目次

2.6.1 緒言 3

略号一覧表

略号又は略称	名称及び内容
gMG	全身型重症筋無力症（generalized myasthenia gravis）
IgG	免疫グロブリン G（immunoglobulin G）
Fc	結晶化可能領域（fragment crystallizable region）
FcRn	新生児型 Fc 受容体（neonatal Fc receptor）
mAb	モノクローナル抗体（monoclonal antibody）

2.6.1 緒言

ニポカリマブは，完全ヒト型 IgG1λ mAb であり，FcRn の IgG Fc 結合部位に結合して IgG リサイクルを阻害することにより血中 IgG 濃度を減少させる。ニポカリマブは gMG のほかに，複数の自己免疫疾患及び同種免疫疾患（胎児新生児溶血性疾患を含む）を適応症として開発中である。

ニポカリマブは，446 個のアミノ酸残基からなる H 鎖（γ1 鎖）2 本及び 216 個のアミノ酸残基からなる L 鎖（λ鎖）2 本で構成されるタンパク質である［$C_{6278}H_{9746}N_{1674}O_{1994}S_{46}$（4 本鎖），H 鎖：$C_{2152}H_{3348}N_{576}O_{664}S_{17}$，L 鎖：$C_{987}H_{1529}N_{261}O_{333}S_{6}$］。また，ニポカリマブはエフェクター機能を持たないよう Fc 領域にグリコシル化を受けない変異（N296A）が導入されている。

ニポカリマブのアミノ酸配列及びジスルフィド結合について図 2.6.1-1 に示す。

H 鎖

```
EVQLLESGGG  LVQPGGSLRL  SCAASGFTFS  TYAMGWVRQA  PGKGLEWVSS          50
IGASGSQTRY  ADSVKGRFTI  SRDNSKNTLY  LQMNSLRAED  TAVYYCARLA         100
IGDSYWGQGT  MVTVSSASTK  GPSVFPLAPS  SKSTSGGTAA  LGCLVKDYFP         150
EPVTVSWNSG  ALTSGVHTFP  AVLQSSGLYS  LSSVVTVPSS  SLGTQTYICN         200
VNHKPSNTKV  DKKVEPKSCD  KTHTCPPCPA  PELLGGPSVF  LFPPKPKDTL         250
MISRTPEVTC  VVVDVSHEDP  EVKFNWYVDG  VEVHNAKTKP  REEQYASTYR         300
VVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKC  KVSNKALPAP  IEKTISKAKG  QPREPQVYTL         350
PPSREEMTKN  QVSLTCLVKG  FYPSDIAVEW  ESNGQPENNY  KTTPPVLDSD         400
GSFFLYSKLT  VDKSRWQQGN  VFSCSVMHEA  LHNHYTQKSL  SLSPGK            446
```

L 鎖

```
QSALTQPASV  SGSPGQSITI  SCTGTGSDVG  SYNLVSWYQQ  HPGKAPKLMI          50
YGDSERPSGV  SNRFSGSKSG  NTASLTISGL  QAEDEADYYC  SSYAGSGIYV         100
FGTGTKVTVL  GQPKAAPSVT  LFPPSSEELQ  ANKATLVCLI  SDFYPGAVTV         150
AWKADSSPVK  AGVETTTPSK  QSNNKYAASS  YLSLTPEQWK  SHKSYSCQVT         200
HEGSTVEKTV  APTECS                                                216
```

図 2.6.1-1　ニポカリマブのアミノ酸配列及びジスルフィド結合

L 鎖 Q1：部分的ピログルタミン酸；H 鎖 K446：部分的プロセシング

H 鎖 C219-L 鎖 C215，H 鎖 C225-H 鎖 C225，H 鎖 C228-H 鎖 C228：ジスルフィド結合

ニポカリマブは，酸性及び中性いずれの pH でも FcRn の IgG Fc 結合部位に高い親和性で結合し，IgG と FcRn の結合を阻害する。その結果，IgG はリソソームに輸送されて分解され，病原性 IgG 自己抗体及び同種抗体を含む血中 IgG が減少する。病原性 IgG 自己抗体により誘導される自

己免疫疾患において，ニポカリマブ投与は，FcRn を介した IgG リサイクルを阻害して，病原性 IgG などの IgG を減少させることで，疾患コントロールを可能にする。

ニポカリマブの予定している効能又は効果（案），並びに用法及び用量（案）は，成人及び 12 歳以上の小児 gMG 患者に対して初回に 30 mg/kg を点滴静注し，初回投与 2 週間以降は 1 回 15 mg/kg を 2 週間隔で点滴静注する。

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.3 副次的薬理試験 20
2.6.2.4 安全性薬理試験 21
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 21
2.6.2.6 考察及び結論 21
2.6.2.7 図表 23
2.6.2.8 参考文献 24
2.6.3 薬理試験概要表 1

略号一覧表

略号又は略称	名称及び内容
AChR	アセチルコリン受容体（acetylcholine receptor）
ADCC	抗体依存性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）
ADCP	抗体依存性細胞貪食（antibody-dependent cellular phagocytosis）
ADM31	FcRn 上のアルブミン結合部位に結合する抗体（an antibody that binds to the albumin binding site on FcRn）
β2M	β2 ミクログロブリン（beta-2 microglobulin）
BLAST	basic local alignment search tool
BSA	ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin）
CAIA	コラーゲン抗体誘発性関節炎（collagen antibody-induced arthritis）
CD	cluster of differentiation
CDC	補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity）
CI	信頼区間（confidence interval）
C_{max}	最高血清中濃度（maximum observed serum concentration）
EC_{50}	50%有効濃度（half-maximal effective concentration）
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法（enzyme-linked immunosorbent assay）
EDTA	エチレンジアミン四酢酸（ethylenediaminetetraacetic acid）
Fab	抗原結合フラグメント（antigen-binding fragment）
Fc	結晶化可能領域（fragment crystallizable region）
fcgrt	Fcγ 受容体及びトランスポーター（マウス）［Fc gamma receptor and transporter (mouse gene)］
FCGRT	Fcγ 受容体及びトランスポーター（ヒト）［Fc gamma receptor and transporter (human gene)］
FcRn	新生児型 Fc 受容体（neonatal Fc receptor）
(g)MG	（全身型）重症筋無力症［(generalized) myasthenia gravis］
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice）
GP	糖タンパク質（glycoprotein）
HAEC	ヒト大動脈内皮細胞（human aortic endothelial cell）
HEK	ヒト胎児腎臓（human embryonic kidney）
HLA	ヒト白血球抗原（human leukocyte antigen）
HSA	ヒト血清アルブミン（human serum albumin）
HVT	ヒト胎盤絨毛栄養膜（human villous trophoblast）
IC_{50}	50%阻害濃度（half-maximal inhibitory concentration）
ICH	医薬品規制調和国際会議（International Council on Harmonization）
IP	腹腔内（intraperitoneal）
ITP	免疫性血小板減少症（immune thrombocytopenia）
IgG	免疫グロブリン G（immunoglobulin G）
IgG1λ	免疫グロブリン G1λ（immunoglobulin G1 lambda）
IVIg	静注用免疫グロブリン製剤（intravenous immunoglobulin）
K_D	平衡解離定数（equilibrium dissociation constant）
LPS	リポ多糖（lipopolysaccharide）
M281	ニポカリマブ（nipocalimab）
mAb	モノクローナル抗体（monoclonal antibody）
MHC	主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex）
MuSK	筋特異的チロシンキナーゼ（muscle-specific tyrosine kinase）
N027	ニポカリマブ（nipocalimab）
NOAEL	無毒性量（no-observed-adverse-effect-level）
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
PBS	リン酸緩衝生理食塩液（phosphate buffered saline）

略号又は略称	名称及び内容
PD	薬力学［pharmacodynamic(s)］
PK	薬物動態［pharmacokinetic(s)］
PR	心臓の電気的周期における P 波の開始から QRS 複合波の開始までの時間を測定（measure of the time between the start of the P wave to the start of the QRS complex in the heart's electrical cycle）
q2w	2 週間に 1 回（every 2 weeks）
q4w	4 週間に 1 回（every 4 weeks）
QRS	心臓の電気的周期における Q 波の開始から S 波の終了までの時間を測定（measure of the time between the start of the Q wave and the end of the S wave in the heart's electrical cycle）
QT	心臓の電気的周期における Q 波の開始から T 波の終了までの時間を測定（measure of the time between the start of the Q wave and the end of the T wave in the heart's electrical cycle）
RO	受容体占有（率）［receptor occupancy (rate)］
SPR	表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance）
Tg32	ヒト FcRn トランスジェニックマウス（human FcRn transgenic mice）

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ニポカリマブの概要と作用機序

ニポカリマブ（M281 又は N027）は，完全ヒト型 IgG1λ mAb であり，酸性及び中性いずれの pH でも FcRn の IgG Fc 結合部位に高い特異性及び親和性で結合し，IgG と FcRn の結合を阻害する。その結果，IgG はリソソームに輸送されて分解され，病原性自己抗体及び同種抗体を含む血中 IgG 濃度が減少する。ニポカリマブが FcRn を介した IgG のリサイクル及びトランスサイトーシスを阻害する作用機序について，詳細は【2.4.1.1】に記載した。また，ニポカリマブの 296 番目のアミノ酸がアスパラギンからアラニンに置換されたことにより，Fc 領域はグリコシル化を受けず，エフェクター機能を持たない。ニポカリマブは gMG を含む複数の自己免疫疾患及び同種免疫疾患を適応症として開発中である。

非臨床薬理試験計画

ニポカリマブの結合様式，生物物理学的及び薬理学的特性は，X 線結晶構造解析，SPR 法，細胞アッセイ，*ex vivo* ヒト胎盤葉二重灌流モデル及び *in vivo* マウス試験を含む複数の異なる実験方法を用いて評価した。ニポカリマブが結合するエピトープ配列はヒト及びカニクイザル FcRn 間でよく保存されており，ニポカリマブはカニクイザルの FcRn にもヒトと同程度の高い結合親和性を示す一方で，ニポカリマブのエピトープ配列は他の動物種の FcRn では保存されておらず，ニポカリマブはマウス及びラットの FcRn には結合しなかった。したがって，全ての *in vivo* 試験はヒト FcRn トランスジェニックマウス（Tg32 マウス：マウス *fcgrt* 遺伝子をノックアウトし，ヒト内在性のプロモーター制御下でヒト *FCGRT* 遺伝子を発現する）又はカニクイザルを用いて実施した。

安全性薬理は，カニクイザルを用いた 4 週間及び 26 週間反復投与毒性試験に安全性薬理の評価項目（心電図，呼吸数及び神経学的検査）を組み込んで評価した。

ニポカリマブの非臨床薬理試験の一覧は【2.6.3.1】に示す。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

