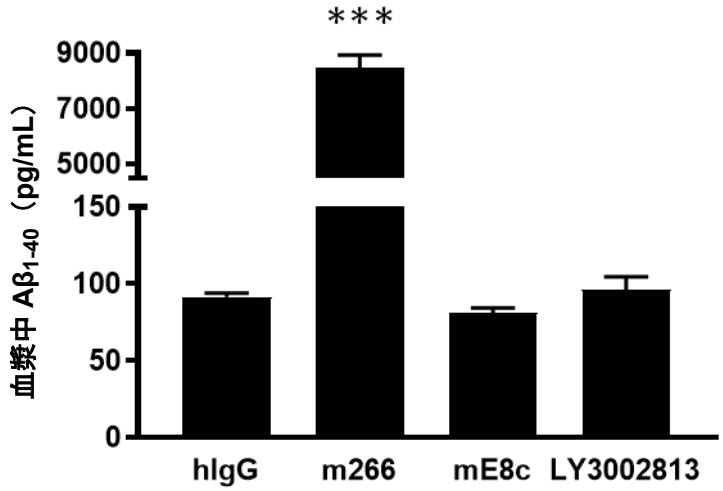
2.6.2.2.6　血漿中 Aβ 増加試験

NDG76 試験（4.2.1.1.6）

マウス抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体（mE8 及び mE8c）を投与すると、顕著な標的結合及び貪食作用によるプラーク減少が見られることが示されている。抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体の主な特性は、沈着 Aβ への結合能が増強されていることであり、この特性は主として、この抗体が意図する沈着 Aβ 標的に到達する前に可溶性 Aβ で飽和されないことに起因する。可溶性モノマーAβ に特異的に結合する中央ドメイン認識抗体 m266（Racke et al. 2005）を用いた過去の試験で、m266 への結合により血漿中 $A\beta_{1\text{-}40}$ が劇的に増加することが示されている（DeMattos et al. 2001）。抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体が可溶性 Aβ に結合しない又は可溶性 Aβ で飽和されないことを確認するため、in vivo での血漿中 Aβ 増加試験を実施した（NDG76 試験）。

若齢雌 PDAPP マウスに抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体（mE8c 又はドナネマブ）又は陽性対照抗体 m266 を 10 mg/kg の用量で投与し、投与 24 時間後の血漿中 $A\beta_{1\text{-}40}$ 濃度を測定した（図 2.6.2.6）。予想されたように、m266 を投与した動物では 24 時間後の血漿中 $A\beta_{1\text{-}40}$ 濃度が約 100 倍に上昇したが、

いずれの抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体でも血漿中 $A\beta_{1\text{-}40}$ 濃度の明らかな上昇は認められなかった。これらのデータから、抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体は生理学的条件下で完全長 Aβ に結合しないため、in vivo では飽和されないことが示唆された。



略語：ELISA = 酵素免疫測定法、IgG = 免疫グロブリン G
PDAPP マウス（1 群 4 例）に 10 mg/kg の mE8c（マウス抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体）、LY3002813（ドナネマブ、ヒト化抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体）、m266（マウス抗 Aβ 抗体）、及び hIgG（ヒト IgG 陰性対照抗体）を皮下投与した。24 時間後に血漿を採取し、血漿中 $A\beta_{1\text{-}40}$ 濃度を ELISA で測定した。可溶性 Aβ に強く結合する m266 の投与により血漿中 $A\beta_{1\text{-}40}$ 濃度は約 100 倍に上昇した（***p<0.001、その他のすべての投与群との比較、一元配置 ANOVA 後に Tukey の事後検定）が、抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体（mE8c 及び LY3002813）投与による血漿中 $A\beta_{1\text{-}40}$ 濃度の明らかな上昇は認められなかった。値は平均値 ± 標準誤差で示す。

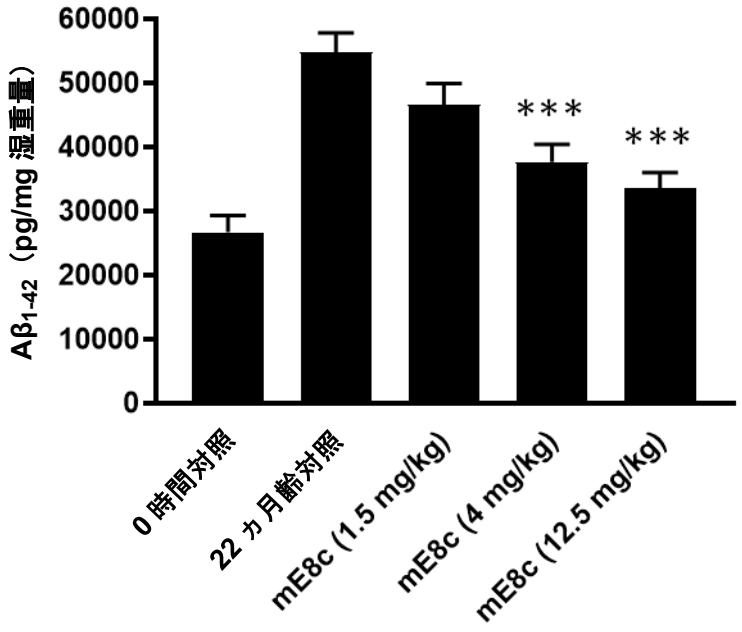
図 2.6.2.6 若齢 PDAPP マウスに抗 Aβ 抗体を投与した際の血漿中 $A\beta_{1\text{-}40}$ 濃度に対する作用

