目次

略語・略号一覧 2
2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.2 薬理試験 10
2.4.3 薬物動態試験 13
2.4.4 毒性試験 14
2.4.5 総括及び結論 22
2.4.6 参考文献 24

表 目次

表 2.4-1 薬理試験一覧 10
表 2.4-2 薬物動態試験一覧 13
表 2.4-3 毒性試験一覧 14
表 2.4-4 ガラダシマブの安全域（投与間隔で補正した及び補正しない AUC の比較） 21
表 2.4-5 ガラダシマブの安全域（投与間隔で補正しない Cmax の比較） 22

図 目次

図 2.4-1 FXII と凝固系、カリクレイン・キニン系、補体系及びサイトカイン産生系における 役割 5

略語・略号一覧

略語・略号	英語	日本語
3F7	Anti-FXIIa parental antibody	抗 FXIIa 親抗体
AAE-C1-INH	Acquired angioedema	後天性血管性浮腫
ACE		アンジオテンシン変換酵素
ADA	Anti-drug antibody	抗薬物抗体
AI	Autoinjector	オートインジェクター
aPTT	Activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC	Area under the plasma concentration time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-tlast}}$	AUC from time 0 to the last measurable concentration	0 時間から最終定量可能時間までの AUC
$AUC_{tlast\text{-Inf}}$	AUC from the last measurable concentration to infinity	最終定量可能時間から無限時間まで外挿した AUC
βFXIIa	Active catalytic fragment of FXII	FXII の活性触媒フラグメント
BK	Bradykinin	ブラジキニン
C1-INH	C1-esterase inhibitor	C1-インアクチベーター
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	Maximum concentration	最高血漿中濃度
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CLS312	Garadacimab; Factor XIIa inhibitor monoclonal antibody	ガラダシマブ：抗活性化第 XII 因子モノクローナル抗体
DXS	Dextran sulfate	デキストラン硫酸
ECMO	Extracorporeal membrane oxygenation	体外式膜型人工肺
Fab	Fragment antigen-binding	フラグメント抗原結合
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FIX	Coagulation Factor IX	血液凝固第 IX 因子
FXI	Coagulation Factor XI	血液凝固第 XI 因子
FXIa	Activated coagulation Factor XI	活性化血液凝固第 XI 因子
FXII	Coagulation Factor XII, (Hageman factor)	血液凝固第 XII 因子（ハーゲマン因子）
FXIIa	Activated coagulation Factor XII, (Hageman factor)	活性化第 XII 因子（ハーゲマン因子）
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
HAE	Hereditary angioedema	遺伝性血管性浮腫
HMWK	High molecular weight kininogen	高分子キニノーゲン
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals	医薬品規制調和国際会議

略語・略号	英語	日本語
	for Human Use	
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IV	Intravenous	静脈内
kDa	Kilodalton	キロダルトン
nC1-INH	Normal C1-esterase inhibitor	正常な C1-インアクチベーター
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NSD	Needle safety device	ニードルセーフティデバイス
PCA	Passive cutaneous anaphylaxis	受動皮膚アナフィラキシー
PD	Pharmacodynamic	薬力学
PFS	Prefilled syringe	プレフィルドシリンジ
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
PPND	Prenatal and postnatal developmental	出生前及び出生後の発生
PSA	Passive systemic anaphylaxis	受動全身性アナフィラキシー
SC	Subcutaneous	皮下
$t_{1/2}$	Terminal half-life	消失半減期
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス

表記規則

これまでの開発期間を通じて、CSL312（ガラダシマブ）は「FXIIa antagonist monoclonal antibody（抗第 XIIa 因子モノクローナル抗体）」と記載されており、過去の関連する記録及び連絡文書でこの用語が使用されている。ガラダシマブは遺伝子組換え完全ヒト型 IgG4/λ モノクローナル抗体であり、血漿タンパク質 FXIIa の触媒ドメインに結合し、その触媒活性を強力に阻害する。ガラダシマブは FXIIa の活性部位に結合することでそのプロテアーゼ活性を阻害するもの（inhibitor）であり、アゴニストの結合を阻害するもの（antagonist）ではない。したがって、ガラダシマブは antagonist より inhibitor と識別するほうが科学的に正確である。この用語の改訂は、製品の活性や作用機序の理解の変更ではない。本文書では、ガラダシマブの正確な記述として、「FXIIa inhibitor monoclonal antibody（抗活性化第 XII 因子モノクローナル抗体）」を使用する。

2.4 非臨床試験の概括評価

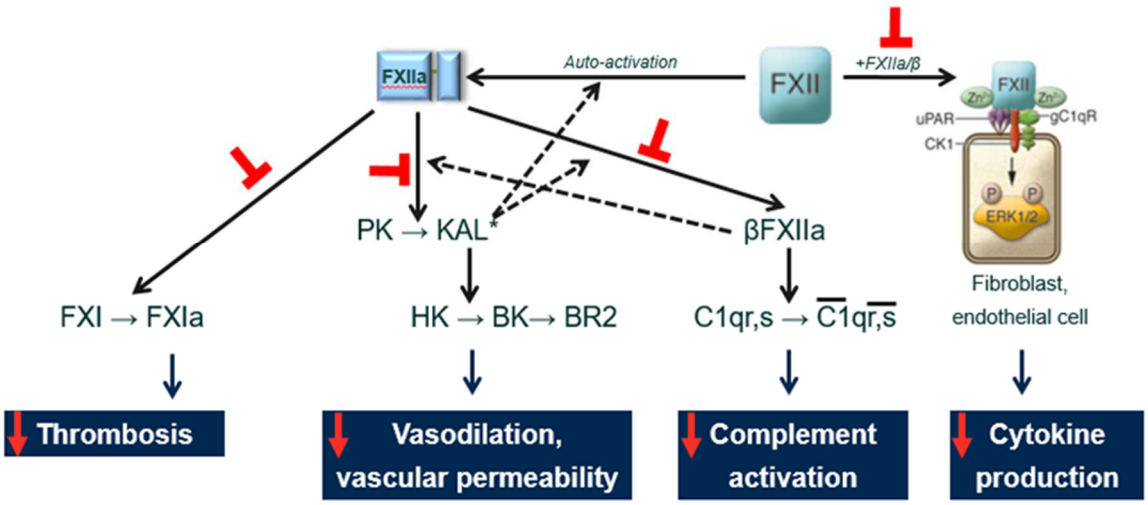
2.4.1 非臨床試験計画概略

背景

ヒトでは、血液凝固第 XII 因子（ハーゲマン因子、FXII）は肝臓で産生され、血漿中に分泌される。糖鎖付加された 80 キロダルトン（kDa）のザイモーゲンが濃度約 30 µg/mL、半減期 50～70 時間で循環している［Bjorkqvist et al, 2014］。

FXII は血漿接触系の主要なイニシエーターである［Renné et al, 2012］。接触系は、タンパク質の FXII、第 XI 因子（FXI）、血漿プレカリクレイン及び非酵素的補因子である高分子キニノーゲン（HMWK）を含むプロテアーゼカスケードである。負に帯電した面と接触すると、FXII は活性化 FXII（FXIIa）に変換される。FXIIa は FXI の活性化を通じてフィブリン形成を誘発し、カリクレインーキニン系（KK）経路を通じて炎症性メディエーターのブラジキニン（BK）の産生をもたらす。FXIIa がさらに切断されると、触媒ドメインを含む 30 kDa の軽鎖（βFXIIa）が遊離し、古典的な補体経路を活性化することができる。このように、活性化型の FXII は、炎症及び凝固促進作用を有する（図 2.4-1）。

図 2.4-1 FXII と凝固系、カリクレイン・キニン系、補体系及びサイトカイン産生系における役割



a 略語：BK = ブラジキニン、BR2 = ブラジキニン B2 受容体、C1qr,s = サブコンポーネント C1q、C1r、C1s からなる補体成分 C1、CK1 = サイトケラチン 1、ERK1/2 = 細胞外シグナル制御キナーゼ 1/2、HK = 高分子キニノーゲン、KAL = カリクレイン、PAR = ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子受容体

凝固系でのフィブリン形成は、傷ついた血管壁に露出した組織因子（外因性因子）又は血液由来因子（内因性因子）によって開始される 2 つの異なる経路によって活性化される［Colman, 2006］。内因性経路によるフィブリン形成は、FXIIa によって開始され、FXIIa は FXI を切断して活性化 FXI（FXIa）とし、この FXIa が血液凝固第 IX 因子（FIX）を活性化することで機能す