ニポカリマブはヒト及びカニクイザルの FcRn に高い親和性で結合し，K_D 値は 58 pmol/L 以下であった。X 線結晶構造解析により，ニポカリマブの Fab は FcRn 上の IgG Fc 結合部位に結合することが示された。細胞アッセイでは，ニポカリマブは濃度依存的に FcRn を占有し，IgG のリサイクルを阻害したが，一方でアルブミンのリサイクルへは影響しなかった。Tg32 マウスを用いた試験において，ニポカリマブ投与による血漿中ヒト IgG 濃度は用量及び時間依存的に減少した。また，Tg32 マウスを用いた 2 種類の病原性 IgG 誘発性疾患（CAIA 及び ITP）モデルマウスにニポカリマブを投与したところ，それぞれの疾患の症状を改善した。*Ex vivo* ヒト胎盤葉二重灌流モデルを用いた検討では，ニポカリマブの胎盤移行はわずかであり，ニポカリマブは IgG の母体側から胎児側への移行を阻害した。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

薬理学的に適切な動物種としてカニクイザルを選択した。カニクイザルにニポカリマブを最高306 mg/kg までの用量で週 1 回 4 週間，及び最高 300 mg/kg までの用量で週 1 回 26 週間静脈内投与したとき，心電図，呼吸数及び神経学的検査に関する所見は認められなかった。

2.6.2.1.4 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 薬理試験

2.6.2.2.1.1 ヒト FcRn とニポカリマブ Fab の X 線結晶構造解析

資料番号 4.2.1.1.1

ヒト FcRn とニポカリマブ Fab 複合体の X 線結晶構造の分解能は 2.41 Å であった。抗原エピトープは主に FcRn の α 鎖に位置し（結合領域：879.6 Å^2），ニポカリマブの軽鎖 CDR1 は FcRn の β2M サブユニットまで伸長した（結合領域：137.9 Å^2）。FcRn アミノ酸残基の Trp131 と Pro132 はニポカリマブ Fab 内の溝に収まり，複合体の結合部内には隆起が形成され，抗体の重鎖及び軽鎖はその両側に集中して配置されていた（図 2.6.2-1）。複合体形成時の Trp131 のインドール側鎖は apo form の立体配座から回転して重鎖と軽鎖間のポケットにフィットし，埋め込まれた重鎖及び軽鎖の結合領域は，それぞれ 413.2 Å^2 及び 604.2 Å^2 であった。結晶構造解析の結果から，ニポカリマブは IgG 結合に関与する FcRn 上のアミノ酸残基（Trp131 等）（Andersen 2009）の近傍に結合し，FcRn の IgG 結合部位を中心とする標的エピトープとニポカリマブとの間にはユニークな立体構造的相互作用が認められ，IgG リサイクルを阻害する作用機序として，ニポカリマブの Fab が FcRn の IgG の Fc 結合部位を標的として IgG の Fc と直接的に競合することが示唆された。一方で，ニポカリマブ Fab の結合エピトープは FcRn 上のアルブミン結合部位から離れているため（Andersen 2006; Chaudhury 2006），ニポカリマブがアルブミン結合部位に対しての立体障害又は明らかなアロステリック調節を引き起こす可能性は低いと考えられた。

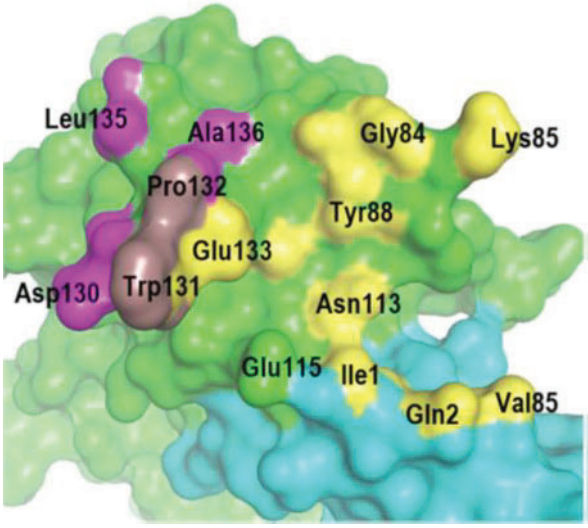


図 2.6.2-1　FcRn に対するニポカリマブ Fab の結合部

FcRn epitopes in contact with the heavy and light chains are colored in magenta and yellow, respectively. Trp131 and Pro132 (colored in brown) fit in a groove within Fab and contact both heavy and light chains.
Source: TD20[redacted]-084.

2.6.2.2.1.2　エピトープ解析に基づく標的タンパク質以外のヒトタンパク質に対するニポカリマブの交差反応性

資料番号 4.2.1.1.2

ニポカリマブの結合エピトープが含まれる FcRn の α 鎖領域の配列を用いた protein BLAST を実施して，ニポカリマブと交差反応性を示す可能性があるヒトタンパク質を検索した。Protein BLAST は，エピトープ配列を含む 2 種の α 鎖領域，すなわちニポカリマブ結合エピトープ配列及びその周辺領域を含む α1-α2 全体又はニポカリマブ結合エピトープ配列全てを含む K80～Q139 アミノ酸残基を検索配列として実施した。いずれの検索結果とも，100 ヒットのうち，上位 14 個は 100%の同一性を示す FcRn α 鎖であったが，残り 86 個は同一性 32%未満の MHC クラス I 及び MHC クラス I 関連タンパク質であった。これらの結果より，ニポカリマブが交差反応性を示すヒトタンパク質は標的タンパク質以外にはないと考えられた。

2.6.2.2.1.3　MHC クラス I 分子の HLA-A2 に対するニポカリマブの交差反応性

資料番号 4.2.1.1.2

FcRn 及び HLA-A2 はともに MHC クラス I 様構造ファミリーに属し，FcRn α 鎖と HLA-A2 の配列は 29%の同一性及び 48%の相同性を有しており，FcRn は他の HLA クラス I タンパク質とも類似している（Bjorkman 1994）。HLA-A2 に対するニポカリマブの結合を ELISA により評価した。ニポカリマブは 1～1,000 µg/mL の濃度範囲では HLA-A2 に結合せず，HLA-A2 と交差反応しないことが示された。一方で，陽性対照の抗 HLA-A2 抗体は濃度依存的に結合した（図 2.6.2-2）。本評価は，protein BLAST の結果を裏付けるものであることが示唆された。

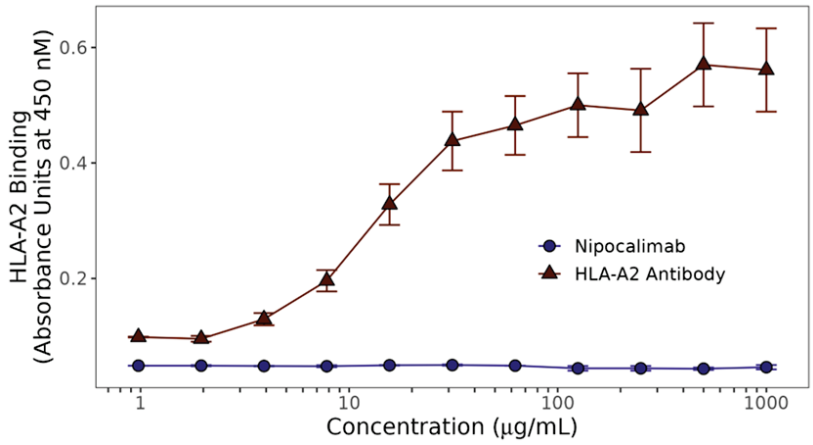


図 2.6.2-2　HLA-A2 に対するニポカリマブの結合

Graph showing nipocalimab does not bind to MHC class I molecule HLA-A2. Binding specificity of nipocalimab to HLA-A2 was assessed using an ELISA. HLA-A2 was coated on the assay plate and different concentrations of nipocalimab, or anti-HLA-2 were tested to determine binding to HLA-A2. The positive control anti-HLA-A2 demonstrated concentration dependent binding as expected to HLA-A2. Points and error bars in the plots represent means and standard deviations, respectively. Experimental replicates: n=1.
Abbreviations: ELISA: enzyme linked immunosorbent assay; HLA: human leukocyte antigen.
Source: DD[redacted]011.

2.6.2.2.1.4　各動物種におけるニポカリマブのエピトープ配列解析

資料番号 4.2.1.1.2

ニポカリマブの結合エピトープの種特異性について，ヒト，カニクイザル，イヌ，ブタ，ラット及びモルモットの FcRn α 鎖についてタンパク質の多重配列 alignment を検討した。ニポカリマブの結合エピトープを構成するヒト FcRn 配列は，カニクイザル FcRn においてのみ良好に保存されていた。一方で，その他の動物種では特に 80～88 番目及び 129～139 番目のペプチド領域に相違が認められた。これらの結果より，ニポカリマブの結合エピトープを形成するヒト FcRn 配列に相同性が高い種はカニクイザルのみであった。

2.6.2.2.1.5　ニポカリマブの FcRn への結合に対する *FCGRT* 遺伝子バリアントの影響

資料番号 4.2.1.1.3

FCGRT 遺伝子のバリアントがニポカリマブの FcRn への結合に影響を及ぼす可能性について，多様な人種（アフリカ系，東アジア系，南アジア系及びヨーロッパ系を含む）が網羅された Genome Aggregation Database (v4.0) を用いて，ニポカリマブとの結合に関与する FcRn 配列におけるヒト *FCGRT* 遺伝子のバリアントの有無を解析した。全部で 93 のバリアントを同定したが，全てのバリアントはマイナー対立遺伝子であり，いずれも 1%未満の頻度であった。このことから，人種による *FCGRT* 遺伝子のバリアントの差違は，FcRn に対するニポカリマブの結合に大きな影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.2.2.1.6 ヒト及びカニクイザルの FcRn に対するニポカリマブの結合親和性

資料番号 4.2.1.1.2，4.2.1.1.4

Avidity 作用を排除するようにデザインされた SPR 法により，ヒト及びカニクイザルの FcRn に対するニポカリマブの結合親和性を評価した。Biacore 8K 装置を用いて，ニポカリマブを Fc 領域キャプチャー法又は直接固定化法で，並びにヤギ抗ヒト Fcγ 抗体をアミンカップリング法で，それぞれ装置のセンサーチップ表面に固定化し，ヒト及びカニクイザルの FcRn を pH6.0（0.2，0.6，1.7，5 nmol/L）又は pH7.4（0.6，1.7，5，15 nmol/L）で注入し，ニポカリマブに対する結合及び解離速度を測定した。ヒト及びカニクイザルの FcRn に対するニポカリマブの結合親和性（K_D 値）は，pH6.0 ではそれぞれ 31.7 pmol/L 以下及び 26.2 pmol/L 以下，並びに pH7.4 では 57.8 pmol/L 以下及び 58 pmol/L であった。ニポカリマブはいずれの pH 条件でもヒト及びカニクイザルの FcRn に高い親和性で結合した（表 2.6.2-1）。

表 2.6.2-1 pH6.0 及び pH7.4 におけるヒト及びカニクイザルの FcRn に対するニポカリマブの結合親和性（推定値）

Description	n	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	95% MoE ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	95% MoE (s^{-1})	K_D (M)	95% MoE (M)
huFcRn – pH6.0	20	2.05E+06	4.38E+05	5.25E-05[a]	NA	≤3.17E-11	NA
huFcRn – pH7.4	22	1.28E+06	8.49E+04	7.42E-05 [a]	NA	≤5.78E-11	NA
cyFcRn – pH6.0	4	2.18E+06	1.84E+05	5.70E-05[a]	NA	≤2.62E-11	NA
cyFcRn – pH7.4	4	2.03E+06	5.99E+04	1.18E-04	9.90E-06	5.80E-11	3.36E-12

The data collected were processed and fitted using the Insight evaluation software. The margin of error to define the 95% CI was calculated in Excel using the CONFIDENCE.
Abbreviations: CI: confidence interval; cyFcRn: cynomolgus monkey FcRn; huFcRn: human FcRn; k_a: association rate constant; k_d: dissociation rate constant; K_D: equilibrium dissociation constant; MoE: margin of error; n: number of replicates; NA: not applicable.
a At least one-measurement in the data had a k_d estimated that was below the limit of quantitation.
Source: TD20[redacted]-095.