2.6.2.2.7　高齢 PDAPP マウスを用いたプラーク減少試験（用量依存性の検討）

NDG78 試験（4.2.1.1.7）

高齢 PDAPP マウスにおいて、抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体 mE8c（IgG2a）が用量依存的に沈着プラークを減少させるか否かを検討した（薬効及び曝露量評価：NDG78 試験、毒性評価：8222743 試験）。高齢 PDAPP マウス（約 16 ヵ月齢）に mE8c を 1.5、4、又は 12.5 mg/kg の用量で週 1 回、6 ヵ月間投与した。試験終了時に、PK 用の血漿及び病理学的評価用の組織を採取し、海馬及び皮質内の沈着 Aβ を測定した。その結果、血漿中 mE8c 濃度から、動物が mE8c に持続的に曝露されたことが示され、血漿中 mE8c 濃度は用量とともに上昇した（CTD 第 2.6.4.3.2.1 項）。海馬溶解物を分析したところ、mE8c を投与した動物では沈着 $A\beta_{1\text{-}42}$ の有意かつ用量依存的な減少が認められた（p<0.0001、ANOVA）（図 2.6.2.7）。海馬内沈着 $A\beta_{1\text{-}42}$ には、4 及び 12.5 mg/kg の用量でそれぞれ 31%（p<0.001、Tukey の事後検定）及び 39%（p<0.001、Tukey の事後検定）の有意な減少が、1.5 mg/kg の用量で有意ではない 15%の減少が認められた。皮質溶解物の分析でも、4 mg/kg の用量で有意差が認められなかったことを除き、類似した結果が得られた（p<0.0073、ANOVA）。これらの結果から、mE8c は高齢 PDAPP マウスのプラークを有意かつ用量依存的に減少させることが示された。

毒性評価の結果（8222743 試験）は、CTD 第 2.6.6.3.2.3 項に示した。



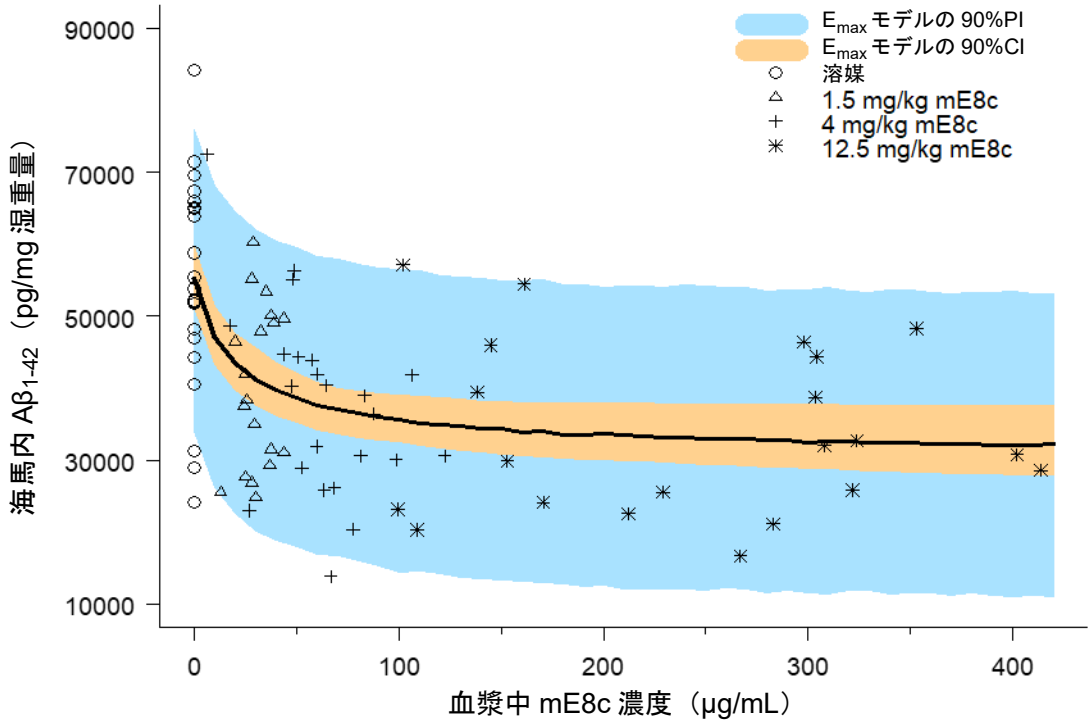
略語：ELISA = 酵素免疫測定法、IgG = 免疫グロブリン G
PDAPP マウス（約 16 ヵ月齢）に mE8c を 1.5（N = 24）、4（N = 23）、又は 12.5（N = 22）mg/kg の用量で週 1 回、6 ヵ月間皮下投与した。対照群にはマウス IgG2a 陰性対照抗体を投与した（N = 23）。また、0 時間群の動物（約 16 ヵ月齢、N = 30）は試験開始時に屠殺した。試験終了時に 5.5 M グアニジンによる海馬溶解物を調製し、沈着 $A\beta_{1\text{-}42}$ 量を ELISA で測定した。mE8c を種々の用量で投与した PDAPP マウスでは、沈着 $A\beta_{1\text{-}42}$ の有意かつ用量依存的な減少が認められた（$p<0.0001$、ANOVA）。mE8c を 4 及び 12.5 mg/kg の用量で投与した動物では、陰性対照抗体を投与した動物と比較して、沈着 $A\beta_{1\text{-}42}$ が有意に減少した（***$p<0.001$、Tukey の事後検定）。値は平均値 ± 標準誤差で示す。