る。この経路は安定した血栓の形成を裏付けると考えられているが、損傷部位の「正常な」止血の際のフィブリン形成には重要な機能を有していないように思われる。これは、FXII の先天性欠損の患者が、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）が延長しているにもかかわらず、出血の表現型を示さないという観察に基づくものである［Lammle et al, 1991；Ratnoff and Colopy, 1955］（注：aPTT は、FXII による凝固の内因性経路を評価する in vitro 検査である。したがって、FXII 欠損種及び FXIIa 阻害剤で治療された種は、aPTT の延長を示す）。これらの患者はまた、重大な出血のリスクなしに外科的処置を受けることができる［Girolami et al, 2004；Lammle et al, 1991］。FXII ノックアウトマウス及びラットのデータから、これらの動物は FXII 欠損にもかかわらず正常な止血を維持することが確認されている［Cai et al, 2015；Renné et al, 2005］。FXIIa は血栓の安定化を裏付ける一方で、状況によっては線溶の開始にも関与することが示されている［Konings et al, 2015］。現在、FXII は病的な血栓形成に決定的に関与しているのではないかという仮説が提唱されている。FXII ノックアウトマウス及びラットは、実験モデルの動脈血栓症、虚血性脳卒中及び深部静脈血栓症から保護される［Cai et al, 2015；Kleinschnitz et al, 2006；Renné et al, 2005］。FXIIa 阻害薬は、止血を妨げることなく、動物モデルで抗血栓薬として使用されたこともある［May et al, 2016；Hagedorn et al, 2010］。重要なことは、ガラダシマブ（garadacimab）の親抗体である抗 FXIIa 抗体（3F7）が、ウサギ体外式膜型人工肺（ECMO）モデルの体外循環回路内でのフィブリン沈着及び血栓症を阻止し、この場合も治療動物の止血能力を損なわなかったことである［Larsson et al, 2014］。要約すると、FXIIa によるフィブリン形成は、病的な血栓形成及び進展に重要であるが、止血中のフィブリン形成には重要な役割を果たしていないと考えられた。

FXII の活性化（FXIIa への活性化）は、KK 経路を介した BK 産生にもつながる。この経路では、プレカリクレインが FXIIa によってカリクレインに変換される。カリクレインは多くの役割を担っている。第一に、正のフィードバック機構によってザイモーゲン FXII を活性化し、カスケードを増幅させる。第二に、カリクレインは HMWK を切断して、強力な炎症性メディエーターである BK を放出する。BK がブラジキニン B2 受容体に結合すると、血管の拡張、好中球の走化性誘導、血管の透過性上昇及び体液の漏出を亢進する様々な細胞内シグナル伝達経路が活性化される［Bjorkqvist et al, 2013］。BK 産生は、急性遺伝性血管性浮腫（HAE）発作の際に増加し、HAE における腫脹のメディエーターと考えられている［Nussberger et al, 1998；Nussberger et al, 1999］。FXIIa がさらに切断されると、活性化 β 凝固第 XII 因子（βFXIIa）を含む軽鎖を放出し、古典的な補体経路を活性化できる。カリクレイン・キニン系（KKS）及び補体活性化とは無関係に、FXII はヒト線維芽細胞及びヒト精密切断肺スライスにおいて IL 8、IL 1β、IL 6 を含む炎症性メディエーターの発現を誘導する［Hess et al, 2017］。ガラダシマブは、in vivo モデルにおける浮腫を効果的に減少させ、正常及びカリクレイン欠損血漿サンプルの接触活性化後の BK 産生を阻害した［Cao et al, 2018］。

HAE は、全身の皮下組織の腫脹及び上気道や消化管の粘膜下浮腫の再発性かつ予測不可能な症状の発現を特徴とする常染色体顕性の疾患である［Bork et al, 2016］。HAE は 3 つの病型

［Rosen et al, 1965；Bork et al, 2000］に分類され、補体成分 1（C1）インアクチベーター（C1-INH）の欠乏又は機能不全を伴う I 型及び II 型、並びに以前は III 型として知られていた C1-INH に異常を認めない型（nC1-INH HAE）に分類されている。C1-INH は、補体、接触相、線維素溶解及び凝固経路の 4 つの凝固酵素カスケードを制御する、広範な主要セリンプロテアーゼインヒビターである。C1-INH は、FXIIa 及びカリクレインを不活性化し、KK 系（接触経路）の主要な阻害薬である。臨床的には、症状のある患者における HAE 発作は、痛みを伴い、生命を脅かす可能性がある全身の皮下組織の腫脹及び上気道や消化管の粘膜下浮腫として発現する。これらの発作は、予測できない頻度、強度及び持続時間で繰り返される。発作が散発的な患者は、発作のない期間でも次の発作を恐れている。

現在承認されている HAE の急性期及び予防的投与は、KK 経路の異なるタンパク質を標的として BK 産生を阻害することに基づいている。FXIIa の血漿中レベルは、HAE 発作の急性期の患者において、寛解期と比較して上昇することが示されている［Csuka et al, 2015；Cugno et al, 1996］。血漿接触系の開始における FXIIa の重要性を考慮すると、FXIIa は、KK 経路の阻害及び HAE 発作時に検出される BK の過剰産生に対する新規ターゲットである。

ガラダシマブは、FXIIa の触媒ドメインに特異的に結合し、その触媒活性を強力に阻害する完全ヒト型遺伝子組み換え IgG4 モノクローナル抗体である（FXIIa-INH mAb 薬理分類）。ガラダシマブによる FXIIa の阻害は、KK 経路及び BK の過剰産生を抑制することで、HAE 発作を予防することができ、HAE に伴う腫脹を防ぐことができる。

ガラダシマブは、[redacted]に対するスクリーニングの結果、[redacted]から単離された親和性成熟変異体である親抗体 3F7 である。ガラダシマブは、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で発現し、2 本の重鎖と 2 本の軽鎖がジスルフィド結合で架橋された IgG4 モノクローナル抗体の典型的な構造をしている。ガラダシマブの分子量は約 148 kDa である。

ガラダシマブは、医療従事者、介護者、又は患者による自己投与に適したニードルセーフティデバイス（NSD）付きプレフィルドシリンジ（PFS）又はオートインジェクター（AI）付き PFS に入った滅菌済み溶液として提供される（本承認申請ではオートインジェクター付き PFS に入った滅菌済み溶液のみを承認申請する）。

ガラダシマブは、12 歳以上の患者における HAE 発作の長期予防に適応される。臨床試験に関する情報は、モジュール 2.7.3 項「臨床的有効性」及びモジュール 2.7.4 項「臨床的安全性」を参照のこと。

非臨床試験の要約

ガラダシマブの臨床開発のための非臨床試験は、医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに概説された国際基準に従い、薬理学的に適切な動物種を用いて効力を裏付ける試験、薬物動態試験（PK）及び毒性試験を実施した。毒性試験には、臨床用製剤と同等の品質を有すると考えられる被験物質を使用した。動物を用いた一部の薬理試験では、3F7 と呼ばれるガラダシマブの親抗体及び他の市販の製剤を比較対照として使用した。

マウス、ウサギ及びカニクイザルは、非臨床試験で一般的に使用される動物種であり、ガラダシマブはこれらの動物種において薬理作用を有することから、毒性評価に適切な動物種として選択した。ガラダシマブはヒト、カニクイザル、ウサギ及びマウス血漿中の FXIIa 活性を阻害したが、ラット血漿中では FXIIa 阻害は認められなかった。従って、ラットは薬理学的に適切な動物種とは考えられなかったことから、ラットを用いた in vivo 毒性試験は実施しなかった。ICH S6（R1）ガイドラインによれば、胚・胎児発生試験には、臨床開発候補化合物がげっ歯類及びウサギにおいて薬理学的な活性を示す場合、両動物種を使用する必要がある。しかし、マウスにおいても FXIIa の結合が認められたが、マウスは反復投与後に異種ヒト蛋白質に対する免疫反応（すなわちアナフィラキシー）を発現することが示されたため、マウスの胎児器官形成期にガラダシマブを反復投与することによって得られた結果は免疫学的応答の影響を受ける可能性があることから、ヒトでの安全性を予測するものにはならないと考えられた。また、3Rs（代替法の利用／使用動物数の削減／苦痛の軽減）の原理を考慮しても、マウスからは意義のある安全性情報を得ることができず、薬理学的に適切な代替種が存在する場合、ヒト以外の霊長類を使用することは倫理的ではないと考えられた。このため、ガラダシマブの生殖発生毒性試験は薬理学的に関連性のある唯一の動物種であるウサギを用いて実施した。

安全性薬理試験及び毒性試験は「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）」に従って実施した（マウスを用いた反復投与忍容性試験及びウサギを用いた胚・胎児発生予備試験については GLP 非適用下で実施）。安全性薬理や局所刺激性の評価は、ICH S6（R1）ガイドラインに従い、可能な限り GLP 適用の反復投与毒性試験に組み込んで実施した。

ヒト血漿中タンパク質がヒトに腫瘍原性／がん原性又は遺伝毒性を誘発するとは考えられないため、ガラダシマブのがん原性試験及び遺伝毒性試験は実施していない。しかし、証拠の重み付け（weight-of evidence）アプローチに基づき、詳細な発がんリスク評価（試験番号 REP-008854）を実施した結果、ガラダシマブを患者に投与しても、潜在的発がんリスクはないと結論した。また、現行のガラダシマブ製剤中における添加剤についても、ヒトでの潜在的発がんリスク評価を実施したが、ヒトにおける発がんリスクが懸念されるものはなかった（試験番号 ST2020CSL-001）。

