# キネレット皮下注 100 mg シリンジ

# ＜アナキンラ（遺伝子組換え）＞

# 第 2 部（モジュール 2）
# CTD の概要（サマリー）

# 2.4　非臨床試験の概括評価

## Swedish Orphan Biovitrum Japan 株式会社

Property of the SOBI group - strictly confidential

# 目次

2.4　非臨床試験の概括評価 ..... 4
2.4.1　非臨床試験計画概略 ..... 4
2.4.2　薬理試験 ..... 7
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 ..... 7
2.4.2.2　安全性薬理試験 ..... 8
2.4.2.3　薬力学的薬物相互作用 ..... 8
2.4.3　薬物動態試験 ..... 8
2.4.3.1　薬物動態学的薬物相互作用 ..... 9
2.4.4　毒性試験 ..... 10
2.4.4.1　単回投与毒性試験 ..... 17
2.4.4.2　反復投与毒性試験 ..... 17
2.4.4.3　遺伝毒性試験 ..... 18
2.4.4.4　がん原性試験 ..... 18
2.4.4.5　生殖発生毒性試験 ..... 18
2.4.4.6　幼若動物試験 ..... 18
2.4.4.7　局所刺激性 ..... 18
2.4.4.8　その他の毒性試験 ..... 19
2.4.4.8.1　免疫調節 ..... 19
2.4.4.8.2　免疫原性 ..... 19
2.4.5　総括及び結論 ..... 20
2.4.6　参考文献 ..... 23

# 表目次

表 2.4-1　動物及びヒトにアナキンラを s.c.投与したときの薬物動態の比較 ..... 9
表 2.4-2　アナキンラ毒性試験の概要 ..... 11

略語・略号一覧

| 略語・略号 | 略していない表現（英語） | 略していない表現（日本語） |
|---|---|---|
| AOSD | Adult onset Still's disease | 成人発症スチル病 |
| AUC | Area under the curve | 血漿中濃度－時間曲線下面積 |
| BID | Twice a day | 1 日 2 回 |
| CAPS | Cryopyrin-associated periodic syndromes | クリオピリン関連周期熱症候群 |
| CSF | Cerebrospinal fluid | 脳脊髄液 |
| DMARD | Disease-modifying anti-rheumatic drug | 疾患修飾性抗リウマチ薬 |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | デオキシリボ核酸 |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid | エチレンジアミン四酢酸 |
| FMF | Familial Mediterranean fever | 家族性地中海熱 |
| 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 |
| ICH | International Council for Harmonisation | 医薬品規制調和国際会議 |
| i.v. | Intravenous (ly) | 静脈内 |
| IL-1 | Interleukin-1 | インターロイキン-1 |
| IL-1Ra | Interleukin-1 receptor antagonist | インターロイキン-1 受容体拮抗薬 |
| IL-1RI | Interleukin-1 receptor type I | インターロイキン-1 受容体 I 型 |
| IL-1RII | Interleukin-1 receptor type II | インターロイキン-1 受容体 II 型 |
| kDa | Kilodalton | キロダルトン |
| *MEFV* | Mediterranean fever gene | 地中海熱遺伝子 |
| mRNA | messenger ribonucleic acid | メッセンジャーリボ核酸 |
| MTX | Methotrexate | メトトレキサート |
| NK | Natural killer (cell) | ナチュラルキラー（細胞） |
| NOAEL | No observed adverse effect level | 無毒性量 |
| PD | Pharmacodynamic (s) | 薬力学的 |
| PEG-sTNF-RI | Polyethylene glycosylated soluble tumor necrosis factor-receptor type I | ポリエチレングリコシル化可溶性腫瘍壊死因子受容体 I 型 |
| $PGE_2$ | Prostaglandin $E_2$ | プロスタグランジン $E_2$ |
| PK | Pharmacokinetic (s) | 薬物動態 |
| r-metHuIL-1Ra | Recombinant-methionyl human interleukin-1 receptor antagonist (anakinra) | 遺伝子組換えメチオニルヒトインターロイキン-1 受容体拮抗薬（アナキンラ） |
| s.c. | Subcutaneous(ly) | 皮下 |
| sJIA | Systemic juvenile idiopathic arthritis | 全身型若年性特発性関節炎 |
| $t_{1/2}$ | Half-life | 半減期 |
| TNF | Tumor necrosis factor | 腫瘍壊死因子 |

## 2.4 非臨床試験の概括評価

### 2.4.1 非臨床試験計画概略

アナキンラ（遺伝子組換え）は、遺伝子組換えヒトインターロイキン-1 受容体拮抗薬（IL-1Ra）で、遺伝子組換えデオキシリボ核酸（DNA）技術を用いて大腸菌で生産した可溶性タンパク質である。アナキンラは、N 末端にメチオニン残基を有する点が天然のヒトタンパク質と異なり、天然分子のように糖鎖修飾されていない。そのため、遺伝子組換えメチオニルヒトインターロイキン-1 受容体拮抗薬（r-metHuIL-1Ra）とも示される。アナキンラは 153 個のアミノ酸からなり、分子量は 17.3 kDa である。アナキンラはヒト以外の動物種で相当のタンパク質と 75～77%の相同性を示す（Eisenberg 1991、Cominelli 1994）。異種タンパク質であるにもかかわらず、実験動物におけるアナキンラの活性はヒトで想定される活性と一致していると考えられる。

アナキンラ/IL-1Ra はインターロイキン-1（IL-1）サイトカインファミリーの一員である。IL-1 シグナル伝達経路は、2 種類の作動物質である IL-1α 及び IL-1β、膜結合型及び可溶型の両方の形態で存在する 2 種類の受容体である、IL-1 受容体 I 型（IL-1RI）及び IL-1 受容体 II 型（IL-1RII）、並びに 1 種類の可溶型拮抗物質（IL-1Ra）から構成される。膜結合型 IL-1RI は、様々な細胞に存在し、IL-1α 及び IL-1β の初期シグナル伝達作用を担う。血中を循環する受容体拮抗物質である IL-1Ra は、I 型受容体に競合的に結合することで IL-1α 及び IL-1β の作用に対して拮抗し、IL-1α 及び IL-1β が媒介する炎症プロセスを抑制する。アナキンラが IL-1 細胞表面受容体に競合的拮抗薬として作用し、内因性作動活性を示さずに IL-1 の作用に対して拮抗することを示す多くの薬理試験が文献で公表されている。アナキンラは、IL-1α 及び IL-1β の作用を効果的に抑制する。