同様の SPR 法を用いて，マウス及びラット FcRn に対するニポカリマブの結合親和性を評価したところ，ニポカリマブはラットでは 50 nmo/L まで，及びマウスでは 400 nmol/L までの濃度で FcRn に結合しなかった。

2.6.2.2.1.7 HAEC におけるヒト IgG 及びアルブミンリサイクルに対するニポカリマブの作用

資料番号 4.2.1.1.6

ニポカリマブが IgG の FcRn への結合を阻害すると，FcRn 発現細胞での IgG のリサイクルが阻害されると考えられる【2.4.1.1】。ニポカリマブによって IgG のリサイクルが阻害されると，IgG は細胞内でリソソームに輸送され，その後蓄積し，最終的には分解されると推測される。FcRn を発現し，生体内における IgG リサイクルの主な標的細胞である HAEC を用いて，細胞内 IgG の蓄積を評価することで，IgG リサイクルに対するニポカリマブの作用を検討した。96-well プレートに HAEC（25,000 cells/well）を播種し，ニポカリマブ（0.001～32 nmol/L），アイソタイプコントロール IgG（B21M IgG1；0.032～1000 nmol/L）又はアルブミン結合部位に結合する抗体（ADM31；0.01～300 nmol/L）（Christianson 2012）で 1 時間処理した後，Alexa 647 で標識さ

れた IgG（最終濃度 13.3 nmol/L）を添加し，一晩培養した後に細胞を回収して固定し，細胞内に取り込まれた標識 IgG をフローサイトメーターで測定した。ニポカリマブ処理により，HAEC 内に標識 IgG が濃度依存的に蓄積した（図 2.6.2-3）。この結果は IgG のリサイクルが阻害されていることを示しており，阻害活性の平均 IC_{50} 値（95% CI）は 0.21 nmol/L（0.12，0.38 nmol/L）であった。一方で，アイソタイプコントロール IgG では IgG の蓄積は認められず，ADM31 では高濃度において軽微な IgG の蓄積が認められたのみで（図 2.6.2-3），これらの抗体はニポカリマブと比較して IgG リサイクルをほとんど又は全く阻害しないと考えられた。

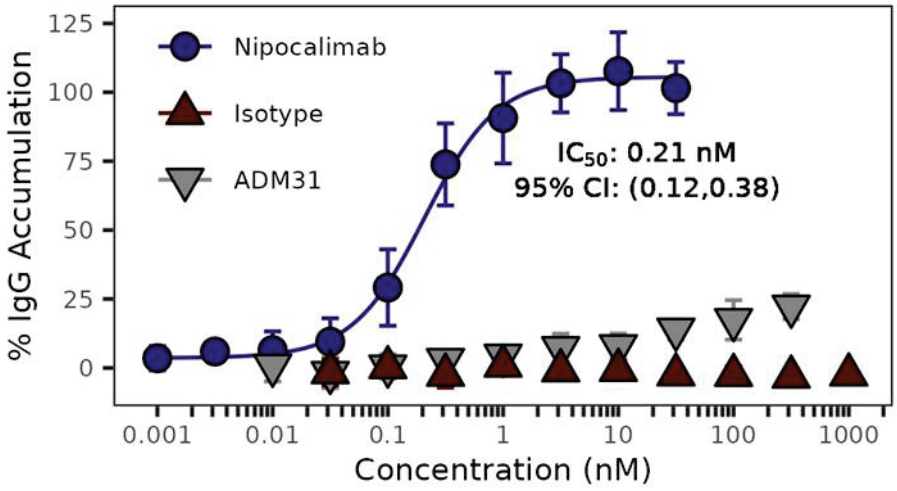


図 2.6.2-3　細胞内 IgG 蓄積に対するニポカリマブの作用

The data were fitted using robust four-parameter logistic regression models and plotted % IgG accumulation versus antibodies concentration-response. Points and error bars in the plots represent means and standard deviations, respectively.
Experimental replicates: n=3. All analysis and plots were generated using R (Version 4.05).
Abbreviations: IgG: immunoglobulin G.
Source: DD[redacted]006.

FcRn はアルブミンの動態にも関与しているが，FcRn のアルブミン結合部位は IgG 結合部位から離れており，重複していない（Chaudhury 2006）。アルブミンリサイクルに対するニポカリマブの作用を検討するため，HAEC（50,000 cells/well）を無血清培地で 1～2 時間培養し，ニポカリマブ又は ADM31 で 1 時間処理した後，Alexa 647 で標識された HSA（最終濃度 500 nmol/L）を添加し，20 時間インキュベートした後に細胞を回収して固定し，細胞内に取り込まれた標識 HSA をフローサイトメーターで測定した。本アッセイでは，IgG アッセイで認められた所見と同様に，アルブミンのリサイクルが阻害されると，内皮細胞内にアルブミンの蓄積が認められると推測される。FcRn のアルブミン結合部位に結合する陽性対照抗体の ADM31 は，Alexa 647 標識の HSA を細胞内に蓄積させ（図 2.6.2-4），アルブミンのリサイクルを濃度依存的に阻害していると考えられた。一方で，ニポカリマブはアルブミン蓄積に影響を及ぼさなかったことから（図 2.6.2-4），本アッセイ条件下ではニポカリマブはアルブミンのリサイクルを阻害しないことが示された。

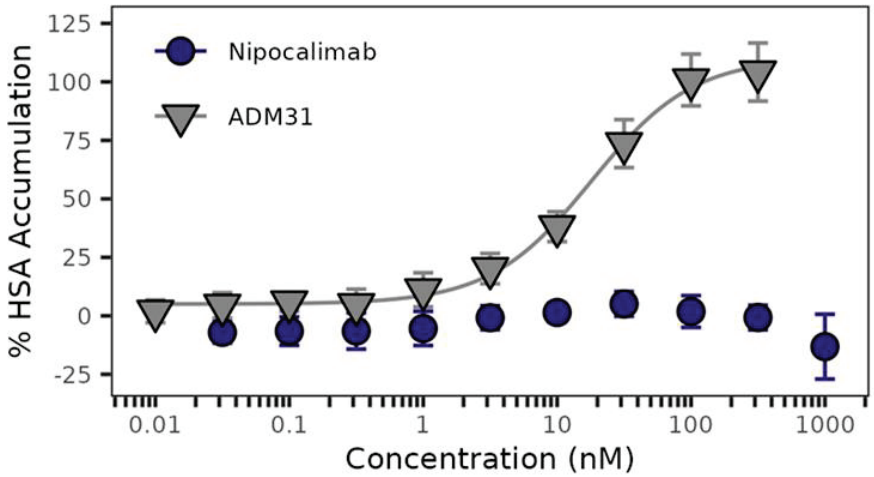


図 2.6.2-4　細胞内 HSA 蓄積に対するニポカリマブの作用

The data were fitted using robust four-parameter logistic regression models and plotted % IgG accumulation versus antibodies concentration-response. Points and error bars in the plots represent means and standard deviations, respectively. Experimental replicates: n=3. All analysis and plots were generated using R (Version 4.05).
Abbreviations: HSA: human serum albumin.
Source: DD[redacted]006.

2.6.2.2.1.8　HAEC 及び HVT におけるニポカリマブの FcRn 占有及び IgG リサイクル阻害

資料番号 4.2.1.1.7

FcRn を介した IgG リサイクル及びトランスサイトーシスがそれぞれ認められる HAEC 及び HVT を用いて，ニポカリマブの FcRn 占有（細胞内の標識ニポカリマブ蛍光強度を測定：RO）及び IgG リサイクルの阻害作用（細胞内の IgG 蓄積を測定：PD）を評価した。

ニポカリマブ（M281）又はアイソタイプコントロール IgG を含む培地で 18 時間培養した HAEC 細胞を回収し，固定及び浸透化処理した後，当該細胞を VT645 標識ニポカリマブで 30 分間処理した。フローサイトメーターを用いて細胞に結合した標識ニポカリマブの蛍光強度を測定することにより，ニポカリマブの FcRn 占有率を評価した。ニポカリマブは濃度依存的に細胞の標識ニポカリマブの蛍光強度を低下させたが，これは標識されていないニポカリマブが FcRn を占有したことによるものと考えられ，その IC_{50} 値は 0.037 µg/mL であった［図 2.6.2-5 (A)］。また，VT645 で標識されたヒト IgG1 存在下でニポカリマブ又はアイソタイプコントロール IgG を添加して 18 時間培養した検討では，ニポカリマブにより濃度依存的な細胞内標識 IgG の蓄積が認められ，その EC_{50} 値は 0.034 µg/mL であった［図 2.6.2-5 (B)］。HVT でも HAEC と同様の結果が得られ，ニポカリマブ（M281）は濃度依存的に FcRn を占有し，その IC_{50} 値は 0.029 µg/mL，また細胞内 IgG 蓄積に関する EC_{50} 値は 0.028 µg/mL であった。これらの結果より，ニポカリマブは濃度依存的に FcRn を占有することで IgG リサイクルを阻害することが示唆された。

A) B)

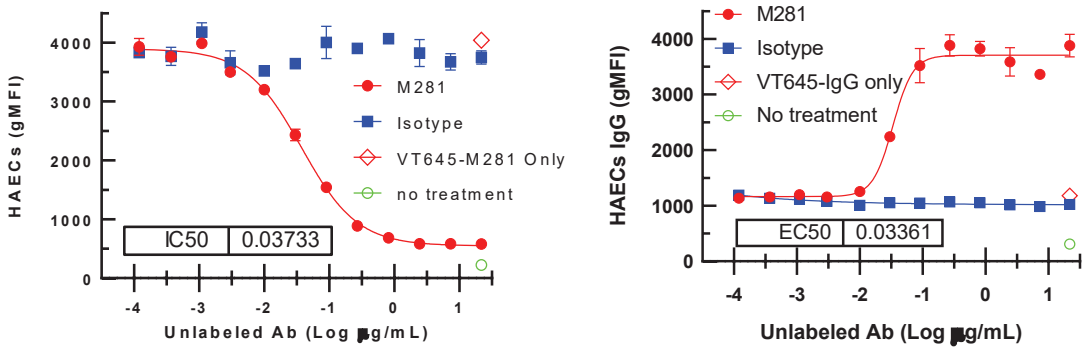


図 2.6.2-5 HAEC におけるニポカリマブの FcRn 占有及び細胞内 IgG 蓄積

A: The data were fitted using a four-parameter logistic regression model in GraphPad Prism and plotted gMFI of VT645-nipocalimab vs concentration of unlabeled antibodies tested. Points and error bars in the plots represent means and standard deviations, respectively. Experimental replicates: n=2.
B: The data were fitted using a four-parameter logistic regression model in GraphPad Prism and plotted gMFI of VT645-IgG vs concentration of unlabeled antibodies tested. Points and error bars in the plots represent means and standard deviations, respectively. Experimental replicates: n=2.
Abbreviations: Ab: antibody; EC_{50}: half maximal effective concentration; FcRn: neonatal Fc receptor; gMFI: geometric mean fluorescence intensity; HAECs: human aortic endothelial cells; IC_{50}: half maximal inhibitory concentration; IgG: immunoglobulin G.
Source: RPT-2262.

