ルプキネスカプセル7.9 mg

第2部（モジュール2）：CTDの概要（サマリー）

2.4 非臨床試験の概括評価

大塚製薬株式会社

目次

目次 2

略号一覧 4

2.4 非臨床試験の概括評価 7

2.4.1 非臨床試験計画概略 7

2.4.2 非臨床開発の要約 8

2.4.2.1 薬理試験 8

2.4.2.1.1 効力を裏付ける薬理試験 9

2.4.2.1.2 安全性薬理試験 9

2.4.2.2 薬物動態試験 9

2.4.2.3 毒性試験 10

2.4.2.3.1 毒性試験プログラム 10

2.4.2.3.2 ブリッジング試験 11

2.4.2.3.3 小児試験プログラム 12

2.4.2.3.4 光安全性試験 12

2.4.2.3.5 不純物の安全性確認 12

2.4.2.3.6 添加物の安全性評価 13

2.4.3 薬理試験 13

2.4.3.1 効力を裏付ける試験 13

2.4.3.1.1 *In vitro*カルシニューリン阻害試験 13

2.4.3.1.2 動物モデルを用いた*in vivo*薬理試験 13

2.4.3.2 副次的薬理試験 14

2.4.3.3 安全性薬理試験 14

2.4.4 薬物動態試験 15

2.4.4.1 吸収 15

2.4.4.2 分布 16

2.4.4.3 代謝 16

2.4.4.4 排泄 20

2.4.4.5 薬物相互作用 20

2.4.4.6 異性体の相互変換 20

2.4.5 毒性試験 21

2.4.5.1 単回投与毒性試験 21

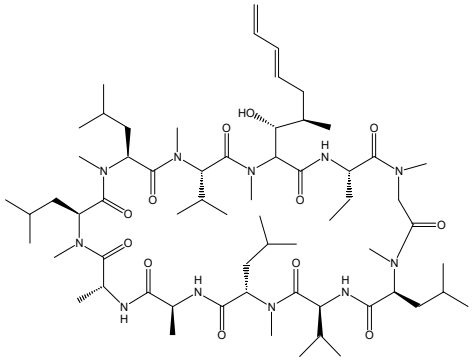
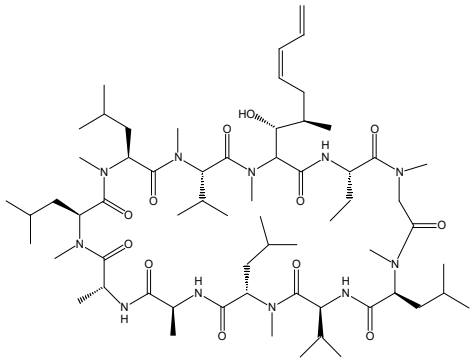
2.4.5.2 反復投与毒性試験 21

2.4.5.3 遺伝毒性試験 23
2.4.5.4 がん原性試験 23
2.4.5.5 生殖発生毒性試験 24
2.4.5.6 幼若動物を用いた試験 25
2.4.5.7 局所刺激性試験 25
2.4.5.8 併用投与毒性試験 25
2.4.5.9 不純物の安全性確認 26
2.4.5.10 添加物の安全性評価 26
2.4.6 総括及び結論 26
2.4.7 参考文献 32

略号一覧

略号	省略していない表現
Ames	Bacterial reverse mutation assay　細菌を用いた復帰突然変異試験
AUC	Area under the concentration-time curve　濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{12h}	投与後0時間から12時間までの濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{24h}	投与後0時間から24時間までの濃度 - 時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein　乳癌耐性蛋白質
BID	Twice daily　1日2回
BW	Body weight　体重
CHO	Chinese hamster ovary　チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	Maximum concentration　最高濃度
CNI	Calcineurin inhibitor　カルシニューリン阻害薬
CsA	Cyclosporine A　シクロスポリンA
CYP	Cytochrome P450　シトクロムP450
DMSO	Dimethyl sulfoxide　ジメチルスルホキシド
ECG	Electrocardiogram　心電図
EMA	European Medicines Agency　欧州医薬品庁
FAL	Final Advice Letter
FDA	Food and Drug Administration　米国食品医薬品局
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
GSH	Glutathione　グルタチオン
hERG	Human Ether-à-go-go Related Gene　ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
IC_{20}	Twenty percent inhibitory concentration　20%阻害濃度
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration　50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation　医薬品規制調和国際会議
IRBP	Interphotoreceptor retinoid–binding protein　光受容体間レチノイド結合タンパク質
ISA247，トランス型ISA247	Isotechnika Pharma Inc. designation for voclosporin　ボクロスポリンのIsotechnika Pharma Inc.による呼称
IV	Intravenous　静脈内
K_i	Inhibitory constant　阻害定数
LC/MS	Liquid chromatography/mass spectrometry　液体クロマトグラフィー/質量分析
LC/MS/MS	Liquid chromatography/tandem mass spectrometry　液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析

LN	Lupus nephritis　ループス腎炎
LX211	Lux Biosciences, Inc. designation for voclosporin　VoclosporinのLux Biosciences, Inc.による呼称
MCT	Medium chain triglyceride　中鎖トリグリセリド
mix-ISA247（$ISA_{TX}247$）	Formulation consisting of 45-50% *trans*- and 50-55% *cis*- isomers of Voclosporin　ボクロスポリンのトランス異性体（45%～50%）及びシス異性体（50%～55%）を成分とする製剤
NOAEL	No observed adverse effect level　無毒性量
NZW	New Zealand White (rabbit strain)　ニュージーランド白色（ウサギ系統）
OAT	Organic anion transporter　有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporting polypeptide　有機アニオントランスポーターポリペプチド
OCT	Organic cation transporter　有機カチオントランスポーター
PD	Pharmacodynamic(s)　薬力学
PEG	Polyethylene glycol　ポリエチレングリコール
P-gp	P-glycoprotein　P-糖タンパク質
PK	Pharmacokinetic(s)　薬物動態
QTc	Corrected QT interval　補正QT間隔
RRT	Relative retention time　相対保持時間
SDラット	Sprague-Dawley rat(s) ラットの系統名
Tac	Tacrolimus　タクロリムス
TK	Toxicokinetic(s)　トキシコキネティクス
t_{max}	Time of maximum concentration　最高濃度到達時間
TPD	Therapeutic Products Directorate　Therapeutic Products Directorate（カナダ保健省，治療薬部門）
TPGS	D-alpha-tocopheryl-polyethylene glycol 1000 succinate コハク酸d-α-トコフェリルポリエチレングリコール

名称（由来）	構造式
ボクロスポリン（JAN）のトランス異性体	
ボクロスポリン（JAN）のシス異性体	

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

次世代CNIであるボクロスポリンは，末端アミノ酸領域の修飾を除いてCsAと構造的に類似している（図 2.4.1-1）。ボクロスポリンは，LN患者の治療用に申請され，経口投与用の7.9 mgソフトゼラチンカプセルとして提供される。推奨用量は23.7 mg BIDである。BWを60 kgと仮定すると，1日臨床用量は0.8 mg/kg（0.4 mg/kg BID）となる。

CNIは，白血球の活性化及び特にTリンパ球におけるサイトカイン産生を可逆的に阻害することが示されている[1,2]。CsAは，ユビキタスな細胞内タンパク質であるシクロフィリンに結合することにより，Tリンパ球に対する抑制作用を示す。この複合体は次に，カルシニューリン酵素のカルシウム及びカルモジュリン依存性セリン-スレオニンホスファターゼ活性を阻害する。カルシニューリンの阻害はさらに，T細胞活性化においてサイトカイン遺伝子（インターロイキン-2，インターロイキン-4，インターフェロン-γ及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子）の誘導に必要な様々な転写因子の活性化を阻害する。ボクロスポリンの免疫抑制活性がCsAと比較して強力であることは，非臨床薬理試験及び毒性試験において立証されている。

LNの病態形成においてT細胞を介した免疫応答は重要である[3,4]。LNの治療薬としてボクロスポリンを使用する根拠は，一部にはT細胞活性化に対する免疫抑制作用に基づいている。

ボクロスポリンは，末端アミノ酸の修飾された官能基の向きに応じた，トランス異性体及びシス異性体という2種類の幾何異性体により構成される。これまでに2種類の薬剤を開発している。1つは初期試験で使用した，2つの異性体の混合物（mix-ISA247；トランス異性体45%～50%，シス異性体50%～55%）であり，もう1つは現在使用している，トランス異性体を多く（[redacted]%～[redacted]%）含有する薬剤である（図 2.4.1-1）。

ボクロスポリン
トランス異性体

ボクロスポリン
シス異性体

CsA

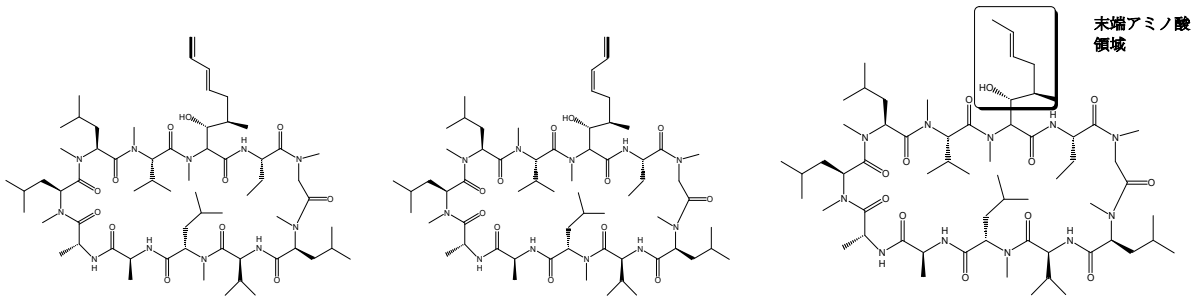


図 2.4.1-1　　ボクロスポリンのトランス及びシス異性体並びにCsAの構造

本書全体を通して，ボクロスポリンは，その剤形及び開発元に応じて複数の名称で記載している。以下の取り決めにしたがって表記する。

- ボクロスポリン：有効成分名（国際一般名）であり，現在大塚製薬株式会社/Aurinia Pharmaceuticals Inc.（Aurinia）により開発が進められている，トランス異性体を[redacted]%～[redacted]%

含有する薬剤の名称。

- ISA247，トランス型ISA247：過去に，固形臓器移植に対する拒絶反応の予防薬及び乾癬の治療薬としてIsotechnika Pharma Inc.により開発された，トランス異性体を[redacted]%以上含有するボクロスポリンの薬剤。
- LX211：Lux Biosciences, Ltd.により非感染性ぶどう膜炎の治療に使用されている，トランス異性体を[redacted]%以上含有するボクロスポリンの薬剤。
- Mix-ISA247（試験報告書には$ISA_{TX}247$とも記載している）：ボクロスポリンのトランス異性体45%～50%及びシス異性体50%～55%を含有。本書では確認しやすいよう，全文を通して「mix-ISA247」という用語を使用している。

非臨床試験の大半はmix-ISA247を用いて実施したが，開発後半の以下の試験にはボクロスポリンを用いた：

- 多数のがん原性，薬理及び薬物動態学的な非臨床試験
- Mix-ISA247のデータとボクロスポリンのデータを関連づけるためのブリッジング毒性試験及び胚・胎児発生に関する試験
- 不純物の安全性確認のための毒性試験
- 幼若ラットを用いた毒性試験

すべてのGLP試験は，GLPの原則及びOECD GLP（ENV/MC/CHEM(98)17）に準拠して実施した。

20[redacted]年[redacted]月，[redacted]を含む[redacted]についてEMAの科学的助言（SA）を求めた（Procedure No.:[redacted]）。20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に発行されたFAL[5]において，[redacted]が，[redacted]を[redacted]とする[redacted]となるだろうというEMAの医薬品委員会（CHMP）の同意が示された。

2.4.2 非臨床開発の要約

ヒトにおけるボクロスポリンの投与経路として経口を予定していることから，大半の試験では特記なき限り経口投与を行った。特記なき限り，非臨床試験では，溶媒としてビタミンE TPGS/MCT油/Tween 40（ポリソルベート40）/95%エタノール（[redacted]，w/w/w/w）を使用した。この溶媒の組成は，化合物の可溶化及び経口吸収を高めるために必要であった。この溶媒は市販製剤で予定されているものと同じである。