図 2.6.2.7 高齢 PDAPP マウスに mE8c を治療的に投与した際の海馬内プラーク減少作用（用量依存性）

2.6.2.2.8　Aβ 量減少の薬物動態／薬力学モデル

NDG78 試験（4.2.1.1.7）

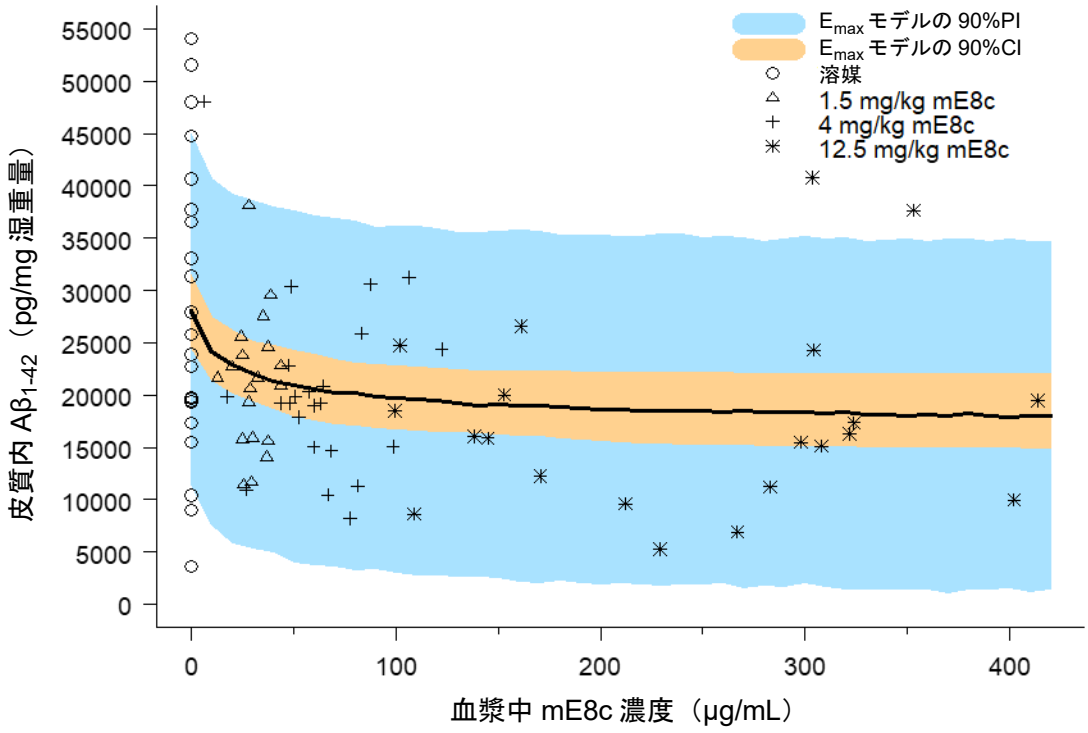
mE8c が高齢 PDAPP マウスの沈着プラークを用量依存的に減少させるか否かを検討した試験（薬効評価：NDG78 試験）において mE8c を週 1 回、6 ヵ月間投与した際の血漿中 mE8c 濃度と海馬及び皮質内 $A\beta_{1\text{-}42}$ 濃度との関係を検討するため、阻害作用の E_{max} に関する PK／PD モデルを構築した。海馬内 $A\beta_{1\text{-}42}$ 濃度と血漿中 mE8c 濃度との関係を図 2.6.2.8 に示す。



略語：CI = 信頼区間、E_{max} = プラーク減少の最大効果、PI = 予測区間
記号は個々のマウスの値を示す。実線は薬物動態／薬力学モデルへの適合曲線を示す。

図 2.6.2.8 PDAPP マウスに mE8c を週 1 回、6 ヵ月間投与した際の血漿中 mE8c 濃度と海馬内 $A\beta_{1-42}$ 濃度との関係