2.6.2.2.1.9 初代培養ヒト単球におけるニポカリマブの FcRn 占有

資料番号 4.2.1.1.7

ヒト末梢血単核細胞より単離した単球を用いてニポカリマブの FcRn 占有について，HAEC 及び HVT と同様の方法（2.6.2.2.1.8）で検討した。その結果，ニポカリマブは濃度依存的に細胞内の標識ニポカリマブの蛍光強度を低下させ，その IC_{50} 値は 0.066 µg/mL であった（図 2.6.2-6）。ニポカリマブは HAEC 及び HVT と同様に，ヒト単球においても濃度依存的に FcRn を占有した。

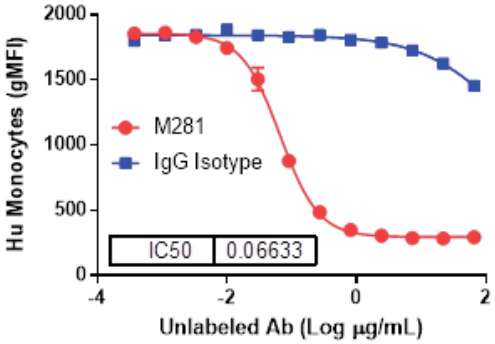


図 2.6.2-6 初代培養ヒト単球におけるニポカリマブの FcRn 占有

The data were fitted using a four-parameter logistic regression model in GraphPad Prism and plotted gMFI of VT645-nipocalimab vs concentration of unlabeled antibodies tested. Points and error bars in the plots represent means and standard deviations, respectively. Experimental replicates: n=2.
Abbreviations: Ab: antibody; FcRn: neonatal Fc receptor; gMFI: geometric mean fluorescence intensity; IC_{50}: half maximal inhibitory concentration.
Source: RPT-2262.

2.6.2.2.1.10 ニポカリマブのエフェクター機能

資料番号 4.2.1.1.5

ニポカリマブは 296 番目のアスパラギンをアラニンに置換され，その結果，Fc 領域はグリコシル化を受けない。Fc 領域がグリコシル化されない抗体は，エフェクター機能に関与する Fcγ 受容体（FcγRII 及び FcγRIII）及び補体成分 C1q と結合しないことが報告されている（Lux 2013; Tao 1989; Vafa 2014）。ニポカリマブがエフェクター機能を持たないことを確認するために，ADCC，ADCP 及び CDC 活性を評価した。

生物発光細胞を用いたレポーターアッセイにて ADCC 及び ADCP 活性を評価した。本試験では，以下の標的細胞及びエフェクター細胞を用いた。

・標的細胞：FcRn を発現する HEK293 細胞

・エフェクター細胞

－ADCC 活性：ヒト FcγRIIIa（IgG に高親和性の V158 バリアント）及びホタルルシフェラーゼの発現を誘導する NFAT を安定発現する Jurkat 細胞

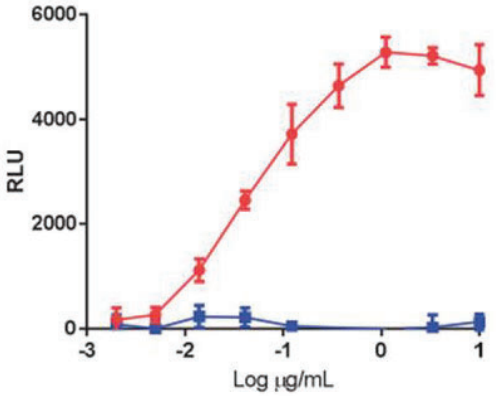
－ADCP 活性：ヒト FcγRIIa-H（IgG に高親和性の H131 バリアント）及びホタルルシフェラーゼの発現を誘導する NFAT を安定発現する Jurkat 細胞

標的細胞とエフェクター細胞の共培養系に種々の濃度の N021（Fc 領域がグルコシル化されている M281）又は N027（Fc 領域がグルコシル化されていない M281：ニポカリマブ）を添加し，誘導された ADCC 又は ADCP 活性を発光シグナルとして測定した。抗体による標的細胞に対する ADCC 活性は細胞内で複数の段階を経て発揮されるが，本評価系は Fcγ 受容体の架橋刺激に伴うエフェクター細胞の活性化，特に細胞内シグナル伝達の亢進に伴う細胞内カルシウム濃度の上昇に着目し，Fcγ 受容体の活性化をルシフェラーゼ活性として検出した（Tada 2017）。N021 は濃度依存的に ADCC 及び ADCP 活性を誘導したが，N027 は誘導しなかった［図 2.6.2-7 (A)及び (B)］。

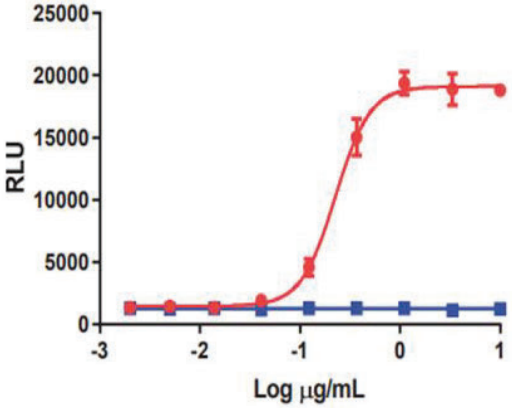
次に，HEK-293 細胞を種々の濃度の N021 又は N027 で処理し，ヒト血清補体とインキュベートした後に，HEK-293 細胞の細胞生存率（細胞溶解率）を測定することにより CDC 活性を評価した。評価した 0.001～50 μg/mL の濃度範囲で，N021 は濃度依存的に CDC 活性を誘導したが，N027 は誘導しなかった［図 2.6.2-7 (C)］。

これらの試験により，Fc 領域がグリコシル化されていないニポカリマブは Fc を介したエフェクター機能を有さないことが確認された。

A) ADCC 活性



B) ADCP 活性



C) CDC 活性

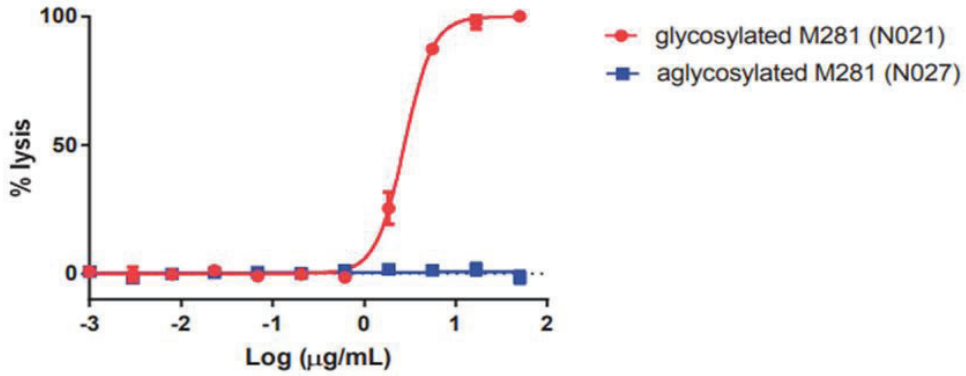


図 2.6.2-7 ADCC，ADCP 及び CDC 活性に対するニポカリマブの影響

A: The data were fitted using a four-parameter logistic regression model in GraphPad Prism and plotted as RLU versus the antibody's concentration response. Points and error bars in the plots represent means and standard deviations, respectively. Experimental replicates: n=1.
B: The data were fitted using a four-parameter logistic regression model in GraphPad Prism and plotted as RLU versus the antibody's concentration response. Points and error bars in the plots represent means and standard deviations, respectively. Experimental replicates: n=1.
C: The data were fitted using a four-parameter logistic regression model in GraphPad Prism and plotted as % cell lysis versus the antibody's concentration response. Points and error bars in the plots represent means and standard deviations, respectively. Experimental replicates: n=1.
Abbreviations: ADCC: antibody dependent cell cytotoxicity; ADCP: antibody dependent cellular phagocytosis; CDC: complement dependent cytotoxicity; RLU: relative luminescence units.
Source: RPT-02479.

2.6.2.2.2 *In vivo* 薬理試験

2.6.2.2.2.1 Tg32 マウスの単球におけるニポカリマブの FcRn 占有率とマウス血漿中ヒト IgG 濃度との相関

資料番号 4.2.1.1.8

Tg32 マウスを用いて，単球におけるニポカリマブの FcRn 占有率（RO）と外因的に投与されたヒト IgG のマウス循環血中での分解速度（マウス血漿中のヒト IgG 濃度を測定：PD）との相関を評価した。Tg32 マウスはマウス *fcgrt* 遺伝子（FcRn α 鎖をコードする遺伝子）を欠損させ，ヒト *FCGRT* 遺伝子をヒト内在性プロモーター下に組み込み，その結果，ヒト FcRn α 鎖が発現してマウス β2M と複合体を形成し，この複合体は内因性のヒト又はマウス FcRn と同様の組織に発現する（Latvala 2017）。

雄性 Tg32 マウス（各群 16 例）にヒト IgG（500 mg/kg）を単回静脈内投与（Day -1）してから 2 日後（Day 1），0.2，2，20，50 及び 100 mg/kg のニポカリマブ（N027）又は溶媒（PBS）を単回静脈内投与し，経時的に採血したサンプルを洗浄して固定後，蛍光標識抗 FcRn 抗体を添加し，単球のニポカリマブ非占有 FcRn をフローサイトメーターにて測定した。投与後 2 時間では，ニポカリマブ 2 mg/kg 以上で 85%を超える FcRn 占有率（15%未満の非占有率）が認められ，高用量では高い FcRn 占有率が長時間持続し，100 mg/kg では 90%を超える FcRn 占有率が最長 72 時間持続した（図 2.6.2-8）。