ガラダシマブを用いた生態毒性及び環境影響評価の試験は実施していない。

抗体、すなわちタンパク質は、化学的、物理的、生物学的な分解を速やかに受ける可能性が高いため、環境中では安定性や生物学的活性は維持されないと考えられている。

ガラダシマブを用いたすべての非臨床試験の概要を表 2.4-1、表 2.4-2 及び表 2.4-3 に示す。

薬理試験

一連の薬理試験は、ガラダシマブとザイモーゲン FXII 又はその活性体型との物理化学的相互作用、並びに FXIIa を介する in vitro 及び in vivo での生物学的作用に対する特異的な阻害作用について、適切な動物種を用いて特徴付けるように構成されている。ガラダシマブは、親抗体 3F7

（ヒト [redacted] に対して特異的）の親和性成熟から生じたものであるため、3F7 についても特に 3F7 が強力な FXIIa 阻害を示すマウスの動物モデルを用いた。

非臨床薬理試験では、次のような点を検討した。

- ヒト、マウス、ウサギ及びカニクイザルのザイモーゲン FXII 及び活性化 FXII（βFXIIa 及び FXIIa）に対する結合親和性を明らかにするために、in vitro 試験を実施した。また、活性化 FXII の結合エピトープを明らかにするため、変異導入試験を実施した。ガラダシマブの特異性は、他のヒト血漿セリンプロテアーゼのパネルに対する阻害作用のスクリーニングにより評価した。
- In vitro 試験では、精製 FXIIa 及び正常ヒトドナー、HAE（I/II 型）、nC1-INH-HAE 及び後天性血管性浮腫（AAE-C1-INH）患者由来の接触経路が活性化された血漿を用いて、ガラダシマブの阻害作用を特徴付ける試験を実施した。デキストラン硫酸（DXS）を介した FXII 活性化に伴う正常ヒト血漿中の血管作動性ペプチドである BK の産生に対するガラダシマブの阻害作用を検討するために、質量分析に基づく新しい方法を開発した。
- 3F7 及びガラダシマブの in vivo での有効性を、BK を介したマウス浮腫モデルを用いて検討した。これらのモデルには、活性化肥満細胞を介した受動的全身性及び皮膚アナフィラキシーモデル及び C1-INH 欠損マウスにおけるアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬誘発性浮腫を含む。
- カニクイザルを用いたガラダシマブの単回投与による非臨床 PK/薬力学（PD）試験を 2 試験実施した。
- 毒性試験における動物種の選択を裏付けるため、カニクイザル、ウサギ、ラット、マウス及びヒトの血漿を用いた DXS による活性化を行い、ガラダシマブの阻害作用を評価した。
- マウスを用いた呼吸系安全性薬理試験を実施した。また、CNS 及び心血管系への作用の評価及び呼吸系への追加的な検討は、マウス及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験で実施した。
- ガラダシマブ及び 3F7 の抗血栓作用（及び出血リスクを高める可能性）を評価するため、適切なマウス及びウサギの血栓症モデル及び出血モデルを用いた。

薬物動態試験

以下の 3 試験は非臨床 PK プログラムの一部であった：

- カニクイザルを用いたガラダシマブの単回静脈内及び皮下投与 PK 試験（2 試験）
- ウサギを用いた 2 種類のガラダシマブ製剤（100 及び 170 mg/mL）の単回皮下投与 PK 試験

ガラダシマブの生物学的分析法は、ICH 及び FDA のガイドライン［FDA Guidance for Industry, 2015; ICH Q2 (R1), 2005］に基づく要件に従ってバリデートされた（注：1 つの非 GLP 試験では、ガラダシマブの血漿中濃度の測定に適格性が確認された測定法を使用した）。

毒性試験

以下の試験を非臨床毒性試験プログラムとして実施した。

- マウス及びカニクイザルを用いた GLP 適用の重要な反復投与毒性試験を 5 試験実施した。これらの試験では、静脈内及び皮下投与後のトキシコキネティック（TK）及び抗

薬物抗体（ADA）評価も実施した。その他に、マウスを用いた GLP 非適用の反復投与忍容性試験を 1 試験実施した。

- 生殖発生毒性を評価するために、ウサギを用いた受胎能及び初期胚発生試験を 2 試験及びウサギを用いた胚・胎児発生試験を 2 試験実施した。また、マウス及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、雌雄生殖器の肉眼的及び病理組織学的検査を実施した。
- ウサギを用いた出生前及び出生後の発生試験を実施し、妊娠及び授乳中の雌に対するガラダシマブの影響を評価するとともに、出生児について、成熟、生殖機能及び神経行動学的発達を評価した。
- ガラダシマブの 2 製剤（100 及び 170 mg/mL）をウサギに皮下投与した局所刺激性試験を実施した。さらに、マウス及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験においても、局所刺激性を評価した。
- ヒトとカニクイザルの組織における交差反応性（抗体結合能）を評価するため、組織交差反応性試験を実施した。

2.4.2 薬理試験

実施した薬理試験の概要を表 2.4-1 に示す。

表 2.4-1 薬理試験一覧

Study type	Study No	Batch No	Product used	GLP-status
Primary Pharmacodynamics – in vitro				
Binding affinity of garadacimab and 3F7 to FXII and βFXIIa (human, cynomolgus monkey, rabbit, mouse)	REP-21280	Research material	garadacimab and 3F7	No
Epitope Mapping of 3F7	REP-21279	Research material	3F7	No
Inhibition of FXII activity with garadacimab in non-human species	REP-21282	Research material	garadacimab	No
Garadacimab binding and efficacy in non-human species (monkey, rat)	REP-009151	Research material	garadacimab	No
Specificity of garadacimab for human FXII	INV_11-01_BN	Research material	garadacimab and 3F7	No
In vitro FXIIa amidolytic activity and aPTT assays	REP-21290	Research material	garadacimab	No
Garadacimab inhibition of FXIIa chromogenic activity in activated plasma from normal human donors and patients with HAE Types I/II/III, and AAE-C1INH	REP-21283	Research material	garadacimab	No
Garadacimab inhibition of bradykinin generation in human plasma following contact activation	REP-21245	Research material	garadacimab	No

Study type	Study No	Batch No	Product used	GLP-status
Selection of species for toxicological studies	REP-21280 (Binding affinities) REP-21282 (FXIIa assays) REP-009151 (FXIIa assays) REP-21245 (Bradykinin assays)	Research material	garadacimab	No
Primary Pharmacodynamics – in vivo				
Inhibition of mast cell heparin-induced edema in passive systemic anaphylaxis (PSA) and passive cutaneous anaphylaxis (PCA) mouse models	REP-21269 (PSA model) REP-21268 (PCA model)	Research material	garadacimab and 3F7	No
Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor-induced edema in C1-INH deficient mice	REP-21267	Research material	garadacimab and 3F7	No
Secondary Pharmacodynamics – in vitro				
-	-	-	-	-
Secondary Pharmacodynamics – in vivo				
3F7 Inhibits experimental thrombosis in mice and rabbits without increased bleeding risk	Larsson et al, 2014	Research material	3F7	No
Effect of garadacimab in a simultaneous thrombosis model in rabbits	REP-001415	Research material	garadacimab	No
Effect of garadacimab in an arterial thrombosis model in mice	REP-001383	Research material	garadacimab	No
Effect of garadacimab on hemostasis in a murine tail tip bleeding model	REP-001412	Research material	garadacimab	No
Safety Pharmacology				
Safety pharmacology, mouse	APQ0059	[redacted]	garadacimab	Yes
Repeat-dose toxicity including safety pharmacology, mouse (4-weeks)	APQ0061	[redacted]	garadacimab	Yes
Repeat-dose toxicity including safety pharmacology, monkey (5-weeks)	APQ0058	[redacted]	garadacimab	Yes
Repeat-dose toxicity including safety pharmacology, monkey (26-weeks)	TH43GT	[redacted]	garadacimab	Yes

ガラダシマブは、活性化したヒト FXII に対して顕著な効力及び特異性を示す（試験番号 REP-21280、REP-21279、INV_11-01_BN）。ガラダシマブは活性化型の FXII（FXIIa 及び βFXIIa）のセリンプロテアーゼドメインに高い親和性（0.14 nM）で結合し、ザイモーゲン FXII には低い親和性（55 nM）で結合する。この活性化型の FXII への優先的な結合は、カニクイザル及びマウスの FXII を用いた場合にも観察される。