海外では、関節リウマチ、クリオピリン関連周期熱症候群（CAPS）、家族性地中海熱（FMF）、全身型若年性特発性関節炎（sJIA）及び成人発症スチル病（AOSD）など他の IL-1 が起因となる疾患の慢性炎症及びそれに伴う組織破壊を、定期的な皮下投与で制御するためにアナキンラを開発した。アナキンラはこれらの適応症の治療を目的としており、単独投与又は疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARD）など他の抗リウマチ薬と併用投与して、症状を軽減し、構造的損傷を遅延させる。日本における申請効能又は効果は全身型若年性特発性関節炎、成人発症スチル病である。

アナキンラの臨床開発プログラムを支援するために、多数の薬理試験、安全性薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験を実施、又は文献報告から要約し、［2.6.2］項、［2.6.4］項及び［2.6.6］項に示す。これらの試験は、アナキンラの作用機序、その *in vitro* 及び *in vivo* での薬理作用、及びその薬物動態（PK）、全身曝露量、一般毒性、生殖発生毒性、遺伝毒性、がん原性及び免疫原性を網羅している。ほとんどの試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した。

## アナキンラの薬理作用

アナキンラは、IL-1α 及び IL-1β と同等の親和性で IL-1 受容体に結合するが、解離速度は遅い。アナキンラは、*in vitro* 及び *in vivo* の両方で IL-1α 及び IL-1β により誘導される反応を抑制する。アナキンラの主な生物学的作用は、IL-1 の作用に対して拮抗することであり、それによって IL-1 が誘導する疾患の症状を軽減する。

アナキンラが IL-1 受容体に結合しても、シグナル伝達を惹起するリガンド受容体複合体を形成できないことが示唆される。腫瘍細胞株を用いたアナキンラの *in vitro* 試験では、アナキンラによる増殖作用は示されていない。IL-1 誘発の *in vitro* 反応、例えば胸腺細胞の増殖、滑膜細胞、包皮線維芽細胞及び軟骨細胞によるプロスタグランジン $E_2$（$PGE_2$）及び/又はコラゲナーゼの産生並びに臍帯静脈内皮細胞での接着分子のメッセンジャーリボ核酸（mRNA）の発現量増加は、全てアナキンラによって抑制される。

*In vivo* 試験では、アナキンラは複数の動物関節炎モデルにおいて炎症、骨破壊及び軟骨変性に対する抑制作用を示している。アナキンラは、実験的アレルギー性脳脊髄炎などの多発性硬化症のラット及びモルモットモデル、脳卒中及び頭部外傷のラットモデル、移植片対宿主病及び角膜同種移植生存のマウスモデルなど、他の自己免疫疾患の動物モデルでも活性を示している。

鎮痛活性、中枢/自律神経系、心血管、消化管又は腎機能を評価する安全性薬理試験では、アナキンラ関連の影響は認められなかった。高用量投与群での可逆的な腎臓の変化及びラットを用いた静脈内及び皮下投与後の注射部位での局所的な影響を除いて、アナキンラによる全身反応は認められなかった。

アナキンラの薬力学的薬物相互作用は、アジュバント関節炎ラットにおいてメトトレキサート（MTX）（Bendele 1999b）又は PEG-sTNF-RI（Feige 2000）との併用投与により評価した。アナキンラ単独投与（5 mg/kg/hour）では足蹠浮腫に対する抑制作用は 9%であり、MTX 単独投与（0.075 mg/kg）では 45%、アナキンラと MTX の併用投与では 78%の抑制が認められた（Bendele 1999b）。さらに、低用量のアナキンラ（0.2 mg/kg/hour）又は PEG-sTNF-RI（0.25 mg/kg/day）の単独投与では、アジュバント関節炎ラットにおける炎症、体重減少及び骨密度の低下に対する抑制作用は認められなかった。しかし、これらの低用量の併用投与により、炎症（足跡浮腫）に対する 78 ± 10%の抑制及び骨密度低下に対する 64 ± 14%の抑制が認められた。低用量での併用投与による足蹠浮腫に対する作用は非常に顕著であり、相乗作用を示した。

## アナキンラの薬物動態

ラット、ウサギ及びカニクイザルに皮下投与したときの血漿中アナキンラ濃度は、同用量を静脈内投与したときより長時間体内に持続したことから、体内の薬物動態においては吸収過程が最も遅い過程であることが示唆された。この吸収の延長は、投与部位からアナキンラが緩徐に移動すること、及び/又はアナキンラ投与量の一部が全身循環への経路でリンパ系を移動する際に緩徐な動態を示すことに起因すると考えられる。3 種の動物にわたり、アナキンラはより大きな動物種でより緩徐な薬物動態を示す傾向があり、平均滞留時間はラット、ウサギ、サルでそれぞれ

2.18、3.04、8.44 時間に増加した。また、動物種の体格が大きくなるにつれて、半減期が長くなる傾向が認められた。

ラットにアナキンラを 1 日 2 回皮下投与したとき、血漿中アナキンラ濃度の有意な蓄積（最大 48 倍）が認められた。アカゲザルでは、10 mg/kg の用量でアナキンラの血漿中濃度の蓄積（74%）が認められたが、その用量ではばらつきが大きく、高用量では蓄積が少なかった。この蓄積は、抗アナキンラ抗体又は他のタンパク質への結合に続くアナキンラの腎糸球体ろ過の減少によるものと考えられる。

アナキンラと MTX 又はアナキンラと PEG-sTNF-RI を併用反復投与したときのアナキンラの全身曝露を検討した。ラットに MTX の経口投与と共にアナキンラを皮下投与しても、アナキンラの薬物動態パラメーターの変化に明確な傾向は認められなかった。PEG-sTNF-RI の反復皮下投与は、ラットにおけるアナキンラの単回静脈内投与後の薬物動態又はカニクイザルにおける反復皮下投与後の薬物動態に明らかな影響を及ぼさなかった。全ての試験でアナキンラの薬物動態に明確な変化の傾向は見られなかった。

**アナキンラの毒性**

開発初期には、アナキンラがどのような疾患の適応症をターゲットにするのかは定まっておらず、臨床投与経路も確立されていなかった。いくつかの非臨床試験は併用療法として実施した。そのため、1990 年代には反復投与毒性試験を多数実施した。

一般毒性試験はラット及びサルを用いて実施し、アナキンラを皮下及び静脈内に投与した。動物で十分な曝露量を得るため、非臨床試験ではヒトよりも頻回投与とした。生殖発生毒性試験では、ラット及びウサギを選択した。小児適応を担保するために、幼若ラットの記憶・学習機能を検査する幼若ラットの毒性試験（GLP 適用）を実施した。ラットで血漿曝露量の測定と共に、抗アナキンラ抗体を検出して免疫原性を検討した。ラットの長期投与試験では、200 mg/kg/日までの用量を 1 日 2 回、6 ヵ月間皮下投与した。