全体として，包括的な非臨床プログラムは完了しており，それによりボクロスポリン/mix-ISA247についてPD，PK，毒性及び安全性の点で理解を深めることができる。多数の試験において対照薬としてCsAを用いた。

2.4.2.1 薬理試験

ボクロスポリンによるカルシニューリン阻害（主に*in vitro*試験），並びに自己免疫疾患及び臓器移植の適応症におけるボクロスポリンの薬理作用（*in vivo*試験）を検討するため，薬理試験を

実施した。また，安全性薬理のコアバッテリー試験を実施した。

2.4.2.1.1　効力を裏付ける薬理試験

*In vitro*及び*in vivo*薬理試験において有効性を評価する主要評価項目は，カルシニューリン阻害であった。カルシニューリン阻害の評価は，*in vitro*ではヒト全血を用いてボクロスポリン，mix-ISA247，シス型ISA247及びCsAについて行い，*in vivo*ではサルにmix-ISA247を投与した39週間毒性試験の一環として行った。一般的なTリンパ球抑制評価として，リンパ球増殖，T細胞サイトカイン産生及びT細胞活性化表面抗原の発現に対するmix-ISA247及びCsAの影響を，サル全血を用いた*in vitro*及び*in vivo*試験で行った。ヒトにおけるボクロスポリン主要代謝物の力価を，カルシニューリン阻害の代替指標としてヒトリンパ球増殖アッセイを用いて評価した。

自己免疫疾患及び臓器移植の適応症を支持するため，*in vivo*薬理試験を実施した。自己免疫疾患の適応症を支持するために，IRBPを接種した自己免疫性ぶどう膜炎のラットモデルを用いてボクロスポリンを評価した。試験には陽性対照として高用量CsA群を用いた。2つの標準的な関節炎動物モデル（コラーゲン誘導関節炎マウスモデル，抗原誘導関節炎ウサギモデル）を用いて，mix-ISA247とCsAの有効性を比較検討した。また，臓器移植の動物モデルを用いてmix-ISA247とCsAのPD及び有効性を比較評価するための4つの薬理試験を実施した。糖尿病Balb/cマウスにドナーCBA/Jマウスの膵島細胞を移植し，マウス膵島細胞同種移植の移植片生着達成及び糖尿病予防に対する有効性を，mix-ISA247とCsAで比較検討した。ドナーWistar-Furthラット由来の心臓を異所移植したLewisラットを用い，心臓の拒絶予防におけるmix-ISA247とCsAの有効性を比較検討した後，同モデルにおいてボクロスポリン，mix-ISA247，シス型ISA247及びCsAの有効性を比較した。カニクイザルを用いた腎同種移植試験において，血中薬物濃度モニタリングとリアルタイムの用量調節を用いて血中濃度をコントロールした状況下で，腎同種移植片の生存時間を評価することで，mix-ISA247とCsAの有効性を比較した。

2.4.2.1.2　安全性薬理試験

安全性薬理のコアバッテリー試験を，ICHS7A及びS7Bガイドライン[6,7]に従って実施し，mix-ISA247及びボクロスポリンが心血管系［hERGチャネルアッセイ，ウサギプルキンエ線維アッセイ（mix-ISA247のみ），カニクイザルを用いた2つの*in vivo*心血管系試験］，中枢神経系（Sprague-Dawleyラット），呼吸系（Sprague-Dawleyラット）及び腎/泌尿器系（Sprague-Dawleyラット）に影響を及ぼす可能性を検討した。これらの安全性薬理試験において，プルキンエ線維アッセイ及びサルを用いた最初の心血管系試験ではmix-ISA247を，hERGチャネルアッセイではmix-ISA247及びボクロスポリンを，その他の試験ではボクロスポリンを用いて実施した。

2.4.2.2　薬物動態試験

ボクロスポリンの吸収，分布，代謝，排泄について種々の試験において評価した。また，薬物相互作用を評価するための*in vitro*試験も実施した。被験物質としてボクロスポリンの他にmix-ISA247及びシス型ISA247も使用した。

薬物動態プロファイルを求める試験では，主にLC/MS及びLC/MS/MSを用いて，全血試料中のmix-ISA247及びボクロスポリン濃度を，シス異性体とトランス異性体とを区別せずに測定した。

特定の試験では，ボクロスポリンのシス異性体とトランス異性体とを分離して定量するため，異性体特異的な液体クロマトグラフィー/大気圧化学イオン化/質量分析法を用いた。

ラットにおける経口バイオアベイラビリティ及びラット，ウサギ，及びサルにおけるmix-ISA247，ボクロスポリン，シス型ISA247又はCsAの単回又は10日間反復経口投与後の薬物動態プロファイルの比較試験を実施した。

分布試験として，[^{14}C]-ボクロスポリン又は[^{3}H]-mix-ISA247を用いたラットの*in vivo*試験，及び[^{14}C]-ボクロスポリンを用いたサルの*in vivo*試験を行った。ラットを用いて[^{14}C]-ボクロスポリンの胎盤移行性を評価した。[^{14}C]-ボクロスポリンの*in vitro*におけるタンパク結合率（マウス，ラット，ウサギ，イヌ，サル，及びヒト）及び代謝物IM9の*in vitro*タンパク結合率（ラット，イヌ，サル，及びヒト）を求めた。ボクロスポリンを用いてヒト血球移行試験を実施した。

代謝試験として，肝ミクロソーム（マウス，ラット，ウサギ，イヌ，サル，及びヒト）及びヒト肝細胞代謝試験，CYP阻害（代謝物IM9の評価含む）及び誘導試験，GSTトラッピング試験を*in vitro*で実施し，マウス，ラット，ウサギ，サル，及びヒトの*in vivo*代謝試験を実施した。

排泄試験として，ラット及びサルを用いて，放射性標識した被験物質の尿糞排泄を評価した。ラットを用いて[^{14}C]-ボクロスポリンの乳汁排泄及び胆汁中排泄を評価した。

薬物相互作用試験として，OAT1，OAT3，OCT2，MATE1，及びMATE2-Kの阻害試験，P-gp，OATP1B1，OATP1B3，及びBCRPの基質及び阻害試験を実施した。

その他の試験として，シス異性体とトランス異性体の相互変換の可能性について*in vitro*及び*in vivo*の評価を実施した。

2.4.2.3　毒性試験

2.4.2.3.1　毒性試験プログラム

毒性試験プログラムはICH M3及びS4ガイドライン[8,9]に従って実施し，必要に応じて特定の問題を検討するための追加試験を実施した。2003年までの毒性試験プログラムはmix-ISA247を用いて実施したが，トランス異性体が多く含まれる製剤であるボクロスポリンの開発が決定された（概要表2.6.7.1）。その後に実施された，ラットを用いたブリッジング試験，がん原性及び製造時における安全性評価のための安全性試験は，ボクロスポリンを用いて実施した。

分析法をバリデートし，経口製剤［ビタミンE TPGS/MCT油/Tween 40/95%エタノール（[redacted]，w/w/w/w）］，IV投与製剤［PEG200/エタノール（98:2，v/v）］及びDMSO中のmix-ISA247又はボクロスポリンの濃度，安定性及び均一性を明らかにして，非臨床試験の裏付けとした。

単回投与毒性試験として，ボクロスポリンを用いたSDラット試験及びmix-ISA247を用いたビーグル犬試験（最大耐量試験）を実施した。反復投与毒性試験として，mix-ISA247を用いたSDラット試験（1，4，13及び26週間試験），ビーグル犬試験（2週間，催吐作用を評価する2週間試験，13週間試験）並びにカニクイザル試験（1，13及び39週間試験）を実施した。イヌでは，催吐作用が用量制限毒性として認められ，TKプロファイルにばらつきがあった。そのため，慢性反復投与試験については，催吐作用が認められていないカニクイザルがより適した非げっ歯類であることが確認された。さらに，サルで得られた代謝プロファイルはヒトの代謝プロファイルと

極めて類似していた（概要文2.6.4.5.2.1）。トランス異性体を多く含む製剤（ボクロスポリン）を用いて開発を進めることが決定された後，SDラットにボクロスポリン，mix-ISA247，シス型ISA247及びCsAを投与する包括的な13週間ブリッジング試験を実施し，各被験物質の毒性プロファイルを比較検討した。また，溶媒中のビタミンE TPGSの存在が，ボクロスポリンがもつ可能性がある肝臓への影響をマスクするかどうかを評価するために，SDラットを用いた13週間毒性試験を別途実施した。その他，ボクロスポリンの不純物の安全性確認を目的としたラット13週試験も実施した。

Mix-ISA247を用いた遺伝毒性のコアバッテリー試験を，ICH S2A及びS2Bガイドライン[10]に従って実施した。*In vitro*試験が2試験（Ames及びCHO細胞を用いた染色体異常試験）と，SDラットを用いた*in vivo*小核試験が含まれた。不純物の安全性確認試験の一環として，2バッチのボクロスポリンを用いた*In vitro*試験（Ames試験及びCHO細胞を用いた染色体異常試験）も実施した。26種類のボクロスポリン関連化合物又はボクロスポリン合成に用いた8種類の試薬について，ICH M7（R1）に準拠した*in silico*構造解析を実施したところ，警告構造は確認されなかった（概要表2.6.7.17.2）。

ICH-S1A，S1B，及びS1Cガイドライン[11,12,13]に準拠して，CD-1マウス（2及び13週間の用量設定試験に続く）及びSprague-Dawleyラットを用いた2年間のボクロスポリンのがん原性試験を実施した。これら試験の用量は，ICH S1B[12]に従って得られた毒性及びTKデータに基づいて選択した。

ICH-S5ガイドライン[14]に準拠してmix-ISA247の生殖発生毒性プログラムを実施した。生殖発生毒性試験として，SDラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験，SDラット及びNZWウサギを用いた胚・胎児発生に関する毒性試験（用量設定試験を含む），並びにSDラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験を実施した。既存のデータセットとのブリッジングを目的に，ウサギを用いたボクロスポリンの胚・胎児発生に関する試験を実施した。また，2歳以上の小児におけるボクロスポリンの使用を支持するため，幼若ラットを用いた10週間経口投与毒性試験を実施した。

製造時の安全性を確認するために必要な試験では，被験物質としてボクロスポリンを用いた。モルモットを用いた皮膚感作性試験，ウサギを用いた眼刺激性及び皮膚刺激性試験を実施した。

さらに，ステロイドとの相互作用の可能性を確認するため，ラットに固定量のステロイド（プレドニゾン）と複数用量のボクロスポリンを併用投与する13週間試験を実施した。

2.4.2.3.2　ブリッジング試験

幾何異性体に関する具体的なガイドラインは作成されていないため，ボクロスポリンのブリッジング試験プログラムには以下の関連するガイドラインの考察を含めた：FDAのPolicy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs（1992年5月）[15]，EMAのInvestigation of Chiral Active Substances Directive 75/318/EEC（1994年4月）[16]，及びHealth Canada TPDの業界向けガイダンス「Stereochemical Issues in Chiral Drug Development」[17]。これら文書にあるガイダンスに基づき，ラット13週間比較反復投与試験及びウサギ胚・胎児発生に関する試験を実施した。ラットで得られた毒性所見及びその所見と薬効分類とが一致していたことに基づき，13週間のブリッジング試験にはラットを選択した。また，ラット胚・胎児試験で認められた所見と比較し，ウサギは

生殖発生毒性のエンドポイントに関して高感度であったため，ブリッジング胚・胎児試験にはウサギを選択した。ブリッジング試験を表 2.4.2.3.2-1に示す。

表 2.4.2.3.2-1　　GLPブリッジング試験毒性の概要

試験の種類	投与経路	被験物質	動物種	資料番号 （報告書番号）
反復投与毒性試験（13週間 ＋4週間の回復期間）	経口	Mix-ISA247; シス型ISA247; ボクロスポリン; CsA	ラット	4.2.3.2-09 （ISA03-03）
細菌を用いた復帰突然変異試験	*In vitro*	ボクロスポリン	ネズミチフス菌， 大腸菌	4.2.3.3.1-02 （AC33TS.503.BTL）
胚・胎児試験のための用量設定試験	経口	ボクロスポリン	ウサギ	4.2.3.5.2-05 （ISA04-04）
胚・胎児試験	経口	ボクロスポリン	ウサギ	4.2.3.5.2-06 （ISA04-05）