ガラダシマブの阻害作用を検討した in vitro 試験は、正常ヒトドナー、HAE（I/II/III 型）患者及び AAE-C1-INH 患者の接触相が活性化された血漿を用いて実施した（試験番号 REP-21283）。ガラダシマブは XII に対するガラダシマブのほぼ等モルレベルで、FXIIa の発色活性及び BK 産生を阻害した。ヒト血漿プールを用いた場合、ガラダシマブは、HAE の治療薬として現在使用されているエカランチド（カリクレイン阻害薬）よりも有意に強い BK 産生阻害作用を示した。

また、ガラダシマブは、カニクイザル、ウサギ及びマウスを含む多くの動物種の接触相が活性化された血漿において、FXIIa 活性を阻害した（in vitro 発色性合成基質法）（試験番号 REP-21282、REP-21280、REP-21245）。ヒト及びマウス血漿では，FXIIa 発色活性の最大阻害に同程度のガラダシマブが必要であったが，ウサギ血漿では，最大阻害に約 10 倍低いガラダシマブ濃度が必要であった。カニクイザルでは、ガラダシマブはヒト血漿と比較して FXIIa 発色活性及び BK 産生阻害作用が約 2 倍弱かった。ラット血漿では、FXIIa の阻害は観察されなかった（試験番号 REP-009151）。また、マウス及びカニクイザルにおけるガラダシマブの薬理作用は、aPTT 法を用いて確認した（試験番号 REP-21290）。

マウス in vivo 受動的全身及び皮膚アナフィラキシーモデルにおいて、親抗体 3F7 及びガラダシマブにより FXIIa を阻害すると、BK を介する浮腫が効果的に抑制された（試験番号 REP-21269、REP-21268）。3F7 及びガラダシマブはともに、0.5 mg/kg 以上の用量で C1-INH 欠損マウスの ACE 阻害薬による浮腫を消失させることができた（試験番号 REP-21267）。

作用機序に起因する別の有益な作用として、ガラダシマブ及び 3F7 による FXIIa 阻害は、出血リスクを増加させることなく、マウス及びウサギの実験的血栓症を強く抑制した。同じウサギで同時に誘発した血栓症モデルにおいて、ガラダシマブを 10 mg/kg 静脈内投与したウサギは、$FeCl_3$ による大腿動脈血栓症から完全に防御されたが、うっ血性の静脈血栓症は変化しなかった。さらに、このモデルでは、ガラダシマブ投与による腎出血パラメータへの影響は認められなかった（試験番号 REP-001415、REP-001383、Larsson et al, 2014）。

ガラダシマブは、マウスの頸動脈における $FeCl_3$ 誘発動脈血栓症モデルにおいて、強い抗血栓作用を示した（試験番号 REP-001412）。マウスへガラダシマブの 2.5 mg/kg を静脈内投与すると、動脈閉塞の発生が完全に抑制された。また、マウス尾端出血モデルにおいてガラダシマブを投与（2.5 mg/kg 又は 25 mg/kg IV 投与）しても、出血リスクの上昇はみられなかった。同様に、親抗体である 3F7 は、マウス $FeCl_3$ 誘発頸動脈血栓症モデルにおいて、5 mg/kg 以上の静脈内投与で血管閉塞を完全に阻害した。3F7（7 mg/kg の IV）は、出血を増加させることなく、ウサギ動静脈シャント及びウサギ ECMO モデルにおいて閉塞性血栓形成を抑制した［Larsson et al,

2014]。薬理学的に妥当な IV 用量（マウスは 5 mg/kg、ウサギは 7 mg/kg）で、3F7 は出血リスクを増加させずに血栓形成を阻害した。

マウスを用いた安全性薬理試験において、呼吸系パラメータ（呼吸数、1 回換気量及び分時換気量）に対するガラダシマブ投与に関連した有害作用は認められなかった（試験番号 APQ0059）。無毒性量（NOAEL）は、IV 投与では 100 mg/kg 以上、SC 投与では 200 mg/kg 以上（それぞれ試験した最大用量）であることが確認された。

また、カニクイザルを用いた 5 週間及び 26 週間の反復投与毒性試験（試験番号 APQ0058、TH43GT）で評価した心臓の電気生理、血圧、心拍数及び呼吸系の測定値、並びにマウスを用いた 4 週間の反復投与毒性試験（試験番号 APQ0061）で評価した神経機能には、ガラダシマブ投与の影響はないと考えられた。

以上のことから、ガラダシマブの非臨床試験であるヒト／動物血漿中における in vitro 試験及び薬理学的に適切な動物種における in vivo 試験において、ガラダシマブの薬理作用が示された。さらに、ガラダシマブは、良好で優れた安全性薬理プロファイルを示した。

2.4.3 薬物動態試験

実施した薬物動態試験の概要を表 2.4-2 に示す。

表 2.4-2 薬物動態試験一覧

Study Type	Study No	Batch No	Product used	GLP Status
Pharmacokinetics/ PD, cynomolgus monkey	REP-21281 / HDE0006-00	Research material	garadacimab	No
Pharmacokinetics, cynomolgus monkey	APQ0062	[redacted]	garadacimab	No
Pharmacokinetics, rabbits	37761	[redacted] (100 mg/mL) [redacted] (170 mg/mL)	garadacimab	Yes

カニクイザルにガラダシマブを単回静脈内投与した PK/PD 試験（試験番号 REP-21281 / HDE0006-00）において、ガラダシマブの PK は典型的なモノクローナル抗体の挙動を示し、二相性の消失曲線を示した。また、$t_{1/2}$ の平均値は 9.7 日であり、いずれのパラメータも用量範囲（3、9 及び 27 mg/kg）で著しい非線形性を示さなかった。さらに、投与に関連した PD 効果（すなわち、aPTT の延長及び FXIIa 活性の阻害）が認められ、ガラダシマブの薬理活性が確認された。観察された一般状態又は血液学的変化のいずれも、ガラダシマブ投与に関連するものとは考えられなかった。

次の試験（試験番号 APQ0062）では、カニクイザルに単回静脈内投与（0.5、1 及び 3 mg/kg）及び皮下投与（6 及び 20 mg/kg）したときのガラダシマブの PK プロファイルを評価した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-tlast}}$ は静脈内及び皮下投与の両方でガラダシマブの用量の増加に伴って増加した。

個々の $t_{1/2}$ は、静脈内投与では 6.1～24.2 日、皮下投与では 8.6～17.7 日であった。バイオアベイラビリティは約 66%（投与量：6 mg/kg、皮下投与）と算出された。また、本試験では、投与に関連した PD 効果（すなわち、aPTT の延長及び FXIIa 活性の阻害）が認められ、ガラダシマブの薬理活性が確認された。投与後の有害作用はみられなかった。

また、ウサギを用いた単回投与 PK 試験（試験番号 37761）において、ガラダシマブの 2 製剤（100 及び 170 mg/mL）を 20 mg/kg の用量で単回皮下投与したときの PK 特性を評価した。ガラダシマブの C_{max} は、投与後 24 又は 48 時間に認められた。両製剤の C_{max} 及び AUC は同様であった。ガラダシマブの平均 $t_{1/2}$ は両製剤で同程度であった。いずれの PK パラメータについても有意な性差は認められなかった。2 製剤間の PK におけるわずかな差をさらに評価し、通常の変動の範囲内であると判断した。

以上をまとめると、上記の PK 試験では、カニクイザルにおけるガラダシマブの適切な PK/PD プロファイルとウサギにおけるガラダシマブの適切な PK プロファイルが示された。

注：さらなる PK 評価を、マウス及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験、ウサギを用いた雌雄受胎能及び初期胚発生に関する試験、胚・胎児発生に関する試験並びに出生前及び出生後の発生に関する試験の一環として実施した。

2.4.4 毒性試験

実施した毒性試験の概要を表 2.4-3 に示す。

表 2.4-3 毒性試験一覧

Study Type	Study No.	Batch No.	Product used	GLP Status
Repeat-dose toxicity, mouse	TOM 16-02	[redacted]	garadacimab	No
Repeat-dose toxicity, mouse	APQ0056	[redacted]	garadacimab	Yes
Repeat-dose toxicity, mouse	APQ0061	[redacted]	garadacimab	Yes
Repeat-dose toxicity, monkey	APQ0055	[redacted]	garadacimab	Yes
Repeat-dose toxicity, monkey	APQ0058	[redacted]	garadacimab	Yes
Repeat-dose toxicity, monkey	TH43GT	[redacted]	garadacimab	Yes
Female fertility & implantation development, rabbit	8408860	[redacted]	garadacimab	Yes
Male fertility & implantation development, rabbit	8399537	[redacted]	garadacimab	Yes
Embryo-fetal development, rabbit	MN80HQ	[redacted]	garadacimab	No
Embryo-fetal development, rabbit	VK47BJ	[redacted]	garadacimab	Yes
Prenatal and postnatal developmental toxicity, rabbit	8410864	[redacted]	garadacimab	Yes
Local tolerance, rabbit	37761	[redacted] (100 mg/mL) [redacted] (170 mg/mL)	garadacimab	Yes
Tissue Cross reactivity, human and monkey	APQ0057	[redacted]	garadacimab	Yes

