目次

略語・略号一覧 2
2.6.1 緒言 3

表 目次

表 2.6.1-1 非臨床開発プログラム 5

図 目次

図 2.6.1-1 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 3

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
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
CSL312	Garadacimab; Factor XIIa antagonist 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
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
IP	Intraperitoneal	腹腔内
IV	Intravenous	静脈内
kDa	Kilodalton	キロダルトン
KK	Kallikrein-kinin	カリクレインーキニン
SC	Subcutaneous	皮下

表記規則

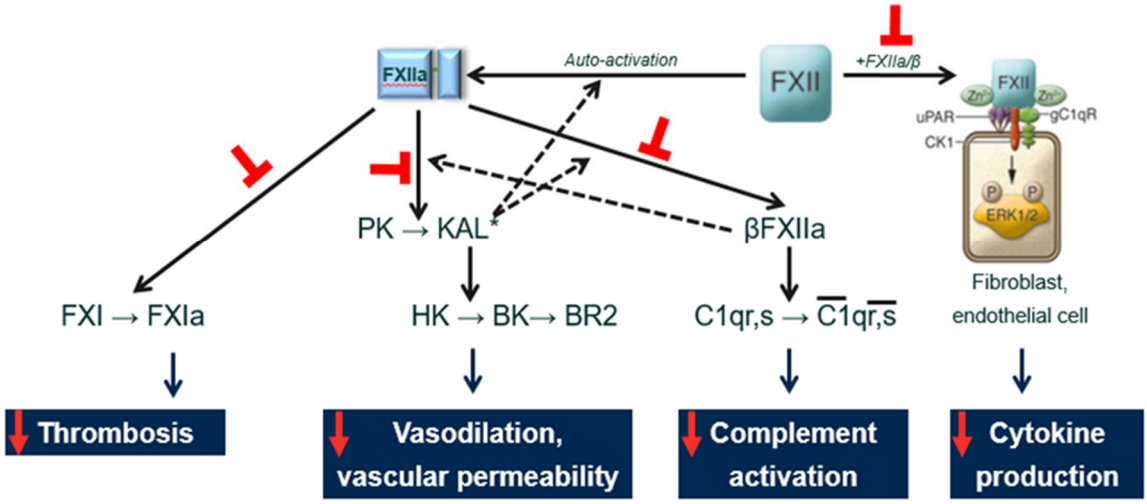
これまでの開発期間を通じて、CSL312（ガラダシマブ）は「FXIIa antagonist monoclonal antibody（抗第 XIIa 因子モノクローナル抗体）」と記載されており、過去の関連する記録及び連絡文書でこの用語が使用されている。CSL312 は遺伝子組換え完全ヒト型 IgG4/λ モノクローナル抗体であり、血漿タンパク質 FXIIa の触媒ドメインに結合し、その触媒活性を強力に阻害する。CSL312 は FXIIa の活性部位に結合することでそのプロテアーゼ活性を阻害するもの（inhibitor）であり、アゴニストの結合を阻害するもの（antagonist）ではない。したがって、CSL312 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。

2.6.1 緒言

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。

FXII は、負に帯電した人工物又は生体表面に結合すると、2 本鎖の活性型 FXII（FXIIa、同じく 80 kDa）に活性化される。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（β-FXIIa）が遊離し、古典的な補体経路を活性化することができる。FXIIa はフィブリン形成の内因性経路を介して血液凝固を引き起こし、ブラジキニン（BK）産生カリクレインーキニン（KK）系を介して炎症を促進する。BK がブラジキニン B2 受容体に結合すると、血管を拡張し、好中球の走化性を誘導し、血管を拡張する炎症性シグナル伝達経路が活性化する。FXIIa は補体系及び線溶系の構成要素を調節する可能性がある。しかし、現在までのところ、これらの活性は in vitro でしか確認されていない。このように、FXII の活性型は、炎症及び凝固促進作用を有する（図 2.6.1-1）。

図 2.6.1-1 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



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 = 細胞外シグナル調節キナーゼ 1/2 、HK = 高分子キニノーゲン、KAL = カリクレイン、PAR = ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子受容体

FXII の活性化（FXIIa への活性化）は、KK 経路を介した BK の産生にもつながる。この経路では、プレカリクレイン（PK）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、カリクレインは高分子キニノーゲンを切断し、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、好中球の走化性の誘導、血管の透過性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。BK 産生は遺伝性血管性浮腫（HAE）急性発作時に増加し、HAE における腫張のメディエーターとされる。

FXII 欠損動物は、止血能を損なうことなく血栓症を予防したことが試験で示された。同様に、薬理学的に FXII 又は FXIIa を標的化すると、出血の発生率を増加させることなく、血栓症を予防する。FXII の触媒ドメインを標的とする親和性成熟抗体であるガラダシマブ（garadacimab）は、in vivo モデルにおいて浮腫を減少させ、正常及びカリクレイン欠損の血漿サンプルの接触活性化後のブラジキニン形成を抑制した。

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繰り返しと予測不能な症状発現を特徴とする常染色体顕性疾患である。HAE は 3 つの病型に分類され、補体成分 1（C1）インアクチベーター（C1-INH）の欠乏及び機能不全を伴う 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、線維素溶解及び凝固経路の 4 つのタンパク分解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阻害薬である。C1-INH は、FXIIa 及びカリクレインを不活性化することにより、KK 系（接触経路）の主要な阻害薬となる。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現れる。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。発作が不定期な患者は、発作のない時間帯でも次の発作を恐れている。

現在承認されている HAE の急性期及び予防治療は、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 の血漿中濃度は、HAE 発作の急性期には寛解期と比較して患者において上昇することが示されている。血漿接触系の開始における FXIIa の重要性を考えると、FXIIa は KK 経路及び HAE 発作中に検出される BK の過剰産生を阻害する新規の標的である。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（FXIIa-INH mAb 薬理学的クラス）。ガラダシマブにより FXIIa を阻害すると、KK 経路及び BK の過剰産生を阻害することにより HAE 発作を予防し、HAE に伴う腫脹を防ぐことができる。

ガラダシマブは、完全ヒト型の遺伝子組換え IgG4 モノクローナル抗体で、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、親抗体である 3F7 の親和性成熟変異体であり、[redacted]に対するスクリーニングの結果、[redacted]から単離された。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した IgG4 モノクローナル抗体の典型的な構造を有している。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、2.7.3「臨床効果の要約」及び 2.7.4「臨床安全性の要約」を参照のこと。

ガラダシマブについては、包括的な薬理試験及び毒性試験が実施されており、個々の試験は表 2.6.1-1 に記載した。一部の非臨床試験では、3F7 と呼ばれるガラダシマブの親抗体を用いた。

表 2.6.1-1　非臨床開発プログラム

Study Type	**Route of Administration**	**Species**	**Product Used**	**GLP Compliance**
Primary pharmacodynamics	In vitro	-	garadacimab and 3F7	No
Primary pharmacodynamics	IP	Mouse	garadacimab and 3F7	No
Safety pharmacology	IV, SC	Mouse, Cynomolgus monkey	garadacimab	Yes
Pharmacokinetics	IV, SC	Cynomolgus monkey	garadacimab	No
28-days repeat-dose toxicity	IV	Mouse	garadacimab	No
Repeat-dose toxicity, 8-days and 4- (mouse) / 5-week (cynomolgus money) and 26-week (cynomolgus monkey)	IV, SC	Mouse, Cynomolgus monkey	garadacimab	Yes
Reproductive and developmental toxicity, female fertility and early embryonic development	IV	Rabbit	garadacimab	Yes
Reproductive and developmental toxicity, male fertility and early embryonic development	IV	Rabbit	garadacimab	Yes
Reproductive and developmental toxicity, embryo-fetal development	IV	Rabbit	garadacimab	No
Reproductive and developmental toxicity, embryo-fetal development	IV	Rabbit	garadacimab	Yes
Prenatal and postnatal developmental toxicity	IV, SC	Rabbit	garadacimab	Yes
Local tolerance and pharmacokinetics	SC	Rabbit	garadacimab	Yes
Other toxicity: Tissue cross reactivity	In vitro	-	garadacimab	Yes

目次

略語・略号一覧 3
2.6.2 薬理試験の概要文 5
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 8
2.6.2.2.1 バイオセンサーデータ：CSL312 の FXII 及び βFXIIa への結合（試験番号 REP-21280） 8
2.6.2.2.2 3F7 のエピトープマッピング（試験番号 REP-21279） 9
2.6.2.2.3 非ヒト動物種における FXII 活性と CSL312 による阻害作用（試験番号 REP-21282） 10
2.6.2.2.4 非ヒト動物種における CSL312 の結合と有効性（試験番号 REP-009151） 11
2.6.2.2.5 CSL312 のヒト FXII に対する特異性（試験番号 INV_11-01_BN） 12
2.6.2.2.6 In vitro FXIIa アミド分解活性及び aPTT 測定（試験番号 REP-21290） 13
2.6.2.2.7 CSL312 の正常ヒトドナー並びに HAE I/II 型、nC1-INH-HAE 及び AAE-C1-INH 患者の活性化血漿における FXIIa 発色性活性阻害作用（試験番号 REP-21283） 13
2.6.2.2.8 接触相活性化後のヒト血漿における BK 産生阻害（試験番号 REP-21245） 14
2.6.2.2.9 3F7 の受動的全身性アナフィラキシー（PSA）及び受動的皮膚アナフィラキシー（PCA）における肥満細胞のヘパリン誘発浮腫抑制作用（試験番号 REP-21269、REP-21268） 16
2.6.2.2.10 C1-INH 欠損マウスにおける ACEi 誘発浮腫の抑制（試験番号 REP-21267） 19
2.6.2.2.11 毒性試験のための動物種の選択 19
2.6.2.3 副次的薬理試験 21
2.6.2.3.1 血栓症 21
2.6.2.3.1.1 3F7 の出血リスクと実験的血栓症抑制作用［Larsson et al, 2014］ 21
2.6.2.3.1.2 CSL312 のウサギの同時血栓症モデルにおける作用（試験番号 REP-001415) 21
2.6.2.3.1.3 CSL312 のマウスの動脈血栓モデルにおける作用（試験番号 REP-001383) 22
2.6.2.3.1.4 CSL312 のマウス尾端出血モデルにおける止血作用（試験番号 REP-001412） 23
2.6.2.4 安全性薬理試験 23
2.6.2.4.1 CSL312：全身バイアスフロープレチスモグラフィーによる覚醒マウスの呼吸パラメータの評価（単回 IV 又は SC 投与）（試験番号 APQ0059） 23
2.6.2.4.2 CSL312：CD-1 マウスを用いた 4 週間反復 IV 及び SC 投与毒性試験並びに 8 週間回復性試験（試験番号 APQ0061） 24
2.6.2.4.3 CSL312 : カニクイザルを用いた 5 週間反復 IV 及び SC 投与毒性試験並びに 8 週間回復性試験（試験番号 APQ0058） 25
2.6.2.4.4 CSL312：カニクイザルを用いた 26 週間反復 IV 及び SC 投与毒性試験並びに 8 週間回復性試験（試験番号 TH43GT） 26

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 28
2.6.2.6 考察及び結論 28
2.6.2.7 図表 29
2.6.2.8 参考文献 29

表 目次

表 2.6.2-1 薬理試験 6
表 2.6.2-2 抗 FXII 抗体ガラダシマブ及び 3F7 のヒト FXII 及びヒト βFXIIa に対する結合親和性 8
表 2.6.2-3 抗 FXII 抗体ガラダシマブ及び 3F7 のマウス、ウサギ及びカニクイザル FXII タンパク質に対する結合親和性 8
表 2.6.2-4 ガラダシマブの接触相活性化後の血漿中 BK 産生抑制作用 20
表 2.6.2-5 CNS 安全性薬理評価：測定時点 24
表 2.6.2-6 ECG の測定時点 25
表 2.6.2-7 BP の測定時点 26
表 2.6.2-8 呼吸数の測定時点 26
表 2.6.2-9 ECG の測定時点 27
表 2.6.2-10 BP 及び HR の測定時点 27
表 2.6.2-11 呼吸数の測定時点 28

図 目次

図 2.6.2-1 3F7 のエピトープマッピング 9
図 2.6.2-2 ガラダシマブの各種活性化血漿中 FXIIa 発色性活性の抑制作用 11
図 2.6.2-3 FXIIa の発色性活性 12
図 2.6.2-4 抗 FXIIa 抗体の in vitro 効力試験 13
図 2.6.2-5 ガラダシマブの正常ヒトドナー、HAE I/II/III 型及び AAE-C1-INH 患者の活性化血漿における FXIIa 発色性活性に対する阻害作用 14
図 2.6.2-6 ガラダシマブの接触相活性化後の血漿中 BK 産生阻害作用 15
図 2.6.2-7 肥満細胞由来ヘパリンによる BK を介する浮腫の誘発 16
図 2.6.2-8 3F7 の PSA モデルにおける肥満細胞ヘパリン誘発浮腫抑制作用 17
図 2.6.2-9 3F7 の PCA モデルにおける肥満細胞ヘパリン誘発浮腫抑制作用 18
図 2.6.2-10 マウス PCA モデルにおける 3F7 及びガラダシマブの作用 18
図 2.6.2-11 C1-INH 欠損マウスにおける ACEi 誘発血管浮腫に対する 3F7 及びガラダシマブの作用評価 19