2.4.2.3.3　　小児試験プログラム

これまでに実施されているLN，ぶどう膜炎及び乾癬に関する臨床プログラムでは，13歳未満の被験者は除外されていた。そのため，発達中の臓器系及び中枢神経系にボクロスポリンの経口投与が影響する可能性の非臨床評価を実施した。試験には4週齢の幼若ラットを用い，ボクロスポリンを10週間経口投与して潜在的毒性を評価した。さらに5週間の回復期間を設けて，変化の回復性の評価も行った（概要表2.6.7.15，資料番号4.2.3.5.4-01）。

2.4.2.3.4　　光安全性試験

放射性標識したボクロスポリンを用いて実施した非臨床試験において，アルビノ及び有色ラットに[^{14}C]-ボクロスポリンを経口投与したところ，皮膚及び眼に放射能が検出された（概要表2.6.5.3及び2.6.5.5，資料番号4.2.2.2-02）。しかしながら，ボクロスポリンは290～700 nmの波長の光を吸収しないことから，光毒性評価の候補ではない[18,19]。ボクロスポリンの紫外線吸収スペクトルは，バリデーション報告書[redacted]（モジュール3.2.P.5.3）に記載している。

2.4.2.3.5　　不純物の安全性確認

ボクロスポリンは半合成の環状ペプチドであるため，またその原薬の構造特性は主にCsAから確立されているため（したがって発酵によって完全に生成されるため），ICH Q3A（R2）ガイドライン[20]は完全にボクロスポリンに適用されるものではない。ICH Q3A（R2）に述べられているとおり，本ガイドラインは，一次発酵プロセスから生成されるペプチド又は半合成製品には適用されない。

個別規格設定不純物の安全レベルは，開発の過程で製造されたボクロスポリンバッチを用いた非臨床毒性試験から決定されている。個別規格設定不純物ごとに，その不純物を評価した非臨床毒性試験を検討し，各不純物の安全性レベルを決定した。ICH Q3A（R2）ガイダンスに述べられ

ている原則に従い，これらの非臨床安全性試験は，それぞれで所定の不純物の量が最も多いバッチを評価していたことで，不純物の安全性確認に最適であるものとして選択した。これらの検討に基づき，これら非臨床安全性試験は，ボクロスポリンの各不純物に提案される「安全性確認の必要な閾値」及び関連物質の判定基準を十分に支持するものである（モジュール2.6.6参照）。

2.4.2.3.6　　添加物の安全性評価

本製剤の添加物として含まれるポリソルベート40について安全性を評価した結果，本製剤の臨床推奨用量までの使用に安全性上の懸念はないと考えられた。

2.4.3　薬理試験

2.4.3.1　効力を裏付ける試験

2.4.3.1.1　*In vitro*カルシニューリン阻害試験

ボクロスポリン（及びmix-ISA247）の非臨床薬理試験データにより，LNなどT細胞が関与する疾患において治療効果を発揮する可能性が実証されている。免疫抑制活性のPDマーカーとしてヒト全血におけるカルシニューリン阻害を用いた試験により，ボクロスポリン（及びmix-ISA247）はCsAと比べて高い力価を示した（概要表2.6.3.2，資料番号4.2.1.1-01及び4.2.1.1-02）。この活性はカニクイザルを用いた*in vitro*及び*in vivo*試験においても確認され，mix-ISA247はCsAと比べてリンパ球増殖の阻害能が高かった（概要表2.6.3.2，資料番号4.2.1.1-03及び4.2.3.2-15）。カルシニューリン阻害の代替指標としてリンパ球増殖アッセイを用い，ボクロスポリン及びその5つの代謝物［IM9，IM4，IM4n，IM1c (R)，IM1-Diol-1］の免疫抑制力価を検討した（概要表2.6.3.2，資料番号4.2.1.1-04）。代謝物の力価はボクロスポリンと比べて著しく低く，IC_{50}値に基づいたときボクロスポリンの1%未満（IM1-Diol-1）から12.9%（IM9）であった。

2.4.3.1.2　動物モデルを用いた*in vivo*薬理試験

IRBP接種を用いたラット自己免疫性ぶどう膜炎モデルにおいて，ボクロスポリン（2.5，10又は40 mg/kg/日）は，ぶどう膜炎の臨床的及び病理組織学的徴候の予防と治療の両方に有効であった。（概要表2.6.3.2）[21]。本モデルにおいてボクロスポリン（40 mg/kg）は，陽性対照であるCsA（40 mg/kg）と同様に有効であった。この結果から，ボクロスポリンはラットにおいて自己免疫性ぶどう膜炎を予防及び治療効果を発揮することが示された。

自己免疫性の関節症モデルとして，コラーゲン誘導関節炎を発症したマウス，及び抗原誘導関節炎を発症したウサギにおいて，mix-ISA247はCsAと比べて高い治療効果を示した（概要表2.6.3.2，資料番号4.2.1.1-09）。予防に用いたとき，mix-ISA247及びCsAはいずれもウサギの抗原誘導関節炎の症状を軽減することが示された（概要表2.6.3.2，資料番号4.2.1.1-09）。

Mix-ISA247はCsAと比べて臓器移植片の生着時間を延長させることが，マウスにおける膵島細胞同種移植（概要表2.6.3.2，資料番号4.2.1.1-05），ラットにおける異所性心臓移植（概要表2.6.3.2，資料番号4.2.1.1-06），及びカニクイザルにおける腎同種移植（概要表2.6.3.2，資料番号4.2.1.1-08）を含め，複数の臓器移植モデルにおいて実証された。Mix-ISA247及びボクロスポリンを用いたラット異所性心移植試験において，いずれの化合物も移植片生着時間をより延長させた

（概要表2.6.3.2，資料番号4.2.1.1-07）。

2.4.3.2　副次的薬理試験

副次的薬理試験により，腎移植サルにおける腎臓のミトコンドリア機能不全に対して，mix-ISA247（50 mg/kg）は，CsA（25 mg/kg）と比べて影響が小さいことが示された（概要表2.6.3.3，資料番号4.2.1.2-01）。ウサギを用いた試験でmix-ISA247を7日間静脈内投与し，次いで23日間皮下投与したとき，腎臓に対する有害作用は認められなかったが，最高用量である25 mg/kg/日群の2例は，代謝障害が認められ死亡した（概要表2.6.3.3，資料番号4.2.1.2-02）。膵島細胞を自家移植したイヌにおいて，mix-ISA247は膵島細胞に対して毒性を示さなかったが，CsAは膵島細胞に対して有害な作用を示した（概要表2.6.3.3，資料番号4.2.1.2-03）。

2.4.3.3　安全性薬理試験

安全性薬理試験を実施し，ボクロスポリン及び/又はmix-ISA247が心血管系（概要表2.6.3.4，資料番号4.2.1.3-01～4.2.1.3-04），中枢神経系（概要表2.6.3.4，資料番号4.2.1.3-05），呼吸系（概要表2.6.3.4，資料番号4.2.1.3-06）及び腎/泌尿器系（概要表2.6.3.4，資料番号4.2.1.3-07）に及ぼす影響を評価した。これらの試験で得られた所見は，心血管系試験における心室再分極（QTc）に対する影響，呼吸系試験における呼吸数の減少，心血管系及び中枢神経系試験で認められた体温低下，並びに腎/泌尿器系試験における尿量に対する軽微な影響に限られていた。ラットにおける単回投与後の曝露量（C_{max}：1412.5 ng/mL及びAUC_{24h}：21929.3 ng･h/mL，資料番号4.2.3.2-09）に基づき，腎/泌尿器系，中枢神経系及び呼吸系試験に用いた最高用量（25 mg/kg）では，臨床における曝露量（C_{max}：113 ng/mL及びAUC_{12h}を2倍して算出したAUC_{24h}：888 ng･h/mL）の約13及び25倍の曝露量となると推定された（臨床用量は0.4 mg/kg BIDレジメン，薬物相互作用試験からの平均データLX211-06及びLX211-07試験，AUC_{12h}：444 ng･h/mL）。

CHO細胞を用いたhERGアッセイの結果により，mix-ISA247，シス型ISA247及びボクロスポリンは*in vitro*においてhERGチャネル電流を阻害し，IC_{20}は約6～18 µmol/L（約7000～22000 ng/mL）であることが示された（概要表2.6.3.4，資料番号4.2.1.3-01）。しかしながら，これらの濃度は，臨床で0.4 mg/kgをBID投与したときの推定C_{max}である0.093 µmol/L（約113 ng/mL）を大きく上回る（LX211-06及びLX211-07試験）。さらに，ウサギプルキンエ線維アッセイにおいて，mix-ISA247は検討した濃度範囲（設定濃度：0.01～10 µmol/L）で不整脈を誘発しなかった（概要表2.6.3.4，資料番号4.2.1.3-02）。覚醒サルを用いた2つの独立した*In vivo*心血管安全性薬理試験において，ボクロスポリン及びmix-ISA247は検討した最高用量である200 mg/kgの用量で，ECG上のQRS波の立ち上がりからQTの終末までの間隔及びQTcを延長したが，低用量（20及び60 mg/kg）では影響は認められなかった（概要表2.6.3.4，資料番号4.2.1.3-03及び4.2.1.3-04）。これらの試験において心拍数に対する影響は認められず，ECG波形からはRR，PR及びQRS間隔に対する影響も示されなかった。サルにボクロスポリンを200 mg/kgの用量で投与したときの曝露量（C_{max}：538.4 ng/mL及びAUC_{24h}：3534.5 ng·h/mL）は，推定臨床曝露量のそれぞれ約5倍及び4倍であった。なお，イヌの2及び13週間試験，サルの13及び39週間試験を含め，げっ歯類以外を用いたいずれの毒性試験においても，薬物に関連するECG異常は認められなかった。

ISA247の心臓安全性に関して，健康被験者を対象に1.5 mg/kg BIDまでの用量で投与する試験

（ISA05-03試験）においてさらに検討し，23.7 mg BID又は39.5 mg BIDの用量で48週間投与するLNのAURA-LV試験（AUR-VCS-2012-01試験）及び23.7 mg BIDの用量で52週間投与するAURORA 1試験（AUR-VCS-2016-01試験）の一環としても検討した。これらの臨床試験からQTc間隔延長の重大なリスクは示されなかった（2.7.4 臨床安全性）。

ラットを用いた呼吸系安全性薬理試験において，検討した最高用量（25 mg/kg）のボクロスポリンの投与により，投与120分後で呼吸数の軽度減少が認められたが，一回換気量は増加しなかった（概要表2.6.3.4，資料番号4.2.1.3-06）。変化の程度は小さく，一過性であったこと及び一回換気量に影響が認められなかったことから，重大な安全上の懸念とは判断されなかった。

サルを用いた心血管系安全性薬理試験［200 mg/kg，臨床曝露量（AUC_{24h}）の約4倍］（概要表2.6.3.4，資料番号4.2.1.3-03）及びラットを用いた中枢神経系安全性薬理試験（25 mg/kg）（概要表2.6.3.4，資料番号4.2.1.3-05）において，検討した最高用量のボクロスポリン投与により体温の軽度減少が認められた。これらの変化の程度は小さかったこと，さらに一過性であったことから，この影響は重大な安全上の懸念とは判断されなかった。

ラットにボクロスポリンを単回投与した腎/泌尿器系の安全性薬理試験において，腎機能に対する軽微な影響（検討した最高用量である25 mg/kgの投与において尿量の25%減少）が認められた（概要表2.6.3.4，資料番号4.2.1.3-07）。これらの結果は，特定の腎機能パラメータを評価したとき，臨床曝露量（AUC_{24h}）の約25倍という曝露量において腎機能に対する急性の有害作用はないことを示している。

2.4.4 薬物動態試験

2.4.4.1 吸収

Mix-ISA247及びボクロスポリンの薬物動態プロファイルを明らかにするため，LC/MSを用いた高感度かつ選択的な生体試料分析法によって，mix-ISA247及びボクロスポリンの全血中濃度を測定した。開発初期には異性体を区別せず測定したが，ボクロスポリン（トランス体を[redacted]%以上含有する原薬）の開発に切り替えた際，ボクロスポリンのシス異性体とトランス異性体を特異的に分離定量可能なバリデートした方法を開発した。異性体特異的な方法を用いて複数の分析を実施後，ボクロスポリンのシス異性体及びトランス異性体は*in vitro*及び*in vivo*で相互変換しないことが確認された（2.4.4.6）。そのため，特記しない限り，異性体特異的でない方法を使用してボクロスポリンの非臨床試験を実施した。