重要な試験であるマウスを用いた反復投与毒性試験（試験番号 APQ0056、APQ0061）及びサルを用いた反復投与毒性試験（試験番号 APQ0055、APQ0058、TH43GT）、ウサギを用いた生殖発生毒性試験（試験番号 8408860、8399537、VK47BJ、8410864）及びウサギを用いた局所刺激性試験（試験番号 37761）を GLP 適用下で実施した。

なお、マウスを用いた反復投与忍容性試験（試験番号 TOM 16-02）及びウサギを用いた胚・胎児発生予備試験（試験番号 MN80HQ）は予備的な GLP 非適用の試験であり、GLP を完全には遵守していないが、これらの試験は、科学的妥当性を担保しており、GLP 適用試験における試験方法やデータ解釈に有用な情報を提供するものと考えられる。

非臨床試験に使用する動物種としては、入手可能な in vitro 及び非臨床 in vivo PD データに基づき、適切な動物種としてげっ歯類及び非げっ歯類として、マウス、ウサギ及びカニクイザルを選択した。ガラダシマブは、ヒト、カニクイザル、ウサギ及びマウス血漿中の FXIIa 活性を阻害したが、ラット血漿中の FXIIa 活性は阻害しなかった。したがって、ラットは薬理学的に適切な動物種ではなく、ラットを用いた in vivo 毒性試験は実施しなかった（詳細は 2.6.2.2.11 参照）。生殖発生毒性の評価は、薬理学的に適切な動物種でのみ実施すべきであるため、受胎能試験、胚・胎児発生試験、並びに出生前及び出生後の発生試験は非げっ歯類、すなわち、ウサギを用いて評価した。マウスは反復投与後に異種ヒトタンパク質に対する免疫反応（すなわち、アナフィラキシー）を発現したため、マウスを用いた試験からは意義のある安全性情報を得ることができない。また、薬理学的に適切な代替種が存在する場合、ヒト以外の霊長類を使用することは倫理的ではない（詳細は 2.6.6.6 参照）。

In vivo 毒性試験では、静脈内及び皮下の両投与経路により評価した（ウサギを用いた受胎能試験及び胚・胎児発生試験、並びに GLP 非適用下のマウスを用いた忍容性試験については、静脈内投与経路のみで評価した）。In vivo 毒性試験における静脈内投与での 10 mg/kg の用量は静脈内投与での予定最大臨床用量に相当する。中用量群（30 mg/kg）と高用量群（100 mg/kg）には、静脈内投与での予定最大臨床用量の 3 倍及び 10 倍を投与した。薬理学的に適切な用量を追加するため、8 日間及び 4～5 週間試験では 3 mg/kg の静脈内投与群も設定した。In vivo 毒性試験における皮下投与での 60 mg/kg 及び 200 mg/kg の用量は、皮下投与での予定臨床最大用量（20 mg/kg）のそれぞれ 3 倍及び 10 倍に相当する。

毒性試験に使用したガラダシマブは、多岐にわたる分析により治験用製剤と同等性／同質性を有していると考えられる。

マウス及びカニクイザルを用いた 8 日間反復静脈内及び皮下投与試験において、良好な忍容性が確認され、ガラダシマブ投与に関連した毒性所見はみられず（試験番号 APQ0056、APQ0055）、薬理作用に基づく用量依存的な aPTT の延長が確認された。両種の NOAEL は試験の最高用量、すなわち、静脈内で 100 mg/kg/回、皮下で 200 mg/kg/回と判断した。

マウスを用いた 4 週間反復静脈内及び皮下投与試験において、薬理作用に基づく aPTT の延長が確認された（試験番号 APQ0061）。静脈内投与試験において、低用量の 3 mg/kg/回ではガラダシマブ投与に関連した一般状態の変化又は死亡がみられたため、投与 12～18 日の間に剖検し

た。また、10 mg/kg/回群の 4 例及び 30 mg/kg/回群の 1 例では、投与 18、22 又は 29 日の投与後に同様の一般状態の変化又は死亡がみられたため、本マウス反復投与試験中に死亡機序解明のための追加検討を実施した。さらに、GLP 非適用のマウスを用いた忍容性試験を実施した（試験番号 TOM 16-02）。得られたすべての情報を要約すると、マウスで観察された所見は、以下の理由から、異種ヒトタンパク質に対する免疫反応（すなわち、アナフィラキシー）と考えられた:

1. 反復投与後にのみ発現した。
2. 主に静脈内投与の最低用量群で発現した。
3. 急性症状及びその経時変化はアナフィラキシー反応を示す所見であった。
4. ADA が検出されたことから、ガラダシマブがマウスにおいて免疫原性を有することが確認された。
5. GLP 非適用のマウスを用いた忍容性試験（試験番号 TOM 16-02）では、ガラダシマブの反復投与によるアナフィラキシー（体温低下を含む）が確認されたが、ヒトアイソタイプコントロール抗体を投与した対照群でもアナフィラキシーが認められたことから、これは標的臓器に対する毒性によるものではなく、ヒト抗体の投与に関連するものであった。

異種タンパク質の反復投与後には主に免疫反応が予想されるため、これらのデータは臨床状況を予測するものではないと考えられた。これは ICH S6（R）ガイドラインの記載と一致したものである。マウスを用いた反復投与毒性試験における各用量段階（静脈内投与では 3、10、30 及び 100 mg/kg/回、皮下投与では 60 及び 200 mg/kg/回）では、ガラダシマブの免疫原性に関連した一般状態及び死亡以外に毒性学的意義のある所見は認められなかった。本試験の条件下では、低用量の静脈内投与群（3 mg/kg/日）の試験中断により、静脈内投与後の NOAEL は特定できなかったが、皮下投与での NOAEL は 200 mg/kg/回と判断した。

カニクイザルを用いた 5 週間反復静脈内及び皮下投与試験において、忍容性は良好であり、ガラダシマブ投与に関連した毒性を示唆する所見は認められなかった（試験番号 APQ0058）。薬理作用に基づく用量依存的な aPTT の延長が確認された。本試験条件下において、NOAEL は最高用量、すなわち静脈内投与では 100 mg/kg/回、皮下投与では 200 mg/kg/回と判断した。

カニクイザルを用いた 26 週間反復静脈内及び皮下投与試験において、薬理作用に基づく aPTT の延長が確認された（試験番号 TH43GT）。主試験群の 2 例は動物福祉の観点から安楽殺した。これら 2 例の一般状態及び検査結果は、ガラダシマブ投与に関連する ADA 反応と一致していた（この結論は、外部査読者によりさらに確認されている。詳細については［Haley, 2018］を参照）。その他の投与動物における病理組織学的変化は、投与部位に限局した局所炎症性反応及びリンパ球の集簇であり、これらはガラダシマブの軽度の局所刺激作用を示すものと考えられた。これら局所刺激作用を示す所見はすべて、8 週間の休薬期間後に少なくとも部分的な回復を示した。したがって、本試験条件下において、カニクイザルに静脈内又は皮下投与によりガラダシマブを毎週 1 回、計 27 回反復投与した時の NOAEL は、静脈内投与では 30 mg/kg/回、皮下

投与では 60 mg/kg/回と判断した。ガラダシマブを毎週 1 回、計 14 回反復投与した後の中間解析での NOAEL は、静脈内投与では 100 mg/kg/回、皮下投与では 200 mg/kg/回と判断した。

雌ウサギを用いて実施した受胎能及び初期胚発生に関する試験（試験番号 8408860）では、母動物に対する毒性は認められなかった。体重、摂餌量、肉眼的病理検査、臓器重量、交尾率、繁殖率［(妊娠動物数／交尾雌動物数）×100］及び受胎率 ［(妊娠動物数／交配雌動物数）×100］に対する影響は認められず、母動物の生殖パラメータや胚の生存率にも影響はなかった。ガラダシマブの 10～100 mg/kg/回を静脈内投与した際の C_{max} 及び AUC_{0-72} は投与量の増加に伴って上昇した。C_{max} 及び AUC_{0-72} の上昇は概ね用量に比例しており、交配前及び交配期間中、並びに妊娠期間中の雌に 3 日間隔でガラダシマブを反復投与することによって蓄積の可能性が示唆された。ADA の生成が認められたが、中和効果やガラダシマブの曝露の減少を引き起こすことはないと考えられた。したがって、母動物及び初期胚発生に対する静脈内投与時の NOAEL は 100 mg/kg/回と判断した。