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	Angiotensin converting enzyme	アンジオテンシン変換酵素
ACEi	Angiotensin converting enzyme inhibitor	アンジオテンシン変換酵素阻害薬
aPTT	Activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
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
BP	Blood pressure	血圧
C1-INH	C1-esterase inhibitor	C1-インアクチベーター
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CSL312	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
ECG	Electrocardiography	心電図
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
FeCl3	Ferric chloride	塩化鉄（III）
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
HR	Heart rate	心拍数
IC50	Half maximal inhibitory concentration	50%抑制濃度
IgE	Immunoglobulin E	免疫グロブリン E
IV	Intravenous	静脈内
Ka	Association rate	会合速度定数
Kd	dissociation constant	解離定数
KD	Equilibrium dissociation constant	平衡解離定数
LMWH	Low molecular weight heparin	低分子ヘパリン
mAb	Monoclonal antibody	モノクローナル抗体
nC1-INH	Normal C1-esterase inhibitor	正常な C1-インアクチベーター
NMRI	Naval Medical Research Institute	Naval Medical Research Institute
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
PCA	Passive cutaneous anaphylaxis	受動的皮膚アナフィラキシー
PCK	H-D-Pro-Phe-Arg-chloromethyl ketone	H-D-Phe-Pro-Arg-クロロメチルケトン
PD	Pharmacodynamic	薬力学

略語・略号	英語	日本語
PSA	Passive systemic anaphylaxis	受動的全身性アナフィラキシー
PT	Prothrombin time	プロトロンビン時間
QTcR	QT corrected for heart rate	補正 QT
SC	Subcutaneous	皮下
TK	Toxicokinetic	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。CSL312 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。CSL312 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、CSL312 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。

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ガラダシマブ（garadacimab）の一連の非臨床薬理試験は、適切な動物種（カニクイザル、ウサギ及びマウス）を用いて、ガラダシマブとザイモーゲン血液凝固第 XII 因子（FXII）及びその活性型との物理化学的相互作用、並びに活性化第 XII 因子（FXIIa）を介する生物活性に対する特異的な阻害作用を in vitro 及び in vivo で明らかにするように構成した。ガラダシマブは親抗体である 3F7（[redacted]に対して特異的に指向する）の親和性成熟から得られたため、3F7 は動物モデル、特に 3F7 が強力な FXIIa 阻害作用を示したマウスでも用いた。3F7 又はガラダシマブを用いた一連の非臨床薬理試験では、以下の点を検討した。

- ヒト、カニクイザル、マウス及びウサギのザイモーゲン FXII 及び活性化 βFXIIa に対する結合親和性を in vitro で検討した。活性化した FXII の結合エピトープを明らかにするために、変異導入試験を実施した。また、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。
- 正常ヒトドナー、遺伝性血管性浮腫（HAE）（I/II 型）、正常な C1-インアクチベーター（nC1-INH）-HAE 及び後天性血管性浮腫（AAE-C1-INH）患者からの精製 FXIIa 及び活性化血漿を用いて、ガラダシマブの阻害活性を特徴付ける in vitro 試験を実施した。デキストラン硫酸（DXS）を介した FXII 活性化後の正常ヒト血漿及び HAE 患者血漿における血管作動性ペプチドブラジキニン（BK）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 とガラダシマブの in vivo での有効性と抗炎症作用を、BK を介したマウス浮腫モデルで検討した。これらのモデルには、活性化肥満細胞を介した受動的な全身及び皮膚アナフィラキシーモデル、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（ACEi）誘発浮腫が含まれている。
- ガラダシマブを用いた 2 つの単回投与非臨床薬物動態/薬力学（PD）試験を、カニクイザルを用いて実施した。
- 毒性試験に用いる動物種の選択を裏付けるため、カニクイザル、マウス、ラット、ウサギ及びヒト血漿の DXS を介した活性化に対する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、中枢神経系（CNS）、心血管系への影響評価及び呼吸系に対する追加試験は、マウス及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験に組み込んで実施した。
- 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）を評価するために、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。

要約すると、ガラダシマブは活性化ヒト FXII に高親和性（0.14 nM）で結合し、ザイモーゲンには低親和性（55 nM）で結合した。ガラダシマブの阻害作用を検討した in vitro 試験は、正常なヒトドナー、HAE 及び AAE-C1-INH の患者の接触相活性化血漿を用いて実施した。ガラダシマブは、FXIIa の発色性活性と BK 産生を強力に阻害した。また、ガラダシマブは、カニクイザル、ウサギ及びマウス等の多くの動物種の接触相活性化血漿中の 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。

抗体の効力評価用のマウスモデルは、既知の BK を介する浮腫形成に基づき選択した。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抑制することができた。

また、ガラダシマブや 3F7 抗体による FXIIa の阻害は、出血リスクを高めることなく、マウスやウサギの実験的血栓症を強力に抑制したことも、作用機序に起因する有益な作用である。

マウスを用いた安全性薬理試験において、ガラダシマブ投与による肺機能への影響を検討した。この試験は、呼吸系パラメータへの潜在的な影響を調べるのに適切な種であることから、プレチスモグラフィーを用いた確立されたモデルで、覚醒下のマウスを用いて実施した。また、心血管系及び呼吸系への影響に関する安全性薬理評価はカニクイザルを用いた反復投与毒性試験で、CNS への影響に関する安全性薬理評価はマウスを用いた反復投与毒性試験に組み込んで実施した。要約すると、呼吸系、神経系及び心血管系の機能はガラダシマブの投与によって影響を受けなかった。

表 2.6.2-1 に、薬理試験の一覧を示した。

表 2.6.2-1　薬理試験

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-C1-INH	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 withoutincreased 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

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 バイオセンサーデータ：CSL312 の FXII 及び βFXIIa への結合（試験番号 REP-21280）

SPR（表面プラズモン共鳴）バイオセンサー解析により、ガラダシマブ及び親抗体である 3F7 の複数動物種の FXII 及び βFXIIa への結合に関する反応速度定数（会合速度［Ka］、解離速度［kd］、平衡解離定数［KD］）及び親和性を測定した。

親抗体である 3F7 は、ヒト βFXIIa（KD=3 nM）に対する結合親和性が、ヒトザイモーゲン FXII（KD=56 nM）に対する結合親和性と比較して 20 倍程度高いことがわかる。ガラダシマブは、3F7 親抗体と比較して、ヒトザイモーゲン FXII（55 nM）に対する親和性を維持し、ヒト βFXIIa（KD=0.14 nM）に対する親和性は約 20 倍強かった（表 2.6.2-2）。

表 2.6.2-2 抗 FXII 抗体ガラダシマブ及び 3F7 のヒト FXII 及びヒト βFXIIa に対する結合親和性

Antibody	Antigen	Ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
garadacimab	human FXII	1.0 × 106	5.7 × 10-2	55.0
garadacimab	human βFXIIa	6.0 × 105	8.5 × 10-5	0.14
3F7	human FXII	8.2 × 103	4.6 × 10-5	56
3F7	human βFXIIa	3.2 × 105	1.0 × 10-3	3

Abbreviations: FXIIa=activated factor XII; FXII=factor XII; Ka=association rate; KD=equilibrium dissociation constant; kd=dissociation rate

さらに、in vivo 薬理試験を裏付けるために、マウス及びウサギの FXII タンパク質に対するガラダシマブ及び 3F7 の結合親和性を検討した。マウス及びウサギの βFXIIa に対するガラダシマブの親和性はそれぞれ 0.7 及び 0.4 nM と比較的高く、親抗体の 3F7 よりも強い親和性を示した（表 2.6.2-3）。

ヒト FXII（表 2.6.2-2）でみられたのと同様に、ガラダシマブは、カニクイザルにおいてもザイモーゲン FXII（KD=143 nM）と比較して、βFXIIa（KD=19 nM）に対して約 10 倍高い結合親和性を示した（表 2.6.2-3）。カニクイザル FXII タンパク質への 3F7 結合については、データがない。

表 2.6.2-3 抗 FXII 抗体ガラダシマブ及び 3F7 のマウス、ウサギ及びカニクイザル FXII タンパク質に対する結合親和性

Antibody	Antigen	KD (nM)
garadacimab	mouse FXII	800
garadacimab	mouse FXIIa	0.3
garadacimab	mouse βFXIIa	0.7
3F7	mouse FXII	6132
3F7	mouse FXIIa	3.5
3F7	mouse βFXIIa	6
garadacimab	rabbit FXII	0.3
garadacimab	rabbit FXIIa	0.1
garadacimab	rabbit βFXIIa	0.4

Antibody	Antigen	KD (nM)
3F7	rabbit FXII	5.6
3F7	rabbit FXIIa	3.4
3F7	rabbit βFXIIa	6.6
garadacimab	cynomolgus monkey FXII	143
garadacimab	cynomolgus monkey βFXIIa	19

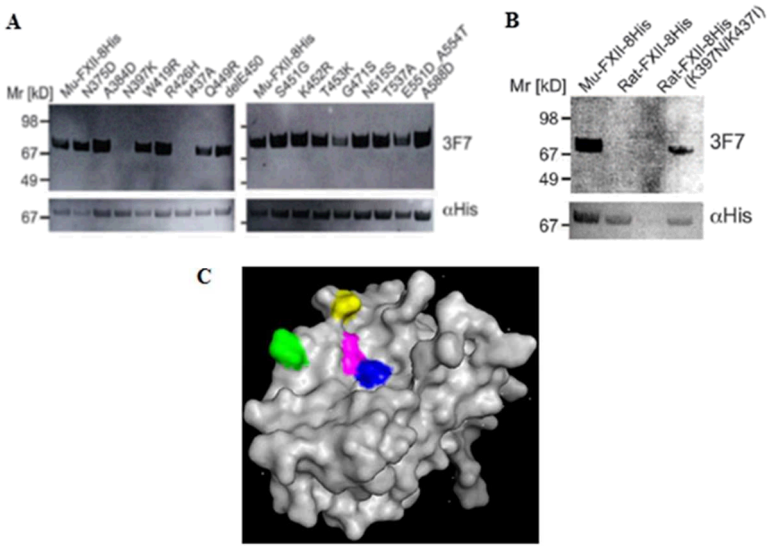
Abbreviations: β-FXIIa=active catalytic fragment of FXII; FXIIa=activated factor XII; FXII=factor XII; KD=equilibrium dissociation constant

全体として、ガラダシマブはヒト βFXIIa に高い親和性を示し、マウス、ウサギ及びカニクイザル βFXIIa に対して交差反応を示す。試験したすべての相互作用において、ガラダシマブは親抗体の 3F7 よりもザイモーゲン FXII 及び βFXIIa の両方に対して強い親和性を示した。

2.6.2.2.2 3F7 のエピトープマッピング（試験番号 REP-21279）

マウスセリンプロテアーゼドメインを用いて 3F7 エピトープを明らかにするために、部位特異的変異導入を実施した。3F7 がラット FXII に結合しないという知見を用いて変異導入のための標的エピトープを決定した。変異導入は、マウス FXII 軽鎖のアミノ酸残基のうち、同じ位置のラット残基と有意な差がある残基を標的とした。その後、マウス FXII 変異体を発現させ、ウェスタンブロット分析を用いて 3F7 結合を評価した。

図 2.6.2-1 3F7 のエピトープマッピング



A) Single amino acids where mutated in murine FXII and variants expressed in Freestyle 293 cells, affinity purified and analyzed for binding to 3F7 by Western blotting. Stripped membranes were reprobed with anti-6xHIS antibodies to confirm equal protein loading.
B) Rescue of rat FXII (Rat-FXII-8His), and a rat FXII variant in which residues 397 and 437 were mutated to their murine orthologous (Rat-FXII-8His K397N/K437I) were probed with 3F7 in western blot analysis (upper panel). Anti-6xHis antibodies confirmed equal protein loading (lower panel).
C) The key 3F7 epitope residues (D397 in yellow and V437 in green) were mapped onto the recently published crystal structure of FXII protease domain [Pathak et al, 2015]. The surface exposed catalytic triad residues H393 (magenta) and S544 (blue) are also shown.