ボクロスポリンの絶対バイオアベイラビリティは，ラットで7.6%～7.8%であった（概要表2.6.5.3，資料番号4.2.2.2-01）。

毒性試験に用いるビタミンE非含有製剤を評価するため，ラットを用いた薬物動態試験を実施したところ，Tween 40/MCT油/ 95%エタノール（[redacted]，w/w/w）のビタミンE非含有製剤で標準製剤と同等の曝露量及び薬物動態プロファイルを示した。いずれの製剤を用いた場合も，雄は雌より高いボクロスポリンの曝露量を示した（概要表2.6.5.4，資料番号4.2.2.2-05，4.2.2.2-06）。

ラットにボクロスポリンを単回及び反復経口投与したとき，ボクロスポリン及びその代謝物の全身曝露量は用量依存的であったが，用量比例性を上回った。ボクロスポリンの全身曝露量は，測定したボクロスポリン代謝物の曝露量より高く，雌より雄でボクロスポリンの曝露量が高かっ

た（概要表2.6.5.4，2.6.5.10，資料番号4.2.2.2-07）。

ラットにおけるCsAの曝露量は，同様の用量でボクロスポリン又はmix-ISA247の曝露量より高かった。反復投与によるボクロスポリン，mix-ISA247，及びCsAの蓄積は認められなかった（概要文2.6.4.3，資料番号4.2.2.2-05，4.2.2.2-08）。

ラット，ウサギ，及びサルを用いた薬物動態試験（異性体特異的な分析法を用いた試験）によると，mix-ISA247又はボクロスポリンを経口投与したとき，トランス異性体の血中濃度がシス異性体の約2倍となり，トランス異性体のバイオアベイラビリティはシス異性体より高いことが示唆された（概要表2.6.5.16，2.6.5.4，資料番号4.2.2.7-02，4.2.2.2-09，4.2.1.3-04）。

サルにボクロスポリン及びmix-ISA247を単回及び反復投与したときの薬物動態を評価した。サルにおけるmix-ISA247の吸収は，約150 mg/kgまで用量に依存し，それ以上の高用量では薬物曝露量の増加は認められなかった。雌サルは概して雄よりも高いボクロスポリン曝露量を示した（概要表2.6.5.3，2.6.7.7，資料番号4.2.1.3-03，4.2.1.3-04，4.2.3.2-14，4.2.3.2-15）。ボクロスポリン及び代謝物の曝露量は，サルでは反復投与により概して減少した（概要表2.6.5.10，資料番号4.2.2.2-10）。

2.4.4.2　分布

ラットにおいて[^{14}C]-ボクロスポリン由来の放射能は消化管，肝臓及び腎臓に高濃度で分布した。薬物由来放射能の分布プロファイルに有色ラットとアルビノラットで顕著な差は認められなかったことから，本薬及びその代謝物はメラニンとほとんど結合しないことが示唆された。[^{3}H]-mix-ISA247（ラット）又は[^{14}C]-ボクロスポリン（ラット及びサル）由来放射能の脳及び脊髄への分布は，無視できる程度であったことから，ボクロスポリン及び代謝物は血液脳関門をほとんど通過しないことが示された。サルにおいて[^{14}C]-ボクロスポリンに由来する放射能は，消化管，胆汁（胆嚢内容物），肝臓，大動脈（雌のみ），リンパ節（腸間膜），及び腎臓に高濃度で認められた（概要表2.6.5.5，資料番号4.2.2.2.02，4.2.2.2-03，4.2.2.2-04）。

*In vitro*血球移行試験から，ボクロスポリンはヒト赤血球に移行することが示され，全血がmix-ISA247及びボクロスポリンの定量に最も適したマトリクスであることが示された（概要表2.6.5.5，資料番号4.2.2.3-01）。ボクロスポリンの血漿タンパク結合率は，各種動物（マウス，ラット，ウサギ，イヌ，及びサル）及びヒトにおいて濃度に依存せず，96.97%～98.34%の範囲であった（概要表2.6.5.6，資料番号4.2.2.3-02）。ボクロスポリンの主要代謝物であるIM9の*in vitro*血漿タンパク結合率は，各種動物（ラット，イヌ，及びサル）及びヒトで55.4%～81.2%であった（概要表2.6.5.6，資料番号4.2.2.3-03）。

ラットを用いて[^{14}C]-ボクロスポリンの胎盤通過試験を実施したところ，母動物に投与した量のうち胎児組織に認められた割合は，投与8時間後（t_{max}）に約0.019%であり，胎盤を介した放射性物質の胎児への移行は緩慢であり限定的であった。（概要表2.6.5.7，資料番号4.2.2.3-04）。

2.4.4.3　代謝

*In vitro*においてヒトを含むすべての動物種で，ボクロスポリン及びmix-ISA247は水酸化反応及び酸化的N-脱メチル化反応により広範に代謝された（概要表2.6.5.9，資料番号4.2.2.4-01，4.2.2.4-02，4.2.2.4-03，4.2.2.4-04，4.2.2.4-05，4.2.2.4-06）。CYP3A4/5は，mix-ISA247の第1相代

謝に関与する主要なCYP分子種であった（概要表2.6.5.9，資料番号4.2.2.4-08）。ヒト肝ミクロソームにおいて，GSHの有無にかかわらず同等のレベルでボクロスポリンの代謝物を生成し，GSH付加物は認められなかった（概要表2.6.5.9，資料番号4.2.2.4.09）。

ボクロスポリンの推定代謝経路は2つに分けることができる。第1の経路は，CYPによって触媒されるIM1残基（環状ペプチドの1番目にあたる共役ジエン構造を有するアミノ酸残基）以外のアミノ酸残基の酸化であり，代謝物IM9，IM4，及びIM4nが生成される（IM9は，9番目のアミノ酸残基における水酸基の付加，IM4は，4番目のアミノ酸残基における水酸基の付加，IM4nは，4番目のアミノ酸残基におけるN-メチル基の脱離を指す）（図 2.4.4.3-1）。第2の経路は，CYPによって触媒されるIM1残基の酸化であり，代謝物IM1-Diol-1，IM1c (R)，及びIM1wが生成される（図 2.4.4.3-2）。他の代謝物IM1-Diol-2，IM1-Diol-3，IM1c (S)，IM1a，及びIM1w-dkも*in vivo*で確認された（概要表2.6.5.11，資料番号4.2.2.4-12）。また，IM1-Diol-2及びIM1-Diol-3は，シス異性体からのみ生成され，IM1-Diol-1はトランス異性体から選択的に生成された（概要表2.6.5.9，資料番号4.2.2.4-07）。ボクロスポリンの代謝は動物種間で同様であり，主要代謝物は，すべての動物種においてIM9であった。ヒトマスバランス試験（LX211-05試験）において循環血中に確認された代謝物（IM1-Diol-1，IM4n9，IM1w，IM9，IM4n，IM4，及びIM4n9n）はサルにおいても確認されており，*in vitro*代謝においてもヒトに固有の代謝物は認められなかった。