次に，マウス循環血中でのヒト IgG の分解速度について検討するために，マウス血漿中のヒト IgG 濃度を測定した。溶媒投与群と比較して，20 mg/kg 以上のニポカリマブ投与群ではより大きなヒト IgG 濃度の減少がみられ，72 時間後までに循環血中から 90%を超えるヒト IgG が消失し，その減少は用量及び時間依存的であった（図 2.6.2-9）。ニポカリマブ投与による血漿中ヒト IgG 濃度の減少は，ヒト IgG のリサイクル阻害による IgG 分解速度の上昇によるものと考えられた。

これらの検討より，ニポカリマブのヒト IgG 分解速度上昇が持続する時間は，FcRn 占有時間の長さと比例していた。一方で，FcRn 占有が認められなかった時点でのヒト IgG 分解速度は，溶媒投与群と同程度であった。

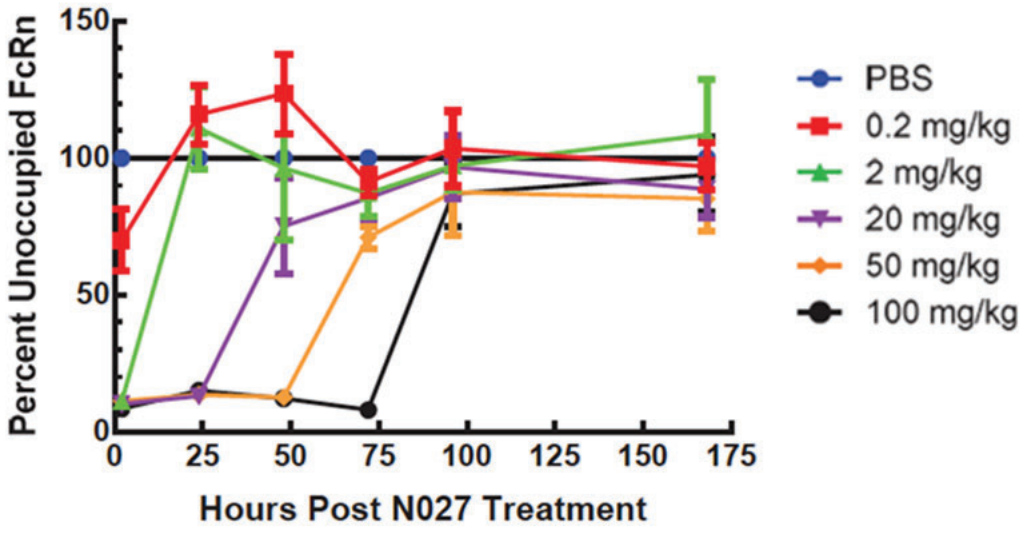


図 2.6.2-8　循環血中単球におけるニポカリマブの FcRn 非占有率

Percent unoccupied receptors were plotted vs time post nipocalimab dosing using GraphPad Prism. Points and error bars in the plots represent means and stand error of mean, respectively. Each timepoint has data from n of 4 mice.
Abbreviations: FcRn: neonatal Fc receptor; N027: nipocalimab; PBS: phosphate buffered saline.
Source: RPT-1667.

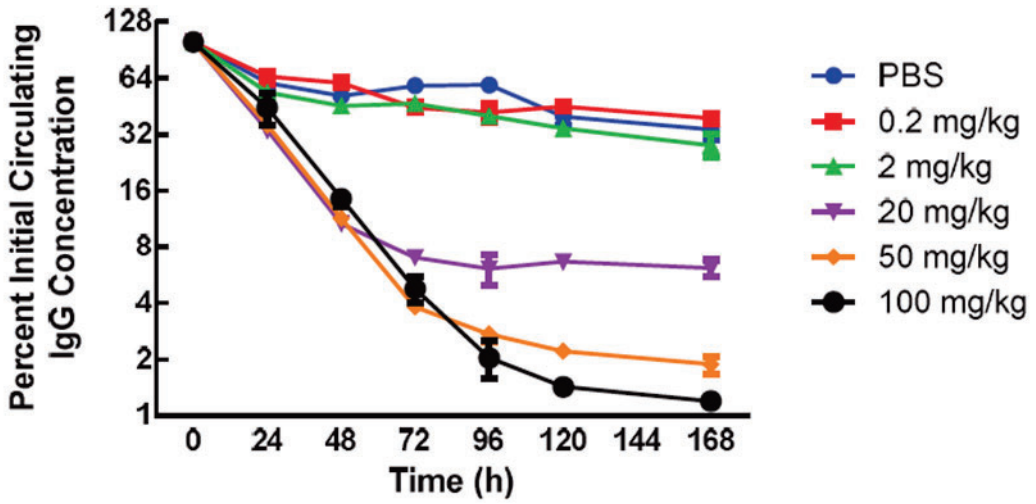


図 2.6.2-9　Tg32 マウス血漿中のヒト IgG 濃度に対するニポカリマブの作用

IgG concentrations were calculated as a percent of the initial (pre-bleed) IgG measurement for each individual mouse and plotted vs time using GraphPad Prism. Points and error bars in the plots represent means and stand error of mean, respectively. Each timepoint has data from n of 4 mice.
Abbreviations: h: hours; IgG: immunoglobulin G; PBS: phosphate buffered saline.
Source: RPT-1667.

2.6.2.2.2.2　Tg32 マウスを用いた CAIA モデルにおけるニポカリマブの効果

資料番号 4.2.1.1.9

CAIA モデルは，関節軟骨の主要タンパク質である II 型コラーゲンに対する抗体を投与することによって関節炎を誘発する自己免疫疾患の動物モデルである。投与された抗体は，軟骨及び滑膜で大型の免疫複合体を形成することによって免疫反応を誘発し，補体を活性化して関節の炎症及び損傷を引き起こす（Maleitzke 2022）。

Tg32 マウスに関節炎誘発性抗体を Day 1 に腹腔内投与し，LPS 100 µg/kg を Day 4 に腹腔内投与した後，5 mg/kg のニポカリマブ（M281），1 g/kg の IVIg（陽性対照），又は溶媒を Day 6 に静脈内投与した（各群 5 例）。関節炎の臨床評価を Day 6（被験物質投与 1 時間後），Day 7 及び Day 9 に盲検下で実施し，疾患重症度（四肢の腫脹，発赤，関節の柔軟性及び握力）を 0～4 の尺度で評価した（最大スコアは 16）。その後，病理組織学的評価のために前肢を採取した。

溶媒投与群では，関節炎の重症度が Day 5 から Day 9 にかけて進行したが，ニポカリマブ投与群の Day 9 の関節炎臨床スコアは IVIg 投与群と同程度のスコアで溶媒対照群と比較して有意に低く，ニポカリマブ投与により関節炎の疾患重症度の進行が抑制された（図 2.6.2-10）。また，Day 9 の前肢関節の炎症，パンヌスの形態，軟骨損傷及び骨吸収の病理組織学的評価のスコアは，溶媒対照群と比較してニポカリマブ投与群では統計学的には有意でないものの改善傾向がみられた。

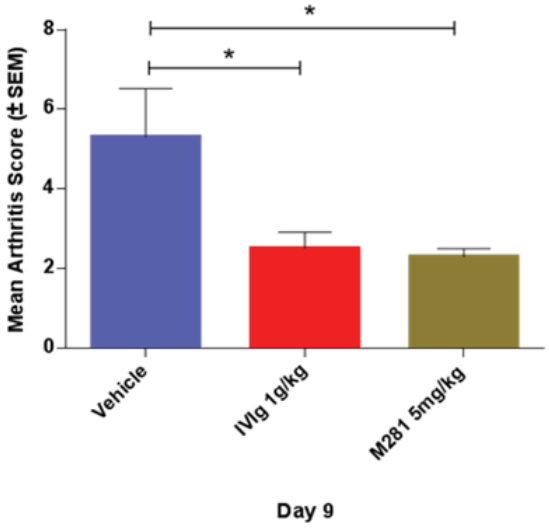


図 2.6.2-10　Tg32 マウスを用いた CAIA モデルにおける関節炎臨床スコアに対する
ニポカリマブの効果

Data were plotted using GraphPad Prism as mean ± SEM. Tukey's multiple comparison test comparing vehicle group vs. 1g/kg IVIg group $p<0.05$ and vehicle group vs. 5 mg/kg M281 $p<0.05$.
Abbreviations: CAIA: collagen antibody induced arthritis model; IVIg: intravenous immunoglobulin; M281: nipocalimab; SEM: standard error of the mean.
Source: RPT-2549.

2.6.2.2.2.3　Tg32 マウスを用いた慢性 ITP モデルにおけるニポカリマブの効果

資料番号 4.2.1.1.10

ITP は，血小板を自己抗原と認識する自己免疫疾患である。マウスにラット抗マウス CD41 抗体を投与し，血小板が破壊する際に食細胞性単球が明らかに関与することが示唆される急速発症型の ITP モデルを作製した。

小型浸透圧ポンプを用いて雄性 Tg32 マウスに，ITP 病態誘発として 1.5 μg/日の抗 CD41 抗体（抗マウス GPIIb，ラット IgG1λ 抗体）を，一方で病態誘発の対照として 2.0 μg/日のアイソタイプコントロール抗体を投与した。ニポカリマブを 5 又は 20 mg/kg で Day 3 及び Day 5 に合計 2 回，若しくは Day 3 又は Day 5 にそれぞれ単回で静脈内投与した（各群 7 例）。対照群には生理食塩液を Day 3 及び Day 5 に合計 2 回，及び陽性対照として 1 g/kg の IVIg を Day 3 に単回で静脈内投与した（各群 4 又は 7 例）。Day 7 に採血後 EDTA 処理し，全血中の血小板数を測定した。抗 CD41 抗体を注入した Tg32 マウスでは，アイソタイプコントロール抗体を投与したマウスと比較して血小板数の有意な減少が認められ，抗 CD41 抗体を注入したマウスにニポカリマブ 20 mg/kg を Day 3 及び Day 5 に 2 回投与すると，陽性対照の IVIg 投与と同様に，生理食塩液を投与したマウスと比較して血小板数が有意に回復した［図 2.6.2-11 (A)及び(B)］。一方で，ニポカリマブを 20 mg/kg の用量で単回（Day 3 又は Day 5）に投与しても生理食塩液投与と比較して血小板数の有意な回復はみられず，50 mg/kg の用量で単回（Day 3 又は Day 5），若しくは 2 回（Day 3 及び Day 5）投与しても，20 mg/kg を単回投与した場合と同程度で血小板数に影響を及ぼさなかった［図 2.6.2-11 (B)］。

A) B)