標準的ながん原性試験は実施しなかった。長期がん原性試験は、アナキンラのタンパク質性を考慮すると、妥当な試験とは考えられなかった。ICH S6（R1）ガイドラインによれば、標準的ながん原性試験は一般的にバイオテクノロジー応用医薬品には不適当である。薬理学的作用機序、観察された宿主抵抗性試験に対する最小限の影響、及びナチュラルキラー（NK）細胞活性の僅かな亢進に基づき、アナキンラ固有の発がん性の懸念はないと考えられた。*In vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験は標準的組合せで実施した。

アナキンラは免疫調節薬（IL-1 シグナル伝達に拮抗）であることから、宿主抵抗性、膿瘍の消失、全体的な免疫能に対する影響など、免疫系への潜在的な有害作用をいくつかの試験で検討した。

### 2.4.2 薬理試験

#### 2.4.2.1 効力を裏付ける試験

単一遺伝子自己炎症性疾患は、自然免疫系の制御障害として特徴づけられる。IL-1 は多くの自己炎症性疾患の主要な誘導因子であり、強力な内因性発熱物質であり、好中球及びマクロファージの強力な遊走因子及び活性化因子である。IL-1 の調節不全は、結果として CAPS 及び FMF などのいわゆる単一遺伝子自己炎症性疾患を発症することが示されている。

CAPS には IL-1 の活性上昇が強く関与している。CAPS 症候群患者の IL-1β 血清中濃度の解析により、IL-1 濃度の上昇が疾患及びその関連症状（発熱、蕁麻疹様発疹及び関節症）の主要な原因であることが示された（Lachmann 2009）。単一遺伝子性自己炎症性疾患で観察されたのと同様に、非臨床及び臨床観察により、炎症性サイトカイン IL-1β の調節不全が sJIA 及び AOSD の病因においても重要な役割を果たすことが示唆されている。Pascual らの試験（Pascual 2005）では、sJIA 関節炎患者由来の血清とインキュベートした健康被験者の末梢血単核細胞が IL-1β を大量に分泌することが示された。IL-1 活性低下により、これらの疾患に特徴的な組織病変の発症を防ぐことができるという臨床的証拠が増加しつつある。

FMF は、地中海熱遺伝子（*MEFV*）（地中海熱）と呼ばれる遺伝子の変異を伴う常染色体劣性遺伝の自己炎症性疾患である。*MEFV* 遺伝子はピリンとして知られる 781 アミノ酸のタンパク質をコードしている。FMF に関連するほとんどの劣性変異が認められる分子の B30.2/SPYR ドメインをコードするエクソン 10 に変異の大部分が局在している。疾患関連変異により、カスパーゼ 1 の負の調節因子であるピリンタンパク質の産生が減少し、成熟 IL-1β の純増を誘導する。実際に、*MEFV* 遺伝子がコードする変異型ピリンにより、IL-1β の分泌及び産生を通じて炎症を増強することが示されている。*MEFV* 変異を示す FMF 患者由来の単球は、リポ多糖刺激により IL-1β の分泌が増加した（Omenetti 2014）。同様に、FMF のマウスモデル（FMF-KI）では、カスパーゼ 1 の異常な活性化が IL-1β の成熟及び遊離を促進した（Sharma 2017）。ピリン欠損マウスでは、IL-1β の成熟促進及び分泌の増加を示す（Chae 2003）。生物学的ホモログである IL-1α とは対照的に、IL-1β が活性化するためにはカスパーゼ 1 によるプロテアーゼ切断が必要となる。

アナキンラは、IL-1α 及び IL-1β の IL-1RI への結合を拮抗することにより、これらの生物学的活性を阻害する。内因性 IL-1Ra は、IL-1RI に対して IL-1RII よりも約 100 倍高い親和性で結合することが知られている（Dripps 1991）。アナキンラは、天然に存在する非糖鎖化型ヒト IL-1Ra と同一であるが、N 末端にメチオニン残基が付加されている点のみが異なる。アナキンラは、IL-1 細胞表面の受容体に対する競合的拮抗薬として位置づけられており、内因性の作動活性を示さずに IL-1 の作用に対して拮抗する。

IL-1α 及び IL-1β の生物学的活性の中和に加えて、滑膜細胞、線維芽細胞及び軟骨細胞による一酸化窒素、$PGE_2$ 及び/又はコラゲナーゼの産生の誘導など、*in vitro* で IL-1 が誘発する反応もアナキンラは抑制する（Dinarello 1991、McIntyre 1991、Miesel 1995）。いくつかの関節炎動物モ

デルにおいて、アナキンラにより関節の炎症及び腫れ、軟骨破壊並びに骨吸収が減少することが示されている（Bendele 1999a）。

アナキンラは、他の炎症性疾患の動物モデル、例えば多発性硬化症のラット及びモルモットの実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル、脳卒中及び頭部外傷のラットモデル、移植片対宿主病のマウスモデル、角膜同種移植片生存モデル並びにいくつかの関節炎動物モデルに対しても活性を示す。

#### 2.4.2.2 安全性薬理試験

安全性薬理試験は、マウス、ラット及びイヌの *in vivo* 試験並びにモルモット回腸を用いた *ex vivo* 試験を実施し、中枢/自律神経系、鎮痛活性及び/又は抗炎症活性、心血管系、消化器系、腎機能に対する機能的影響を明らかにすることに重点を置いた。モルモット回腸では、自律神経系及び平滑筋に対するアナキンラの影響は認められなかった。血圧、心拍数、呼吸、血流及び心電図に対するアナキンラの影響は観察されなかった（[2.6.2.4］項）。

#### 2.4.2.3 薬力学的薬物相互作用

長年にわたり、MTX は関節リウマチ患者の標準治療薬であった。したがって、アナキンラ及び MTX の併用投与が各単独投与よりも大きな効果をもたらす可能性を検証するための試験を実施した。アナキンラ及び MTX の併用作用は、ラットアジュバント関節炎モデルで評価した。アナキンラは、アジュバント関節炎モデルのラットに対して 8 日目から 15 日目にかけて 5 mg/kg/hour を持続静脈内投与し、MTX は 0 日目から 15 日目にかけて 75 µg/kg/日を経口投与した。併用投与により相乗作用又は相加作用を示した（Bendele 1999b）。アナキンラ単独投与で、足蹠浮腫を 9%抑制したのに対し、MTX 単独投与では 45%抑制した。アナキンラ及び MTX の併用投与では、腫れが 78%減少した。アナキンラ単独投与では骨吸収が 53%減少したのに対し、MTX 単独投与では 58%抑制した。アナキンラ及び MTX の併用投与では、骨吸収が 97%減少した。これらの所見は、関節リウマチ患者でのアナキンラの単独療法又は他の DMARD（例：MTX）との併用療法の無作為化臨床比較試験を進めるための実験的裏付けとなった（[2.5.1.5］項）。