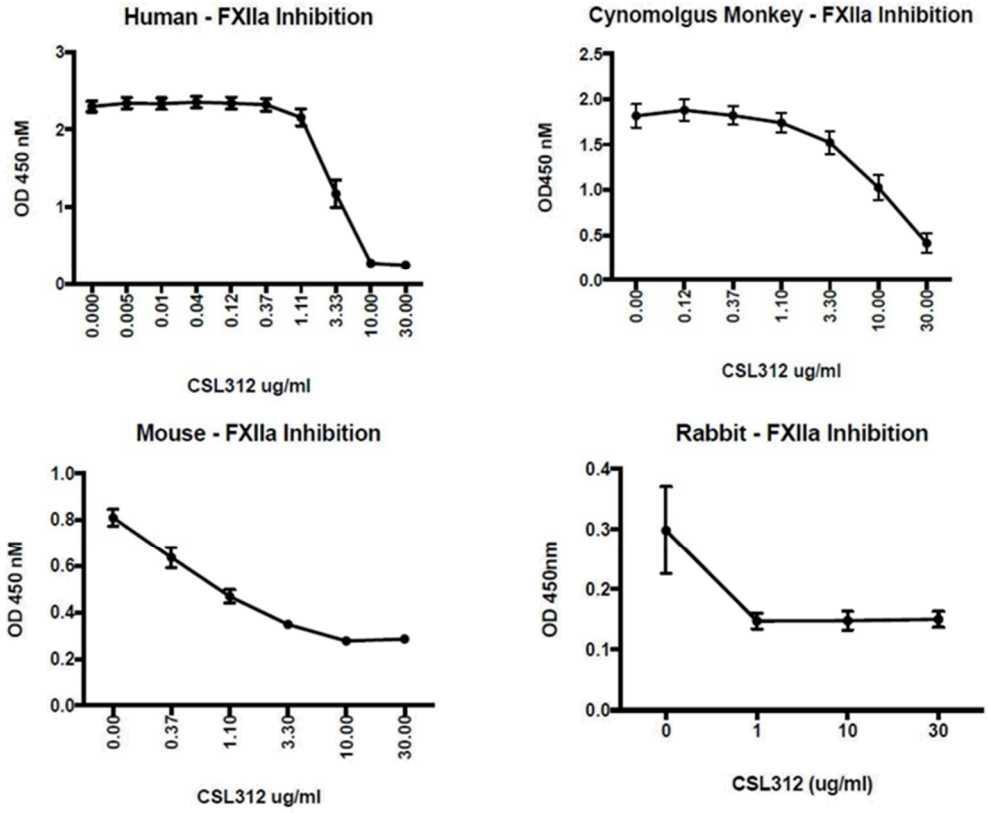
図 2.6.2-1A に示すように、3F7 は N397K 及び I437 変異体に結合することができず、これらの残基が 3F7/FXIIa 相互作用に重要であることを示している。これらの残基の重要な役割を確認するために、レスキュー法によりラット FXII の 2 つの残基をオルソログのマウス残基に変異させた。ラット FXII の K397N と K437I の交換は、この変異体への 3F7 結合を可能にするのに十分であり（図 2.6.2-1B）、これらのアミノ酸残基が 3F7 エピトープに重要であることが確認された。

ヒト FXII プロテアーゼドメインの結晶構造上の残基 397 と 437 のマッピングにより、これらの残基は表面に露出し、触媒三残基に該当する H393 と S544 に近接していることがわかった（図 2.6.2-1C）。このことは、活性化した FXII の触媒部位に結合し、その活性を強力に阻害する 3F7 とガラダシマブの役割を裏付けている。

2.6.2.2.3 非ヒト動物種における FXII 活性と CSL312 による阻害作用（試験番号 REP-21282）

FXII 活性は、非ヒト動物種（カニクイザル、マウス、ウサギ）を用いて分析し、ヒトと比較した。すべての動物種の血漿サンプルを、漸増量のガラダシマブとインキュベートし、その後 DXS で刺激した。ガラダシマブによる FXIIa 活性の阻害は、基質[redacted]を用いた発色性合成基質法で測定した。

図 2.6.2-2　ガラダシマブの各種活性化血漿中 FXIIa 発色性活性の抑制作用



FXIIa activity in A) human (n=28), B) monkey (n=8), C) mouse (n=7) and D) rabbit (n=4) plasma was assessed by stimulating diluted plasma samples with 1 ug/ml of dextran sulphate.

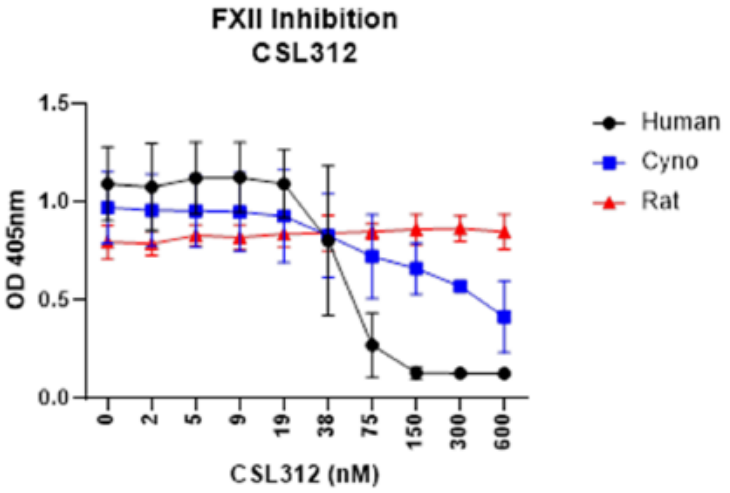
カニクイザルはヒトと同等な FXII 活性を示し、ガラダシマブ濃度 0 µg/mL で高い光学濃度（OD 値）を示した。対照的に、マウス及びウサギは FXII 活性が非常に低かった。これは、これらの動物種では血中 FXII の基礎濃度が低く、ヒト及びサルは同程度の濃度（約 30 µg/mL）を示したことと関連している可能性がある（図 2.6.2-2）。

試験したすべての動物種において、ガラダシマブは用量依存的に FXIIa を阻害することができた。

2.6.2.2.4　非ヒト動物種における CSL312 の結合と有効性（試験番号 REP-009151）

ガラダシマブのカニクイザル及びラットの FXII への結合及び活性化阻害作用をヒト FXII と比較して検討した。すべての動物種の血漿サンプルを、漸増濃度のガラダシマブとインキュベートし、その後 DXS で刺激した。

図 2.6.2-3　FXIIa の発色性活性



Inhibition of FXIIa activity with CSL312 (garadacimab) was measured with a chromogenic-based assay utilising substrate [redacted]. Human (n=3), cyno (n=2) and rat (n=2) plasma sample were incubated with increasing CSL312 concentrations for 5 min prior to activation of the plasma with dextran sulfate (10 µg/mL). 5 min later FXII chromogenic substrate [redacted] was added and samples measured spectrophotometrically at 405 nm.

ヒト及びカニクイザルの血漿サンプルでは、同程度の濃度のガラダシマブで FXIIa 阻害作用が認められた。しかし、ラット FXII に対する阻害作用は認められず、ラット FXII に対してガラダシマブは交差反応性を示さなかった（図 2.6.2-3）。

したがって、これらのデータはラットが薬理学的に適切な動物種ではないことを示している。

2.6.2.2.5　CSL312 のヒト FXII に対する特異性（試験番号 INV_11-01_BN）

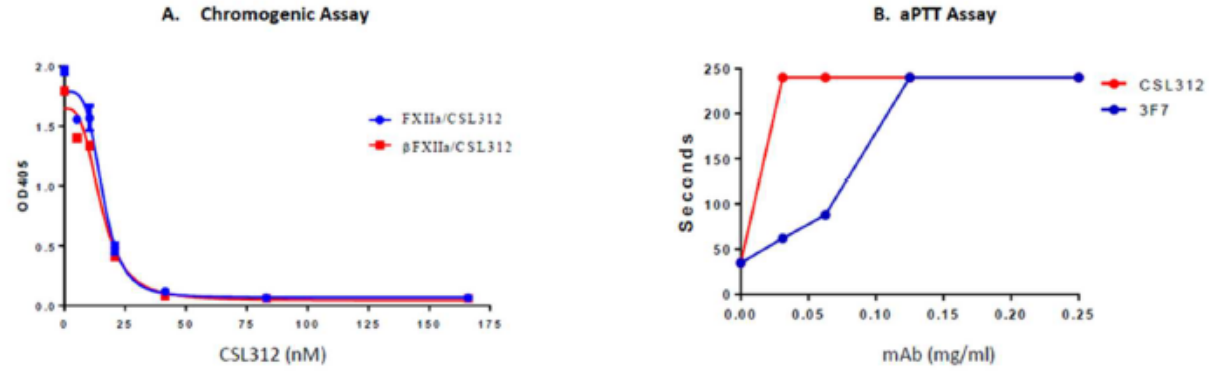
ヒト FXII に対するガラダシマブの特異性を明らかにするため、構造的に関連するヒトセリンプロテアーゼのパネル（活性化血液凝固 VII 因子、活性化血液凝固 IX 因子、活性化血液凝固 X 因子、活性化血液凝固 XI 因子、カリクレイン、組織プラスミノーゲンアクチベーター、活性化プロテイン C、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター、プラスミン）の触媒活性に対する阻害能を精製酵素を用いて in vitro で検討した。

ガラダシマブは強力な FXII 阻害薬であり、酵素：抗体の比率を 1：0.5 でインキュベートすると、触媒活性（FXIIa 及び βFXIIa）を 100%阻害した。一方、構造的に関連するセリンプロテアーゼの阻害作用について、酵素と抗体の比率を 1：500 まで上げて試験したところ、どのプロテアーゼについても、試験したガラダシマブの最高濃度においても 50%阻害濃度（IC_{50}）に達しなかった。

2.6.2.2.6　In vitro FXIIa アミド分解活性及び aPTT 測定（試験番号 REP-21290）

ガラダシマブの阻害作用は、精製したヒト FXIIa 及び βFXIIa を用いた in vitro 発色性合成基質法、及び接触を介した FXII 活性化後の内因性凝固経路の活性を測定する活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）検査により検討した。また、aPTT 測定において、ガラダシマブの効力を親抗体の 3F7 と比較した。

図 2.6.2-4　抗 FXIIa 抗体の in vitro 効力試験



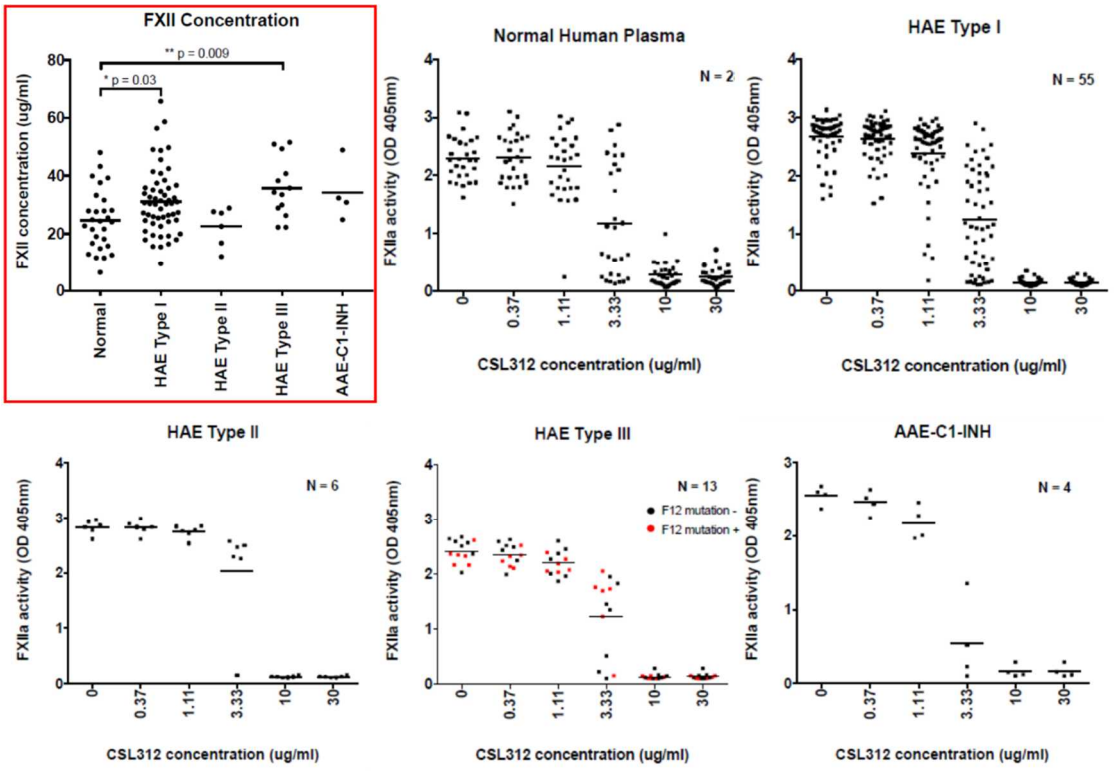
A) CSL312 (garadacimab) inhibition of human FXIIa and βFXIIa amidolytic activity.
B) Dose-dependent prolongation of aPTT clotting time in human plasma with CSL312 and the parental 3F7 antibody.