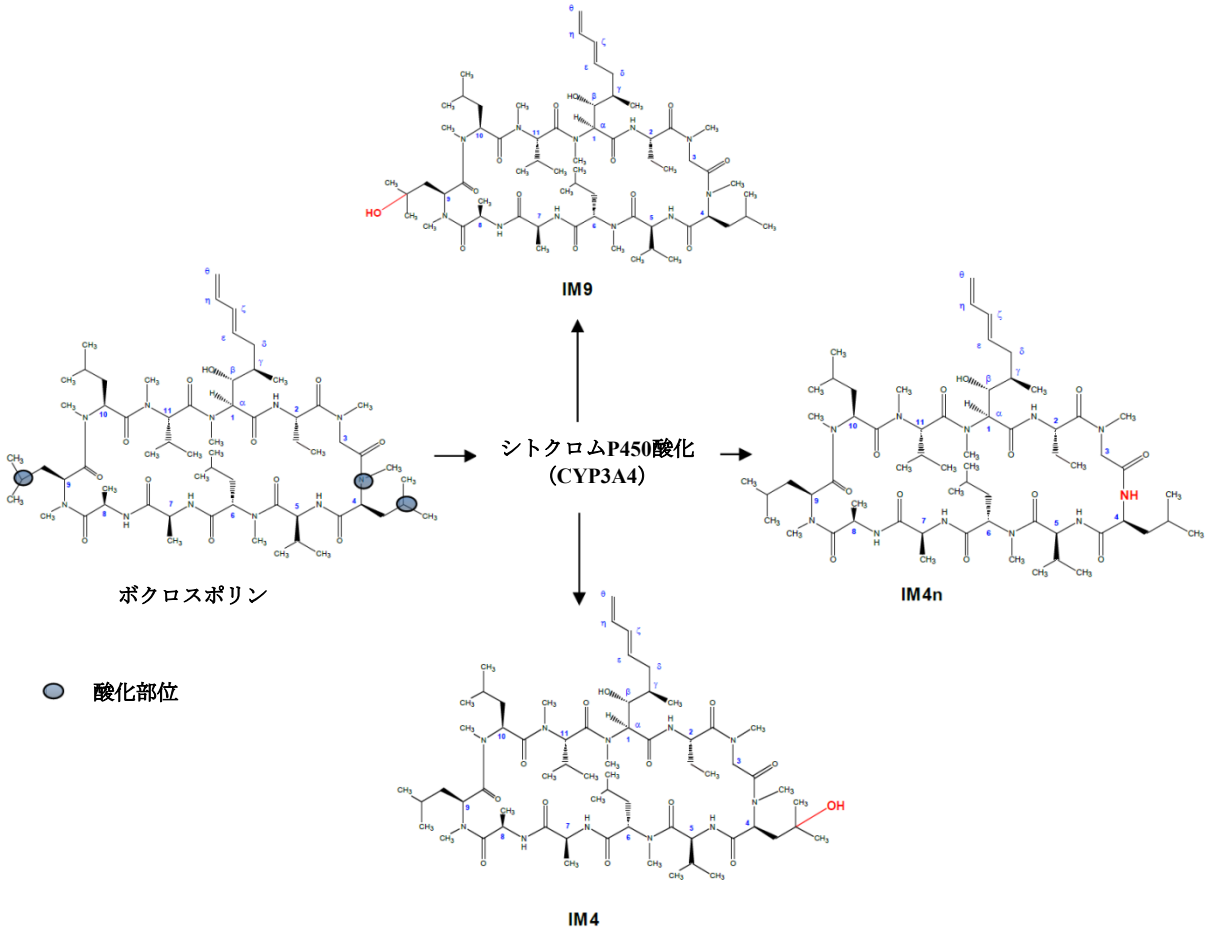


図 2.4.4.3-1　　IM1残基以外の代謝

＜資料番号4.2.2.4-12：Section 2.3.1より作成＞

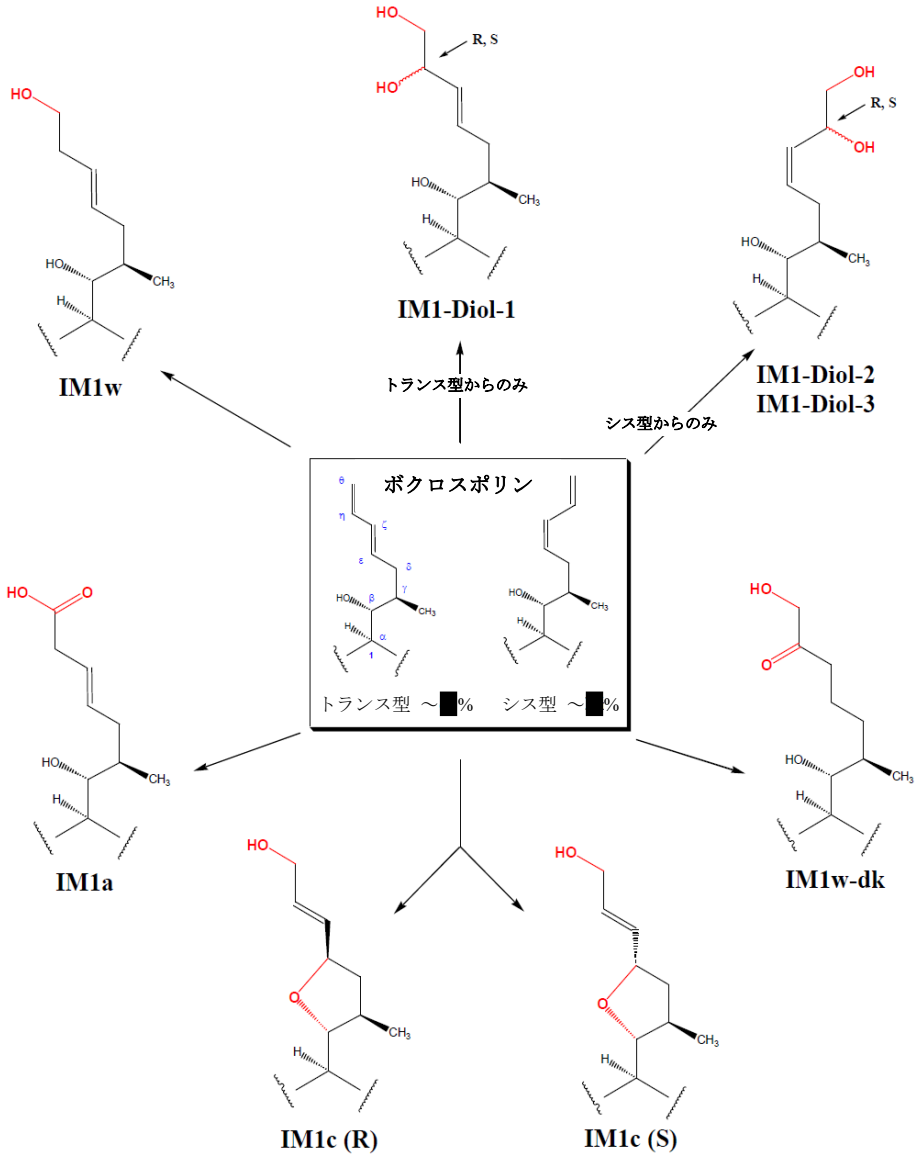


図 2.4.4.3-2　　IM1残基の代謝（IM1残基のみ表示）

注：IM1a＝IM1残基の酸化，IM1c＝IM1残基の環化，IM1-Diol＝IM1残基のエポキシ化後ジオールへの変換，
IM1w＝ 水分子（＋18 amu）のIM1残基への付加，IM1w-dk＝ 水分子が付加しジヒドロケト基へ変換
＜資料番号4.2.2.4-12：Section 2.3.2より作成＞

2.4.4.4　排泄

[^{3}H]-mix-ISA247（ラット）又は[^{14}C]-ボクロスポリン（ラット及びサル）の排泄は速やかであり，薬物由来放射能の大部分は24時間（ラット）又は48時間（サル）以内に消失した。ラット及びサルにおける主要な排泄経路は糞中排泄であった（概要表2.6.5.13，資料番号4.2.2.2-02，4.2.2.2-03，4.2.2.2-04）。

ラットを用いて[^{14}C]-ボクロスポリンの乳汁排泄試験を実施したところ，薬物由来放射能の乳汁排泄は比較的速やかであった，出生児への移行は緩慢であり限定的であった（概要表2.6.5.13，資料番号4.2.2.3-04）。

2.4.4.5　薬物相互作用

ボクロスポリンのCYP阻害及び誘導試験を*in vitro*で実施した。ヒト肝ミクロソームでは，ボクロスポリンはCYP3A4/5（ミダゾラム1'-水酸化による評価）の競合的阻害薬であり，IC_{50}値は1.2 µmol/L，K_iは1.1 µmol/Lであった。一方で，CYP3A4/5の阻害に時間依存性及び代謝依存性は認められなかった（概要表2.6.5.12，資料番号4.2.2.4-13）。主要代謝物であるIM9は，3 µmol/Lまでの濃度において，ヒト肝ミクロソームのCYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6，及びCYP3A4/5に対して直接的および時間依存的な阻害効果を示さないか，阻害率が50%未満であった（概要表2.6.5.12，資料番号4.2.2.4-14）。ヒト肝細胞において，ボクロスポリンは3 µmol/LまでCYP2B6を誘導しなかった（概要表2.6.5.12，資料番号4.2.2.4-16）。ヒト肝細胞における試験では，ボクロスポリンは最高7 µmol/Lまで，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，及びCYP3A4の誘導能を示さなかった。CYP1A2の誘導能は3 µmol/Lまで認められなかったが，7 µmol/Lにおいて3ロット中1ロットで被験物質非添加群に対して2倍以上の誘導を示した（概要表2.6.5.12，資料番号4.2.2.4-17）。

[^{14}C]-ボクロスポリンがP-gpの基質及び阻害能を有する可能性を，ヒト結腸癌（Caco-2）細胞単層膜を用いて検討した。結果，ボクロスポリンは4 µmol/LでP-gpの阻害薬となる可能性があり，また基質となる可能性があることが示唆された（概要表2.6.5.15，資料番号4.2.2.6-01）。Madin-Darbyイヌ腎臓細胞（MDCKII）単層膜において，ボクロスポリンはBCRP，OATP1B1，及びOATP1B3の基質ではなかった（概要表2.6.5.15，資料番号4.2.2.6-02）。

ボクロスポリンがOATP及びBCRPを阻害する可能性を検討した。ボクロスポリンはOATP1B1を阻害し（IC_{50} = 0.49 µmol/L），CsAによる阻害（IC_{50} = 0.6 µmol/L）と同程度であった。また，BCRPと相互作用することが示されたが，算出されたIC_{50}値は10 µmol/Lより高かった（概要表2.6.5.15，資料番号4.2.2.6-03）。ボクロスポリンは，OATP1B3を阻害した（IC_{50} = 0.24 µmol/L）（概要表2.6.5.15，資料番号4.2.2.6-04）。ボクロスポリンはOAT1，OAT3，OCT2，MATE1，及びMATE2-Kの阻害剤ではなかった（概要表2.6.5.15，資料番号4.2.2.6-02）。

2.4.4.6　異性体の相互変換

ヒト全血中（*in vitro*）でISA247のシス異性体からトランス異性体に，又はトランス異性体からシス異性体への相互変換は認められなかった。ラットを用いた13週間毒性ブリッジング試験，サルを用いた安全性薬理試験，反復漸増投与試験（ISA03-12試験）で得られたデータから，*in vivo*

においてトランス異性体はシス異性体に変換しないことが確認された（概要表2.6.5.16，資料番号4.2.2.7-01，4.2.2.7-02，4.2.1.3-04）。

2.4.5　毒性試験

全ての重要な試験は，GLP規則を遵守して実施した。概要表2.6.7.1には，開発元により実施された毒性試験の概要及びそのGLP適合状況を示している。

2.4.5.1　単回投与毒性試験

SDラットにボクロスポリンを2.5 mg/kgまでIV投与したところ，忍容性は良好であった（概要表2.6.7.5，資料番号4.2.3.1-01）。ビーグル犬にmix-ISA247を75 mg/kgまで単回経口投与したところ，認められた影響は嘔吐のみであった（概要表2.6.7.5，資料番号4.2.3.1-02）。

2.4.5.2　反復投与毒性試験

反復投与毒性試験では，主な動物種としてSDラット及びカニクイザルを使用した。CD-1マウスはがん原性試験の用量設定試験に用いた。ビーグル犬を用いて13週間試験まで実施したが，嘔吐によりPKが大きく変動したため，その後の長期試験は実施しなかった。イヌで嘔吐が認められたことを除き，ラット又はサルで認められなかった変化は，マウス及びイヌでも認められなかった。

Mix-ISA247及びボクロスポリンの忍容性は良好で，この免疫抑制剤クラスの作用と一致した影響が認められた。ラット，イヌ及びサルにおいて，胸腺，脾臓及びリンパ節でリンパ組織の萎縮が認められた。ラットにおいて，循環血中の好中球及びリンパ球の減少が認められた。これらの変化は可逆的であった。

ラットにおいて白内障発症，腎臓への影響及び神経組織学的所見が認められた（概要表2.6.7.7.1～2.6.7.7.3，資料番号4.2.3.2-06～4.2.3.2-08）。白内障発症は種特異的なクラスエフェクトと考えられ，CsAでも認められている[22,23,24,25]。腎臓への影響として，血中尿素窒素及びクレアチニンの増加，好塩基性尿細管，尿細管の変性/再生並びに皮髄の鉱質沈着が認められた。認められた病理組織学的変化の範疇は，雄ラットの腎臓で特に加齢に伴って自然発生的に生じることがあるため，これらの腎所見が，投与に直接関連したものなのか，又はmix-ISA247，ボクロスポリン又はCsAへの曝露により正常な生体反応が増悪した結果なのかは不明である。神経組織学的影響として，脳及び脊髄にグリオーシス及び血管周囲性細胞浸潤が認められた。ラットで認められた神経病理組織学的変化は，イヌ及びサルを用いたmix-ISA247の反復投与毒性試験では認められなかったことから，動物種特異的な影響と考えられる。ラットを用いた13週間ブリッジング試験において，CsA投与後にも同じ神経病理組織学的所見が得られている（概要表2.6.7.7.4，資料番号4.2.3.2-09）。ラットにボクロスポリンを10 mg/kg/日以上の用量で投与したとき，軽度から中等度の血清マグネシウム減少が認められた。当該濃度は概して正常範囲内であったが，群平均値の低下が統計学的有意に達したこともしばしば認められた。CsAは，ヒト及び動物で血清マグネシウムの減少を引き起こすことが知られている[26]。尿中マグネシウム値は増加することから，血清マグネシウム減少の原因は，腎臓からのマグネシウム喪失の増加であることがわかる。その原因は，CsAによる腎尿細管上皮内のマグネシウムの細胞内再分布と考えられているが，正確なメ

カニズムは不明である。血清マグネシウム値は，CsA投与中止後，速やかに正常値に戻ることが知られている。毒性試験で認められたボクロスポリンの血清マグネシウムに対する影響は，CsAで認められる影響と同様であった。

イヌにおいて，催吐作用及び歯肉増殖が認められたが，眼，腎臓又は神経系への影響は認められなかった（概要表2.6.7.7.7及び2.6.7.7.8，資料番号4.2.3.2-12及び4.2.3.2-13）。この系統の化合物において，歯肉増殖が生じることは既に知られている。イヌへの免疫抑制剤の使用により，消化管毒性が認められている[27,28,29,30]。また，CsAを投与したイヌにおいて，食欲低下，下痢，体重減少，下痢，嘔吐及び体重減少などの一般状態が認められている[30]。

サルでは，主な毒性所見として歯肉増殖及びリンパ肉腫が認められた（概要表2.6.7.7.9及び2.6.7.7.10，資料番号4.2.3.2-14及び4.2.3.2-15）。カルシニューリン阻害データから，中及び高用量群のサルでは強い免疫抑制作用が発現したことが示された。カニクイザルにおいて，免疫抑制療法によりリンパ肉腫の発生が著明に増加したことが報告されている[31,32,33]。したがって，当該試験における強い免疫抑制作用が，リンパ肉腫の発現頻度増加の理由と考えられた。

ラットを用いた13週間反復経口投与ブリッジング試験において，ボクロスポリンを反復投与したときの毒性をmix-ISA247，シス型ISA247及びCsAを反復投与したときの毒性と直接比較した（概要表2.6.7.7.4，資料番号4.2.3.2-09）。概して，検討した用量において，ボクロスポリン又はCsAを投与したときの有害作用の発現頻度及び/又は重症度は，mix-ISA247又はシス型ISA247のいずれかを投与したときよりも高かった。これらの差は，CsAのバイオアベイラビリティが高いこと及びトランス異性体のバイオアベイラビリティがシス異性体より高いこと（約2倍）に関連する可能性が高い。ボクロスポリンを投与したときのAUCは，mix-ISA247を投与したときのAUC（シス異性体及びトランス異性体の合計値）より高かった。また，ラットにおけるCsAの曝露量はシス型ISA247，ボクロスポリン又はmix-ISA247の曝露量より高かった。

ラットを用いたボクロスポリンの13週間経口投与による製剤比較試験において，25 mg/kg/日群の毒性プロファイルは，ボクロスポリンを標準製剤として投与した場合と，ビタミンE非含有製剤として投与した場合で同様であった（概要表2.6.7.7.5，資料番号4.2.3.2-10）。したがって，溶媒中のビタミンE成分は肝毒性又はその他の毒性をマスクしていなかったと結論付けた。