本試験で用いた用量の mE8c により、PDAPP マウスの海馬内 $A\beta_{1-42}$ 濃度にほぼ最大の低下が認められた。12.5 mg/kg の用量での平均血漿中 mE8c 濃度は約 235 μg/mL、PK／PD モデルの EC_{50} は約 19.3 μg/mL であった。12.5 mg/kg の用量での $A\beta_{1-42}$ の減少の程度は、PK／PD モデルで予測される最大反応の約 89%であった。皮質溶解物の分析でも類似した結果が得られ、EC_{50} は約 18.2 μg/mL、モデルで予測される最大反応は 94%であった（図 2.6.2.9）。この反応プロファイルは漸近的であるため、PDAPP マウスに mE8c を 12.5 mg/kg/週を超える用量で投与してもより強い薬理作用は得られないと考えられる。



略語：CI = 信頼区間、E_{max} = プラーク減少の最大効果、PI = 予測区間
記号は個々のマウスの値を示す。実線は薬物動態／薬力学モデルへの適合曲線を示す。

図 2.6.2.9 PDAPP マウスに mE8c を週 1 回、6 ヵ月間投与した際の血漿中 mE8c 濃度と皮質内 $A\beta_{1-42}$ 濃度との関係

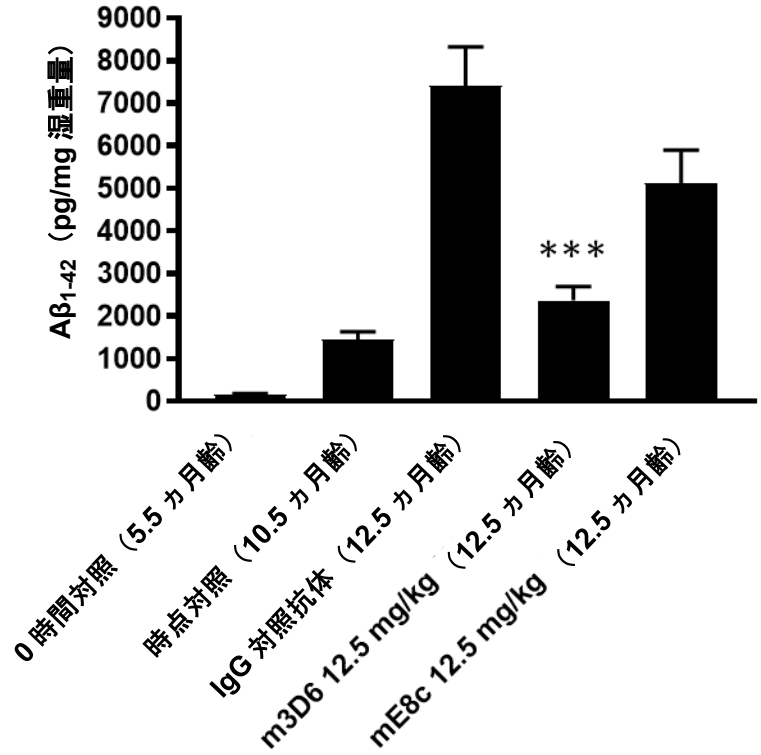
2.6.2.2.9　PDAPP マウスを用いたプラーク減少試験（予防的効果の検討）

NDG79 試験（4.2.1.1.8）

前述した試験において、抗 $A\beta_{p3-X}$ 抗体は高齢 PDAPP マウスの脳内で沈着した $A\beta_{1-42}$ を除去したが、可溶性及び不溶性両方の Aβ に結合する N 末端認識抗体 m3D6 は沈着した $A\beta_{1-42}$ を除去出来なかった（NDG77 試験）。若齢 PDAPP マウスを用いて、抗 $A\beta_{p3-X}$ 抗体 mE8c がプラーク沈着に対する予防効果を示すか否かを検討した（NDG79 試験）。

若齢 PDAPP マウス（5.5 ヵ月齢）に陰性対照抗体（IgG2a）、m3D6（抗 $A\beta_{1-X}$ 抗体、IgG2b）、及び mE8c（抗 $A\beta_{p3-X}$ 抗体、IgG2a）を 12.5 mg/kg の用量で週 1 回、7 ヵ月間皮下投与した。$A\beta_{1-42}$ 沈着の時間推移を追跡するため、試験開始時（0 時間対照群）及び 10.5 ヵ月齢時（時点対照群）にマウスを剖検した。試験終了時には全群を酵素免疫測定法（enzyme-linked immunosorbent assay：ELISA）で分析し、抗体投与により $A\beta_{1-42}$ 沈着が変化したか否かを検討した（図 2.6.2.10）。予想されたように、0 時間対照群の動物（5.5 ヵ月齢）では沈着 $A\beta_{1-42}$ は認められなかった。海馬内 $A\beta_{1-42}$ 濃度は試験の経過とともに著しく上昇し、5 ヵ月間で 9 倍に、その後 2 ヵ月間で更にその 5 倍に上昇した（7 ヵ月で 45 倍に上昇）。m3D6 を投与したとき、陰性対照抗体投与群と比較して、海馬内 $A\beta_{1-42}$ の有意な減少が認められた（約 68%、$p<0.001$）。mE8c を投与したときにも、陰性対照抗体投与時と比較して、$A\beta_{1-42}$ の減少が認められた（約 30%）が、有意な作用ではなかった。これらの結果から、mE8c を若齢 PDAPP マウスに予防的に投与しても $A\beta_{1-}$