ガラダシマブは、ヒト FXIIa と βFXIIa の両方のアミド分解活性に対して強い阻害作用を示した（図 2.6.2-4A）。62.5 nM の FXIIa 存在下でガラダシマブは FXIIa 活性を阻害し、その IC_{50} 値は 15 nM であった。ガラダシマブと親抗体の 3F7 のいずれも aPTT 凝固時間を最大値（240 秒）まで延長したが、ガラダシマブは、3F7 と比較して aPTT 延長作用が約 4 倍強かった。（図 2.6.2-4B）。

2.6.2.2.7　CSL312 の正常ヒトドナー並びに HAE I/II 型、nC1-INH-HAE 及び AAE-C1-INH 患者の活性化血漿における FXIIa 発色性活性阻害作用（試験番号 REP-21283）

ガラダシマブによる血漿サンプル中の FXIIa 活性阻害は、基質[redacted]を用いた発色性合成基質法により測定した。

図 2.6.2-5　ガラダシマブの正常ヒトドナー、HAE I/II/III 型及び AAE-C1-INH 患者の活性化血漿における FXIIa 発色性活性に対する阻害作用



Abbreviations: AAE-C1-INH=acquired angioedema; FXII=factor XII; HAE=hereditary angioedema.

ガラダシマブは、正常ヒト血漿、HAE I/II 型、nC1-INH-HAE（HAE III 型）及び AAE-C1-INH 患者の血漿の DXS による活性化後の FXIIa 発色性活性を強力に阻害する。DXS は、FXII の初期接触相活性化によりカリクレイン・キニン経路を活性化し、HAE 発作の開始を模して BK を介した病的腫脹をもたらす。これらの実験では、血漿を 1：9 に希釈した。FXII T309K/R 変異を有する nC1-INH-HAE 患者の血漿を含む試験したすべての血漿サンプルについて、FXII 発色性活性はガラダシマブ 10 µg/mL で強く阻害された（図 2.6.2-5）。試験したサンプルにおける FXII 濃度の範囲（図 2.6.2-5、赤枠）を考慮すると、完全な阻害には FXII に対するガラダシマブのほぼ等モル濃度が必要であると考えられる。これは、精製 FXIIa を用いた発色性合成基質法で認められた結果と同様である（図 2.6.2-4A）。

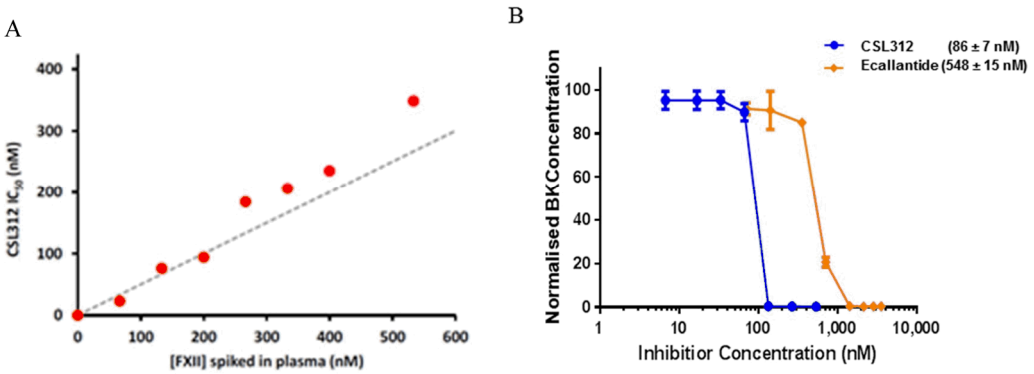
2.6.2.2.8　接触相活性化後のヒト血漿における BK 産生阻害（試験番号 REP-21245）

ガラダシマブは、接触相活性化後の血漿（正常人及び HAE 患者）において FXIIa 発色性活性を強く阻害したが、濃縮血漿の色が発色性合成基質法を妨害したため、未希釈の血漿を試験することができなかった。臨床におけるガラダシマブの効果をよりよくモデル化するために、BK 測定用の高感度質量分析法を開発した。BK はカリクレインによる高分子キニノーゲンの切断後

に産生される最終的な血管作動性ペプチドで、HAE 発作における浮腫の原因であることが一般的に認められている。

未希釈のヒト血漿は、ガラダシマブ及び同位体標識内部 BK 標準物質を添加する前に、BK 分解を最小限に抑えるための阻害薬のカクテルで処理し、定量を容易にした。血漿の活性化を 100 µg/mL の DXS で開始し、産生した BK をメタノールで抽出し、回収した内部標準物質を用いて定量した。

図 2.6.2-6　ガラダシマブの接触相活性化後の血漿中 BK 産生阻害作用



Abbreviations: BK=bradykinin; FXII=factor XII.
A) Titration of FXII deficient human plasma with human FXII zymogen and correlation with CSL312 (garadacimab) inhibitory activity.
B) Comparative potency of CSL312 with a current HAE product, ecallantide (IC_{50} values in Figure key).

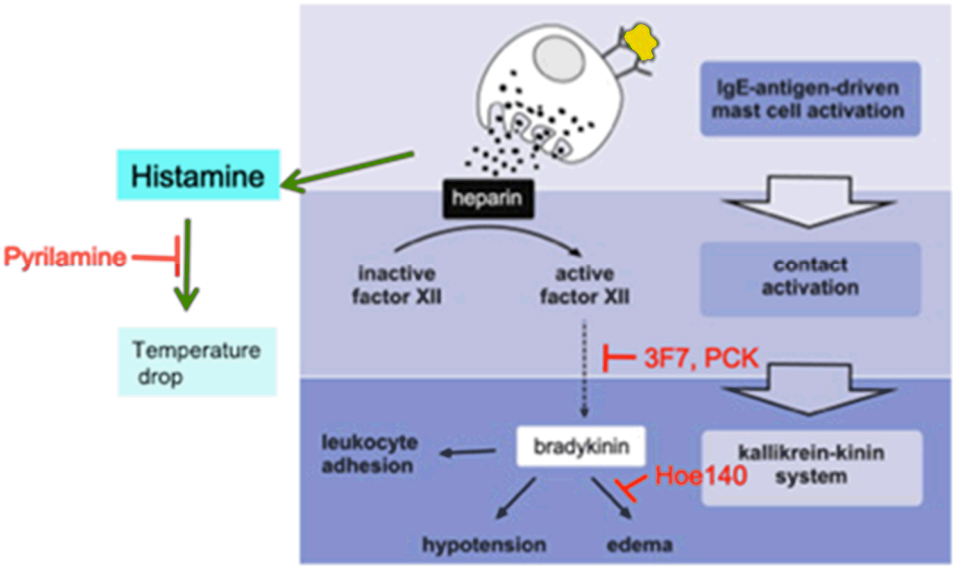
ガラダシマブは、100 µg/mL DXS による強固な接触相活性化後のヒト血漿中の BK 産生を完全に阻害した（図 2.6.2-6）。ガラダシマブの IC_{50} 値を FXII 濃度に対してプロットすると、線形相関が認められた（図 2.6.2-6A）。さらに、この線形相関は、実験データが理論的な 2：1 の点線とほぼ一致することによって明らかなように、FXII：モノクローナル抗体（mAb）が 2：1 であることと一致している。この比率は、各抗原結合フラグメント（フラグメント抗原結合；Fab）アーム上に 2 つの FXIIa 結合部位を有するガラダシマブの構造及び分子デザインと合致する。したがって、カリクレイン・キニン系活性化のエンドポイントの一つである BK を測定することにより、ガラダシマブの IC_{50} 値が FXII 濃度に直線的に依存し、これは FXII：mAb 比 2：1 に従うことが実験的に示されている。

健康な被験者から採取したヒト血漿をプールして用いると、ガラダシマブの BK 産生阻害作用は、HAE の治療に用いられる承認品の一つであるカリクレイン阻害薬の ecallantide（国内未承認）と比較して有意に強かった（図 2.6.2-6 B）。

2.6.2.2.9 3F7 の受動的全身性アナフィラキシー（PSA）及び受動的皮膚アナフィラキシー（PCA）における肥満細胞のヘパリン誘発浮腫抑制作用（試験番号 REP-21269、REP-21268）

HAE 発作がカリクレイン・キニン系の活性化に伴って産生される BK を介することは文献上一般的に認められているが、その発作の誘因は必ずしも明らかではない。FXII 依存性の免疫グロブリン E（IgE）を介した肥満細胞の活性化のマウスモデルは、in vivo でヘパリンによる BK 産生により血管透過性を高めることが示されている（図 2.6.2-7）。

図 2.6.2-7 肥満細胞由来ヘパリンによる BK を介する浮腫の誘発



Abbreviations: 3F7=anti-FXIIa parental antibody; Hoe140=a bradykinin receptor inhibitor; PCK=H-D-Pro-Phe-Arg-chloromethyl ketone, a non-specific FXIIa inhibitor; Pyrilamine=an anti-histamine H1 receptor antagonist
Source: Adapted from Oschatz et al, 2011

患者を対象とした最近の研究で、これらの知見が支持され、FXII により開始される接触相の活性化がアナフィラキシーに寄与していることが示された［Sala-Cunill et al, 2015］。

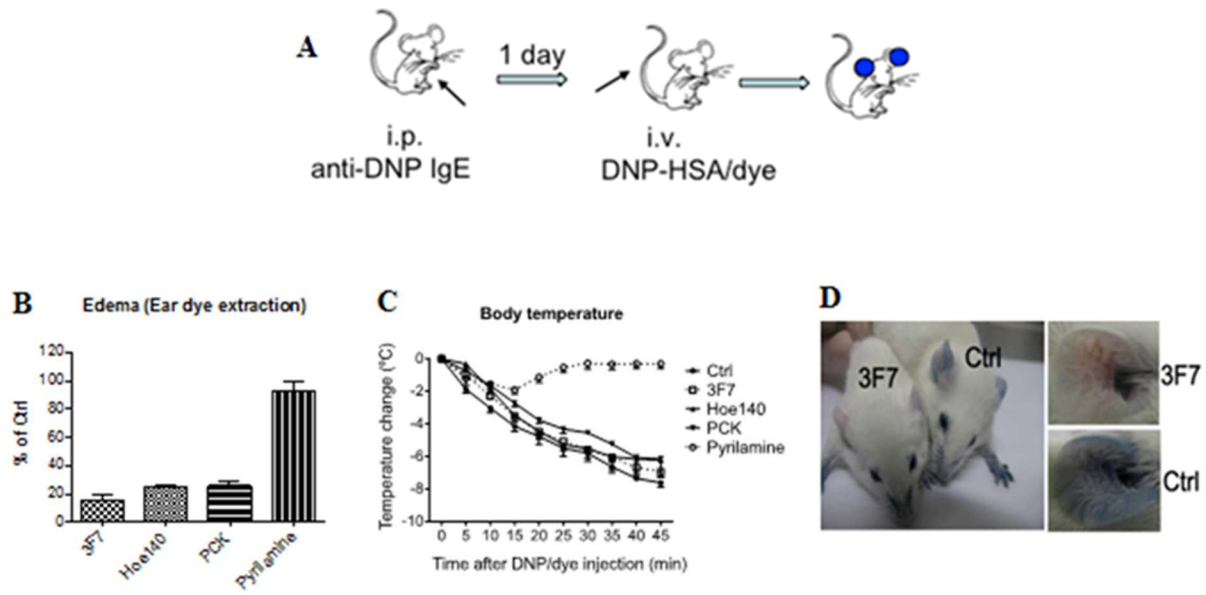
PSA モデルでは、3F7 は BK を介した浮腫形成の強力な阻害薬であり、Hoe 140（イカチバント）及び H-D-Pro-Phe-Arg-クロロメチルケトン（非特異的 FXIIa 阻害薬、［PCK］）と比較して高い効力を示した（図 2.6.2-8）。患者における HAE 発作は一般に身体の特定の部位に限局しているため、局所的な浮腫モデルとして PCA アッセイにおける 3F7 の治療効果も検討した。図 2.6.2-9B に示すように、3F7 は、浮腫形成を用量依存的に阻害した。検討したすべての阻害薬が同等の阻害を示した PSA モデルと比較して、PCA モデルにおいて 3F7 はより強力な効力を示した（図 2.6.2-9C）。

現在承認されている HAE の治療薬であるイカチバント及び ecallantide（国内未承認）は、分子量が小さい化学物質であるため血中半減期が短く、投与後急速に作用が消失する。3F7 とガラ

ダシマブはモノクローナル抗体であり、その性質上、血中半減期が長いため、PCA 誘発の 10 分前又は 4 時間前に阻害薬を投与して、浮腫抑制を延長する可能性があるかを検討した（図 2.6.2-9C）。3F7 は 10 分前又は 4 時間前の投与に関わらずその活性をすべて保持していたが、他の阻害薬は PCA の 4 時間前に投与すると一部又はすべての活性が失われた。この結果は、ガラダシマブが浮腫を長時間抑制する可能性を有することを裏付けるものであり、予防的な使用に関連するものである。