### 2.4.3 薬物動態試験

ラット、ウサギ、カニクイザルを用いた非臨床薬物動態試験の結果、アナキンラは、効率的なクリアランスと小さい分布容積のため、静脈内投与後に血漿から速やかに消失することが示された。ラット、ウサギ及びカニクイザルにアナキンラを単回皮下投与したとき、投与部位からのアナキンラの見かけ上の緩徐な吸収のため、同用量を静脈内投与したときよりも全身血漿中アナキンラ濃度の持続時間が長くなった（[2.6.4.3.2］項）。皮下投与後の消失半減期の平均値は、ラット、ウサギ及びサルでそれぞれ 0.891、1.18 及び 3.03 時間であった。皮下投与後のバイオアベイラビリティはラット、ウサギ及びサルでそれぞれ 62%、72%及び 88%であった。投与期間の延長に伴い、ラット及びサルで血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）の相対的な増加が認められ

たが、これは腎排泄からタンパク質を再吸収するアナキンラ抗体複合体の生成に関連していると考えられる（[2.6.4.3.3]項）。

ラットにおける組織分布試験で、筋肉、腎臓、肝臓、腸及び肺がアナキンラの初期分布の主要部位であることが示された。定常状態での分布容積は、細胞外液容積（約 200 mL/kg）と同程度の容積へのその後の分布を意味している。ラットにおける定常状態の組織対血漿アナキンラ濃度比は、腎臓を除く全ての組織で生理学的細胞外液量への分布と類似している。腎臓では、アナキンラは腎臓の細胞外液量から予測されるよりもはるかに大きな組織対血漿濃度比を示し、腎臓が体循環からアナキンラを排泄する主要部位であることを示している。アナキンラの平均血漿クリアランスは、ラット、ウサギ及びカニクイザルでそれぞれ 7.36、5.15 及び 2.55 mL/min/kg であり、それぞれの動物種における糸球体ろ過量と同程度である。ラットを用いた定常状態の試験結果から、腎臓がアナキンラの血漿クリアランスの約 80%の要因である考えられる。しかし、アナキンラの尿中回収率は投与量に対して低い。したがって、アナキンラは腎臓で糸球体ろ過により除去され、その後尿細管上皮の再吸収と代謝が行われると考えられる（[2.6.4.4]項）。

使用した動物及びヒトにおけるアナキンラの全身曝露量の比較を表 2.4-1 に示す。

**表 2.4-1　動物及びヒトにアナキンラを s.c.投与したときの薬物動態の比較**

| Species | Dose mg/kg s.c. | $C_{max}$ ng/mL | $t_{1/2}$ h | $t_{max}$ h | CL/F mL/min/kg | $AUC_{0-\infty}$ ng·h/mL |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Rat[a,b] 28 days | 100 | 210000 | 1.2 | 2 | 1.2 | 1440000 |
| Rhesus monkey[a] 28 days | 100 | 38390 | 3.4 | 2 | 4.9 | 375600 |
| Cynomolgus monkey[a] 28 days | 100 | 46000 | 4.4 | 2.7 | 4.0 | 462000 |
| Humans[c] (healthy subjects) Single dose | 100 | 773 | 5.24 | 4.0 | 170* | 10188 |

*mL/min

Abbreviations: $AUC_{0-\infty}$, Area under the curve from time 0 to infinity; CL/F, Apparent clearance; $C_{max}$, Maximum plasma concentration; F, Bioavailability; Rh A, Rheumatoid arthritis; s.c., Subcutaneous; $t_{1/2}$, Half-life; $T_{max}$, Time to reach maximum concentration.

[a]From nonclinical pharmacokinetics report ([redacted]100787).

[b]F 61 %; from nonclinical pharmacokinetics report ([redacted] 100787).

[c] Source: Open-label, Single-dose Study of the Pharmacokinetics of Anakinra (r-metHuIL-1ra) in Subjects With Various Degrees of Renal Function ([redacted] 20000268).

### 2.4.3.1　薬物動態学的薬物相互作用

アナキンラと MTX、アナキンラと PEG-sTNF-RI との相互作用を検討した。ラットに 28 日間 MTX を連日経口投与と併用しアナキンラを連日皮下投与したとき、アナキンラは経口投与した MTX の全身曝露に明らかな影響を及ぼさなかった。PEG-sTNF-RI の反復皮下投与は、ラットにおけるアナキンラの単回静脈内投与後の薬物動態又はカニクイザルにおける反復皮下投与後の薬

物動態に明らかな影響を及ぼさなかった。全ての試験で明らかなアナキンラの薬物動態の変化の傾向は認められなかった（[2.6.4.3.3.1]項、[2.6.4.3.3.3]項、[2.6.4.3.3.4]項、[2.6.4.3.3.6]項)。

### 2.4.4 毒性試験

重要な毒性試験は、ラット及びヒト以外の霊長類を用いて実施したが、アナキンラの薬理学的評価に基づき、これらの動物種が薬理学的に適切であるためである。これは、動物種の選択に関する ICH S6（R1）ガイドラインの勧告に従ったものである。

アナキンラは、ラット及びヒト以外の霊長類のいずれにおいても生物学的活性を有することが知られている。アナキンラの中期及び長期の反復投与毒性試験はいずれもラットを用いて実施し、中期の反復投与試験はヒト以外の霊長類を用いて実施した。幼若ラットを用いた試験で、海馬依存性の記憶・学習機能に対するアナキンラの影響を検討した。アナキンラの主な生物学的作用は IL-1 の作用に拮抗することであり、アナキンラは固有のアゴニスト活性を有さないため、高用量のアナキンラによる過度の薬理作用は予測されなかった。

遺伝子組換えメチオニルヒトインターロイキン-1 受容体拮抗薬（r-metHuIL-1Ra）は、他の種の類似した IL-1 受容体アンタゴニストタンパク質と同様であるが、同一ではない。したがって、アナキンラは非臨床毒性評価に用いた動物種において免疫学的反応を誘発する可能性がある。アナキンラの免疫原性をサルで評価した。

毒性試験のために、EDTA を含有するリン酸塩及びクエン酸塩緩衝液の種々の調製物中にアナキンラを処方した。開発後期には、ポリソルベート 80 を安定化剤として添加したクエン酸塩を最適な緩衝液として選択した。*In vivo* で試験した製剤は、臨床製剤とほぼ類似していた。