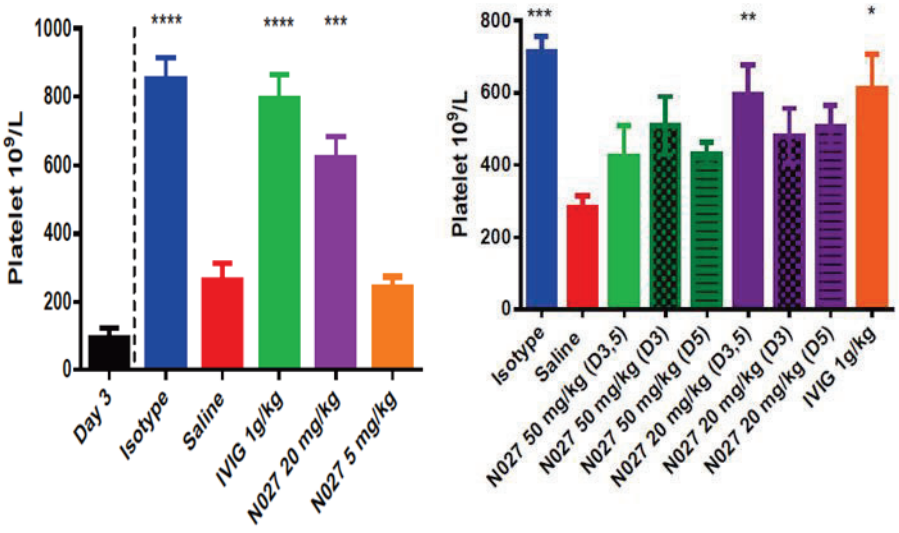


図 2.6.2-11 Tg32 マウスを用いた慢性 ITP モデルにおける血小板数に対するニポカリマブの効果

A. Isotype control mice were treated with an isotype control IgG1 antibody instead of anti-CD41 (blue bar). The other colored bars on the right represent platelet counts from mice treated with anti-CD41 (chronic ITP mice). Data was plotted as mean±SEM using GraphPad Prism. All groups were compared to the saline group (red bar). One-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test comparing all groups to the saline treatment group; *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.
B. The blue bar represents mice with isotype control IgG antibody in the mini osmotic pump. All the other colored bars depict mice subjected to anti-CD41 Ab being dispensed from the pump. All groups were compared to the saline group (red bar). Platelet counts in the isotype control mice were significantly higher than in the saline mice. Data was plotted as mean±SEM using GraphPad Prism. One-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test comparing all groups to the saline treatment group; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.
Abbreviations: ITP: immune thrombocytopenia purpura; IVIg: intravenous immunoglobulin; N027: nipocalimab; SEM: standard error of the mean.
Source: RPT-1669.

2.6.2.2.3 *Ex vivo* 薬理試験

2.6.2.2.3.1 ヒト単一胎盤葉二重灌流モデルにおける母体から胎児へのニポカリマブの移行及び IgG 移行に対する作用

資料番号 4.2.1.1.11，4.2.1.1.12

Ex vivo 単一胎盤葉二重灌流モデルを用いて，1）母体から胎児へのニポカリマブ移行の可能性，2）母体から胎児への IgG 移行に対するニポカリマブの阻害作用について検討した。

ニポカリマブの母体から胎児への移行性を評価するために，帝王切開による開腹分娩直後の健康妊婦より妊娠後期（妊娠 38～40 週を 17 例及び妊娠 32 週を 1 例）のヒト胎盤を採取した。無処置の単一胎盤葉の末梢にカニューレを挿入し，胎盤葉を中心に母体循環系（灌流流速：12 mL/分，95% O^2+5% CO^2 混合ガスで平衡化）及び胎児循環系（灌流流速：3 mL/分，95% N^2+5% CO^2 混合ガスで平衡化）を模倣する 2 つの循環系を構築し，最初に培地で 1 時間灌流した後，母体循環側に 3 mg/mL の BSA 及び母体から胎児への移行の陽性対照としてアンチピリン（100 μg/mL）に加えて，0.3，3 又は 20 mg/mL のニポカリマブ（M281）を含む溶液を灌流させ，その 4 時間後又は 6 時間後まで経時的に母体及び胎児それぞれの循環系から灌流液を採取し，ニポカリマブ濃度を測定した。

構築した *ex vivo* 単一胎盤葉二重灌流モデルにおいて，アンチピリンの母体から胎児への移行が確認され（移行率 35%超），灌流液の漏出はわずかであり，十分な酸素輸送が確認できたことから，評価系は適切に成立していると判断した。38～40 週の胎盤葉を用いた灌流時間 4 時間の胎児循環系のニポカリマブ濃度（平均値±標準偏差）は，母体側より灌流させた濃度が 0.3，3 及び 20 mg/mL の時，それぞれ 0.006±0.004，0.08±0.07 及び 0.4±0.3 µg/mL であった。採取した全てのサンプルにおいてニポカリマブの母体循環系から胎児循環系への移行が認められ，ニポカリマブの胎児循環系への移行率は 0.0007～0.005%であった（表 2.6.2-2，図 2.6.2-12，Roy 2019）。

表 2.6.2-2　*Ex vivo* ヒト胎盤葉二重灌流モデルにおけるニポカリマブの母体循環系から胎児循環系への移行率

Experiment ID	Test Article	Run Time (h)	Conc. in maternal reservoir (mg/mL)	Antipyrine FTR[1] (%)	M281 FTR[1] (%)	Average [M281] Fetal Conc at Experiment End (µg/ml)
PP07-PP11 (n=5)	M281	4	20	41.24± 0.7	0.003 ± 0.001	0.4± 0.3
PP15-PP20 (n=6)[2]	M281	4	3	41.17± 4.50	0.002 ± 0.001	0.08 ± 0.07
PP23-PP25 (n=3)	M281	4	0.3	40.57± 0.51	0.005 ± 0.003	0.006 ± 0.004
PP30 (n=1)[3]	M281	4	3	41.9	0.0007	0.02
PP40, 42, 44 (n=3)	M281	6	3	41.4± 1.74	0.002± 0.001	0.08 ± 0.04

[1]Ratio of fetal concentration at experiment end to maternal concentration at experiment start x 100%
[2] All perfusion experiments were done for 4 hours except PP16 which was terminated at 3 hours
[3] Early term placenta at gestational age 32 weeks

The concentrations of nipocalimab in the fetal circuit were measured using a MSD assay with an LLOQ determined to be 5 ng/mL.
Abbreviations: conc: concentration; FTR: fetal transfer rate; PP: placental perfusion; M281: nipocalimab; MSD: meso scale discovery; LLOQ: lower limit of quantification.
Source: RPT-2130.

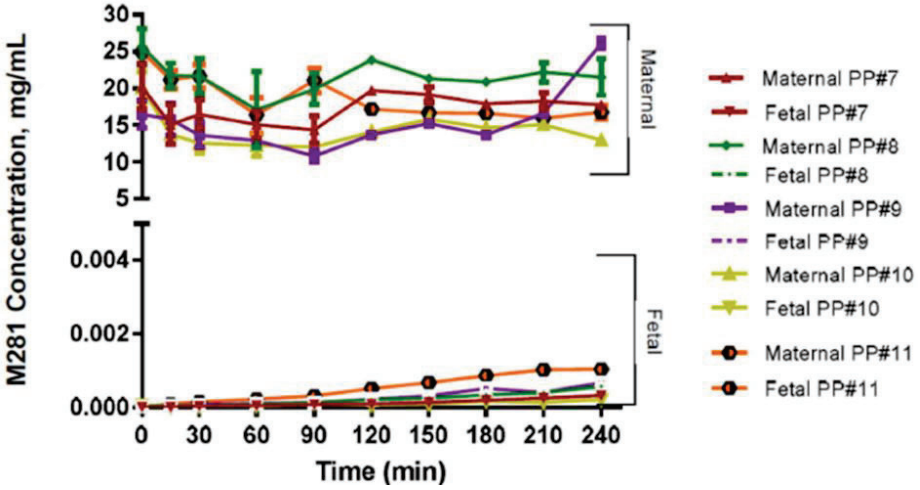


図 2.6.2-12　ニポカリマブ 20 mg/mL を母体側より循環させた後の母体及び胎児循環系のニポカリマブ濃度の経時的変化

Graph represents nipocalimab concentrations as mean ±SD in the fetal and maternal circulation after maternal administration of 20 mg/mL nipocalimab at time 0. Nipocalimab concentrations in all the maternal and fetal sample aliquots were determined using an MSD assay.
Abbreviations: Fetal: fetal circulation; Maternal: maternal circulation; PP: placental perfusion. M281: nipocalimab; MSD: meso scale discovery; SD: standard deviation.
Source: RPT-2130.

次に，胎盤を通過することが知られている代表的な IgG 抗体のアダリムマブ（ヒュミラ®）を用いて（Mahadevan 2013），母体から胎児への IgG 移行に対するニポカリマブの作用を評価した。*Ex vivo* ヒト胎盤葉二重灌流モデルの母体循環側に 3 mg/mL の BSA 及び 270 µg/mL のアダリムマブを含む溶液を灌流する際に 10，300 及び 3,000 µg/mL のニポカリマブを同時に添加し，その 6 時間後まで経時的に母体及び胎児それぞれの循環系から灌流液を採取し，アダリムマブ及びニポカリマブの濃度を測定した。また，評価系成立の確認のために，アダリムマブと同時にアンチピリン（100 µg/mL）も添加した。

評価系成立の陽性対照であるアンチピリンの母体循環系から胎児循環系への移行率は，全ての評価で 39%を超える基準を満たしていた時，アダリムマブの母体循環系から胎児循環系への移行率は 0.03～0.65%であった（表 2.6.2-3）。また，アダリムマブの 6 時間後の母体循環系から胎児循環系への移行率（0.23±0.21%）は，ニポカリマブの 4 及び 6 時間後の平均移行率（38～40 週の胎盤葉使用：0.002～0.005%）より 46～115 倍高かった（表 2.6.2-2，表 2.6.2-3）。一方で，アダリムマブを 10，300 及び 3,000 µg/mL のニポカリマブと併用したとき，アダリムマブの母体から胎児への移行率は 0.05～0.08%に低下した（表 2.6.2-4，Roy 2019）。したがって，ニポカリマブは母体から胎児への IgG の移行を阻害することが示された。

表 2.6.2-3 *Ex vivo* ヒト胎盤葉二重灌流モデルにおけるアダリムマブの母体から胎児への移行率

Exp. ID (PP#)	Test Article	Humira Lot #	Run Time (h)	Wt. of cotyledon (g)	Antipyrine FTR[1] (%)[2]	Humira FTR[1] (%)
39	Humira	66188XD07	6	38.7	41.6	0.65
41	Humira	66188XD07	6	34.3	39.3	0.11
45	Humira	66188XD07	6	32.3	39.9	0.22
60	Humira	72245XD14	6	29.5	42.0	0.42
72	Humira	72245XD14	6	37.5	39.8	0.21
73	Humira	1080720	6	39.7	39.6	0.03
74	Humira	1080720	6	32.7	47.2	0.05
80	Humira	72245XD06	6	28.1	43.9	0.15

[1]Ratio of fetal to maternal perfusate concentration x 100%
[2]Antipyrine transfer range between 35-45%

Adalimumab (humira) concentrations in all the maternal and fetal sample aliquots were determined using an ELISA with a LLOQ of ~ 1 ng/mL.
Abbreviations: FTR: fetal transfer rate; h: hour; Humira: adalimumab; PP: placental perfusion; wt: weight.
Source: RPT-2273.