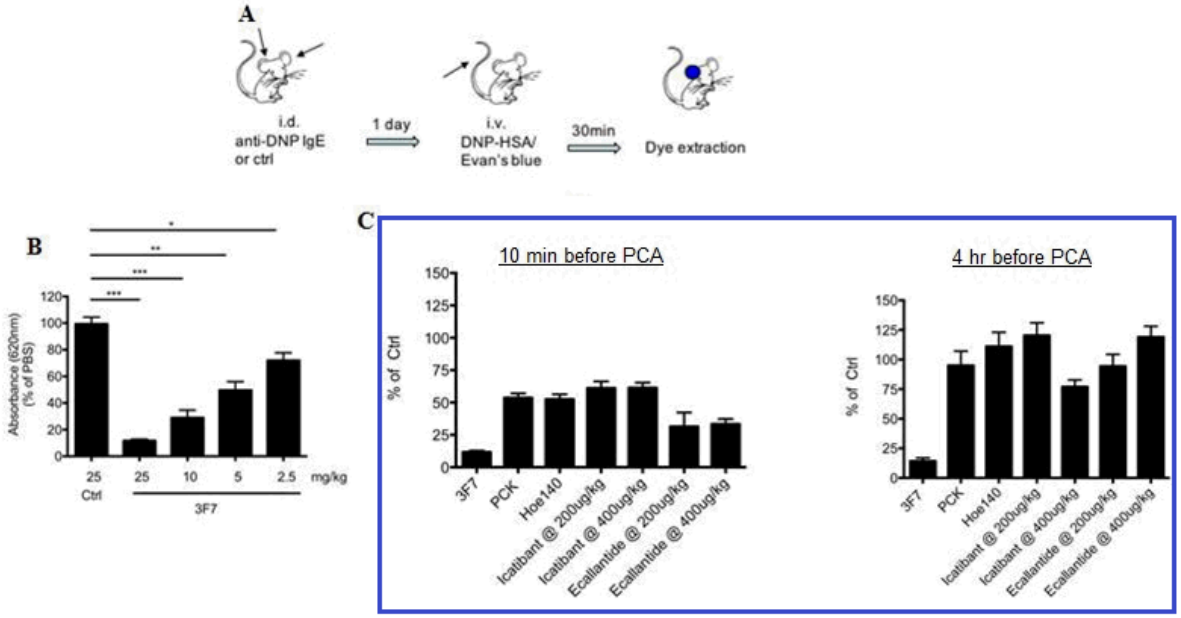
その後の試験で、抗体 3F7 とガラダシマブをマウス PCA モデルで比較した（図 2.6.2-10）。このモデルでは、どちらの抗体も浮腫の形成を有意に抑制したが、3F7 は試験した 3F7 の最高用量においてガラダシマブよりも高い効力を示した。

図 2.6.2-8　3F7 の PSA モデルにおける肥満細胞ヘパリン誘発浮腫抑制作用



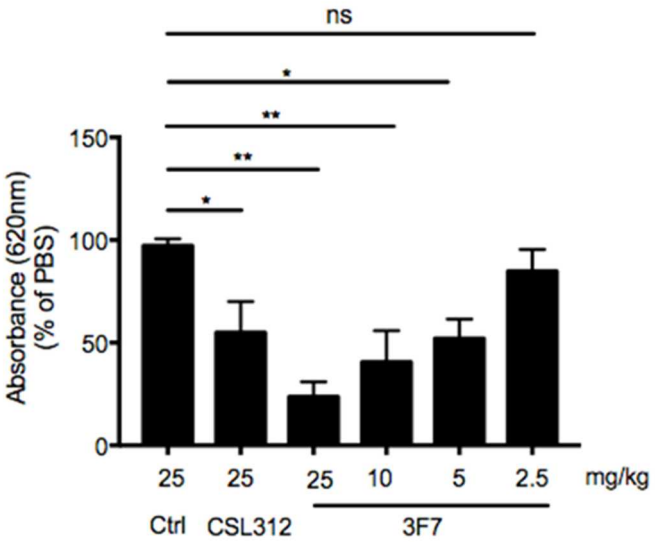
Abbreviations: 3F7=anti-FXIIa parental antibody; Ctrl=control; DNP=dinitrophenyl; HSA=human serum albumin; IP=intraperitoneal; PCK=H-D-Pro-Phe-Arg-chloromethyl ketone, a non-specific FXIIa inhibitor; PSA=Passive systemic anaphylaxis.
A) To induce systemic anaphylaxis, mice were sensitized by intraperitoneal (IP) injection of 1 mg/kg anti-dinitrophenyl IgE for 24 h. Anaphylaxis was initiated by intravenous (tail vein, IV) injection of 200 µl of 0.5% Evans blue solution containing 200 µg of DNP-HSA 40 minutes after the antigen challenge, increase in vascular permeability was evaluated by dye extraction of the ear skin, which was conducted in 0.5 mL dimethylformamide at 55°C overnight. The absorbance of the extracted dye was measured with a spectrophotometer at 620 nm.
B) Ten minutes or 30 minutes prior to the induction of anaphylaxis the bradykinin receptor inhibitor Hoe 140 (175 µg/kg, IV), the non-specific FXIIa inhibitor PCK (8 mg/kg IV), or the anti-histamine H1 receptor antagonist pyrilamine (2.5 mg/kg, IV) were administered. Four hours prior to the induction of anaphylaxis, 3F7 (0.5 mg, IP) was administered. Edema was evaluated as described in part A.
C) Animals treated as described in part B were monitored for body temperature following anaphylaxis induction. Only the anti-histamine pyrilamine stabilized body temperature.
D) Visualization of 3F7-mediated inhibition of vascular permeability and edema in the PSA model.

図 2.6.2-9　3F7 の PCA モデルにおける肥満細胞ヘパリン誘発浮腫抑制作用



Abbreviations: Ctrl=control; DNP=dinitrophenyl; HSA=human serum albumin; ID=intradermal; IP=intraperitoneal; IV=intravenous; PCA=Passive cutaneous anaphylaxis; PCK=H-D-Pro-Phe-Arg-chloromethyl ketone;
A) To induce local cutaneous anaphylaxis, 20 ng of anti-DNP IgE in 10 µl of saline were intra-dermally injected into ear skin. The PCA reaction was induced 24 h later by an IV administration of 100 µg DNP-HSA in 200 µl of 0.5% Evan blue. After 30 minutes the mice were sacrificed and increase in vascular permeability was assessed in the ear skin as described in the PSA model (Figure 2.6.2-8A).
B) Four hours prior to antigen challenge, 3F7 (2.5 – 25 mg/kg) was administered IP and edema quantified in comparison to PBS treated animals.
C) Effectiveness of inhibitors administered 10 minutes or 4 hours prior to induction of PCA. Doses used for 3F7, PCK and Hoe 140 as detailed in (Figure 2.6.2-8B).

図 2.6.2-10　マウス PCA モデルにおける 3F7 及びガラダシマブの作用



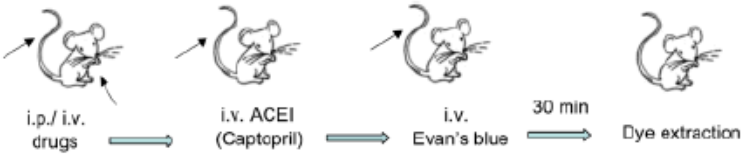
Abbreviations: 3F7=anti-FXIIa parental antibody; CSL312 (garadacimab)=affinity-matured anti-FXIIa antibody; Ctrl=isotype control antibody; PBS=phosphate buffered saline

2.6.2.2.10 C1-INH 欠損マウスにおける ACEi 誘発浮腫の抑制（試験番号 REP-21267）

3F7 及びガラダシマブはいずれも、ACEi 誘発浮腫マウスモデルにおいて、0.5 mg/kg 以上の用量で浮腫を消失させた（図 2.6.2-11）。3F7 抗体では、最大阻害に必要な抗体量は、0.5 mg（約 25 mg/kg）が必要であった PCA モデルと比較して、約 40 倍少なかった（図 2.6.2-9B）。

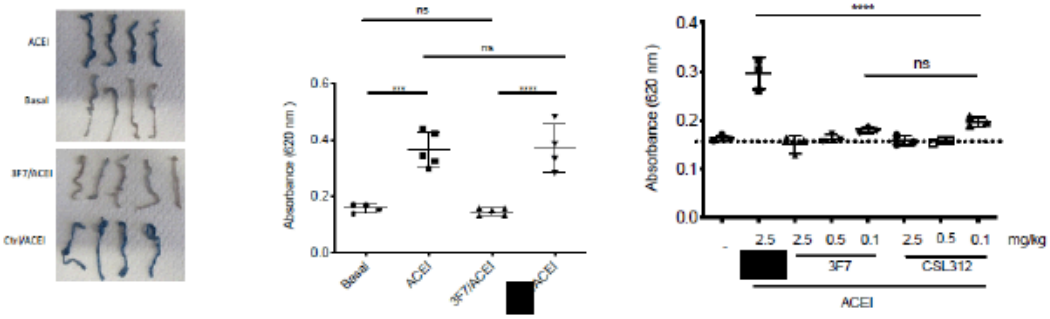
図 2.6.2-11 C1-INH 欠損マウスにおける ACEi 誘発血管浮腫に対する 3F7 及びガラダシマブの作用評価

A



B

C



Abbreviations: IP=intraperitoneal; IV=intravenous; mAb=monoclonal antibody; NS=no significance; PSA=Passive systemic anaphylaxis.
A) Mice were treated intravenously with 2.5 mg/kg of ACEi captopril (Sigma). Five minutes later, Evans blue dye (30 mg/kg) in saline was injected into mice via the tail vein. After 30 minutes, colons were removed and Evans blue extracted with 0.5 ml dimethylformamide at 55°C overnight and quantitated spectrophotometrically at 620 nm as described for the PSA models (Figure 2.6.2-8A)
B) Captopril treatment results in significant edema in mouse colons which is completely inhibited by 3F7 (IP) given 4 hours prior to captopril/dye administration. Isotype control antibody [redacted] showed no effect on edema. Statistically significant differences in values between groups were calculated using Ordinary One-way ANOVA with the Tukey's test for multiple comparisons.. A p value < 0.05 was considered statistically significant. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. All data is expressed as the mean±SD.
C) CSL312 (garadacimab) shows comparable efficacy to 3F7 in this mouse model.

2.6.2.2.11 毒性試験のための動物種の選択

ガラダシマブの毒性試験における動物種の選択を容易にするため、薬理学的に適切な動物種を特定するいくつかの in vitro 試験を実施した。

複数動物種（ヒト、カニクイザル、ウサギ及びマウス）の FXII 及び βFXIIa に対するガラダシマブの結合親和性を Biacore 法により検討した（試験番号 REP-21280）。

ヒト FXII への結合で認められたのと同様に（表 2.6.2-2）、ガラダシマブは、ザイモーゲンと比較して、活性化したカニクイザル及びマウス βFXIIa に優先的に結合する。一方、ガラダシマブはウサギザイモーゲン FXII 並びに活性化 FXIIa 及び βFXIIa のいずれにも同等の高い親和性で結合する（表 2.6.2-3）（詳細は 2.6.2.2.1 を参照）。

FXIIa 活性阻害作用は、カニクイザル、マウス、ウサギ（試験番号 REP-21282）及びラット（試験番号 REP-009151）において、発色性合成基質法を用いて検討し、ヒト試料と比較した。

ガラダシマブは、ヒト、カニクイザル、マウス及びウサギの希釈血漿において、DXS を介した FXII 活性を阻害し、毒性試験においてこれらの動物種を用いる可能性を裏付けている（図 2.6.2-2）（詳細は 2.6.2.2.3 を参照）。

ラット FXIIa に対する阻害は認められず、ガラダシマブのラット FXIIa に対する交差反応性がないことが示された（図 2.6.2-3）。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 2.6.2.2.4 を参照）。

動物種選択でのカニクイザルの適合性をさらに評価するため、質量分析に基づくアッセイ（試験番号 REP-21245）を用いて、ガラダシマブの無希釈血漿における BK 産生阻害作用を検討した（詳細は 2.6.2.2.8 を参照）。

表 2.6.2-4　ガラダシマブの接触相活性化後の血漿中 BK 産生抑制作用

Sample	**IC_{50} (nM) (per mAb binding site)**
Human pooled	170±9
Cyno FM51	403±3
Cyno FM71	274±3
Cyno FM87	437±4
Cyno FM157	274±2
Cyno mean	312±108

Note: Human pooled plasma and individual plasma samples from 4 cynomolgus monkeys were activated with dextran sulfate and bradykinin quantified as described in Report REP-21245.

ガラダシマブは、ヒト血漿（健康な被験者のプール血漿）において、カニクイザル血漿の平均値（n=4）と比較して約 2 倍強力である（表 2.6.2-4）。ヒル係数に有意差は認められなかった（本項ではデータを表示しない）。

カニクイザルとヒトの IC_{50} 値は 2 倍以内であり、一連の非臨床毒性試験における動物種を選択したことを裏付けるものである。

以上のことから、入手可能な in vitro データ及び非臨床 in vivo PD データに基づいて、マウス、ウサギ及びカニクイザルをそれぞれ毒性試験に適切なげっ歯類及び非げっ歯類の動物種として選択した。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 血栓症

マウス及びウサギの適切な血栓及び出血モデルを用いて、ガラダシマブ及び 3F7 の抗血栓作用（及び出血リスクの増加の可能性）を評価した。

2.6.2.3.1.1 3F7 の出血リスクと実験的血栓症抑制作用［Larsson et al, 2014］

FXIIa は凝固の内因性経路も活性化するので、3F7 のマウス頸動脈に惹起される血栓症に対する抑制作用を検討した。

3F7（用量 5 mg/kg 以上）は、FXIIa 凝固活性を消失させる一方で、マウス塩化鉄（III）（$FeCl_3$）誘発血栓症モデルにおいて血管閉塞を完全に抑制した。さらに、3F7 は試験した最高用量（30 mg/kg）において、プロトロンビン時間（PT）（9.2～13.0 秒）に影響を与えずに aPTT を最大値（125 秒以上）まで用量依存的に延長させた。FXIIa を薬理学的に阻害しても、血栓症を完全に抑制し、FXIIa を最大に阻害する用量（5 及び 25 mg/kg）で止血能は低下しなかった［Larsson et al, 2014］.