Mix-ISA247（又は可能であればボクロスポリン）の反復投与毒性試験で用いた各動物種における代表的なNOAELを表 2.4.5.2-1に示す。

表 2.4.5.2-1　　ボクロスポリン及び/又はmix-ISA247の反復投与毒性試験における NOAELの要約

動物種	試験	NOAEL（mg/kg/日） （被験物質）
SDラット	13週間ブリッジング試験 （資料番号4.2.3.2-09）	2.5（ボクロスポリン，mix-ISA247）
SDラット	13週間製剤比較試験 （資料番号4.2.3.2-10）	2.5（ボクロスポリン，溶媒比較）
SDラット （幼若）	10週間経口投与毒性試験 （資料番号4.2.3.5.4-01）	1.25（雄，ボクロスポリン）[a] 2.5（雌，ボクロスポリン）[a]
ビーグル犬	13週間経口投与毒性試験 （資料番号4.2.3.2-13）	2.5（mix-ISA247）
カニクイザル	39週間経口投与毒性試験 （資料番号4.2.3.2-15）	25（mix-ISA247）

[a]過去のデータより，検討した用量における雄ラットでの曝露量が高かったことから，雌雄で用量を調整した。

2.4.5.3　　遺伝毒性試験

ボクロスポリンは，Ames試験（概要表2.6.7.8.2及び2.6.7.8.3，資料番号4.2.3.3.1-02及び4.2.3.3.1-03）及び染色体異常試験において（概要表2.6.7.8.5，資料番号4.2.3.3.1-05），代謝活性化系の有無にかかわらず遺伝毒性を示さなかった。Mix-ISA247は，以下のような標準的な一連の遺伝毒性試験において遺伝毒性を示さなかった：Ames試験（概要表2.6.7.8.1，資料番号4.2.3.3.1-01），染色体異常試験（概要表2.6.7.8.4，資料番号4.2.3.3.1-04）及び*in vivo*ラット小核試験（概要表2.6.7.9，資料番号4.2.3.3.2-01）。加えて，ボクロスポリン関連物質26種類の*in silico*評価より，これらの化合物が遺伝毒性を有するというエビデンスはないとの結論が得られた［[redacted]及び不純物のHPLC法において各不純物が溶出するRRTにより部分的に特定された類縁化合物（[redacted]）及び分解生成物4種（[redacted]）］（概要表2.6.7.17.2，資料番号4.2.3.7.7-02，4.2.3.7.7-06～4.2.3.7.7-09）。同様に，ボクロスポリンの合成に用いられる8種類の試薬について実施した*in silico*評価では，[redacted]及び[redacted]はクラス2に分類され，[redacted]は専門的経験に基づくルールベース及び統計ベースの2つのモデルにおいて陰性であることが確認された（概要表2.6.7.17.2，資料番号4.2.3.7.7-03）。

2.4.5.4　　がん原性試験

ラットにボクロスポリンを少なくとも96週間連日強制経口投与したところ，検討した最高用量（雄で1.25 mg/kg/日，雌で2.5 mg/kg/日）までがん原性のエビデンスは得られなかった（概要表

2.6.7.10.3，資料番号4.2.3.4.1-04）。マウスにボクロスポリンを60～89週間連日強制経口投与したところ，最高用量である30 mg/kg/日群の雄では生理食塩水対照群に比べて悪性リンパ腫の発現頻度が上昇し（溶媒対照群との差はなし），30 mg/kg/日群の雌では溶媒投与群に比べて悪性リンパ腫の発現頻度が上昇した（生理食塩水対照群との差はなし）（概要表2.6.7.10.2，資料番号4.2.3.4.1-03）。

2.4.5.5　生殖発生毒性試験

ICH S5ガイドラインに準拠したmix-ISA247の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験，胚・胎児発生に関する試験，出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験が実施された（概要表2.6.7.12，2.6.7.13.1，2.6.7.13.2及び2.6.7.14，資料番号4.2.3.5.1-01，4.2.3.5.2-03，4.2.3.5.2-04及び4.2.3.5.3-01）。最も高感度な動物種であるウサギにおいて，母体への有害作用に関連する胎児所見が主に認められたことから，mix-ISA247の生殖発生毒性試験全体のNOAELは2 mg/kg/日であった（ウサギ胚・胎児試験における母動物及び胚・胎児発生に関するNOAEL）。

ブリッジング試験の1つとして，ウサギを用いたボクロスポリンの胚・胎児発生への影響について評価した（モジュール2.6.7.13.3，資料番号4.2.3.5.2-06）。本試験における母動物及び胚・胎児発生に関するNOAELは，1 mg/kg/日であった。母動物毒性は体重変化及び/又は乳腺腫脹であった。胎児への影響は，軽度の体重減少とこれに関連した骨格変異が認められた。Mix-ISA247とボクロスポリンのいずれにも催奇形性は認められなかった。

トランス異性体が約50%含まれているmix-ISA247の試験結果と，最も感度の高い動物種であるウサギを用いたボクロスポリンの胚・胎児発生に関するブリッジング試験の結果を比較すると，ボクロスポリンの発生毒性はmix-ISA247と同等であった。したがって，ボクロスポリンの生殖毒性はmix-ISA247と同等と考えられた。

Mix-ISA247又はボクロスポリンの生殖発生毒性試験におけるNOAELの要約を表 2.4.5.5-1に示す。

表 2.4.5.5-1　　ボクロスポリン又はmix-ISA247の生殖発生毒性試験における NOAELの要約

動物種	試験	NOAEL（mg/kg/日）
SDラット	受胎能及び初期胚発生に関する試験 （資料番号4.2.3.5.1-01）	雌雄生殖：＞25（mix-ISA247） 初期胚発生：＞25（mix-ISA247）
SDラット	胚・胎児発生に関する試験 （資料番号4.2.3.5.2-03）	母動物：10（mix-ISA247） 胚・胎児発生：10（mix-ISA247）
NZWウサギ	胚・胎児発生に関する試験 （資料番号4.2.3.5.2-04）	母動物：2（mix-ISA247） 胚・胎児発生：2（mix-ISA247）
NZWウサギ	胚・胎児発生に関する試験 （資料番号4.2.3.5.2-06）	母動物：1（ボクロスポリン） 胚・胎児発生：1（ボクロスポリン）
SDラット	出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 （資料番号4.2.3.5.3-01）	F0：10（mix-ISA247） F1：＞25（mix-ISA247） F1発生：10（mix-ISA247） F2：＞25（mix-ISA247）

2.4.5.6　　幼若動物を用いた試験

幼若ラットに1日1回，10週間（4～14週齢）投与し，ボクロスポリンの潜在的毒性を評価した。5週間の回復期間を設定し，回復性も評価した（概要表2.6.7.15，資料番号4.2.3.5.4-01）。本試験の幼若ラットでは，過去に実施した標準週齢ラットを用いた経口投与毒性試験の所見と比較して，新たな毒性又は予測できない毒性は認められなかった。用量別の全身曝露量は，過去に実施した成熟ラット経口投与毒性試験と同程度であった。ボクロスポリンに関連する変化が雌雄で胸腺に，雌で腎臓に認められたことから，幼若ラットにボクロスポリンを1日1回10週間反復経口投与したときのNOAELは，雄で1.25 mg/kg/日，雌で2.5 mg/kg/日であった。

2.4.5.7　　局所刺激性試験

ボクロスポリンを用いた局所刺激性試験として，ウサギ皮膚一次刺激性試験（概要表2.6.7.16，資料番号4.2.3.6-01），モルモット皮膚感作性試験（概要表2.6.7.16，資料番号4.2.3.6-02）及びウサギ眼一次刺激性試験（概要表2.6.7.16，資料番号4.2.3.6-03）を実施した。これらの試験から，ボクロスポリンは皮膚に対して非感作性及び非刺激性であることが示された。一方，ウサギにおいて眼への影響がわずかに認められたことから，ボクロスポリンはわずかに眼刺激性を有すると考えられる。

2.4.5.8　　併用投与毒性試験

実臨床ではボクロスポリンとステロイド剤の併用投与が予想されるため，ラットを用いたボクロスポリンとプレドニゾンの13週間併用投与毒性試験を実施した（概要表2.6.7.17.1，資料番号

4.2.3.7.7-01）。ラットにボクロスポリン及びプレドニゾンを併用投与しても，各被験物質を単独で投与したときと比較して新たな毒性作用は生じないことが示された。白内障発症の発現頻度は，ボクロスポリンを単独投与しても，プレドニゾンと併用投与しても同程度であった。

2.4.5.9　不純物の安全性確認

ボクロスポリンは半合成の環状ペプチドであるため，またその原薬の構造特性は主にCsAから確立されているため（したがって発酵によって完全に生成されるため），ペプチド又は一次発酵工程に由来する半合成生成物を除外しているICH Q3A（R2）ガイドライン[20]は，完全にボクロスポリンに適用されるものではない。

以下の項には，ボクロスポリンの規格にある関連不純物及び判定基準の適格性確認を支持している，安全性の根拠を記述する。関連物質及びその判定基準に関する詳細な情報は，モジュール2.6.6及びLonza MF 3.2.S.3.2に示す。ICH M7（R1）に準拠した*in silico*試験も実施し，その結果，26種のボクロスポリン関連物質は遺伝毒性を有するというエビデンスはなく，クラス5の化合物（「警告部分構造なし」）に分類できると結論付けた。ボクロスポリンの合成に用いられる8種類の試薬について実施した*in silico*評価では，[redacted]及び[redacted]はクラス2に分類され，その他6種はクラス5の化合物（「警告部分構造なし」）に分類され，非変異原性不純物として扱うことができると結論付けた。

個別規格設定不純物の安全レベルは，開発の過程で製造されたボクロスポリンバッチを用いた非臨床毒性試験から決定されている。ICH Q3A（R2）ガイダンスに述べられている原則に従い，これらの非臨床安全性試験は，それぞれで所定の不純物の量が最も多いバッチを評価していたことで，不純物の安全性確認に最適であるものとして選択した。各不純物がその判定基準のレベルで製剤中に存在すると想定し，経口投与後の各不純物の曝露量を，臨床用量（23.7 mg BID又は0.8 mg/kg/日）の経口投与により得られると考えられるヒト曝露量と比較した（概要表2.6.6.9項参照）。その結果，ボクロスポリンの各不純物に提案される安全性確認の必要な閾値及び判定基準を十分に支持するものであると考えられた。

2.4.5.10　添加物の安全性評価

本製剤の添加物として含まれるポリソルベート40について安全性を文献調査に基づき評価した結果，本製剤の臨床推奨用量までの使用に安全性上の懸念はないと考えられた。

2.4.6　総括及び結論

ボクロスポリン/mix-ISA247に関する非臨床薬理試験のデータから，ボクロスポリン/mix-ISA247が*in vitro*及び*in vivo*において免疫抑制活性をもつことが実証されている。ヒト全血において免疫抑制活性のPDマーカーとしてカルシニューリン阻害を用いたとき，*in vitro*においてボクロスポリン及びmix-ISA247はCsAと比べて高い力価を示した。この活性はカニクイザルを用いた*in vitro*及び*in vivo*試験においても確認され，mix-ISA247はCsAと比べてリンパ球増殖の阻害能が高かった。ボクロスポリンの5種類の代謝物は，*in vitro*ヒトリンパ球増殖アッセイにおいてボクロスポリンと比べて有意に低い効力を示したことから，ボクロスポリン治療を受けた患者における免疫抑制に顕著に影響することは予想されない。自己免疫疾患モデルにおいて，ボクロスポリン

はIRBP誘導ぶどう膜炎を予防及び治療し，mix-ISA247は確立されたマウスのコラーゲン誘導関節炎及び確立されたウサギの抗原誘導関節炎を治療できることが示された。Mix-ISA247の免疫抑制活性は臓器移植モデルにおいて*in vivo*でも実証された。Mix-ISA247はCsAと比べ，マウスに移植した膵島細胞の同種移植片の生着期間を延長した。ラット心移植モデルではmix-ISA247とボクロスポリンの双方が移植片生着時間を延長させることが実証されている。ヒト以外の霊長類を用いた腎移植試験において，同程度の曝露量で，mix-ISA247はCsAと比べて高い力価を示した。これらのデータは，T細胞を介した疾患においてボクロスポリンはCsAと比べて高い力価と効果をもつことを示している。