表 2.6.2-4 *Ex vivo* ヒト胎盤葉二重灌流モデルにおけるアダリムマブの母体から胎児への移行率に対するニポカリマブ阻害作用

Exp. ID (PP#)	Test Article[1]	[M281] (µg/mL)	Run Time (h)	Wt. of cotyledon (g)	Antipyrine FTR[2] (%)	M281 FTR[2] (%)	Humira FTR[2] (%)
46	Humira	3000	6	24.8	39.7	0.001	0.06
48	Humira	300	6	30.3	45.8	0.002	0.08
70	Humira	300	6	38.0	39.1	0.003	0.05
71	Humira	300	6	28.1	42.7	0.003	0.05
75	Humira	300	6	35.3	-	0.021	0.07
76	Humira	300	6	30.8	43.9	0.001	0.07
77	Humira	10	6	26.5	41.8	0.000	0.06
78	Humira	10	6	29.5	52.3	0.000	0.08
79	Humira	10	6	41.2	44.8	0.000	0.07

[1]Humira lots used were 66188XD07 (Exp. ID 46), 71236XD0 (Exp. ID 48), 72245XD14 (Exp. ID 70,71), 72245XD06 (Exp ID 75-79) (ref. 56)
[2]Ratio of fetal to maternal perfusate concentration x 100%

Note: In all the studies reported except for PP 75, the transfer of the control molecule antipyrine was used to monitor the integrity of the perfusion between the maternal and fetal circuits.
Abbreviations: FTR: fetal transfer rate; h: hour; Humira: adalimumab; PP: placental perfusion; wt: weight, M281: nipocalimab.
Source: RPT-2273.

2.6.2.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

独立した安全性薬理試験は実施せず，ICH S6 (R1)及び S7A ガイダンスに従い，カニクイザルを用いた GLP 準拠の 4 週間及び 26 週間反復投与毒性試験に安全性薬理の評価項目（心電図，呼吸数及び神経学的検査）を組み込んで実施した。

2.6.2.4.1 心血管系

資料番号 4.2.3.2.2，4.2.3.2.3

雌雄のカニクイザルを用いた 4 及び 26 週間反復投与毒性試験において，両試験ともニポカリマブを 0，20，100 及び 306 又は 300 mg/kg で週 1 回，又は 26 週間試験では 50 mg/kg を隔週に 1 回，15 分間かけて静脈内投与し，心電図を評価した。回復期間はそれぞれ 9 週間及び 8 週間とした。主試験群は 1 群雌雄各 3 例を使用し，回復群として対照群及び高用量群に雌雄各 2 例を追加した。4 週間反復投与毒性試験では，Day 1，8，15 及び 22 にニポカリマブ又は溶媒を投与し，投与開始前に 2 回，Day 8（投与開始前及び投与後 2 時間）及び Day 27，並びに回復動物については回復期間終了時近く（Day 90）に，各動物の心電図を記録した。また，26 週間反復投与毒性試験では Day 1（Week 1）から Week 26 までニポカリマブ又は溶媒を週 1 回又は隔週に 1 回投与し，投与開始前に 2 回，Day 8（Week 2）（投与開始前及び投与 2 時間後）及び Week 25，並びに回復動物については回復期間終了時近く（Week 34）に，各動物の心電図を記録した。

いずれの試験においても，ニポカリマブの投与に関連する心電図所見（PR，QRS，QT 間隔及び心拍数）の変化は認められなかった【2.6.3.4】。

2.6.2.4.2 中枢神経系及び呼吸系

資料番号 4.2.3.2.2

雌雄のカニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験において，ニポカリマブを 0，20，100 及び 306 mg/kg の用量で Day 1，8，15 及び 22 に 15 分間かけて静脈内投与し，神経学的検査（観察及び評価の両方）及び呼吸数の測定を行った。低及び中用量群は 1 群雌雄各 3 例，対照群及び高用量群は 1 群雌雄各 5 例とした。投与前（Day -2）に 1 回，並びに Day 8（投与後 2 時間）及び Day 27（投与後 5 日）に神経学的検査を実施した。

検討した最高用量まで，ニポカリマブの投与に関連すると考えられる有害な神経学的所見及び呼吸数の変化は認められなかった【2.6.3.4】。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

X 線結晶構造解析より，ニポカリマブは FcRn の IgG Fc 結合部位に結合し，ニポカリマブと FcRn IgG 結合部位を中心とする標的エピトープとの間にはユニークな立体構造的相互作用が認め

られた。分子間相互作用に関する広範な検討により，ニポカリマブは FcRn 上の IgG Fc 結合部位に高い特異性及び親和性で結合することが示され，この結合様式から，ニポカリマブは IgG との直接競合により IgG リサイクルを阻害することが示唆された。一方で，FcRn のアルブミン結合部位は IgG 結合部位から離れて独立しており，ニポカリマブが FcRn 上のアルブミン結合部位に対して立体障害又は明らかなアロステリック調節を引き起こすエビデンスは示されなかった。

ニポカリマブの結合エピトープと交差反応する可能性が高い FcRn のヒト近縁タンパク質はなく，FcRn α 鎖とアミノ酸配列相同性が約 48%の HLA-A2 に対してニポカリマブは結合しなかった。ニポカリマブの結合エピトープを構成するヒト FcRn 配列が保存されていた動物種はカニクイザルのみであり，イヌ，ブタ，ラット及びモルモットの他の動物種との相同性は低かった。SPR 法を用いた検討では，ニポカリマブはマウス及びラットの FcRn には結合せず，ヒト及びカニクイザルの FcRn には pH にかかわらず高い親和性で結合し，K_D 値は 58 pmol/L 以下であった。ニポカリマブと FcRn の結合部位に位置するヒト *FCGRT* 遺伝子のコーディングバリアントの有無を解析した結果，*FCGRT* 遺伝子バリアントは，アフリカ系，東アジア系，南アジア系及びヨーロッパ系を含む多様な集団において全て 1%未満のマイナーな対立遺伝子であり，ニポカリマブの FcRn への結合に広範な影響を及ぼさないと考えられた。

HAEC を用いた細胞アッセイにより，ニポカリマブは IgG のリサイクルを濃度依存的に阻害したが，アルブミンのリサイクルには影響を及ぼさないことが示された。この結果は，ニポカリマブがアルブミン結合部位に影響を及ぼすことなく FcRn の IgG 結合部位に結合する結果と一致した。また，HAEC 及び HVT を用いたアッセイにおいても，FcRn 占有及び IgG リサイクルの阻害には濃度依存的な反応が認められた。

ニポカリマブは，296 番目のアミノ酸がアスパラギンからアラニンに置換されており，Fc 領域はグリコシル化を受けずエフェクター機能を持たないように設計されている。ADCC，ADCP 及び CDC 活性の検討結果より，ニポカリマブはエフェクター作用により細胞又は組織を傷害する可能性が低いことが示唆された。

Tg32 マウスを用いた *in vivo* 薬理試験において，投与されたヒト IgG 濃度はニポカリマブ投与により用量及び時間依存的に減少し，ヒト IgG の分解速度上昇が持続する時間は FcRn の占有時間の長さに比例していた。

また，病原性 IgG による自己免疫疾患に関して，ニポカリマブは CAIA モデル Tg32 マウスの病態を改善し，ITP モデル Tg32 マウスの血小板数を増加させることにより治療効果を示した。

Ex vivo 単一胎盤葉二重灌流モデルを用いた試験では，代表的な IgG の胎児移行に対するニポカリマブの阻害能が示され，ニポカリマブは母体の同種抗体の胎児への経胎盤移行を減少させる可能性が示唆された。

全体として，これらの効力を裏付ける試験の結果より，IgG 自己抗体又は同種抗体によって引き起こされる自己免疫疾患及び同種免疫疾患の病態において，ニポカリマブが治療効果を示すことが期待される。

2.6.2.6.2 安全性薬理試験

カニクイザルを用いた 4 週間及び 26 週間反復静脈内投与毒性試験に組み込んだ安全性薬理評価項目では，4 週間試験におけるニポカリマブの最高用量 306 mg/kg/日（雌雄合算の C_{max} は 8,660 µg/mL）及び 26 週間試験におけるニポカリマブの最高用量 300 mg/kg/日（雌雄合算の C_{max} は 10,300 µg/mL）まで，心電図，呼吸数及び神経学的検査に重要な所見は認められなかった。サルの 4 週間及び 26 週間試験の NOAEL での曝露量（平均 C_{max}）は，gMG 患者を対象とした第 III 相臨床試験（MOM-M281-011 試験）の用法及び用量（15 mg/kg q2w 又は 30 mg/kg q4w）に基づいて MOM-M281-011 データを反映した母集団 PK/PD モデル（M5.3.3.5/Phase 3 PPK Report）を用いたシミュレーションにより推定したヒト C_{max} の推定値（中央値：434 又は 902 µg/mL）の 20 及び 24 倍（15 mg/kg q2w に対する比）又は 9.6 及び 11 倍（30 mg/kg q4w に対する比）であった。

以上のことから，gMG 患者にニポカリマブを投与する上で，心血管系，呼吸系及び中枢神経系に対する重大な懸念は示唆されなかった。

2.6.2.6.3 結論

MG は，主に AChR 又は MuSK の機能を障害する病原性 IgG 自己抗体の作用によって神経筋接合部におけるコリン作動性の神経伝達が阻害される病態であり，筋力低下や易疲労性を特徴とする。ニポカリマブは，マウス FcRn との交差反応性がなく，ヒト FcRn トランスジェニックマウスを用いた gMG モデルが確立されていないため，MG モデルマウスでの評価はできなかったが，抗ラット AChR mAb 投与による受動的な実験的自己免疫 MG モデルラットに抗ラット FcRn 抗体又はエフガルチギモドアルファを投与すると血清中の IgG 濃度が減少し症状が改善すること，また MuSK 抗体陽性の MG 患者から精製した IgG の投与により誘発した MG モデルマウスにエフガルチギモドアルファを投与した場合も症状の改善が報告されている（Liu 2007; ウィフガート審査報告書）。これらの結果より FcRn の阻害は MG の治療において重要な役割を果たしていると考えられるが，ニポカリマブを評価可能な動物種（サル）の実験的自己免疫 MG モデルでは臨床症状を呈するものの可逆的であるため（Kusner 2015），MG 疾患モデル動物を用いたニポカリマブの薬効評価は実施していないが，ニポカリマブも抗 FcRn 抗体と同様の作用機序による gMG に対する治療効果が期待される。

結論として，ここに報告した種々の細胞を用いた *in vitro* 及びマウスの薬理データ，並びにサルの安全性薬理試験結果より，ニポカリマブは gMG を含む IgG による自己免疫疾患治療のための有効で安全な治療薬になることが示唆される。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

Andersen JT, et al. The conserved histidine 166 residue of the human neonatal Fc receptor heavy chain is critical for the pH-dependent binding to albumin. Eur J Immunol. 2006;36:3044-51.