さらに、3F7 の抗凝固作用について、動静脈シャントモデルを用いたウサギでの試験も実施された。シャントは左頸動脈と右外頸静脈を結び、血栓形成を評価するためのガラスマイクロチャンバーを備えている。生理食塩液を投与した対照群では、平均重量 126±23 mg の血栓で 9～11 分以内にチャンバーが閉塞した。一方、ヘパリン（300 IU/kg）又は 3F7（7 mg/kg）を投与したウサギでは、60 分の灌流時間内にシャントは閉塞せず、3F7 を投与した 1 例の動物で重量 2 mg の微小血栓が検出されたのみであった。ヘパリン及び 3F7 は同様の血栓予防作用を示したが、止血作用は異なっていた。ヘパリンは出血時間を大幅に延長し、皮膚切開及び標準化された腎臓の傷からの出血を増加させた。一方、皮膚及び腎臓の傷からの出血は、生理食塩液を投与した対照と比較して 3F7 を投与したウサギでは増加しなかった［Larsson et al, 2014］。

3F7 の抗血栓作用についてもウサギを用いて検討した。この研究では、体外式膜型人工肺（ECMO）の心肺バイパスシステムが FXII を容易に活性化し、フィブリンの産生と血栓症を引き起こすことが示された。ウサギには ECMO 開始の 5 分前にヘパリン（50 IU/kg）又は 3F7（7 mg/kg）を単回ボーラスで前投与した。どちらの投与も、6 時間の試験期間中、回路内の血栓を抑制した。生理食塩液を前投与した動物は、実験開始後 5 分以内に著しい血栓症が認められた。3F7 及びヘパリンはともに強固で長時間の血栓予防作用を示したが、ヘパリン投与動物は生理食塩液投与対照動物に比べ、出血（皮膚及び爪上皮出血時間並びに総出血量）が有意に増加した。3F7 を投与したウサギは出血リスクの増加を示さず、傷口からの出血の増加が明らかであったヘパリン投与ウサギとは対照的であった。まとめると、3F7 はマウス及びウサギにおいて、出血リスクを増加させることなく実験的血栓症を抑制する［Larsson et al, 2014］。

2.6.2.3.1.2 CSL312 のウサギの同時血栓症モデルにおける作用（試験番号 REP-001415)

ガラダシマブの抗凝固作用について、ウサギの動脈・静脈同時血栓症モデルを用いて検討した。両側大腿動脈に $FeCl_3$ を異所性に投与して動脈血栓症を誘発し、同時に外頸静脈を閉塞して

静脈血栓症を誘発した。$FeCl_3$ 誘発傷害後の閉塞率及び閉塞までの時間（動脈）並びにうっ血誘発 3 時間後の血栓湿重量及び血栓スコア（静脈）を記録した。ウサギに等張生理食塩液、ガラダシマブ（10 mg/kg）又は低分子ヘパリン（LMWH）（フラグミン D、10 IU/kg/min）を血栓誘発 15 分前に IV 投与した。

ガラダシマブ投与動物 5 例は、いずれも $FeCl_3$ による動脈閉塞から完全に保護され、90 分の観察時間内に動脈閉塞は検出されなかった。等張生理食塩液を投与したウサギのうち 1 例では、90 分の観察期間内に動脈閉塞は検出されなかった。この生理食塩液対照群の残りの 4 例では、最初の閉塞（すなわち、最初の大腿動脈閉塞）までの平均時間は 28±5 分であった。LMWH を投与したウサギのうち、2 例は動脈閉塞を示さなかった。このグループの残りの 3 例は、2 本の大腿動脈のうち 1 本が安定して閉塞していた。これらの動物では、最初の閉塞までの平均時間は 37±10 分であった。

生理食塩液対照と比較すると、ガラダシマブ投与後の平均静脈血栓湿重量及び血栓スコアには統計的に有意な差は検出されなかったが、LMWH は静脈血栓症を有意に減少させた。FXIIa 活性は、ガラダシマブ投与ウサギで完全に阻害された。ガラダシマブ又は LMWH のいずれかを投与すると、aPTT 及び全血凝固時間が延長し、PT は変化しなかった。

抗血栓作用の評価と並行して、止血に対する作用を検討するため、同時血栓症モデルを評価したウサギを用い、腎切開創モデルを作製して評価した。止血時間の平均値は、ガラダシマブ投与群（3.4±0.5 分）と生理食塩液投与群（4.6±0.7 分）で差がなかったが、LMWH 投与群では止血時間が延長された（28.0±4.5 分）。これらのデータと同様に、腎臓切開後の平均血液損失量も、等張生理食塩液投与群（3.2±1.6 mL）とガラダシマブ投与群（2.0±1.7 mL）の間で差がなかったが、LMWH 投与群（16.2±7.4 mL）では明らかかつ統計的に有意な増加が認められた。

結論として、生理食塩液を投与した対照群と比較し、ガラダシマブを 10 mg/kg 投与したウサギにおいて、$FeCl_3$ 誘発動脈血栓症は完全に抑制されたが、うっ血による静脈血栓症は抑制されなかった。さらに、出血リスクの増加も認められなかった。

2.6.2.3.1.3　CSL312 のマウスの動脈血栓モデルにおける作用（試験番号 REP-001383)

ガラダシマブの抗血栓作用を、Naval Medical Research Institute（NMRI）マウスの $FeCl_3$ 誘発動脈閉塞モデルを用いて検討した。動物には，血栓誘発の 15 分前に等張生理食塩液、ガラダシマブの 3 用量（1、1.75 及び 2.5 mg/kg）又は LMWH（フラグミン D）200 IU/kg を IV 投与した. 血栓形成は、頸動脈への $FeCl_3$ の局所適用により誘発した。血流と閉塞までの時間をドップラー超音波検査でモニターし、血栓が発生するまで記録し、最大観察時間は $FeCl_3$ 適用後 45 分とした。

等張生理食塩液を投与した NMRI マウスでは、$FeCl_3$ 適用後速やかに頸動脈の閉塞が認められ、血栓性閉塞の発生率は 70%であった。ガラダシマブの用量増加に伴い、閉塞率の低下が観察された。この閉塞率の低下は、ガラダシマブ 2.5 mg/kg で統計的に有意であった。閉塞率は、1、1.75 及び 2.5 mg/kg のガラダシマブを投与したマウスでそれぞれ 50%、40%及び 0%であっ

た。頸動脈閉塞までの平均時間は、ガラダシマブの用量増加に伴い延長し、ガラダシマブの 2.5 mg/kg で統計的に有意であった。ガラダシマブを 2.5 mg/kg 投与したマウスは、いずれも 45 分の観察期間内に動脈閉塞は認められなかった。ガラダシマブの用量を増やすと、平均 aPTT が増加し、平均 FXIIa 活性が低下したことから、投与動物におけるガラダシマブの薬理活性がさらに裏付けられたが、PT には影響が認められなかった。LMWH の 200 IU/kg 投与では、本モデルにおいて動脈閉塞率が 50%となり、部分的な抗血栓作用が認められた。

結論として、ガラダシマブは $FeCl_3$ 誘発動脈血栓症モデルマウスにおいて強い抗血栓作用を示した。

2.6.2.3.1.4 CSL312 のマウス尾端出血モデルにおける止血作用（試験番号 REP-001412）

マウスにおける止血に対するガラダシマブの作用を尾部出血モデルを用いて検討した。NMRI マウスに等張生理食塩液又はガラダシマブ 2.5 及び 25 mg/kg を尾先端切断の 15 分前に IV 投与した。止血作用は、麻酔下で水中尾端出血モデルを用いて測定した。切断直後に尾端を等張生理食塩液（0.9%）に浸し、ウォーターバスを用いてマウスの生理的体温（約+37°C）に維持した。尾端出血パラメータは、止血までの時間及び総失血量を定量化して測定した。

2.5 mg/kg（マウスで抗血栓作用を示すのに十分な有効量）又は 25 mg/kg のガラダシマブを投与したところ、止血までの時間及び総失血量は等張生理食塩液を投与した対照群と比較して有意な変化は認められなかった。ガラダシマブ投与群では、aPTT が明らかに延長し、FXIIa 活性が阻害された。一方、PT はガラダシマブ投与により影響を受けなかった。

要約すると、ガラダシマブはこのマウスモデルで試験した用量では出血リスクの上昇とは関連しなかった。ガラダシマブの 10 倍高用量（25 mg/kg）でも、止血までの時間及び総出血量に統計学的に有意な影響は認められなかったことから、本試験の条件下では、ガラダシマブは出血リスクに関して良好な安全性プロファイルを有すると結論された。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 CSL312：全身バイアスフロープレチスモグラフィーによる覚醒マウスの呼吸パラメータの評価（単回 IV 又は SC 投与）（試験番号 APQ0059）

呼吸系に対する安全性薬理試験として、CD-1 マウスを用い、ガラダシマブの呼吸パラメータ（呼吸数、1 回換気量及び分時換気量）に対する副作用の可能性について評価した。

雄の CRL:CD-1(ICR)マウス（8 例/群）に、0.9%等張生理食塩液（対照）又はガラダシマブを単回ボーラス投与した。第 1 群のマウスには 0.9%等張生理食塩液を IV 投与し、第 2～5 群のマウスには 3、10、30 又は 100 mg/kg のガラダシマブを IV 投与した。第 7 群のマウスには 0.9%生理食塩液を SC 投与し、第 8 及び 9 群のマウスには 60 又は 200 mg/kg のガラダシマブを SC 投与した。試験系の妥当性を確認するため、陽性対照としてバクロフェン（30 mg/kg）を SC 投与した（第 6 群）。投与容量は全群とも 4 mL/kg であった。

呼吸パラメータは投与前に最低 60 分間記録した。その後、投与のために動物をチャンバーから取り出した。投与後すぐにマウスを全身プレチスモグラフに戻した。

その後、呼吸数、1 回換気量及び分時換気量を連続的に記録し、全群について投与後 0、30、60、90、120、150、180、210、240、270、300、330 及び 360 分に解析した。SC 投与群の第 7～9 群及び第 6 群の半分については、追加の記録セッションを実施し、投与後 20、21、22、23、24、25、26、27 及び 28 時間にも解析した。

ガラダシマブの 3、10、30 又は 100 mg/kg を IV 投与若しくは 60 又は 200 mg/kg を SC 投与したところ、測定した投与後のどの時点においても、対照動物と比較して呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に統計的に有意又は生物学的に意味のある影響を及ぼさなかった。

陽性対照であるバクロフェンを 30 mg/kg で SC 投与したところ、測定した呼吸パラメータに対して、該当する対照動物と比較して期待される有意な作用（すなわち、呼吸数及び分時換気量の減少、1 回換気量の増加）が得られ、試験系の妥当性が証明された。

この試験における無毒性量（NOAEL）は、少なくとも IV 投与ルートでは 100 mg/kg、SC ルートでは 200 mg/kg と特定された。

2.6.2.4.2 CSL312：CD-1 マウスを用いた 4 週間反復 IV 及び SC 投与毒性試験並びに 8 週間回復性試験（試験番号 APQ0061）

マウスを用いた 4 週間反復投与毒性試験に組み込んで、CNS に対する安全性薬理評価（Irwin 変法）を実施した。

本毒性試験では、CD-1 マウスを用いた 4 週間の IV 投与（ボーラス；3、10、30 及び 100 mg/kg）及び SC 投与（60 及び 200 mg/kg）によるガラダシマブの全身毒性を検討した。8 週間の休薬期間を設け、毒性からの回復性を評価した。試験動物は、4 週間にわたり、対照である等張生理食塩液（0.9%）又は被験物質のガラダシマブを、1、4、8、11、15、18、22、25 及び 29 日目に IV（ボーラス）又は SC 投与した。回復期として 8 週間の休薬期間を設け、所見の可逆性及び遅延毒性の可能性を評価した。

試験は Irwin［Irwin, 1968］変法を用いて実施した。各観察期間の終了時に、各動物の直腸温を測定した。Irwin の各評価項目観察中、餌と水は与えなかった。観察されたその他の症状も記録した。試験の測定時点は、表 2.6.2-5 に示す。

表 2.6.2-5　CNS 安全性薬理評価：測定時点

Occasion	Time (hours after dosing)	Animals
Pretreatment		All timepoints: First 6 main study animals/sex/group and all recovery animals
Day 1	IV groups – 1 hour post dose	
	SC groups – 24 hours post dose	
Day 22	IV groups – 1 hour post dose	
	SC groups – 24 hours post dose	