$_{42}$ 沈着に対する明らかな抑制作用は見られないことが示された。これは若年から中年の PDAPP マウスでは、化学修飾されていない完全長の $A\beta_{1-42}$ がプラークの大半を占め、$A\beta_{p3-42}$ はほとんど存在しないためと推測される。一方、可溶性及び凝集した $A\beta_{1-42}$ の N 末端を認識する m3D6 は、この年齢層で生じる低レベルのプラーク沈着を抑制した（DeMattos et al. 2001）。



略語：ELISA = 酵素免疫測定法、IgG = 免疫グロブリン G
PDAPP マウス（約 5.5 ヵ月齢）に m3D6（抗 $A\beta_{1-X}$ 抗体、IgG2b、N = 29）、mE8c（抗 $A\beta_{p3-X}$ 抗体、IgG2a、N = 29）、及び陰性対照抗体（IgG2a、N = 29）を 12.5 mg/kg の用量で週 1 回、7 ヵ月間皮下投与した。$A\beta_{1-42}$ 沈着の時間推移を追跡するため、試験開始時（0 時間対照群、N = 30）及び 10.5 ヵ月齢時（時点対照群、N = 27）にマウスを屠殺した。試験終了時に 5.5 M グアニジンによる海馬溶解物を調製し、沈着 $A\beta_{1-42}$ 量を ELISA で測定した。試験期間を通して $A\beta_{1-42}$ の顕著な沈着（約 45 倍）が認められ、沈着の大半は試験の最後 2 ヵ月間で生じた（約 80%が 10.5～12.5 ヵ月齢で生じた）。
m3D6 を投与した PDAPP マウスでは、試験終了時に沈着 $A\beta_{1-42}$ の有意な約 68%の減少が認められた（***p<0.001、Tukey の事後検定）。mE8c を予防的に投与したマウスでは、沈着 $A\beta_{1-42}$ の有意ではない約 30%の減少が認められた。値は平均値 ± 標準誤差で示す。

図 2.6.2.10 若齢 PDAPP マウスに抗 Aβ 抗体を予防的に投与した際の海馬内プラーク抑制作用

2.6.2.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

安全性薬理評価は、カニクイザルを用いた 6 週間反復投与毒性試験（8242713 試験、CTD 第 2.6.6.3.1 項）の一環として実施した。雌雄カニクイザル（雌雄各 3 例／群）にドナネマブを 0（対照群）、1、10、又は 100 mg/kg の用量で週 1 回、6 週間静脈内投与した。溶媒には、注射用滅菌水（USP）で調製した 10 mM クエン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、及び 0.02%（w/v）

ポリソルベート 80（pH 6.0 ± 0.2）を用いた。また、変化が認められた場合の回復性、持続性、又は遅発性を評価するため、0 又は 100 mg/kg 群では回復群（1 群雌雄各 3 例）を設け、13 週間の休薬期間にも一連の評価を行った。

安全性薬理評価として、体温測定、神経行動学的検査、並びに心血管系機能及び呼吸系機能の評価を実施した。

これらの評価は、ICH S7 ガイドラインに従い、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice：GLP）を遵守して実施した。

いずれの安全性薬理パラメータにもドナネマブ投与に関連する変化は認められなかった。

2.6.2.4.1　心血管系

8242713 試験（4.2.3.2.4）、概要表 2.6.3.4

心血管系安全性薬理評価項目は、カニクイザルを用いた 6 週間反復投与毒性試験（8242713 試験）で測定した。心電図検査は、無麻酔下で体外ジャケット式テレメトリーシステムを用いて行った。心電図データは、以下の測定日に、投与の 1.5 時間以上前から投与の 20 時間以上後まで採取した。

- 投与前期間に 1 回
- 投与 8 及び 29 日目
- 休薬 7 及び 13 週目に 1 回ずつ

定量的心電図測定項目は、心拍数、PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔、及び補正 QT 間隔であった。

心拍数、PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔、及び補正 QT 間隔に、ドナネマブに関連する変化は認められなかった。ドナネマブに起因する調律異常及び定性的心電図変化も認められなかった。

心血管系機能への影響に関する無作用量（no-observed-effect level：NOEL）は 100 mg/kg であった。

なお、サルを用いた 6 週間反復投与毒性試験では血圧を測定しなかったが、臨床試験で血圧に対する本薬の影響が評価された。起立性変化を含むバイタルサインパラメータは、ベースラインからいずれのベースライン後時点までの平均変化も、本薬群とプラセボ群で同程度であった（RSUR 第 5.4.1 項）。