自己免疫疾患でCNIを使用する根拠として，T細胞活性化に対する強力な作用及び免疫調節作用がある。T細胞を介した免疫応答は，LNを含むこれら多くの疾患の病態形成の重要な特徴である。

Mix-ISA247及びボクロスポリンの心血管系作用を評価するため，安全性薬理試験を実施した。CHO細胞を用いたhERGアッセイの結果により，mix-ISA247及びボクロスポリンは*in vitro*においてhERGチャネル電流を阻害し，IC_{20}は約6～18 µmol/L（約7000～22000 ng/mL）であることが示された。ただし，これらの濃度は，臨床で推定されるC_{max}である0.093 µmol/L（約113 ng/mL）をはるかに超える濃度であった（LX211-06及びLX211-07試験）。さらに，ウサギプルキンエ線維アッセイにおいて，mix-ISA247は検討した濃度範囲（設定濃度：0.01～10 µmol/L）で不整脈を誘発しなかった。*In vivo*では，覚醒サルを用いた心血管系の安全性薬理試験においてボクロスポリン及び/又はmix-ISA247は200 mg/kg（検討した最高用量）でQT間隔及びQTcを延長したが，低用量では影響が認められなかった。これらの試験において心拍数に対する影響は認められず，ECG波形からはRR，PR及びQRS間隔に対する影響も示されなかった。サルにボクロスポリンを200 mg/kgの用量で投与したときの曝露量（C_{max}：538.4 ng/mL，AUC_{24h}：3534.5 ng·h/mL）は，推定臨床曝露量（C_{max}：113 ng/mL，AUC_{24h}：888 ng·h/mL，LX211-06及びLX211-07試験）のそれぞれ約5倍及び4倍であった。イヌの2及び13週間試験，サルの13及び39週間試験を含め，げっ歯類以外を用いたいずれの毒性試験においても，薬物に関連するECG異常は認められなかった。加えて，健康被験者（ISA05-03試験）及びAURA-LV（AUR-VCS-2012-01）及びAURORA 1（AUR-VCS-2016-01）のLN患者から得られたECG所見の解析から，ECGに関する重大な安全上の懸念は認められなかった（概要文2.7.4）。

呼吸系，中枢神経系及び腎/泌尿器系に対するボクロスポリンの影響を評価した。ラットにボクロスポリンを最高用量25 mg/kgで投与したとき，呼吸数の軽度減少が認められたが，一回換気量は増加しなかった。25 mg/kgまでの用量のボクロスポリンは，ラットの神経病理学的徴候に影響しなかった。ラットの腎/泌尿器系に対する影響を検討した試験において唯一認められたボクロスポリンの急性作用は，25 mg/kg（検討した最高用量）の投与による尿量の軽微な減少であった。過去の試験結果（資料番号4.2.3.2-09）に基づいたとき，ラットに25 mg/kgを単回投与後した時の曝露量（C_{max}：1412.5 ng/mL，AUC_{24h}：21929.3 ng·h/mL）は，臨床試験で認められた曝露量（C_{max}：113 ng/mL，AUC_{24h}：888 ng·h/mL）の約13及び25倍であった。

ラットにおいてボクロスポリンの絶対的経口バイオアベイラビリティは，雌雄で7.6%～7.8%であった。ボクロスポリン及びmix-ISA247は，主に水酸化反応及び酸化的N-脱メチル化反応により

代謝された。主要代謝物は，すべての動物種においてIM9であった。ボクロスポリンの代謝は動物種間で同様であり，ヒトに固有の代謝物は認められなかった。CYP3A4/5は，ボクロスポリンの第1相代謝に関与する主要な代謝酵素である。*In vitro*の薬物相互作用試験から，ボクロスポリンが，時間依存性及び代謝依存性をもたないCYP3A4/5の競合的阻害薬であることが示された。また，*in vitro*試験の結果から，ボクロスポリンは，高濃度（4 µmol/L）でP-gpの阻害剤及び基質となる可能性があることも示唆された。

*In vitro*試験の結果から，ボクロスポリンは，OATP1B1及びOATP1B3の基質である他剤と併用投与した場合，薬物相互作用を引き起こす可能性があることが示唆された。ボクロスポリンは，BCRPを介した小胞輸送阻害アッセイにおいて，BCRPと相互作用することが示されたが，算出されたIC_{50}値は検討した最高濃度10 µmol/Lより高かった。

全血中におけるシス及びトランス異性体の相互変換は認められなかった。ラット及びサルにおける[^{14}C]-ボクロスポリンの組織分布は，消化管，肝臓，及び腎臓で高かった。薬物由来放射能の分布プロファイルは有色ラットとアルビノラットで同様であったことから，本薬及びその代謝物とメラニンとの結合はごくわずかであることが示唆された。ボクロスポリンは動物種全体で高いタンパク結合率を示し，赤血球に多く分配されていた。排泄は速やかであり，薬物の大部分は24～48時間以内に糞中から排泄した。ラットを用いて[^{14}C]-ボクロスポリンの胎盤通過試験及び乳汁排泄試験を実施したところ，胎盤を介した薬物由来放射能の移行は緩慢で限定的であった。一方で乳汁排泄は比較的速やかであったものの，出生児への全身吸収は緩徐で限定的であった。

ボクロスポリン（及びmix-ISA247）の非臨床薬理試験及び薬物動態試験データにより，T細胞を介した疾患において治療活性をもつ可能性が実証されている。特に，CsAの末端アミノ酸残基を修飾することで，代謝部位が末端アミノ酸残基から9番目のアミノ酸残基に部分的に移行し，それによって主要血中代謝物の量的比率が変化したことが，データから示された。代謝プロファイルの変化に加え，ボクロスポリンは*in vitro*試験においてCsAの約2～4倍というカルシニューリン阻害活性を示した。このような力価の増強は，種々の動物モデルでも認められた（概要表2.6.3.2，資料番号4.2.1.1-03，4.2.1.1-05，4.2.1.1-06，4.2.1.1-07，4.2.1.1-08，4.2.1.1-09）。

毒性試験への使用に最も適切な動物種はラット及びサルであった。ボクロスポリンの毒性プロファイルは質的にmix-ISA247と類似していた。毒性試験において特定されたボクロスポリン及びmix-ISA247の標的器官は，既承認のCNIに知られている器官と同じであった。

ラットで認められた主な有害作用は，白内障発症，腎臓への影響及び神経組織学的所見であった。白内障発症は種特異的なクラスエフェクトと考えられ，CsAでも認められている[22,23,24,25]。腎臓への影響として，血中尿素窒素及びクレアチニンの増加，好塩基性尿細管，尿細管の変性/再生，並びに皮髄の鉱質沈着が認められた。これらの所見は，長期の反復投与試験の概ね2.5 mg/kg/日以上の用量で認められた。認められた病理組織学的な腎臓における変化の範疇は，雄ラットの腎臓で特に加齢に伴って自然に生じることがあるため，これらの腎所見が，投与に直接関連したものなのか，又はmix-ISA247，ボクロスポリン又はCsAへの曝露により正常な生体反応が増悪した結果なのかは不明である。神経組織学的影響として，脳及び脊髄にグリオーシス及び血管周囲性細胞浸潤が認められた。ラットで認められた神経病理組織学的変化は，イヌ及びサルを用いたmix-ISA247の反復投与毒性試験では認められなかったことから，動物種特異的な影響と考

えられる。CsAを比較対照としたラット13週間ブリッジング試験において，CsAは同様の神経病理組織学的所見と関連していた。概して，検討した用量において，ボクロスポリン又はCsAを投与したときの有害作用の発現頻度及び/又は重症度は，mix-ISA247を投与したときよりも高かった。これらの差は，CsAのバイオアベイラビリティが高いこと及びISA247トランス異性体のバイオアベイラビリティがシス異性体より高いこと（約2倍）に起因する可能性が高い。

CsAは患者に，軽度の振戦，及びまれに頭痛，視覚異常及び痙攣発作を含む神経学的な有害事象を引き起こすことが長年知られている[34,35]。神経毒性の発現頻度は，25%から移植患者で59%という高さであることが報告されている[34]。白質の低吸収域，可逆性後白質脳症症候群及び脳浮腫がMRIにより検出可能であり[34,36]，発現頻度及び重症度は，用量依存性及び曝露依存性である。短期のCsA投与後にこのような影響が認められる患者では，トラフ血中濃度が通常の目標濃度（200 ng/mL未満）をはるかに上回っている。しかしながら，長期投与の場合は，CsAトラフ濃度が目標治療域内にある患者でも神経学的徴候が発現する可能性がある[34]。ラットにおいて認められるボクロスポリンと関連する神経病理組織学的所見も，用量に依存することが確認されている。LNのために予定しているボクロスポリンの治療用量（0.4 mg/kg BID）は，移植患者で通常使用されるCsAの用量（1.5～3.0 mg/kg BID）よりも低い[34]。このような移植患者集団では，CsAに関連した神経学的徴候が発現している。LN治療薬として使用するボクロスポリンの用量（23.7 mg BID）は，患者に神経学的影響を引き起こす可能性がある用量を下回るものである。したがって，ラットで認められたボクロスポリンに関連した神経病理組織学的作用の発現は，LNに推奨される治療の条件下でヒトへのリスクを示すものではないと考えられる。

サルの39週間反復投与毒性試験において，高用量群での主要な毒性学的所見の1つとして，リンパ肉腫が認められた（mix-ISA247の150 mg/kg/日群の雄1例及び雌4例）。中及び低用量群ではリンパ肉腫は認められていない。本試験におけるカルシニューリン阻害データから，中用量及び高用量群のサルでは，臨床で乾癬又はぶどう膜炎を治療するために必要になると考えられるカルシニューリン阻害を超えた阻害（> 80%）が生じ，強い免疫抑制が生じたことが確認された。このことは，LNなど他の自己免疫疾患の治療にも適用されると考えられる。免疫抑制状態のサルは特に，ウイルスと関連した悪性腫瘍が発現するリスクがある。特に，複数の公表文献において，カニクイザルは免疫抑制療法によりリンパ肉腫の発生が著明に増加したことが報告されている[31,32,33]。リンパ腫の発現頻度の上昇は，免疫抑制剤のクラスエフェクトと考えられる（CsA及びTacの製品情報に本知見について掲載されている）。以上のことを考慮すると，サルにおけるリンパ肉腫の所見は予測できないものではなく，さらなる懸念を引き起こすものではない。同様に，mix-ISA247の75及び150 mg/kg/日投与群で認められた脾臓での（リンパ組織の）過形成及び歯肉増殖は，薬理作用に関連するものであると考えられた。

ボクロスポリン及びmix-ISA247は標準的な一連の試験において遺伝毒性を示さず，さらに，ボクロスポリン分子構造の*in silico*解析において警告部分構造は確認されなかった。ラットにボクロスポリンを少なくとも96週間連日強制経口投与したところ，がん原性のエビデンスは得られなかった。マウスにボクロスポリンを60～89週間連日強制経口投与したところ，高用量である30 mg/kg/日投与群の雄では生理食塩水対照群に比べて悪性リンパ腫の発現頻度が上昇し（溶媒対照群との差はなし），30 mg/kg/日投与群の雌では溶媒投与群に比べて悪性リンパ腫の発現頻度が

上昇した（生理食塩水対照群との差はなし）。高用量群のマウスで認められた悪性リンパ腫の増加は，免疫抑制状態ではリンパ腫のリスクが高いことが良く知られていることに一致している。

Mix-ISA247を用いた生殖発生毒性試験として，受胎能，胚・胎児発生及び出生前後試験を実施した。主として母体への有害作用に関連する胎児所見から，mix-ISA247の生殖発生毒性試験全体のNOAELは2 mg/kg/日であった（ウサギ胚・胎児試験における母動物及び胚・胎児発生に関するNOAEL）。ボクロスポリンのウサギ胚・胎児発生に関する試験の結果，NOAELは1 mg/kg/日であった。Mix-ISA247及びボクロスポリンのいずれにも催奇形性は認められなかった。最も高感度の動物種であるウサギを用いたボクロスポリンの胚・胎児発生に関するブリッジング試験よりボクロスポリンの生殖発生毒性は，mix-ISA247（トランス異性体を約50%含有）と同等であると考えられた。