Occasion	Time (hours after dosing)	Animals
Recovery Week 8	IV group 5	
	SC group 7	

Prior to dosing, baseline measurements were established based on detailed subjective observations

要約すると、Irwin 変法において、ガラダシマブの IV 又は SC 投与後、投与に関連した影響は認められなかった。APQ0061 試験の詳細及び全体的な結論については、2.6.6.3.2 を参照のこと。

2.6.2.4.3 CSL312：カニクイザルを用いた 5 週間反復 IV 及び SC 投与毒性試験並びに 8 週間回復性試験（試験番号 APQ0058）

カニクイザルを用いた 5 週間反復投与毒性試験に組み込んで、心血管系及び呼吸系の安全性薬理評価を実施した。

カニクイザルを用いた 5 週間の IV（ボーラス；3、10、30 及び 100 mg/kg）及び SC（60 及び 200 mg/kg）投与毒性試験において、ガラダシマブの全身毒性及びトキシコキネティクス（TK）を評価した。対照薬である 0.9%等張生理食塩液又は被験物質であるガラダシマブの IV（第 1、2、3、4 及び 5 群）又は SC（第 1、6 及び 7 群）投与を 5 週間行い、1、8、15、22、29 及び 36 日目に投与した。休薬群の動物にも同様に 5 週間投与し、その後 8 週間の休薬期間を設けた。

心電図（ECG）記録の測定時点を表 2.6.2-6 に示す。

表 2.6.2-6 ECG の測定時点

Occasion	Time	Animals
Pretreatment[a], Day 22 and Recovery Week 8	Multiple time points selected from continuous recording for 24 hours after dosing[b]	All animals (main study and recovery)

a For pre-treatment recording, animals were exposed to the dosing procedure to mimic the dosing on treatment days
b points required for analysis comprise predose and 30 min after administration for animals dosed via the IV route and predose and 24 hours after administration for animals dosed via the SC route. All pre-dose baseline time points were referenced to the target time of dosing the first animal

22 日目において、投与前及び対照群と比較した場合、30 分（IV 投与）及び 24 時間（SC 投与）のいずれの時点においても、投与に関連した影響を示唆する心拍数（HR）の変化は認められなかった。22 日目のガラダシマブ投与により、心房脱分極（PR）及び心室脱分極第 3 相（QRS）時間への明らかな影響は認められなかった。

投与前の心室脱分極と再分極を合わせた平均 QT 時間は 195～278 ms で、概して HR と逆パターンを示した。22 日目の QT 時間は 178～252 ms であり、投与に関連した影響は認められなかった。HR で補正した補正 QT（QTcR）時間の合計平均は、投与前で 227～245 ms、22 日目では同様の範囲（226～252 ms）にあった。投与前及び対照群と比較した場合、QTcR に対する投与関連の影響は認められなかった。

血圧（BP）記録の測定時点を表 2.6.2-7 に示す。

表 2.6.2-7　BP の測定時点

Occasion	Time (hours after dosing)	Animals
Pretreatment	Two occasions	All animals
Days 8 and 29	Pre-dose	All animals
	30 minutes after dosing (± 15 minutes)	Groups 1-5
	24 hours after dosing (± 15 minutes)	Groups 1, 6 and 7
Recovery Week 8	One occasion	Recovery animals

Indirect blood pressure tracings were obtained from each animal using a pressure cuff, secured at the base of the tail connected to a physiological pressure transducer and chart recorder. Routinely five measurements of the systolic pressure were attempted on each occasion. The pulse rate was also obtained from the tracing.

今回実施した BP 測定では、ガラダシマブの IV 投与や SC 投与に起因する所見は認められなかった。

呼吸数計測の測定時点を表 2.6.2-8 に示す。

表 2.6.2-8　呼吸数の測定時点

Occasion	Time	Animals
Pretreatment	Two occasions	All animals
Days 8 and 29	Pre-dose	All animals
	30 minutes after dosing (± 15 minutes)	Groups 1-5
	24 hours after dosing (± 15 minutes)	Groups 1, 6 and 7
Recovery Week 8	One occasion	Recovery animals

Respiration rate (breaths/minute) were taken as a visual assessment from chair restrained animals over a period of 1 minute.

8 日目及び 29 日目に評価した呼吸数には、投与の影響はみられなかった。

以上のことから、本試験で実施した ECG、BP 及び呼吸数に関する検討において、ガラダシマブの IV 及び SC 投与に起因する所見は認められなかった。

試験番号 APQ0058 試験の詳細及び全体的な結論については、2.6.6.3.5 を参照のこと。

2.6.2.4.4　CSL312：カニクイザルを用いた 26 週間反復 IV 及び SC 投与毒性試験並びに 8 週間回復性試験（試験番号 TH43GT）

カニクイザルを用いた 26 週間の反復投与毒性試験に組み込んで、心血管系及び呼吸系の安全性薬理評価を実施した。

カニクイザルを用いた 26 週間の IV（ボーラス）及び SC 投与毒性試験（13 週目の中間屠殺を含む）で、ガラダシマブの全身毒性及び TK を評価した。動物には被験物質であるガラダシマブを IV（2、3 及び 4 群）又は SC（5、6 群）投与、若しくは対照の 0.9%等張生理食塩液を両投与経路（1 群）で週 1 回、26 週まで投与した。中間屠殺動物の最終投与は 14 週目の 1 日目に、本試験動物の最終投与は 27 週目の 1 日目に行った。休薬群の動物には 26 週間、本試験動物と同等の投与を行い、その後、8 週間の休薬期間を設けた。

ECG 記録の測定時点を表 2.6.2-9 に示す。

表 2.6.2-9　ECG の測定時点

Occasion	Time[a]	Animals
Pretreatment[b]	Multiple time points selected from continuous recording for 24 hours	All animals (main study, interim and recovery)
Week 13	Multiple time points selected from continuous recording for 24 hours	All animals from Groups 2-4 (main study, interim and recovery)
Week 13	Multiple time points selected from continuous recording for 48 hours	All animals from Groups 1, 5 and 6 (main study, interim and recovery)
Week 26	Multiple time points selected from continuous recording for 24 hours	Main study and recovery animals from Groups 2-4
Week 26	Multiple time points selected from continuous recording for 48 hours	Main study and recovery animals from Groups 1, 5 and 6
Recovery Week 8	Multiple time points selected from continuous recording for 24 hours	All recovery phase animals

a Time points required for analysis comprise predose and 30 min after administration for animals dosed via the IV route and predose and 32 hours after administration for animals dosed via the SC route. All pre-dose baseline time points were referenced to the target time of dosing the first animal
b For pre-treatment recording, animals were exposed to the dosing procedure to mimic the dosing on treatment days

投与前及び対照群と比較した場合、ガラダシマブの IV 又は SC 投与群の 13 及び 26 週目並びに休薬 8 週目の平均 HR には、投与に関連した影響は認められなかった。

投与前及び対照群と比較した場合、13 及び 26 週目並びに休薬 8 週目の記録において、ガラダシマブの IV 又は SC 投与による PR 及び QRS 間隔には投与に関連した影響は認められなかった。

投与前のデータ及び対照群と比較した場合、ガラダシマブの IV 又は SC 投与による QTcR 間隔には投与に関連した影響は認められなかった。

BP 及び HR 記録の測定時点を表 2.6.2-10 に示す。

表 2.6.2-10　BP 及び HR の測定時点

Occasion	Time	Animals
Pretreatment	One occasion	All animals
Week 12	Pre-dose	All animals
	30 minutes after dosing (± 15 minutes)	Groups 1-4
	32 hours after dosing (± 15 minutes)	Groups 1, 5 and 6
Week 25	Pre-dose	Main study and recovery animals
	30 minutes after dosing (± 15 minutes)	Groups 1-4 (main and recovery)
	32 hours after dosing (± 15 minutes)	Groups 1, 5 and 6 (main and recovery)
Recovery Week 8	One occasion	Recovery animals

Indirect blood pressure tracings were obtained from each animal using a pressure cuff, secured around the base of the tail, connected to a physiological pressure transducer and chart recorder. Routinely 5 measurements of the systolic pressure were attempted on each occasion. The pulse rate was also be obtained from the tracings

ガラダシマブを IV 又は SC 投与した場合、12 及び 25 週目の BP に対する明らかな影響は認められなかった。

呼吸数の測定時点を表 2.6.2-11 に示す。

表 2.6.2-11　呼吸数の測定時点

Occasion	Time	Animals
Pretreatment	One occasion	All animals
Week 12	Pre-dose	All animals
	30 minutes after dosing (± 15 minutes)	Groups 1-4
	32 hours after dosing (± 15 minutes)	Groups 1, 5 and 6
Week 25	Pre-dose	Main study and recovery animals
	30 minutes after dosing (± 15 minutes)	Groups 1-4 (main and recovery)
	32 hours after dosing (± 15 minutes)	Groups 1, 5 and 6 (main and recovery)
Recovery Week 8	One occasion	Recovery animals

Respiration rate (breaths/minute) were taken as a visual assessment from chair restrained animals over a period of 1 minute

投与期間中、呼吸数に被験物質に関連した影響は認められなかった。

以上のことから、本試験で実施した心血管系（ECG、BP 及び HR）及び呼吸系（呼吸数）の安全性薬理試験において、ガラダシマブの IV 又は SC 投与に起因する所見は認められなかった。

TH43GT 試験に関する詳細及び全体的な結論は、2.6.6.3.6 を参照のこと。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

ガラダシマブと他の薬剤との相互作用は検討しなかった。

2.6.2.6　考察及び結論

ガラダシマブは、ヒト FXII に対して有意かつ特異的な効力を示した。ガラダシマブは、活性化した 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）で結合する。

In vitro 試験において、正常ヒトドナー、HAE 患者（I/II/III 型）及び AAE-C1-INH 患者の接触相活性化血漿を用いて、ガラダシマブの阻害活性を検討した。ガラダシマブは、FXIIa の発色性活性と BK 産生をそれぞれ強力に阻害した。また、ガラダシマブは、非臨床試験で使用した動物種（カニクイザル、ウサギ及びマウス等）の接触相活性化血漿中の FXIIa 活性を阻害した。非臨床試験で用いた動物種はすべて aPTT 延長を示し、ガラダシマブ（又は親抗体の 3F7）の薬理作用を確認した。

3F7 又はガラダシマブによる FXIIa 阻害は、マウスモデルにおいて BK を介した浮腫形成を効果的に阻害した。3F7 及びガラダシマブはいずれも、0.5 mg/kg 以上の用量で C1-INH 欠損マウスにおける ACEi 誘発浮腫を消失させた。

作用機序に起因する別の有益な作用として、ガラダシマブ又は 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阻害した。同時血栓症モデルにおいて 10 mg/kg のガラダシマブを IV 投与したウサギでは、$FeCl_3$ 誘発動脈血栓症は完全に抑制されたが、うっ血性の静脈血栓症は抑制されなかった。さらに、ガラダシマブ投与による腎臓の出血パラメータへの影響は認められなかった。

ガラダシマブは、マウスの $FeCl_3$ 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。2.5 mg/kg のガラダシマブの IV 投与は、動脈閉塞を完全に抑制した。同様に、親抗体である 3F7 は 5 mg/kg 以上の IV 投与で、マウス $FeCl_3$ 誘発血栓症モデルの血管閉塞を完全に抑制した。

ガラダシマブ投与（2.5 又は 25 mg/kg、IV）では、マウス尾部先端出血モデルにおける出血リスクの増加は認められなかった。

3F7（7 mg/kg、IV）は、ウサギ動静脈シャント及びウサギ ECMO モデルにおいて、出血を増加させることなく閉塞性血栓形成を抑制した。薬理学的に適切な IV 用量（マウス：5 mg/kg、ウサギ：7 mg/kg）において、3F7 は出血リスクを増加させずに血栓予防作用を示した。

マウスの安全性薬理試験において、呼吸系パラメータ（例：呼吸数、1 回換気量及び分時換気量）に対してガラダシマブの投与に関連した有害作用は認められなかった。NOAEL は、IV 投与では少なくとも 100 mg/kg、SC 投与では 200 mg/kg であった。

さらに、カニクイザルを用いた 5 及び 26 週間の反復投与毒性試験で評価した心臓の電気生理学、BP、HR 及び呼吸数測定、並びにマウスを用いた 4 週間の反復投与毒性試験で評価した神経機能に関する安全性薬理試験を実施し、すべての評価項目がガラダシマブ投与により影響を受けないものと判断した。

結論として、ヒト及び動物血漿におけるガラダシマブの非臨床 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、ガラダシマブの薬力学的作用が示された。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。

2.6.2.7 図表

関連する各項目の本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia. 1968;13(3):222-57

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.

Oschatz C, Maas C, Lecher B, Jansen T, Björkqvist J, Tradler T, et al. Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation in vivo. Immunity. 2011; 34(2):258-68.

Pathak M, Wilmann P, Awford J, Li C, Hamad BK, Fischer PM, et al. Coagulation factor XII protease domain crystal structure. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2015;13(4):580-91.