アナキンラの非臨床毒性試験の概要を表 2.4-2 に示す。

## 表 2.4-2 アナキンラ毒性試験の概要

| Type of study (Module 4 eCTD location) | Test system (species and strain) | Method of administration | Duration of dosing (frequency) | Dose level[a] | GLP[b] | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Single-dose toxicity (［4.2.3.1］) | | | | | | |
| Acute intravenous toxicity study of IL-1Ra in rats | CD® VAF/Plus® rat | i.v. | Single dose | 0, 1.5, 15, 150, 720 mg/kg/day | Yes | SY05-T94-01 |
| Acute intravenous toxicity study of IL-1Ra in cynomolgus monkeys | Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) | i.v. | Single dose | 0, 1.5, 15, 150 mg/kg/day | Yes | SY05-T94-02 |
| Repeat-dose toxicity (［4.2.3.2］) | | | | | | |
| Subchronic (2 week, b.i.d.) subcutaneous toxicity study of IL-1Ra in Sprague-Dawley® rats | Sprague-Dawley® rat CD® (SD) BR | s.c. | 2 weeks (b.i.d.) | 0, 5, 20, 80 mg/kg/day | Yes | SY05-T89-10 |
| Subchronic high-dose subcutaneous toxicity (q.i.d.) study of IL-1Ra in Sprague-Dawley rats | Sprague-Dawley rat | s.c. | 2 weeks (q.i.d.) | 0, 120 mg/kg/day | Yes | SY05-T89-12 |
| Subcutaneous 6-month toxicity study in rats treated with anakinra (Kineret), including 1-month interim and 1-month recovery groups | Sprague-Dawley rat | s.c. | 1/6 months (b.i.d.) | 0, 2, 20, 200 mg/kg/day | Yes | SY05-T94-04 |
| Intravenous (2 week) systemic toxicity study of IL-1Ra in Sprague-Dawley rats | Sprague-Dawley rat | i.v. | 2 weeks | 0, 0.047, 0.231, 1.17 mg/kg/day | Yes | SY05-T89-01 |
| A subchronic (2 week) intravenous toxicity study of IL-1Ra in Sprague-Dawley rats | Sprague-Dawley rat | i.v. | 2 weeks | 0, 2, 5, 20 mg/kg/day | Yes | SY05-T89-02 |
| A 4-week toxicity and toxicokinetic study of subcutaneously administered anakinra and orally administered methotrexate in rats (GLP toxicity study, non-GLP PK and TK data reported in Module [2.6.4]) | Sprague-Dawley rat | s.c. anakinra; p.o. MTX | 4 weeks (q.d.) | Anakinra - 0, 1, 10, 100 mg/kg/day; MTX - 0, 0.04, 0.2 mg/kg/day | Yes | 960048 |

| Type of study (Module 4 eCTD location) | Test system (species and strain) | Method of administration | Duration of dosing (frequency) | Dose level[a] | GLP[b] | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Subchronic (2 week) intravenous toxicity study of IL-1Ra in Sprague-Dawley rats | Sprague-Dawley rat | i.v. | 2 weeks | 0, 3, 10, 30 mg/kg/day | Yes | SY05-T89-05 |
| Subchronic (2 week) intravenous toxicity study of IL-1Ra in Sprague-Dawley rats | Sprague-Dawley rat | i.v. | 2 weeks | 0, 30 mg/kg/day | Yes | SY05-T89-09 |
| A two-week nose-only inhalation toxicity study of recombinant human IL-1Ra in the rat | Sprague-Dawley rat | Inhalation | 2 weeks | 0, 0.33, 3.2 mg/kg/day | Yes | SY05-T92-01 |
| Subchronic (2 week, b.i.d.) systemic toxicity study of IL-1Ra in male and female rhesus monkeys following repeated subcutaneous injections | Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) | s.c. | 2 weeks (b.i.d.) | 0, 5, 20, 80 mg/kg/day | Yes | SY05-T89-11 |
| A 4-week toxicity study of IL-1Ra administered by subcutaneous injection to rhesus monkeys with a 4-week recovery period | Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) | s.c. | 4 weeks | 0,10, 100, 200 mg/kg/day | Yes | 960040 |
| One week intravenous infusion study on IL-1Ra in male rhesus monkeys | Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) | i.v. (CI) | 1 week | 0, 150 mg/kg/day | Yes | SY05-T90-02 |
| A range-finding (2 week) toxicity study of IL-1Ra in male cynomolgus monkeys following repeated intravenous injections | Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) | i.v. | 2 weeks | 0, 0.1, 1, 10 mg/kg/day | Yes | SY05-T89-03 |
| Subchronic systemic toxicity study with recovery period of IL-1Ra in rhesus monkeys | Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) | i.v. | 2 weeks (b.i.d.) | 0, 3, 10, 30 mg/kg/day | Yes | SY05-T89-08 |
| *Salmonella*/mammalian-microsome plate incorporation mutagenicity assay (Ames test) and *Escherichia co*li WP2 *uvr*A reverse mutation assay with a confirmatory assay – IL-1Ra | *E. coli; S. typhimurium* | In vitro | N/A | 0.1 to 5000 µg/plate (dose-range finding assay) 33 to 5000 µg/plate (mutagenicity and confirmatory assays) | Yes | SY05-T92-13 |

| Type of study (Module 4 eCTD location) | Test system (species and strain) | Method of administration | Duration of dosing (frequency) | Dose level[a] | GLP[b] | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| In vitro mammalian cytogenetics test – IL-1Ra | CHO cells | In vitro | N/A | 0.2 to 2000 µg/mL (initial assay)<br>250, 500, 1000, and 2000 µg/mL (repeat assay) | Yes | SY05-T92-15 |
| L5178Y thymidine kinase +/- mouse lymphoma mutagenesis assay with a confirmatory assay – IL-1Ra | Mouse lymphoma (L5178Y $TK^{+}$) | In vitro | N/A | 67 to 5000 µg/ml | Yes | SY05-T92-14 |
| Micronucleus cytogenetics assay in mice – IL-1Ra | Mouse, ICR | In vivo | Single dose | 0, 500, 1000, 2000 mg/kg/day | Yes | SY05-T92-16 |
| Carcinogenicity | | | | | | |
| N/A | | | | | | |