2.6.2.4.2　中枢神経系

8242713 試験（4.2.3.2.4）、概要表 2.6.3.4

カニクイザルを用いた 6 週間反復投与毒性試験（8242713 試験）で、以下の測定日に、無麻酔下で神経行動学的検査及び体温測定を実施した。

- 投与前期間に 1 回
- 投与 1 日目の投与前並びに投与の約 1、6、12、24、72、及び 150 時間後（心電図測定用ジャケットの装着前）
- 投与 22 及び 36 日目の投与前並びに投与の約 1 及び 24 時間後
- 休薬 7 及び 13 週目に 1 回ずつ

ドナネマブに関連する神経行動学的所見及び体温の変化は認められなかった。中枢神経系への影響に関する NOEL は 100 mg/kg であった。

2.6.2.4.3 呼吸系

8242713 試験（4.2.3.2.4）、概要表 2.6.3.4

呼吸系安全性薬理評価項目は、カニクイザルを用いた 6 週間反復投与毒性試験（8242713 試験）で測定した。以下の測定日に、無麻酔下で、定性的呼吸評価（呼吸深度）を行うとともに、10 秒間の呼吸数を計測し、これを 6 倍して呼吸数／分時換気量を推定した。

- 投与前期間に 2 回
- 投与 1 日目の投与前及び投与の約 1、6、12、24、72、及び 150 時間後（心電図測定用ジャケットの装着前）
- 投与 22 及び 36 日目の投与前並びに投与の約 1 及び 24 時間後
- 休薬 7 及び 13 週目に 1 回ずつ

投与及び休薬期間中に、ドナネマブに関連する呼吸系の所見は認められなかった。呼吸系機能への影響に関する NOEL は 100 mg/kg であった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

ドナネマブは独特の作用機序及び高い標的（$A\beta_{p3\text{-}X}$）特異性を有するため、薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

非臨床薬効薬理試験から、可溶性 Aβ に結合しないプラーク特異的な抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体は、Aβ プラークに対する高い結合能及び除去能を有することが示された。高齢 PDAPP マウスにマウスサロゲート抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体（mE8 及び mE8c）を投与したとき、用量依存的に Aβ プラークが減少し、一部の抗 Aβ 抗体で見られるような CAA 関連微小出血が生じる傾向は認められなかった。mE8 を基に作製されたヒト化抗 $A\beta_{p3\text{-}X}$ 抗体ドナネマブは良好な in vitro 結合及び高齢 PDAPP マウスでの in vivo 標的結合を示した。

サルを用いたドナネマブの 6 週間反復投与毒性試験で実施した安全性薬理評価の結果より、ドナネマブは心血管系（心電図測定）、呼吸系、及び中枢神経系の機能に影響を及ぼさないと考えられた。

以上の試験結果から、ドナネマブは申請適応症に対する使用を支持する薬理プロファイルを有していることが示された。

2.6.2.7 参考文献

Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H et al. Peripherally administered antibodies against amyloid β-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Medicine.* 2000; 6: 916-919.

Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC et al. Dominantly Inherited Alzheimer Network. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*. 2012; 367: 795-804.

Bibl M, Gallus M, Welge V, Lehmann S, Sparbier K, Esselmann H et al. Characterization of cerebrospinal fluid aminoterminally truncated and oxidized amyloid-β peptides. *Proteomics Clinical Applications.* 2012; 6: 163-169.

Chelius D, Jing K, Lueras A, Rehder DS, Dillon TM, Vizel A et al. Formation of pyroglutamic acid from N-terminal glutamic acid in immunoglobulin gamma antibodies. *Analytical Chemistry*. 2006; 78: 2370-2376.

Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G et al. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid β-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Medicine.* 1997; 3: 67-72.

Cohen SI, Linse S, Luheshi LM, Hellstrand E, White DA, Rajah L et al. Proliferation of amyloid-β42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110: 9758-9763.

Cynis H, Schilling S, Bodnár M, Hoffmann T, Heiser U, Saido TC et al. Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1764: 1618-1625.

Das P, Murphy MP, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE. Reduced effectiveness of Abeta1-42 immunization in APP transgenic mice with significant amyloid deposition. *Neurobiology of Aging.* 2001; 22: 721-727.

Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB et al. apoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *The Journal of Clinical Investigation.* 2008; 118: 4002-4013.

DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart J-C, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-Aβ antibody alters CNS and plasma Aβ clearance and decreases brain Aβ burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 8850-8855.

DeMattos RB, Bales KR, Parsadanian M, O'Dell MA, Foss EM, Paul SM et al. Plaque-associated disruption of CSF and plasma amyloid-β (Aβ) equilibrium in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry.* 2002; 81: 229-236.

DeMattos RB, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM. Potential role of endogenous and exogenous Aβ binding molecules in Aβ clearance and metabolism. In: Saido TC, editor. *Aβ Metabolism and Alzheimer's Disease.* Landes Bioscience. 2003; 127-143.

DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, O'Dell MA, Taylor JW et al. ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron.* 2004; 41: 193-202.