雄ウサギ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（試験番号 8399537）では、交配前から剖検までガラダシマブの 10、30 又は 100 mg/kg/回を 3 日間隔で静脈内投与したところ、雄の生殖器官及びそれに関連する生理学的機能（すなわち、精子の運動性及び濃度、並びに精巣上体尾部の重量）に関する変化は観察されなかった。さらに、交尾、受胎能、精子評価、又は繁殖率にガラダシマブ投与の影響は確認されなかった。ガラダシマブを投与した 75 例に毒性は観察されず、良好な忍容性を示した。6 例は死亡又は安楽殺したが、ヒト異種タンパク質の反復投与に対する免疫反応によるものであり、ガラダシマブ投与による影響ではないと考えられた。異種タンパク質は、免疫複合体の形成によりマウスが死に至る有害な免疫反応を誘発することが報告されている［Bugelski et al, 2000；Jönsson et al, 2011；Krishna and Nadler, 2016；Luffer-Atlas et al, 2018］。論文報告では、ウサギではなくマウスが使用されており、本試験では免疫複合体の形成に関する評価は実施していないが、反応の類似性から、ウサギにおける死亡あるいは瀕死は、異種タンパク質に対する免疫反応による可能性が高いものと考えられた。また、死亡あるいは瀕死の原因として、ADA 量が多かった可能性も除外できない。しかし、動物におけるヒトタンパク質のガラダシマブに対する免疫反応は、異種タンパク質（動物種におけるヒトタンパク質）の反復投与後に発現が予想されるものであり、臨床使用での有害事象を予見するものではなかった。この点については ICH S6（R1）ガイドラインの記載とも一致している。したがって、雄の一般毒性、交尾及び生殖能に対する静脈内投与時の NOAEL はいずれも 100 mg/kg/回と判断した。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（試験番号 VK47BJ）では、ガラダシマブを反復して静脈投与することにより、薬理作用に基づく aPTT の延長が認められた。100 mg/kg/回群では摂餌の低下及び糞便量の減少が観察された 2 例を安楽殺した。ウサギを用いた胚・胎児発生予備試験（試験番号 MN80HQ）では、生存動物に投与による影響が認められなかったこと、妊娠ウサギは実験操作に対する感受性が強いこと（主に消化管障害及び食欲不振、並びにこれらに引き続いて起きる流産）から、これらの 2 例の状態悪化はガラダシマブ投与に起因したもので

はないと考えられた。したがって、ガラダシマブ投与による影響は試験期間を通じて認められず、母動物及び胎児に対する静脈内投与時の NOAEL は 100 mg/kg/回と判断した。

ウサギを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験（試験番号 8410864）では、着床から離乳までガラダシマブの 10、30 又は 100 mg/kg/回を 5 日間隔で皮下投与あるいは 100 mg/kg/回を静脈内投与したところ、分娩及び出生児の生存に対するガラダシマブの影響は認められなかった。全身曝露量は投与量の増加に伴って上昇したが、用量比を概ね下回った。母動物の ADA 陽性率は 10～100 mg/kg の皮下投与で最大 44%、静脈内投与で最大 6.8%であった。ADA 陽性及び ADA 陽性が疑われる動物は TK 解析から除外した。妊娠 29 日における胎児の血漿中ガラダシマブ濃度は 10 及び 30 mg/kg/日の皮下投与で母動物の 76.6～136.6%であったが、100 mg/kg/日の皮下投与では母動物の 40.8%であった。ガラダシマブの 100 mg/kg/日を静脈内投与した場合、母動物と胎児の血漿中薬物濃度はほぼ同等であった。F0 母動物及び F1 出生児にはガラダシマブ投与に関連した毒性は観察されなかった。したがって、母動物に対する NOAEL、F1 胎児の発生に対する NOAEL、F1 出生児の発達・神経行動・生殖能に対する NOAEL は、いずれも皮下及び静脈内投与ともに 100 mg/kg/回と判断した。

ウサギでは、母動物の IgG 及びより低いレベルのアルブミンが胎児卵黄嚢膜を通過して母動物の子宮内腔から胎児へ移行する。さらに、母動物の循環血液中に注入されたヒト IgG は、ウサギ胎児にも良好に輸送され、ウサギ新生児 Fc 受容体がヒト IgG と効率的に結合することが知られている［Szikora et al, 2017］。ガラダシマブの胎児移行性はウサギを用いた出生前及び出生後の発生試験及び胚・胎児発生予備試験においても確認された。

ウサギを用いた局所刺激性試験（試験番号 37761）では、ガラダシマブの忍容性は良好であり、同じ組成の緩衝液（すなわち添加剤は同じ濃度）でガラダシマブの 2 製剤（100 及び 170 mg/mL）を評価したが、皮下投与部位において、ガラダシマブに関連した変化は認められなかった。

In vitro 組織交差反応性試験（試験番号 APQ0057）では、ガラダシマブは、ヒト又はカニクイザル由来の種々の組織に対して特異的に結合した。重要な点は、サル組織における染色性は、ヒト組織における染色性を概ね予測しており、カニクイザルが毒性試験における反応種であることを確認できたことである。したがって、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験の成績は、薬理学的及び毒性学的に意義があると考えられる。以上、カニクイザルの反復投与毒性試験では、いずれの投与用量においても、安全性が問題となる所見は認められなかった。

ガラダシマブを用いた遺伝毒性試験は実施されていない。ICH S6（R1）ガイドラインでは、バイオ医薬品が DNA や染色体成分に直接相互作用とは考えにくいことから、標準的な in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験は適用されない。

ICH S6（R1）ガイドラインに従い、ガラダシマブを用いた遺伝毒性及びがん原性試験は実施しなかった。ガラダシマブの潜在的発がんリスクを評価した（試験番号 REP-008854）結果、ガラダシマブを患者に投与しても、潜在的発がんリスクはないと考えられた。

安全域

非臨床試験における NOAEL での曝露量は、ガラダシマブの 400 mg を初回投与後、200 mg を月 1 回投与する臨床用量での曝露量と比較して十分な安全域を示している（表 2.4-4 及び表 2.4-5）。

ヒトにおけるガラダシマブの全身曝露量

ガラダシマブのヒトでの推奨用量は 400 mg（2 x 200 mg）の初回皮下投与後、月 1 回の 200 mg 皮下投与である。400 mg の初回皮下投与後の予測 $AUC_{0\text{-}30days}$ 及び C_{max} は、それぞれ 13,700 µg*h/mL 及び 28.5 µg/mL である。200 mg の月 1 回皮下投与後の予測定常状態の $AUC_{0\text{-}30days}$ は 10,300 µg*h/mL、C_{max} は 21.2 µg/mL である。この値は、3001 試験においてガラダシマブを月 1 回 200 mg 投与した全被験者（N=39）の母集団薬物動態解析に基づいている（詳細は表 2.7.2-6 参照）。

カニクイザルにおけるガラダシマブの全身曝露量

カニクイザルを用いた週 1 回投与による 26 週間反復静脈内及び皮下投与毒性試験（試験番号 TH43GT）において、皮下投与の NOAEL である 60 mg/kg/回の平均 $AUC_{0\text{-}168h}$ は 89,395 µg*h/mL であった。本試験の投与は週 1 回、臨床試験の投与は月 1 回であることから、サルの平均 AUC 値に 30/7 の比率を乗じ、400 mg の初回投与後に 200 mg を月 1 回投与して得られた臨床 AUC 値と比較した。サル皮下投与時の NOAEL の平均 $AUC_{0\text{-}30days}$ 及び C_{max} は、それぞれ 383,079 µg*h/mL 及び 686 µg/mL であった。サル皮下投与時の NOAEL の AUC は、臨床用量である 400 mg の初回投与時及び 200 mg の月 1 回投与時の臨床 AUC の、それぞれ約 28 及び 37 倍である。サル皮下投与時の NOAEL の C_{max} は、400 mg の初回投与時及び 200 mg の月 1 回投与時の臨床 C_{max} の、それぞれ約 24 及び 32 倍である。

ウサギにおけるガラダシマブの全身曝露量

8399537 試験では、雄の妊孕性を評価するため、ガラダシマブを 3 日ごとに静脈内投与した。本試験の NOAEL は 100 mg/kg、その際の平均 $AUC_{0\text{-}72h}$ は 106,000 µg*h/mL、C_{max} は 2,930 µg/mL であった。平均 AUC 値は、400 mg の初回投与後に 200 mg を月 1 回投与して得られた臨床 AUC 値と適切に比較できるように 30/3 の比率を乗じた。静脈内投与の NOAEL である 100 mg/kg の平均 $AUC_{0\text{-}30days}$ は、1,060,000 µg*h/mL であった。NOAEL における $AUC_{0\text{-}30days}$ は、臨床用量である 400 mg の初回投与時及び 200 mg の月 1 回投与時の臨床 AUC の、それぞれ約 77 及び 103 倍高い。NOAEL における C_{max} は、400 mg の初回投与時及び 200 mg の月 1 回投与時の臨床 C_{max} の、それぞれ約 103 及び 138 倍高い。

8408860 試験では、雌の妊孕性を評価するため、ガラダシマブを 3 日ごとに静脈内投与した。本試験の NOAEL は 100 mg/kg、その際の平均 $AUC_{0\text{-}72h}$ は 85,200 µg/mL、C_{max} は 2,430 µg/mL であった。平均 AUC 値は、400 mg の初回投与後に 200 mg を月 1 回投与して得られた臨床 AUC