| Type of study (Module 4 eCTD location) | Test system (species and strain) | Method of administration | Duration of dosing (frequency) | Dose level[a] | GLP[b] | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Reproductive and developmental toxicity (［4.2.3.5］) | | | | | | |
| Fertility and general reproduction (Segment I) study of IL-1Ra administered by subcutaneous injection to rats | Sprague-Dawley Crl:CDBR VAF/Plus rat | s.c. | Males: 64 days prior to mating to Study Day 85; Females: 15 days prior to mating, during gestation and lactation until the day prior to euthanasia | 0, 12.5, 50, 200 mg/kg/day | Yes | SY05-T93-01 |
| A study of fertility and early embryonic development to implantation of r-metHuIL-1Ra administered subcutaneously in rats | Sprague-Dawley Crl:CD VAF/Plus rat | s.c. | Males: 29 days prior to mating and throughout mating until one day prior to euthanization; Females: 14 days prior to mating to Day 7 of gestation | 0, 10, 100, 200 mg/kg/day | Yes | 960044 |
| SDevelopmental toxicity study in rats with IL-1Ra | Sprague-Dawley Crl:CD BR VAF/Plus rat | s.c. | 12 days (Day 6 to Day 17 of gestation) | 0, 12.5, 50, 200 mg/kg/day | Yes | SY05-T92-03 |
| Perinatal and postnatal study of IL-1Ra administered by subcutaneous injection to rats | Sprague-Dawley Crl:CD BR VAF/Plus rat | s.c. | 15 days (Day 6 of gestation to Day 20 of lactation) | 0, 12.5, 50, 200 mg/kg/day | Yes | SY05-T93-02 |
| Developmental toxicity study in rabbits with IL-1Ra | New Zealand White rabbit | s.c. | 13 days (Day 6 to Day 18 of gestation) | 0, 12.5, 50, 200 mg/kg/day | Yes | SY05-T92-04 |

| Type of study (Module 4 eCTD location) | Test system (species and strain) | Method of administration | Duration of dosing (frequency) | Dose level[a] | GLP[b] | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Toxicity in juvenile animals (［4.2.3.5.4］) | | | | | | |
| A feasibility study by subcutaneous injection in rats to determine the tolerability of the proposed high-dose level and confirm feasibility of once and twice daily dosing | Sprague-Dawley rat | s.c. | 7 days (Day 4 to Day 10 postpartum for Group 1 [q.d.]) and 16 days (Day 4 to Day 19 postpartum for Group 2 [b.i.d.]) | 100 mg/kg/day (Group 1); 200 mg/kg/day (Group 2) | No | 497888 |
| A 6 week neonatal/juvenile study to determine the adverse effects on memory and learning functions in rats after subcutaneous injection followed by a 1-month recovery period | Sprague-Dawley rat | s.c. | 6 weeks (38 days, b.i.d.) | 0, 20, 60, 200 mg/kg/day | Yes | 498001 |
| Local tolerance | | | | | | |
| N/A | | | | | | |
| Other toxicity studies (［4.2.3.7］) | | | | | | |
| Potential effects of IL-1Ra and PEG-sTNF-RI dosed singly and in combination on immune function in Fisher 344 rat | Fisher 344 rat | s.c. (anakinra and TNF); i.v. (anti-asialo GM1 antibody); i.p. (cyclophosphamide) | 21 days (b.i.d.) | Anakinra – 0, 20, 200 mg/kg/day; TNF – 5, 50 mg/kg; Anti-asialo GM1 antibody – 24 hours prior to scheduled sacrifice (Phase 1 only); Cyclophosphamide – 25 mg/kg 4 days prior to sacrifice | Yes | 100797 |
| A study to determine the effects of 3-day continuous infusion of IL-1Ra on *E. coli* clearance and organ colonization in the rat | Tac: N(SD)fBR rat | i.v. (CI) | 3 days | 0, 173, 346 mg/kg/day | Yes | SY05-T92-17 |

| Type of study (Module 4 eCTD location) | Test system (species and strain) | Method of administration | Duration of dosing (frequency) | Dose level[a] | GLP[b] | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A study to determine the effects of 3-day continuous infusion of IL-1Ra on *S. aureus* 502A clearance and organ colonization in the rat | Tac: N(SD)fBR rat | i.v. (CI) | 3 days | 0, 173, 346 mg/kg/day | Yes | SY05-T92-18 |
| A study to determine the effects of 3-day continuous infusion of IL-1Ra on *Listeria monocytogenes* clearance and organ colonization in the rat | Tac: N(SD)fBR rat | i.v. (CI) | 3 days | 0, 173, 346 mg/kg/day | Yes | SY05-T92-19 |
| An antigenicity study (19-day) of IL-1Ra in male rhesus monkeys following repeated intravenous injections | Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) | i.v. | 19 days (q.d.) | 10 mg/kg/day | Yes | SY05-T89-07 |

Abbreviations: b.i.d., Twice a day; CHO, Chinese hamster ovary (cell line); CI, Continuous infusion; eCTD, Electronic Common Technical Document; GLP, Good Laboratory Practice; GM1, Ganglioside-monosialic acid; IL-1Ra, Interleukin-1 receptor antagonist; i.p., Intraperitoneal; i.v., Intravenous; MTX, Methotrexate; N/A, Not applicable; NOAEL, No observed adverse effect level; PEG-sTNF-RI, Polyethylene glycosylated soluble tumor necrosis factor-receptor I; PEG r-metHu-sTNF-RI, Polyethylene glycosylated recombinant-methionyl human-soluble tumor necrosis factor-receptor I; PK, Pharmacokinetic; p.o., Per os; q.d., Once daily; q.i.d., 4 times a day; r-MetHuIL-1Ra, Recombinant-methionyl human interleukin-1 receptor antagonist; SD, Sprague Dawley; s.c., Subcutaneous; TK, Toxicokinetics; TNF, Tumor necrosis factor.

[a] Unless otherwise specified. For repeat-dose toxicity, the highest NOAEL is underlined.

[b] Yes" indicates the study includes a GLP compliance statement.

#### 2.4.4.1 単回投与毒性試験

アナキンラの急性毒性は、ラット（投与量：1.5、15、150、720 mg/kg）及びカニクイザル（投与量：1.5、15、150 mg/kg）への単回静脈内投与により評価した。アナキンラによる毒性徴候は認められなかった（[2.6.6.2]項）。

アナキンラの皮下投与による急性毒性は、ラット（投与量：120 mg/kg/日、SY05-T89-12 試験）及びアカゲザル（投与量：5、20、80 mg/kg/日、SY05-T89-11 試験）を用いた 2 週間投与試験で評価した。両動物種共に全身性毒性は認められなかったが、投与局所に炎症が観察された（[2.6.6.3]項）。