DeMattos RB, Lu J, Tang Y, Racke MM, Delong CA, Tzaferis JA et al. A plaque-specific antibody clears existing β-amyloid plaques in Alzheimer's disease mice. *Neuron.* 2012; 76: 908-920.

Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J et al. Increased amyloid-β42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature.* 1996; 383: 710-713.

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β-amyloid precursor protein. *Nature.* 1995; 373: 523-527.

Golde TE. Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted? *The Journal of Clinical Investigation.* 2003; 111: 11-18.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002; 297: 353-356.

Hampel H, Teipel SJ, Fuchsberger T, Andreasen N, Wiltfang J, Otto M et al. Value of CSF β-amyloid$_{1-42}$ and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Mol Psychiatry.* 2004 Jul; 9(7): 705-10.

Iwatsubo T, Saido TC, Mann DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Full-length amyloid-beta (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-beta 42(43) deposit in diffuse plaques. *Am J Pathol.* 1996; 149: 1823-1830.

Jack CR, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Aisen PS, Trojanowski JQ et al. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Evidence for ordering of Alzheimer disease biomarkers. *Arch Neurology.* 2011; 68(12): 1526-1535.

Johnson-Wood K, Lee M, Motter R, Hu K, Gordon G, Barbour R et al. Amyloid precursor protein processing and $A\beta_{42}$ deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 1550-1555.

Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature.* 2012; 488: 96-99.

Kuo YM, Emmerling MR, Woods AS, Cotter RJ, Roher AE. Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3-pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1997; 237: 188-191.

Levites Y, Das P, Price RW, Rochette MJ, Kostura LA, McGowan EM et al. Anti-$A\beta_{42}$- and anti-$A\beta_{40}$-specific mAbs attenuate amyloid deposition in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of Clinical Investigation.* 2006; 116: 193-201.

Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature reviews Neurology.* 2013; 9: 106-118.

May PC, Dean RA, Lowe SL, Martenyi F, Sheehan SM, Boggs LN et al. Robust central reduction of amyloid-β in humans with an orally available, non-peptidic β-secretase inhibitor. *The Journal of Neuroscience.* 2011; 31: 16507-16516.

Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P et al. Correlation between elevated levels of amyloid β-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA.* 2000; 283: 1571-1577.

Pul R, Dodel R, Stangel M. Antibody-based therapy in Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Biological Therapy.* 2011; 11: 343-357.

Racke MM, Boone LI, Hepburn DL, Parsadainian M, Bryan MT, Ness DK et al. Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid β. *J. Neurosci.* 2005; 25(3): 629-636.

Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, Aβ N3(pE), in senile plaques. *Neuron.* 1995; 14: 457-466.

Saido TC, Yamao-Harigaya W, Iwatsubo T, Kawashima S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of β-amyloid peptides deposited in human brain. *Neuroscience Letters.* 1996; 215: 173-176.

Saido TC. Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of β-amyloid. *Neurobiology of Aging.* 1998; 19: S69-75.

Schenk D. Amyloid-β immunotherapy for Alzheimer’s disease: the end of the beginning. *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3: 824-828.

Schilling S, Lauber T, Schaupp M, Manhart S, Scheel E, Böhm G et al. On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry.* 2006; 45: 12393-12399.

Schlenzig D, Manhart S, Cinar Y, Kleinschmidt M, Hause G, Willbold D et al. Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry.* 2009; 48: 7072-7078.

Tseng BP, Esler WP, Clish CB, Stimson ER, Ghilardi JR, Vinters HV et al. Deposition of monomeric, not oligomeric, Aβ mediates growth of Alzheimer's disease amyloid plaques in human brain preparations. *Biochemistry.* 1999; 38: 10424-10431.

Vandenberghe R, Rinne JO, Boada M, Katayama S, Scheltens P, Vellas B et al. Bapineuzumab 3000 and 3001 Clinical Study Investigators. Bapineuzumab for mild to moderate Alzheimer's disease in two global, randomized, phase 3 trials. *Alzheimer's Research & Therapy.* 2016; 8(1): 18.

Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S et al. Abeta immunotherapy: intracerebral sequestration of Abeta by an anti-Abeta monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble Abeta. *The Journal of Neuroscience.* 2009; 29: 11393-11398.