幼若ラットにおけるボクロスポリンの毒性プロファイルは，成熟ラットを用いた毒性試験で認められたものと同様であり，胸腺，腎臓，脳及び坐骨神経で変化が認められた。これらは幼若動物で新たに確認された所見ではなかった。

ボクロスポリン及びプレドニゾンの13週間併用投与毒性試験では，ラットにボクロスポリン及びプレドニゾンを併用投与しても，各被験物質を単独で投与したときと比べて新たな毒性作用は生じないことが示された。

ICH Q3A（R2）に記述されている原則に従い，非臨床安全性試験は，それぞれで所定の不純物の量が最も多いバッチを用いて評価した。これらの非臨床安全性試験結果は，ボクロスポリンの各不純物に提案される安全性確認の必要な閾値及び関連物質の判定基準を支持するものであった。

本製剤の添加物として含まれるポリソルベート40について安全性を評価した結果，本製剤の臨床推奨用量までの使用に安全性上の懸念はないと考えられた。

治療用量である0.4 mg/kg BIDでの推定曝露量に対するラット及びサルの重要な試験におけるNOAELでの曝露マージンを表 2.4.6-1に示す。

表 2.4.6-1　　曝露マージン

資料番号	動物種	試験期間	NOAEL（mg/kg/日）	平均AUC_{24h}（ng·h/mL）	推定臨床量におけるAUC_{24h}（ng·h/mL）	曝露マージン
4.2.3.2-09	ラット	13週	2.5	716.2[a]	888[b]	0.8
4.2.3.2-08	ラット	26週	1.25	199.0[c]	888[b]	0.2
4.2.3.2-15	サル	39週	25	781.9[c]	888[b]	0.9
4.2.3.4.1-03	マウス	104週	10	雄405.9[d,e] 雌612.1[d,e]	888[b]	雄0.5 雌0.7
4.2.3.4.1-04	ラット	104週	雄1.25[f] 雌2.5[f]	雄395.24[e] 雌366.21[e]	888[b]	雄0.4 雌0.4
4.2.3.5.2-03	ラット	妊娠6~17日	10	6240.3 [c,g]	888[b]	7.0
4.2.3.5.2-06	ウサギ	妊娠6~18日	1	8.1[h,i]	888[b]	0.01

[a]ボクロスポリン（雌雄合算；プールしたサンプル）
[b]0.4 mg/kg BIDで投与した薬物相互作用試験のボクロスポリンデータを合算した［AUC_{12h} = 444 ng·h/mL，LX211-06試験（n = 24）及びLX211-07試験（n = 20）］。
[c]Mix-ISA247（雌雄合算又は妊娠動物）
[d]AUC_{12h}を代用
[e]採血は26週時点
[f]がん原性に関する無影響量
[g]採血は妊娠17日時点
[h]AUC_{all}を代用
[i]採血は妊娠18日時点

Mix-ISA247及びボクロスポリンの毒性学的プロファイルは十分に明らかにされており，大半の所見は薬剤の薬理作用に起因する変化であった。認められた所見は，他の系統薬関連の免疫抑制剤への曝露後に認められた影響と一致していた。Mix-ISA247とボクロスポリンを比較したとき，毒性の質的な差は認められなかった。ボクロスポリン投与後の曝露量は，mix-ISA247投与後と比べて高かった。加えて，カルシニューリン阻害作用について比較した時，ボクロスポリンは高い阻害作用を示していた。毒性作用については，ボクロスポリン投与群の方がmix-ISA247投与群と比較して顕著であることが多かった。同じ用量及び同じ動物種を用いて実施した試験間の，所見の程度及び発現頻度に関するこのような差は，高い薬理活性を有するボクロスポリンの全身曝露量が高かったためと考えられる。ウサギを用いたボクロスポリンの胚・胎児発生に関する試験では，mix-ISA247投与後と同様にボクロスポリン投与により，胎児毒性がみられた。いずれの薬剤にも催奇形性は認められなかった。

ラットを用いた13週間ブリッジング試験でのNOAEL（2.5 mg/kg/日）におけるボクロスポリンの曝露量（AUC_{24h}）は，ループス腎炎の治療のためのボクロスポリンの治療用量での推定曝露量の0.8倍であった。同様に，mix-ISA247を用いたサル39週間反復投与毒性試験でのNOAEL（25 mg/kg/日）における曝露量（AUC_{24h}）は，ボクロスポリンの臨床曝露量の0.9倍であった。なお，毒性試験で使用した各動物種におけるヒト主要代謝物（IM9）の曝露を評価した結果，い

ずれの動物種においても臨床曝露と同等以上の曝露であったことが確認されており，実施済みの毒性試験で評価可能であると考えられた（表 2.6.4.9-3及び概要表2.6.5.10参照）。これらの毒性試験結果及びTKデータから，ボクロスポリンは，臨床的に検討した高用量（39.5 mg BID）及びLN患者集団には予定している用量（27.3 mg BID）で，治療に使用できることを支持するものである。

2.4.7 参考文献

1 Granelli-Piperno A, Andrus L, Steinman RM. Lymphokine and nonlymphokine mRNA levels in stimulated human T cells: kinetics, mitogen requirements, and effects of cyclosporin A. J Exp Med. 1986;163:922-37.（参考文献番号4.3-01）

2 Stepkowski SM. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. Expert Rev Mol Med. 2000;2(4):1-23. Expert Rev Mol Med. p. 1-6.（参考文献番号4.3-02）

3 Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. N Engl J Med. 2008;358(9):929-39.（参考文献番号4.3-03）

4 Comte D, Karampetsou MP, Tsokos GC. T cells as a therapeutic target in SLE. Lupus. 2015;24:351-63.（参考文献番号4.3-04）

5 [redacted]. EMA Scientific Advice sought on LN development programme; Final Advice Letter issued [redacted] 20[redacted].（参考文献番号4.3-37）

6 ICH Harmonised Tripartite Guideline. S7A: Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. Final guidance. 2001 Jun 21.（参考文献番号4.3-05）

7 ICH Harmonised Tripartite Guideline. S7B: The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals. 2005b May 12.（参考文献番号4.3-06）

8 ICH Harmonised Tripartite Guideline. M3(R2): Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. Final guidance. 2009 Jun 11.（参考文献番号4.3-07）

9 ICH Harmonised Tripartite Guideline. S4: Duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non rodent toxicity testing). Final guidance. 1998 Sep 2.（参考文献番号4.3-08）

10 ICH Harmonised Tripartite Guideline. S2(R1): Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. Final guidance. 2011 Nov 9.（参考文献番号4.3-10）

11 ICH Harmonised Tripartite Guideline. S1A: Guideline on the need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals. Final guidance. 1995 Nov 29.（参考文献番号4.3-11）

12 ICH Harmonised Tripartite Guideline. S1B: Testing for carcinogenicity of pharmaceuticals. Final guidance. 1997 Jul 16.（参考文献番号4.3-12）

13 ICH Harmonised Tripartite Guideline. S1C(R2): Dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals. Final guidance. 2008 Mar 11.（参考文献番号4.3-13）

14 ICH Harmonised Tripartite Guideline. S5(R2): Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility. Final guidance. 2000 Nov 9. Updated 2005a Nov.（参考文献番号4.3-14）

15 Food and Drug Administration [Internet]. Silver Spring (MD): Policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. 1992 May 1. Available from: http://www.fda.gov/drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122883.htm.（参考文献番号4.3-15）

16 EMA Investigation of chiral active substances. Final guidance. 1994 Apr. Report No.: Directive 75/318/EEC as amended.（参考文献番号4.3-16）

17 Health Canada. Therapeutic Products Programme Guidance For Industry: Stereochemical issues in chiral drug development. Final guidance. 2000.（参考文献番号4.3-17）

18 Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on photosafety testing. London, UK. CPMP/SWP/398/01. 2002 Jun.（参考文献番号4.3-18）

19 Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Photosafety Testing. Final guidance. Rockville (MD); 2003 May.（参考文献番号4.3-19）

20 ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q3A(R2): Impurities in new drug substances. Final guidance. 2006a Oct 25.（参考文献番号4.3-20）

21 Cunningham MA, Austin BA, Li Z, Liu B, Yeh S, Chan CC, et al. LX211 (voclosporin) suppresses experimental uveitis and inhibits human T cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50(1):249-55..（参考文献番号4.3-21）

22 Cruz OA, Fogg SG, Roper-Hall G. Pseudotumor cerebri associated with cyclosporine use. Am J Ophthalmol. 1996;122(3):436-7.（参考文献番号4.3-09）

23 Avery R, Jabs DA, Wingard JR, Vogelsang G, Saral R, Santos G. Optic disc edema after bone marrow transplantation. Possible role of cyclosporine toxicity. Ophthalmology. 1991;98(8):1294-301.（参考文献番号4.3-23）

24 Bernauer W, Gratwohl A, Keller A, Daicker B. Microvasculopathy in the ocular fundus after bone marrow transplantation. Ann Intern Med. 1991;115(12):925-30.（参考文献番号4.3-24）

25 O'Riordan JM, FitzSimon S, O'Connor M, McCann SR. Retinal microvascular changes following bone marrow transplantation: the role of cyclosporine. Bone Marrow Transplant. 1994;13(1):101-4.（参考文献番号4.3-25）

26 Ledeganck KJ, De Winter BY, Van den Driessche A, Jürgens A, Bosmans JL, Couttenye MM, et al. Magnesium loss in cyclosporine-treated patients is related to renal epidermal growth factor downregulation. Nephrol Dial Transplant. 2014;29(5):1097-102. Epub 2013 Dec 18.（参考文献番号4.3-26）

27 Ochiai T, Sakamoto K, Gunji Y, Hamaguchi K, Isegawa N, Suzuki T, et al. Effects of combination treatment with FK506 and cyclosporine on survival time and vascular changes in renal-allograft-recipient dogs. Transplantation. 1989;48(2):193-7.（参考文献番号4.3-27）

28 Ochiai T, Gunji Y, Nagata M, Komori A, Asano T, Isono K. Effects of rapamycin in experimental organ allografting. Transplantation. 1993;56(1):15-9.（参考文献番号4.3-28）

29 Collier DS, Calne R, Thiru S, Lim S, Pollard SG, Barron P, et al. Rapamycin in experimental renal allografts in dogs and pigs. Transplant Proc. 1990;22(4):1674-5.（参考文献番号4.3-29）

30 Vaden SL, Breitschwerdt EB, Armstrong PJ, Correa MT, Brown C, Polzin DJ, et al. The effects of cyclosporine versus standard care in dogs with naturally occurring glomerulonephritis. J Vet Intern Med. 1995;9(4):259-66.（参考文献番号4.3-30）

[31] Gaschen L, Schuurman HJ. Ultrasound detection on non-Hodgkin's lymphoma in three cynomolgus monkeys after renal transplantation and cyclosporine immunosuppression. J Med Primatol. 2001;30(2):88-93.（参考文献番号4.3-31）

[32] Schmidtko J, Wang R, Wu CL, Mauiyyedi S, Harris NL, Della Pelle P, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorder associated with an Epstein-Barr-related virus in cynomolgus monkeys. Transplantation. 2002;73(9):1431-9.（参考文献番号4.3-32）

[33] McInnes EF, Jarrett RF, Langford G, Atkinson C, Horsley J, Goddard MJ, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorder associated with primate gamma-herpesvirus in cynomolgus monkeys used in pig-to-primate renal xenotransplantation and primate renal allotransplantation. Transplantation. 2002;73(1):44-52.（参考文献番号4.3-33）

[34] Serkova NJ, Christians U, Benet LZ. Biochemical mechanisms of cyclosporine neurotoxicity. Mol Interv. 2004;4(2):97-107.（参考文献番号4.3-34）

[35] Schwartz RB, Bravo SM, Klufas RA, Hsu L, Barnes PD, Robson CD, et al. Cyclosporine neurotoxicity and its relationaship to hypertensive encephalopathy: CT and MR findings in 16 cases. AJR Am J Roentgenol. 1995;165(3):627-31.（参考文献番号4.3-35）

[36] Hinchey J, Chaves C, Appignani B, Breen J, Pao L, Wang A, et al. A reversible posterior leukoencephalopathy syndrome. N Engl J Med. 1996;334(8):494-500.（参考文献番号4.3-36）