#### 2.4.4.2 反復投与毒性試験

アナキンラの中期及び長期の反復投与毒性は、ラットでは最長 6 ヵ月間、サルでは最長 28 日間反復静脈内又は皮下投与して評価した。ラットにアナキンラを 30 mg/kg/日までの用量で 14 日間静脈内投与、あるいは 120 mg/kg/日までの用量で 14 日間皮下投与したとき、全身性毒性は認められなかった。静脈内投与後に血管周囲の炎症が投与部位に観察され、皮下投与部位には局所反応（痕跡から軽度の慢性炎症）が認められた。ラットにアナキンラを 2、20、200 mg/kg/日の用量で 1 日 2 回、6 ヵ月間皮下投与したとき、全ての用量で局所投与部位に炎症が認められ、200 mg/kg/日では腎臓に限定された全身性毒性が観察された。投与 6 ヵ月後の主な所見は、雄で腎臓重量の増加、タンパク尿及び慢性進行性腎症であった。腎臓の変化は可逆的であり、回復期間終了後には明らかな徴候は認められなかった。投与動物は、投与量にほぼ比例したアナキンラの曝露量を示した。全ての用量群でアナキンラに対する抗体が検出され、抗体産生は定常状態の血漿中アナキンラ濃度に達するまでの時間に相関していた（[2.6.6.3]項）。

非げっ歯類では、雄アカゲザルにアナキンラを 150 mg/kg/日の用量で 1 週間、カニクイザルに 10 mg/kg/日までの用量で 2 週間、反復静脈内持続投与した。これらの試験では、投与に関連した影響は認められなかった。アカゲザルにアナキンラを 80 mg/kg/日までの用量で 14 日間反復皮下投与したが、全身性毒性は認められなかった。また、ラットと同様に、サルにおいても投与部位に慢性炎症が認められた。アカゲザルにアナキンラの 200 mg/kg/日を 1 日 1 回 28 日間皮下投与した 10 例中 5 例に、投与開始後 2～3 週間に皮膚病変（投与部位だけではない）が認められた。病変部から採取した生検組織の病理組織学的検査により、慢性リンパ組織球性炎症であることが明らかとなった。リンパ組織球性炎症の二次的変化として、末梢リンパ節の腫大が高用量群の 6 例中 3 例に観察された。これは、抗原刺激に対する機能的細胞性免疫応答の徴候である可能性がある。投与したアカゲザルは、投与量にほぼ比例したアナキンラへの曝露を示した。最高用量 2 群では、28 日間の反復投与による蓄積は認められなかった。抗アナキンラ抗体の測定により、低用量群でのみアナキンラに対する抗体の存在が確認された（[2.6.6.3]項）。

#### 2.4.4.3 遺伝毒性試験

*In vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験として、Ames 試験、染色体異常試験、マウスリンフォーマチミジンキナーゼ試験及びマウス小核試験を実施した。アナキンラに関連した遺伝毒性は認められなかった（[2.6.6.4］項）。

#### 2.4.4.4 がん原性試験

がん原性試験は実施しなかった。アナキンラがタンパク性物質であることを考慮すると、長期がん原性試験の実施は妥当であるとみなされない。ICH S6（R1）ガイドラインによると、バイオテクノロジー応用医薬品については、標準的ながん原性試験は一般的に不適当である。薬理学的作用機序、観察された宿主抵抗性試験に対する最小限の影響、及び NK 細胞活性の僅かな亢進に基づき、アナキンラ固有の発がん性の懸念はないと考えられた。

#### 2.4.4.5 生殖発生毒性試験

ラット及びウサギを用いて、アナキンラの受胎能及び初期胚発生、胚・胎児発生、並びに出生前及び出生後の発生に対する影響を、生殖発生の適切な期間に 200 mg/kg/日までの用量を投与して検討した。アナキンラに関連した生殖毒性、並びに子宮内から離乳まで曝露された出生児の発達及び認知能への影響は認められなかった（[2.6.6.6］項）。

#### 2.4.4.6 幼若動物試験

幼若ラットを用いて複式 Y 字型水迷路での行動検査により、海馬依存性の学習及び記憶の発達に及ぼす影響を検討した（498001 試験）。幼若ラットにアナキンラの 100 mg/kg までの用量を生後 7 日から 44 日まで 1 日 2 回皮下投与し、投与後 1 ヵ月間の回復期間を設けた。本試験の目的は、先に実施した授乳中の出生児へのアナキンラ曝露を評価したラットの出生前及び出生後の発生に関する試験のデータを補完することであった。幼若ラットでは、死亡、一般状態及び体重の変化は認められなかった。アナキンラを投与した全動物の肝臓及び脳重量は、溶媒対照動物と同程度であった。全てのアナキンラ投与群における Y 字型水迷路学習試験の成績は、投与期間中及び回復期間中、いずれの群においても同様であった。この試験では、出生児期から成熟期までアナキンラに曝露されたラット出生児の空間記憶及び学習機能に有害な影響は認められなかった（[2.6.6.7］項）。

#### 2.4.4.7 局所刺激性

局所刺激性は反復投与毒性試験で評価した。ラット及びサルの反復投与毒性試験（2.4.4.2 項）における皮下投与又は静脈内投与部位の病理組織学的検査において、ラット及びサルの皮下投与試験での投与部位、ラットの静脈内投与試験での血管周囲に、亜急性ないし慢性の炎症が観察された。これらの病変の出現頻度及び重症度は、投与量増加に伴い増加する傾向が認められた。対照群の動物に炎症が時折見られたが、これは製剤の成分によるものと考えられた（Bendele 1995）。皮下投与部位の炎症に対する無影響量は、2 週間までの試験で確認されたが、ラットの 6 ヵ月間投与試験及びサルの 1 ヵ月間投与試験では、アナキンラを投与した全ての用量で炎症が認

められた。投与部位の炎症は可逆性であった。動物試験で認められた投与部位の炎症とアナキンラの臨床試験で認められた注射部位反応との関係は、炎症性成分が共有されている可能性があるものの不明である。

#### 2.4.4.8 その他の毒性試験

##### 2.4.4.8.1 免疫調節

アナキンラは免疫調節薬であり、主に自然免疫と適応免疫系とのクロストークに影響を及ぼす。自然免疫系は侵入病原体を検出することを目的としており、そのため、感染に対する宿主防御に及ぼすアナキンラの影響を検討するために様々な実験が行われてきた。ラットに 346 mg/kg/日までの用量で 3 日間持続静脈内投与したところ、アナキンラは大腸菌、リステリア菌、黄色ブドウ球菌に対する宿主抵抗性に様々な影響を示した。アナキンラの持続注入により、大腸菌の静脈内負荷に対する宿主抵抗性が僅かに低下し（血液、脾臓及び肝臓で明らかなコロニー形成）、リステリア菌については、脾臓のみが最高用量でコロニー形成の徴候を示し、黄色ブドウ球菌については、血液、肝臓及び脾臓においてコロニーを形成しなかった（[2.6.6.9.2］項［2.6.6.9.3］項、［2.6.6.9.4］項）。