Andersen JT, et al. The versatile MHC class I-related FcRn protects IgG and albumin from degradation: Implications for development of new diagnostics and therapeutics. Drug Metab Pharmacokinet. 2009;24:318-32.

Bjorkman PJ, et al. Structures of two classes of MHC molecules elucidated: crucial differences and similarities. Curr Opin Struct Biol. 1994;4:852-6.

Chaudhury C, et al. Albumin binding to FcRn: Distinct from the FcRn-IgG interaction. Biochemistry. 2006;45:4983-90.

Christianson GJ, et al. Monoclonal antibodies directed against human FcRn and their application. mAbs. 2012;4:208-16.

Kusner LL, et al. Guidelines for pre-clinical assessment of the acetylcholine receptor-specific passive transfer myasthenia gravis model - Recommendations for methods and experimental designs. Exp Neurol. 2015;270:3-10.

Latvala S, et al. Distribution of FcRn across species and tissues. J Histochem Cytochem. 2017;65:321-33.

Liu L, et al. Amelioration of experimental autoimmune myasthenia gravis in rats by neonatal FcR blockade. J Immunol. 2007;178:5390-8.

Lux A, et al. Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human FcγRs. J Immunol. 2013;190:4315-23.

Mahadevan U, et al. Placental transfer of anti-tumor necrosis factor agents in pregnant patients with inflammatory bowel disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013;11:286-92.

Maleitzke T, et al. Standardized protocol and outcome measurements for the collagen antibody-induced arthritis mouse model. STAR Protocols. 2022;3:101718.

Roy S, et al. M281, an anti-FcRn antibody, inhibits IgG transfer in a human ex vivo placental perfusion model. Am J Obstet Gynecol. 2019;220:498.e1-9.

Tada M, et al. Characterization of therapeutic monoclonal antibodies by using FcγR-expressing reporter cell lines. Yakugaku Zasshi. 2017;137:837-43.

Tao MH, et al. Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. J Immunol. 1989;143:2595-601.

Vafa O, et al. An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations. Methods. 2014;65:114-26.

ウィフガート点滴静注 400 mg 審査報告書
https://www.pmda.go.jp/drugs/2021/P20211223002/113014000_30400AMX00013_A100_1.pdf

Confidential

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: Nipocalimab

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/Formulation[a]) Doses (mg/kg)	GLP	Test Facility	Study No./ Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Nipocalimab Fab-FcRn x-ray crystallography	X-ray crystallography	NA	No	Janssen R&D, Spring House, PA, US	TD20[redacted]-084/ 4.2.1.1.1
Epitope-based analysis of nipocalimab's cross-reactivity potential to human proteins and select non-human mammalian FcRn, and experimental evaluation of specificity against HLA-A2 and cross reactivity to rodent FcRns	In silico analyses, ELISA and SPR	NA	No	Janssen R&D, Spring House, PA, US	DD[redacted]011/ 4.2.1.1.2
Survey of genetic variants of FcRn that are located at the nipocalimab-FcRn binding interface	In silico analysis	NA	No	Janssen R&D, Spring House, PA, US	DD[redacted]004/ 4.2.1.1.3
SPR analysis to determine binding affinity of nipocalimab for human and cynomolgus monkey FcRn	SPR	NA	No	Janssen R&D, Spring House, PA, US	TD20[redacted]-095/ 4.2.1.1.4
Nipocalimab lacks effector function	FcRn-HEK293 cell, Jurkat cells expressing FcγRIIIa receptor, Jurkat cells expressing FcγRIIa-H receptor	NA	No	Momenta Pharmaceuticals, Inc, Cambridge, MA, US	RPT-2479/ 4.2.1.1.5
Nipocalimab inhibits IgG recycling and has no effect on albumin recycling in a primary human endothelial cell-based assay	HAECs	NA	No	Janssen R&D, San Diego, CA, US	DD[redacted]006/ 4.2.1.1.6
Correlation between nipocalimab's FcRn occupancy and IgG recycling in cell-based assays	HAECs, HVTs, monocytes	NA	No	Momenta Pharmaceuticals, Inc, Cambridge, MA, US	RPT-2262/ 4.2.1.1.7
Nipocalimab's FcRn occupancy and PD relationship in Tg32 mice	Tg32 mouse	IV (PBS) 0, 0.2, 2 20, 50 and 100	No	Momenta Pharmaceuticals, Inc, Cambridge, MA, US	RPT-1667/ 4.2.1.1.8
Nipocalimab ameliorated disease pathology in a Murine CAIA model	Tg32 mouse	IV, 0 and 5	No	Momenta Pharmaceuticals, Inc, Cambridge, MA, US	RPT-2549/ 4.2.1.1.9
Nipocalimab improved platelet recovery murine chronic ITP model	Tg32 mouse	IV 0, 5, 20 and 50	No	Momenta Pharmaceuticals, Inc, Cambridge, MA, US	RPT-1669/ 4.2.1.1.10

(Continued)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: Nipocalimab

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/Formulation[a]) Doses (mg/kg)	GLP	Test Facility	Study No./ Location in CTD
Primary Pharmacodynamics (Continued)					
Assessment of nipocalimab blockade of IgG transfer across human placenta using an ex-vivo placental perfusion model	Human placental cotyledon dual perfusion model	NA	No	Momenta Pharmaceuticals, Inc, Cambridge, MA, US and University of Texas, Medical Branch	RPT-2130/ 4.2.1.1.11 RPT-2273/ 4.2.1.1.12
M281, an anti-FcRn antibody, inhibits IgG transfer in a human ex vivo placental perfusion model	Human placental cotyledon dual perfusion model	NA	No	Momenta Pharmaceuticals, Inc, Cambridge, MA, US, and University of Texas, Medical Branch	Roy 2019/ 4.3.1
Secondary Pharmacodynamics	*No secondary pharmacodynamics studies have been conducted*				
Safety Pharmacology					
Cardiovascular and CNS assessment, as part of the 4-week repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkey	IV (M281-placebo[b]) 0, 20, 100, 306 (weekly)	Yes	[redacted], UK	529060/ 4.2.3.2.2
Cardiovascular assessment, as part of the 26-week repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkey	IV (0.9% NaCl) 0, 20, 100, 300 (weekly) 50 (twice weekly)	Yes	[redacted], UK	501555/ 4.2.3.2.3
Pharmacodynamic Drug Interactions	*No pharmacodynamic drug interaction studies have been conducted*				

Note: nipocalimab = M281 or N027 (stated in study reports)
Note: Momenta Pharmaceutics, Inc, was acquired by Johnson & Johnson in 2020 and is now considered a part of Janssen Research & Development LLC.
[a] Formulation information in the table is aligned with information specified in study report. Formulation information was not specified in study reports RPT-2594 and RPT-1669.
[b] M281-placebo = 24.2 mM sodium phosphate, 24.1 mM sodium chloride, 7.6% (w/v)/7.3% (w/w) trehalose (222 mM), 0.01% (w/v) PS80, pH 6.5.

CAIA: collagen antibody-induced arthritis; CNS: central nervous system; [redacted]; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; Fab: fragment antigen-binding; FcRn: neonatal fragment crystallizable receptor; GLP: good laboratory practice; HAEC: human aortic endothelial cell; HEK: human embryonic kidney; HVT: human villous trophoblast; IgG: immunoglobulin G; ITP: immune thromcobytopenia; IV: intravenous; NA: not applicable; PBS: phosphate buffered saline; PD: pharmacodynamics; PS: polysorbate; R&D: Research and Development; SPR: surface plasmon resonance; Tg32: human FcRn transgenic mouse; UK: United Kingdom; US: United States

Confidential

Confidential

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

No primary pharmacodynamics tabulated summary is provided as a separate document. Tables and figures were included as part of the Mod2.6.2 Pharmacology Written Summary.

2.6.3.3　副次的薬理試験

No secondary pharmacodynamics studies with nipocalimab have been conducted.

2.6.3.4　安全性薬理試験

Test Article: Nipocalimab

Species/Strain sex/No. Per group	Route (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/week)	Noteworthy Findings (Safety Pharmacology Endpoints[a])	Study No./ Location in CTD
Cynomolgus monkey (n=3/sex/group + 2/sex/control and high dose group for recovery)	IV (M281-placebo[b])	4 weeks + 9 weeks treatment-free	0, 20, 100, 306	Neurologic examinations (observations and assessments) and respiratory rate observations (breaths/min) (pretreatment, Day 8 and end of dosing): no adverse findings Cardiovascular examinations (ECG; pretreatment, Day 8, end of dosing and end of recovery): no findings 306 mg/kg/week: C_{max}: 8,730/8,590 µg/mL (M/F) $AUC_{0\text{-}last}$[c]: 746,000/827,000 µg·h/mL (M/F)	529060/ 4.2.3.2.2
Cynomolgus monkey (n=3/sex/group + 2/sex/control and high dose group for recovery)	IV (0.9% NaCl)	26 weeks + 8 weeks treatment-free	0, 20, 100, 300 (weekly) 50 (twice weekly)	Cardiovascular examinations (ECG; pretreatment, Day 8, end of dosing and end of recovery): no findings 300 mg/kg/week: C_{max}: 9,810/10,700 µg/mL (M/F) $AUC_{0\text{-}last}$[d]: 503,000/563,000 µg·h/mL (M/F)	501555/ 4.2.3.2.3

Note: M281 (used in study report) = nipocalimab

[a] Safety pharmacology endpoints were incorporated into the design of the 4-week and 26-week GLP toxicity study in cynomolgus monkeys; for the detailed results of the entire study please see Tables 2.6.7.7.A and 2.6.7.7.B.

[b] M281-placebo = 24.2 mM sodium phosphate, 24.1 mM sodium chloride, 7.6% (w/v)/7.3% (w/w) trehalose (222 mM), 0.01% (w/v) PS80, pH 6.5.

[c] $AUC_{0\text{-}last}$ represents the AUC over the entire dosing period from time 0 before the first dose to the last measurable time point after the last dose and includes the recovery period for the recovery animals at 306 mg/kg dose group.

[d] The mean $AUC_{0\text{-}last}$ values for the 300 mg/kg/week dose group on Week 26 include animals in the main and recovery groups, although the last TK sampling timepoint differed between these two groups (96 hours vs 8 weeks [1344 hours] post dose, respectively). For the main and recovery groups, individual $AUC_{0\text{-}last}$ ($AUC_{0\text{-}96h}$) values were 453,000 and 429,000 µg·h/mL (main) and 495,000 and 361,000 µg·h/mL (recovery) for males, and 577,000, 472,000, and 499,000 µg·h/mL (main) and 444,000 and 449,000 µg·h/mL (recovery) for females, with a combined sex mean of 464,000 µg·h/mL.

$AUC_{0\text{-}last}$: area under the serum concentration versus time curve from time 0 to the last measurable time point; C_{max}: maximum serum concentration; ECG: electrocardiogram; F: female; IV: intravenous; M: male; NaCl: sodium chloride; PS: polysorbate

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

No pharmacodynamic drug interaction studies with nipocalimab have been conducted.