値と適切に比較できるように 30/3 の比率を乗じた。静脈内投与の NOAEL である 100 mg/kg の平均 $AUC_{0\text{-}30days}$ は、852,000 µg*h/mL であった。NOAEL における $AUC_{0\text{-}30days}$ は、臨床用量である 400 mg の初回投与時及び 200 mg の月 1 回投与時の臨床 AUC の、それぞれ約 62 および 83 倍高い。NOAEL における C_{max} は、400 mg の初回投与時及び 200 mg の月 1 回投与時の臨床 C_{max} の、それぞれ約 85 及び 115 倍高い。

VK47BJ 試験は、ガラダシマブを 3 日ごとに静脈内投与する胚・胎児発生試験である。本試験の NOAEL は 100 mg/kg、18 日目の平均 $AUC_{0\text{-}72h}$ は 106,828 µg*h/mL、C_{max} は 3,677 µg/mL であった。平均 AUC 値は、400 mg の初回投与後に 200 mg を月 1 回投与して得られた臨床 AUC 値と適切に比較できるように 30/3 の比率を乗じた。静脈内投与の NOAEL である 100 mg/kg の平均 $AUC_{0\text{-}30days}$ は、1,068,280 µg*h/mL であった。NOAEL における $AUC_{0\text{-}30days}$ は、臨床用量である 400 mg の初回投与時及び 200 mg の月 1 回投与時の臨床 AUC の、それぞれ約 78 及び 104 倍である。NOAEL における C_{max} は、400 mg の初回投与時及び 200 mg の月 1 回投与時の臨床 C_{max} の、それぞれ約 129 及び 173 倍であった。

ウサギを用いた 5 日間隔での静脈内又は皮下投与による出生前及び出生後の発生に関する試験（試験番号 8410864）において、NOAEL は 100 mg/kg/回であり、授乳 38 日の皮下投与時における平均 $AUC_{0\text{-}120days}$ は 91,800 µg*h/mL、C_{max} は 927 µg/mL であった。平均 AUC 値は、400 mg の初回投与後に 200 mg を月 1 回投与して得られた臨床 AUC 値と適切に比較できるように 30/5 の比率を乗じた。皮下投与の NOAEL である 100 mg/kg の平均 $AUC_{0\text{-}30days}$ は、550,800 µg*h/mL であった。NOAEL における $AUC_{0\text{-}30days}$ は、臨床用量である 400 mg の初回投与時及び 200 mg の月 1 回投与時の臨床 AUC の、それぞれ約 40 及び 53 倍である。NOAEL における C_{max} は、400 mg の初回投与時及び 200 mg の月 1 回投与時の臨床 C_{max} の、それぞれ約 33 及び 44 倍であった。

表 2.4-4　ガラダシマブの安全域（投与間隔で補正した及び補正しない AUC の比較）

Human			Monkey	Rabbit	Rabbit	Rabbit	Rabbit
Population PK			General Tox	Male Fertility	Female Fertility	PPND	Embryo-Fetal
Dose	$AUC_{0\text{-}30days}$ (μg*h/mL)	NOAEL	60 mg/kg (SC)	100 mg/kg (IV)	100 mg/kg (IV)	100 mg/kg (SC)	100 mg/kg (IV)
400 mg loading dose	13,700	$AUC_{0\text{-}30days}$ (μg*h/mL)	383,079[a]	1,060,000[b]	852,000[c]	550,800[d]	1,068,280[e]
200 mg once monthly	10,300						
400 mg loading dose		Exposure Margin *Corrected for dosing interval*	28	77	62	40	78
		Exposure Margin *Not corrected for dosing interval*	6.5	7.7	6.2	6.7	7.8
200 mg once monthly		Exposure Margin *Corrected for dosing interval*	37	103	83	53	104
		Exposure Margin *Not corrected for dosing interval*	8.7	10.3	8.3	8.9	10.4

[a] $AUC_{0\text{-}30days}$ = 383,079 μg*h/mL calculated by multiplying $AUC_{0\text{-}168h}$ of 89,385 μg*h/mL after Week 14 in male and female cynomolgus monkeys at NOAEL (60 mg/kg SC) in the 26-week toxicity study (Study TH43GT) to estimate 30 days of exposure

[b] $AUC_{0\text{-}30days}$ = 1,060,000 μg*h/mL calculated by multiplying $AUC_{0\text{-}72h}$ of 106,000 μg*h/mL after Pre-mating Day 27 in male rabbits at NOAEL (100 mg/kg IV) in Study 8399537 to estimate 30 days of exposure

[c] $AUC_{0\text{-}30days}$ = 852,000 μg*h/mL calculated by multiplying $AUC_{0\text{-}72h}$ of 85,200 μg*h/mL after Gestation Day 7 in female rabbits at NOAEL (100 mg/kg IV) in Study 8408860 to estimate 30 days of exposure

[d] $AUC_{0\text{-}30days}$ = 550,800 μg*h/mL calculated by multiplying $AUC_{0\text{-}120h}$ of 91,800 μg*h/mL after Lactation Day 38 in female rabbits at NOAEL (100 mg/kg SC) in Study 8410864 to estimate 30 days of exposure

[c] $AUC_{0\text{-}30days}$ = 1,068,280 μg*h/mL calculated by multiplying $AUC_{0\text{-}72h}$ of 106,828 μg*h/mL after Day 18 in female rabbits at NOAEL (100 mg/kg IV) in Study VK47BJ to estimate 30 days of exposure

表 2.4-5　ガラダシマブの安全域（投与間隔で補正しない Cmax の比較）

Human			**Monkey**	**Rabbit**	**Rabbit**	**Rabbit**	**Rabbit**
Population PK			General Tox	Male Fertility	Female Fertility	PPND	Embryo-Fetal
Dose	C_{max} (μg/mL)	NOAEL	60 mg/kg (SC)	100 mg/kg (IV)	100 mg/kg (IV)	100 mg/kg (SC)	100 mg/kg (IV)
400 mg loading dose	28.5	C_{max} (μg/mL)	686	2,930	2,430	927	3,677
200 mg once monthly	21.2						
400 mg loading dose		Exposure Margin	24	103	85	33	129
200 mg once monthly		Exposure Margin	32	138	115	44	173

2.4.5　総括及び結論

ガラダシマブの臨床開発を裏付ける非臨床試験は、ICH ガイドラインに記載された国際基準に従って実施した。一連の非臨床試験には、in vitro 及び薬理学的に適切な動物種で実施された薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験が含まれている。

薬理試験では、まず、ガラダシマブとザイモーゲン FXII 及びその活性体型との相互作用、並びに FXIIa を介する生物学的作用に対するガラダシマブの特異的な阻害作用を in vitro 及び薬理学的に適切な動物種を用いた in vivo で明らかにした。ガラダシマブは活性化型のヒト FXII に高い親和性（0.14 nM）で結合し、ザイモーゲン FXII には低い親和性（55 nM）で結合する。ガラダシマブの阻害作用を調べた in vitro 試験は、ヒトドナーから採取した接触相が活性化された血漿を用いて行った。ガラダシマブは FXIIa の発色活性及び FXIIa を介したブラジキニン産生を強く阻害する。ガラダシマブの用量依存的な aPTT 延長は、ガラダシマブ投与により予想される薬理学的反応と一致しており、非臨床試験で観察され、臨床試験でも確認された。また、ガラダシマブは、カニクイザル、ウサギ及びマウスを含む数種の動物から採取した接触相が活性化された血漿において、FXIIa 活性を阻害した。ラット血漿では FXIIa の阻害は認められなかった。抗体の力価を評価したマウスモデルは、既知のブラジキニンを介した浮腫形成に基づいて選択した。すべてのモデルにおいて、3F7 及びガラダシマブは浮腫形成を強く抑制した。

有益な副次的薬理試験作用として、ガラダシマブ及び 3F7 による FXIIa の阻害は、出血リスクを増加させることなくマウス及びウサギの実験的血栓症を強力に阻害した。

ガラダシマブは、マウスの呼吸系安全性薬理試験における呼吸パラメータ（呼吸数、1 回換気量及び分時換気量）、並びにマウス及びカニクイザルの反復投与毒性試験に組み込まれた心血管、呼吸系及び CNS の安全性指標に対して投与に関連した有害作用は認められなかった。