Sala-Cunill A, Björkqvist J, Senter R, Guilarte M, Cardona V, Labrador M, et al. Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. J Allergy Clin Immunol. 2015; 135(4):1031-43.

目次

略語・略号一覧 2
2.6.3 薬理試験概要表 4
2.6.3.1 薬理試験一覧表 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.3.3 副次的薬理試験 10
2.6.3.4 安全性薬理試験 12
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 13

表 目次

表 2.6.3-1 薬理試験一覧表 4
表 2.6.3-2 効力を裏付ける試験 6
表 2.6.3-3 副次的薬理試験 10
表 2.6.3-4 安全性薬理試験 12

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
ACE	Angiotensin converting enzyme	アンジオテンシン変換酵素
ACEi	Angiotensin converting enzyme inhibitor	アンジオテンシン変換酵素阻害薬
aPTT	Activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
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
CHB	Chinchilla Bastard	Chinchilla Bastard
CSL312	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
F	Female	雌
FeCl3	Ferric chloride	塩化鉄（III）
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
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
IP	Intraperitoneal	腹腔内
IV	Intravenous	静脈内
M	Male	雄
mAB	Monoclonal Antibody	モノクローナル抗体
nC1-INH	Normal C1 esterase inhibitor	正常な C1-インアクチベーター
NMRI	Naval Medical Research Institute	Naval Medical Research Institute
NZW	New Zealand White	New Zealand White
PCA	Passive cutaneous anaphylaxis	受動皮膚アナフィラキシー
PSA	Passive systemic anaphylaxis	受動的全身性アナフィラキシー
SC	Subcutaneous	皮下

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。

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

表 2.6.3-1 薬理試験一覧表

Overview			**Test Article: garadacimab, 3F7**		
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Primary Pharmacodynamics					
Binding affinity of garadacimab and 3F7 to FXII and βFXIIa (human, cynomolgus monkey, rabbit, mouse)	In vitro	-	CSL Limited	REP-21280	4.2.1.1
Epitope mapping of 3F7	In vitro	-	CSL Limited	REP-21279	4.2.1.1
Inhibition of FXII activity with garadacimab in non-human species	In vitro	-	CSL Limited	REP-21282	4.2.1.1
Garadacimab binding and efficacy in non-human species	In vitro	-	CSL Limited	REP-009151	4.2.1.1
Specificity of garadacimab for human FXII	In vitro	-	[redacted]	INV_11-01_BN	4.2.1.1
In vitro FXIIa amidolytic activity and aPTT assays	In vitro	-	CSL Limited/ CSL Behring GmbH	REP-21290	4.2.1.1
Garadacimab inhibition of FXIIa chromogenic activity in activated plasma from normal human donors and patients with HAE types I/II, nC1-INH-HAE and AAE-C1INH	In vitro	-	CSL Limited	REP-21283	4.2.1.1
Garadacimab inhibition of bradykinin generation in human plasma following contact activation	In vitro	-	CSL Limited	REP-21245	4.2.1.1

Overview			**Test Article: garadacimab, 3F7**		
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Inhibition of mast cell heparin-induced edema in PSA and PCA anaphylaxis	Mouse/BALB/c	IP	CSL Limited	REP-21269 (PSA model) REP-21268 (PCA model)	4.2.1.1
Inhibition of ACEi-induced edema in C1-INH-deficient mice	Mouse/ C1INH-/-	IP	CSL Limited	REP-21267	4.2.1.1
Secondary Pharmacodynamics					
3F7 inhibits experimental thrombosis in mice and rabbits without increased bleeding risk	Rabbit/(NZW) Mouse/FXII-/- and wildtype	IV	Karolinska Institutet and University Hospital, CSL Behring	Larsson et al, 2014	4.2.1.2
Effect of garadacimab in a simultaneous thrombosis model in rabbits	Rabbit/CHB	IV	CSL Behring	REP-001415	4.2.1.2
Effect of garadacimab in an arterial thrombosis model in mice	Mouse/NMRI	IV	CSL Behring	REP-001383	4.2.1.2
Effect of garadacimab on hemostasis in a murine tail tip bleeding model	Mouse/NMRI	IV	CSL Behring	REP-001412	4.2.1.2
Safety Pharmacology					
Safety pharmacology	Mouse/CRL:CD-1(ICR)	IV	[redacted]	APQ0059	4.2.1.3
Repeat-dose toxicity including safety pharmacology (4 weeks)	Mouse/CD-1	IV/SC	[redacted]	APQ0061	4.2.3.2
Repeat-dose toxicity including safety pharmacology (5 weeks)	Monkey/Cynomolgus	IV/SC	[redacted]	APQ0058	4.2.3.2
Repeat-dose toxicity including safety pharmacology (26 weeks)	Monkey/Cynomolgus	IV/SC	[redacted]	TH43GT	4.2.3.2
Pharmacodynamic Drug Interactions	-	-	-	-	-

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

表 2.6.3-2 効力を裏付ける試験

				Test Article: garadacimab, 3F7			
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study Number**
Purified or recombinant antigen (binding affinity)	Human, cynomolgus monkey, mouse, rabbit	-	-	-	Garadacimab has high affinity to human βFXIIa and is cross reactive with mouse, rabbit and cynomolgus βFXIIa. Garadacimab showed tighter affinity to both FXII zymogen and βFXIIa than the parental 3F7 mAb.	No	REP-21280
Recombinant antigen (epitope mapping)	Mouse, rat	-	-	-	The FXII N397K and I437A residues are crucial for the 3F7/FXIIa interaction and are in close proximity to FXII catalytic triad residues, which supports the role of 3F7 and garadacimab in binding to the catalytic site of activated FXII and potently inhibiting activity.	No	REP-21279
FXII activity and FXIIa inhibition with garadacimab in non-human species	Cynomolgus monkey, rabbit and mouse	-	0 to 30 µg/mL	-	FXIIa inhibition was observed in all species at similar concentrations of garadacimab, indicating that these non-human species can be used for toxicology studies and other animal models.	No	REP-21282

				Test Article: garadacimab, 3F7			
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study Number**
Purified or recombinant antigen (binding affinity)	Human, cynomolgus monkey, rat	-	0 – 600 nM	-	FXIIa inhibition with garadacimab was observed in monkey plasma comparable to human plasma. No inhibition was observed in rat plasma indicating that garadacimab is not cross reactive to rat FXII.	No	REP-009151
Purified or recombinant antigen (Specificity Analysis)	Human	-	-	-	Garadacimab displayed 100% inhibition of FXIIa catalytic activity (FXIIa and βFXIIa) when incubated at an enzyme:antibody ratio of 1:0.5. In contrast, when garadacimab was tested for inhibition of structurally related serine proteases at enzyme to antibody ratios of up to 1:500, no IC_{50} was reached for any protease at the highest concentration tested.	No	INV_11-01_BN
Purified antigen (activity assay) and Blood plasma (aPTT assay)	Human	-	Activity assay (0 to 166 nM) aPTT assay (0 to 1.0 mg/mL)	-	Garadacimab displays potent inhibition of human FXIIa and βFXIIa amidolytic activity. Garadacimab is ~4-fold more potent at prolonging aPTT in human plasma than the parental 3F7 antibody.	No	REP-21290

				Test Article: garadacimab, 3F7			
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study Number**
Blood plasma (FXIIa activity assay)	Human	-	0 to 30 µg/mL	-	Garadacimab at a concentration of 10 µg/mL potently inhibits FXIIa chromogenic activity following DXS-mediated activation of plasma from normal, HAE I/II, nC1-INH-HAE, FXII-HAE (with the T309K/R mutation), and patients with AAE-C1INH.	No	REP-21283
Blood Plasma (bradykinin assay)	Human, cynomolgus monkey	-	0 to 80 µg/mL (0 to 530 nM)	-	Garadacimab is able to completely inhibit BK formation at concentrations greater than 20 µg/mL in human pooled plasma and greater than 30-40 µg/mL cynomolgus monkey plasma following robust contact activation. Garadacimab concentration required for complete inhibition is dependent on plasma FXII levels. Using pooled human plasma, garadacimab displayed significantly greater potency to inhibit BK generation than a current product used to treat HAE, the kallikrein inhibitor ecallanide.	No	REP-21245

				Test Article: garadacimab, 3F7			
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study Number**
Pharmacological efficacy (anaphylaxis models)	Mouse / BALB/c	IP	0 to 25 mg/kg	4-5 per group	The FXII-driven contact system contributes to anaphylaxis. 3F7 was a potent inhibitor of BK-mediated edema formation in the PSA model. 3F7 displayed potent inhibition of edema regardless of whether administered 4 hours prior to PCA induction. 3F7 and garadacimab significantly reduced edema formation in the murine PCA model.	No	REP-21269 REP-21268
Pharmacological efficacy (ACEi-induced edema)	Mouse / C1INH -/- C1INH+/+ BALB/c	IP	0 to 2.5 mg/kg (3F7) 0 to 2.5 mg/kg (garadacimab)	F / 3-5 per group	3F7 and garadacimab abolished edema at doses of 0.5 mg/kg or higher.	No	REP-21267

2.6.3.3 副次的薬理試験

表 2.6.3-3 副次的薬理試験

				Test Article: garadacimab, 3F7			
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study Number**
Pharmacological efficacy (several thrombosis and bleeding studies)	Mouse/ $FXII^{-/-}$ and wildtype	IV	0.5 to 30 mg/kg $FeCl_3$-induced thrombosis	F/5-25	At 3F7 doses ≥ 5 mg/kg, complete inhibition of vascular occlusion was observed in a mouse FeCl3-induced thrombosis model.	No	Larsson et al, 2014
	Rabbit/ NZW	IV	7 mg/kg ECMO AV-shunt	F/3-5 F/3	3F7 prevented occlusive clot formation in a rabbit arteriovenous-shunt and a rabbit ECMO model without increased bleeding.		
	Mouse/ $FXII^{-/-}$ and wildtype	IV	5 or 25 mg/kg tail bleeding model	F/10	Pharmacological inhibition of FXIIa also did not impair hemostatic capacity at doses showing complete protection from thrombosis and maximum FXIIa inhibition (5 and 25 mg/kg)		
Pharmacological efficacy (Simultaneous arterial and venous thrombosis)	Rabbit / CHB	IV	10 mg/kg	F/5	Rabbits treated with 10 mg/kg garadacimab were completely protected from $FeCl_3$-induced arterial thrombosis, whereas stasis-driven venous thrombosis was unaltered. No impact of garadacimab treatment was observed on kidney bleeding parameters.	No	REP-001415

				Test Article: garadacimab, 3F7			
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study Number**
Pharmacological efficacy (Ferric chloride induced arterial thrombosis)	Mouse/ NMRI	IV	1 to 2.5 mg/kg	F/10	Garadacimab exhibited a strong antithrombotic effect in a FeCl3-induced arterial thrombosis model in mice. A dose of 2.5 mg/kg garadacimab was completely protective against arterial occlusion.	No	REP-001383
Pharmacological efficacy (Tail-tip bleeding model)	Mouse/ NMRI	IV	2.5 and 25 mg/kg	F/20	Treatment with garadacimab (2.5 or 25 mg/kg) was not associated with increased bleeding risk in a murine tail tip bleeding model.	No	REP-001412

2.6.3.4 安全性薬理試験

表 2.6.3-4 安全性薬理試験

				Test Article: garadacimab			
Organ Systems Evaluated	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study Number**
Respiratory parameters	Mouse / CRL:CD-1(ICR)	IV/SC	3, 10, 30 and 100 IV; 60 and 200 SC	M/8	Garadacimab, administered IV or SC, produced no statistically significant or biologically-relevant effects on respiratory rate, tidal volume or minute volume at any postdose time point measured in this study compared with the relevant control animals.	Yes	APQ0059
Neurological parameters (assessed within repeat-dose toxicity study)	Mouse / CD-1	IV/SC	3, 10, 30 and 100 IV; 60 and 200 SC	M/12 + F/12 Main Study; M/6 + F/6 Recovery	No treatment-related effects following IV or SC dosing were observed during the Irwin screens.	Yes	APQ0061

				Test Article: garadacimab			
Organ Systems Evaluated	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study Number**
Cardiovascular and respiratory parameters (assessed within repeat-dose toxicity study)	Monkey / Cynomolgus	IV/SC	3, 10, 30 and 100 IV; 60 and 200 SC	M/3 + F/3 Main Study; M/2 + F/2 Recovery	Electrocardiographic and blood pressure investigations as well as respiratory rate investigations performed in this study did not reveal any findings that were attributable to IV or SC administration with garadacimab.	Yes	APQ0058
Cardiovascular and respiratory parameters (assessed within repeat-dose toxicity study)	Monkey / Cynomolgus	IV/SC	10, 30 and 100 IV; 60 and 200 SC	M/4 + F/4 Main Study; M/2 + F/2 Recovery	Electrocardiographic, blood pressure, and pulse rate investigations as well as respiration rate investigations performed in this study did not reveal any findings that were attributable to IV or SC administration with garadacimab.	Yes	TH43GT

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

当該試験は実施しなかった。