ケサンラ点滴静注液 350 mg

2.6.3　薬理試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.3.　Pharmacology Tabulated Summary 1
2.6.3.1.　Pharmacology: Overview 1
2.6.3.2.　Primary Pharmacodynamics 2
2.6.3.3.　Secondary Pharmacodynamics 2
2.6.3.4.　Safety Pharmacology 3
2.6.3.5.　Pharmacodynamic Drug Interactions 4

2.6.3. Pharmacology Tabulated Summary

2.6.3.1. Pharmacology: Overview

Type of Study	Test System	Route	Testing Facility	Document ID	Section #
Primary Pharmacodynamics					
Antibody binding assays	A beta peptides	In vitro	Eli Lilly and Company Indianapolis, IN USA	bTDR128	4.2.1.1.1
Phagocytosis assays	Murine antibodies	Ex vivo	Eli Lilly and Company Indianapolis, IN USA	NDG73	4.2.1.1.2
Target engagement assays	Murine antibodies	Ex Vivo	Eli Lilly and Company Indianapolis, IN USA	NDG74	4.2.1.1.3
Target engagement assays	PDAPP transgenic mice	Intraperitoneal injection	Eli Lilly and Company Indianapolis, IN USA	NDG75	4.2.1.1.4
Therapeutic plaque lowering asssays	PDAPP transgenic mice	Intraperitoneal injection	Eli Lilly and Company Indianapolis, IN USA	NDG77	4.2.1.1.5
Plasma Aβ accumulation assays	PDAPP transgenic mice	Subcutaneous injection	Eli Lilly and Company Indianapolis, IN USA	NDG76	4.2.1.1.6
Dose-responses plaque lowering asssays	PDAPP transgenic mice	Subcutaneous injection	Eli Lilly and Company Indianapolis, IN USA	NDG78	4.2.1.1.7
Prevention plaque lowering assays	PDAPP transgenic mice	Subcutaneous injection	Eli Lilly and Company Indianapolis, IN USA	NDG79	4.2.1.1.8
In vitro biochemical analysis	Murine antibodies	In vitro	Eli Lilly and Company Indianapolis, IN USA	NS49	4.2.1.1.9
Secondary Pharmacodynamics					
Not applicable					
Safety Pharmacology					
6-week repeat-dose toxicity with a 3-month recovery[a,b]	Monkey, cynomolgus	Intravenous injection	[redacted] USA	8242713	4.2.3.2.4
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Not applicable					

Abbreviations: # = number; GLP = Good Laboratory Practice.

[a] Contains a GLP compliance statement.

[b] Cardiovascular, respiratory, and central nervous systems were evaluated.

2.6.3.2. Primary Pharmacodynamics

Refer to Section 2.6.2 (Pharmacology Written Summary).

2.6.3.3. Secondary Pharmacodynamics

Not applicable.

2.6.3.4. Safety Pharmacology

Organ Systems Evaluated	Species, Strain	Route	Doses	Sex #/Group	Noteworthy Findings	GLP	Document ID
Cardiovascular[a,b,c]	Monkey, cynomolgus	IV	0 mg/kg[d] 1 mg/kg 10 mg/kg 100 mg/kg	Male/6[e]; Female/6[e] Male/3; Female/3 Male/3; Female/3 Male/6[e]; Female/6[e]	No cardiovascular system findings were noted during the dosing or recovery phase. NOEL = 100 mg/kg	Yes	8242713
Central Nervous[a,f]	Monkey, cynomolgus	IV	0 mg/kg[d] 1 mg/kg 10 mg/kg 100 mg/kg	Male/6[e]; Female/6[e] Male/3; Female/3 Male/3; Female/3 Male/6[e]; Female/6[e]	No central nervous system findings (including body temperature) were noted during the dosing or recovery phase. NOEL = 100 mg/kg	Yes	8242713
Respiratory[a,f]	Monkey, cynomolgus	IV	0 mg/kg[d] 1 mg/kg 10 mg/kg 100 mg/kg	Male/6[e]; Female/6[e] Male/3; Female/3 Male/3; Female/3 Male/6[e]; Female/6[e]	No respiratory system findings were noted during the dosing or recovery phase. NOEL = 100 mg/kg	Yes	8242713

Abbreviations: # = number; ECG = electrocardiogram; IV = intravenous; JET = Jacketed external telemetry; NOEL = no-observed-effect level.

[a] A repeat-dose toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys given LY3002813 (donanemab) by intravenous injection once weekly for 6-weeks with a 3-month recovery phase.

[b] Cardiovascular system data was collected via JET procedures once during the predose phase, on Days 8 and 29 of the dosing phase, and once during Weeks 7 and 13 of the recovery phase.

[c] Qualitative ECG evaluations were conducted on 1 to 1.5 minute segments of continuous ECG recordings for each animal that were isolated prior to dosing and 2, 3, 6, 12, and 18 hours postdose on Days 8 and 29 of the dosing phase, and during Weeks 7 and 13 of the recovery phase.

[d] 10 mM sodium citrate, 150 mM sodium chloride, and 0.02% (w/v) polysorbate 80 prepared in Sterile Water for Injection, USP (pH 6.0 ± 0.2).

[e] The recovery group consisted of 3 male and 3 female monkeys in the 0 mg/kg and 100 mg/kg dose groups.

[f] Central nervous system (including body temperature) and respiratory system observations were performed once during the predose phase; predose and approximately 1, 6, 12, 24, 72, and 150 hours (prior to jacketing for ECG collections) postdose on Day 1; predose and approximately 1 and 24 hours postdose on Days 22 and 36 of the dosing phase; and once during Weeks 7 and 13 of the recovery phase.

2.6.3.5. Pharmacodynamic Drug Interactions

Not applicable.