PK 試験の結果から、カニクイザルにおけるガラダシマブの適切な PK/PD プロファイル及びウサギにおける適切な PK プロファイルが示された。

ガラダシマブの毒性試験プログラムでは、マウス及びカニクイザルを用いた安全性薬理評価において、100 mg/kg までの静脈内投与及び 200 mg/kg までの皮下投与は、ガラダシマブ投与に関連した有害な影響を及ぼさないことが示された。反復投与毒性試験（マウス及びカニクイザルを用いた 8 日間試験、並びにカニクイザルを用いた 5 週間試験）において、3～100 mg/kg/回の静脈内投与及び 60～200 mg/kg/回の皮下投与での忍容性は良好であった。マウスを用いた 4 週間反復投与毒性試験において、皮下投与（60～200 mg/kg/回）及び静脈内投与の最高用量（100 mg/kg）での忍容性は良好であったが、静脈内投与のより低用量（3～30 mg/kg/回、主に 3 mg/kg 回）ではガラダシマブ投与に関連した一般状態の変化及び死亡がみられた。これらの変化はヒトタンパク質であるガラダシマブに対する免疫反応（すなわち、アナフィラキシー）と考えられることから、ヒトへの外挿性に乏しいと考えられた。カニクイザルを用いた 26 週間反復静脈内（10～100 mg/kg/回）及び皮下（60～200 mg/kg/回）投与試験では、動物福祉の観点から 2 例を安楽殺し、同時にヒトタンパク質であるガラダシマブに対する免疫反応を評価した。残りの動物では注射部位における軽度の局所刺激作用のみが認められた。また、ウサギを用いた受胎能及び初期胚発生に関する試験及び胚・胎児発生に関する試験において、本薬投与に関連した影響は認められなかった。しかし、雄ウサギを用いた受胎能及び初期胚発生試験では、ヒトタンパク質であるガラダシマブに対する免疫反応（すなわち、アナフィラキシー）が一部の動物（10 mg/kg/回群の 4/25 例、30 mg/kg/回群の 2/25 例）で観察された。ウサギを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験では、最高用量、すなわち 100 mg/kg の皮下あるいは静脈内投与によって、F0 母動物及び F1 出生児にガラダシマブ投与による影響は観察されなかった。

ガラダシマブの 2 製剤（100 及び 170 mg/mL）をウサギに皮下投与した局所刺激性試験において、忍容性は良好であり、投与部位においてガラダシマブ投与に関連した変化は認められなかった。

ヒト及びカニクイザルの種々の組織において交差反応性が認められた。しかしながら、カニクイザルの反復投与毒性試験では、安全性が問題となる所見は認められなかった。

ICH S6（R1）ガイドラインに従い、ガラダシマブの遺伝毒性及びがん原性試験は実施しなかった。ガラダシマブとその添加剤に関する発がんリスク評価の結果、ガラダシマブを患者に投与しても、潜在的発がんリスクはないと考えられた。

結論として、ガラダシマブは、非臨床試験の結果、ヒトにおけるガラダシマブの臨床使用を支持する PD 活性、適切な PK 特性及び安全性プロファイルを示した。異種タンパク質（すなわち、動物種におけるヒトタンパク質）の反復投与後には主として免疫反応が予想されることか

ら、反復投与毒性試験で認められたそれぞれの所見は、臨床での有害事象を予測するものではないと考えられた。この考え方は ICH S6（R1）ガイドラインの記載と一致したものである。

2.4.6 参考文献

Bjorkqvist J, Jamsa A, Renné T. Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme. Thromb Haemost. 2013;110(3):399-407.

Bjorkqvist J, Nickel KF, Stavrou E, Renné T. In vivo activation and functions of the protease factor XII. Thromb Haemost. 2014;112(5):868-875.

Bork K, Barnstedt SE, Koch P, Traupe H. Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. Lancet. 2000;356(9225):213-217.

Bork K, Bernstein JA, Machnig T, Craig TJ. Efficacy of different medical therapies for the treatment of acute laryngeal attacks of hereditary angioedema due to C1-esterase inhibitory deficiency. J Emerg Med 2016;50(4):567-80.

Bugelski PJ, Herzykl DJ, Rehm S, Harmsen AG, Gore EV, Williams DM, et al. Preclinical development of keliximab, a Primatized anti-CD4 monoclonal antibody, in human GD4 transgenic mice: Characterization of the model and safety studies. Hum Exp Toxicol. 2000;19(4):230-243.

Cai TQ, Wu W, Shin MK, Xu Y, Jochnowitz N, Zhou Y, et al. Factor XII full and partial null in rat confers robust antithrombotic efficacy with no bleeding. Blood Coagul Fibrinolysis. 2015;26(8):893-902.

Cao H, Biondo M, Lioe H, Busfield S, Rayzman V, Nieswandt B, et al. Antibody-mediated inhibition ofFXIIablocks downstream bradykinin generation. J Allergy Clin Immunol. 2018;142(4):1355-1358. doi:10.1016/j.jaci.2018.06.014

Colman RW. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? J Exp Med. 2006;203(3):493-495.

Csuka D, Veszeli N, Imreh E, Zotter Z, Skopal J, Prohaszka Z, et al. Comprehensive study into the activation of the plasma enzyme systems during attacks of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. Orphanet J Rare Dis. 2015;10:132.

Cugno M, Cicardi M, Coppola R, Agostoni A. Activation of factor XII and cleavage of high molecular weight kininogen during acute attacks in hereditary and acquired C1-inhibitor deficiencies. Immunopharmacology. 1996;33(1-3):361-364.

Girolami A, Ruzzon E, Lombardi AM, Cabrio L, Randi ML. Thrombosis-free surgical procedures in severe (Homozygote) factor XII deficiency: report of four additional cases and literature review. Clin Appl Thromb Hemost. 2004;10(4):351-355.

Hagedorn I, Schmidbauer S, Pleines I, Kleinschnitz C, Kronthaler U, Stoll G, et al. Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. Circulation. 2010;121(13):1510-1517.

Haley, P.J. Opinion by Patrick J. Haley regarding: Study No. TH43GT. 2018.

Hess R, Wujak L, Hesse C, Sewald K, Jonigk D, Warnecke G, Fieguth HG, de Maat S, Maas C, Bonella F, Preissner KT, Weiss B, Schaefer L, Kuebler WM, Markart P, Wygrecka M. Coagulation factor XII regulates inflammatory responses in human lungs. Thromb Haemost. 2017 Oct 5;117(10):1896-1907. doi:10.1160/TH16-12-0904. Epub 2017 Aug 17. PMID:28816340.

ICH S6[R1], Guidance for Industry S6 Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. 2011

Jönsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, Van Rooijen N, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. J Clin Invest. 2011;121(4):1484-1496.

Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, et al. Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. J Exp Med. 2006;203(3):513-518.

Konings J, Hoving LR, Ariens RS, Hethershaw EL, Ninivaggi M, Hardy LJ, et al. The role of activated coagulation factor XII in overall clot stability and fibrinolysis. Thromb Res. 2015;136(2):474-480.

Krishna M, Nadler SG. Immunogenicity to biotherapeutics - The role of antidrug immune complexes. Front Immunol. 2016;7:21.

Lammle B, Wuillemin WA, Huber I, Krauskopf M, Zurcher C, Pflugshaupt R, et al. Thromboembolism and bleeding tendency in congenital factor XII deficiency--a study on 74 subjects from 14 Swiss families. Thromb Haemost. 1991;65(2):117-121.

Larsson M, Rayzman V, Nolte MW, Nickel KF, Bjorkqvist J, Jamsa A, et al. A factor XIIa inhibitory antibody provides thromboprotection in extracorporeal circulation without increasing bleeding risk. Sci Transl Med. 2014;6(222):222ra217.

Luffer-Atlas D, Reddy VR, Hilbish KG, Grace CE, Braslin WJ. PDGFRα monoclonal antibody: assessment of embryo-fetal toxicity and time-dependent placental transfer of a murine surrogate antibody of alaratumab in mice. Birth Defects Res. 2018;110(18):1358-1371.

May F, Krupka J, Fries M, Thielmann I, Pragst I, Weimer T, et al.FXIIa inhibitor rHA-Infestin-4: Safe thromboprotection in experimental venous, arterial and foreign surface-induced thrombosis. Br J Haematol. 2016;173(5):769-778.

Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. Lancet. 1998;351(9117):1693-1697.

Nussberger J, Cugno M, Cicardi M, Agostoni A. Local bradykinin generation in hereditary angioedema. J Allergy Clin Immunol. 1999;104(6):1321-1322.

Ratnoff OD, Colopy JE. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. J Clin Invest. 1955;34(4):602-613.

Renné T, Pozgajova M, Gruner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, et al. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. J Exp Med. 2005;202(2):271-281.

Renné T, Schmaier AH, Nickel KF, Blomback M, Maas C. In vivoroles of factor XII. Blood. 2012;120(22):4296-4303.

Rosen FS, Pensky J, Donaldson V, Charache P. Hereditary Angioneurotic Edema: Two Genetic Variants. Science. 1965;148(3672):957-958.

Szikora B, Hiripi L, Bender B, Kacskovics I, Iliás A. Characterization of the interactions of rabbit neonatal Fc receptor (FcRn) with rabbit and human IgG isotypes. PLoS One. 2017 Sep 28;12(9):e0185662. doi:10.1371/journal.pone.0185662. PMID:28957416;PMCID:PMC5619814.