全体的な免疫能に対する潜在的な影響を明らかにし、宿主細胞抵抗性に関与する細胞型に対する影響を評価するために、アナキンラを雌ラットに 21 日間反復静脈内投与した。このアッセイは、NK 細胞応答アッセイ及び抗ヒツジ赤血球抗体形成細胞アッセイであった。マイトジェン反応の *in vitro* 評価として、血清及び抗体分析、並びに脾臓及び胸腺の細胞密度及び生存率を測定し、脾臓及び胸腺重量、並びに血液学的パラメーターの評価を実施した。アナキンラによる処理は、NK 細胞活性の見かけ上の僅かな増強を除いて、免疫系の構造及び機能にほとんど影響を及ぼさなかった。200 mg/kg/日の高用量群では、絶対好酸球数の軽度な増加が認められた（[2.6.6.9.1］項）。

これらの結果から、アナキンラは感染に対する宿主防御を含む免疫機能を著しく損なわないことが示唆された。

##### 2.4.4.8.2 免疫原性

ラットの 6 ヵ月間投与毒性試験（SY05-T94-04 試験）において、アナキンラを 2、20 及び 200 mg/kg/日の用量で反復皮下投与した。アナキンラに対する抗体は試験 15 日に産生され、用量に反比例している傾向が見られた。すなわち、用量が増加するにつれて、抗体反応を示す動物数は減少した。抗体レベルは試験 13 週に低下し、試験 27 週にはいずれの群でも検出されなかった。しかし、抗アナキンラ抗体に結合したアナキンラが抗アナキンラ抗体検査ではほとんど検出されなかった可能性は否定できず、本試験で認められた見かけ上の抗体産生率の低下の原因と考えられた（[2.6.6.3.3］項）。

### 2.4.5　総括及び結論

アナキンラに関する広範な薬理試験、PK/薬力学的（PD）試験及び毒性試験を実施し、又は文献報告から要約している。

アナキンラは、内因性 IL-1α 及び IL-1β と同等の親和性で IL-1 受容体に結合する遺伝子組換え IL-1 受容体拮抗薬である。アナキンラの主な生物学的作用は、IL-1 の作用に対して拮抗することであり、これにより IL-1 が誘導する疾患の症状を軽減する。アナキンラが IL-1 受容体に結合しても、シグナル伝達を惹起するリガンド受容体複合体を形成できないことが示唆される。腫瘍細胞株を用いたアナキンラの *in vitro* 試験では、アナキンラによる増殖作用は示されなかった。

アナキンラは IL-1 シグナル伝達を拮抗する免疫調節剤であることから、宿主抵抗性、膿瘍縮小及び一般的な免疫能力に対する潜在的な有害作用を評価するためにいくつかの試験を実施した。全体として、顕著な免疫抑制作用又は感染に対する宿主防御などの免疫機能に対して顕著な低下作用をアナキンラは示さなかった。

*In vivo* 試験では、アナキンラは複数の関節炎動物モデルにおいて炎症、骨破壊及び軟骨変性に対する抑制作用を示した。腎臓の変化及びラットを用いた静脈内及び皮下投与後の注射部位での局所的な影響を除いて、アナキンラによる全身反応は認められなかった。若年個体での成熟過程の免疫系に及ぼす潜在的なアナキンラの影響は研究されていないが、遺伝子操作した動物は、IL-1 活性を恒久的に鈍化した際の有害作用を予測する際に貴重な情報源となる。IL-1Ra を過剰発現したトランスジェニックマウスでは、骨髄機能、造血又は免疫細胞プロファイルに影響は観察されなかった（Hirsch 1996）。

マウス、ラット、イヌ及び *ex vivo* でモルモット回腸を用いて実施した一連の安全性薬理試験では、中枢/自律神経系、鎮痛活性、心血管、消化器及び腎機能に関するアナキンラ関連の影響は見られなかった。

アナキンラの薬力学的薬物相互作用は、アジュバント関節炎ラットにおいて MTX（Bendele 1999b）又は PEG-sTNF-RI（Feige 2000）との併用投与で評価した。アナキンラ単独投与では足蹠浮腫に対する抑制作用は 9%であり、MTX 単独投与では 45%、アナキンラと MTX（Bendele 1999b）の併用投与では 78%の抑制が認められた。さらに、低用量のアナキンラ又は PEG-sTNF-RI の単独投与では、アジュバント関節炎ラットにおける炎症、体重減少及び骨密度の低下に対する抑制作用は認められなかった。しかし、これらの低用量の併用投与により、炎症（足蹠浮腫）に対する 78 ± 10%の抑制及び骨密度低下に対する 64 ± 14%の抑制が認められた。低用量の併用投与による足蹠浮腫に対する作用は非常に顕著であり、相乗作用を示した。

アナキンラの薬物動態及び代謝は、実験動物において単純なパターンに従うと考えられた。本剤は皮下投与後良好なバイオアベイラビリティを示し、その分布は細胞外空間にあり、そのクリアランスは糸球体ろ過により急速で、おそらく尿細管再吸収とタンパク質分解が続く。アナキンラの 1%未満が未変化体のまま尿中に排泄される。腎臓以外に臓器蓄積はなかった。

アナキンラの反復投与により、おそらく血漿中からの消失の減少及び蓄積の原因であると考えられる抗アナキンラ抗体が産生した。ラットでは、投与を継続すると抗体量は低下し、4 週目までに検出されたが、13 週目まで低下し、27 週目までには消失した。反復投与後のアナキンラの薬物動態は、実験動物とヒトで類似していた。アナキンラに対する抗体は、クリオピリン関連周期熱症候群患者におけるアナキンラの治療効果を妨げることはないと考えられ（Wikén 2018）、そのため、スチル病患者における安全性及び有効性が抗薬物抗体の影響を受ける可能性は低いと考えられる。

反復投与毒性試験では、全身臓器毒性は認められなかった。腎臓の変化は、200 mg/kg/日を 6 ヵ月間投与したラットでのみ認められ、慢性進行性腎症として特徴付けられた。しかし、アナキンラの長期投与試験における極めて高い用量での進行性腎症（雄ラットでよく見られる背景所見）の僅かな増加は、おそらく直接的な毒性徴候ではなく、むしろ加齢に伴い自然発生する慢性進行性腎症として特徴付けられる種特異的な変化と組み合わされた高タンパク負荷の結果であると考えられた（Johnson 1988）。腎臓の変化は可逆的であり、回復期間後に腎症の徴候は認められなかった。したがって、ラット 6 ヵ月間投与毒性試験で観察された慢性腎症は、特異的な薬理学的又は毒性学的な特性ではなく、タンパク質としてアナキンラの物性が関与している可能性が最も高い。

変異原性、生殖発生毒性及び免疫毒性など、発生／発育中の生物が特に感受性を示す可能性のある毒性を検討する非臨床試験では、有害な影響は観察されなかった。200 mg/kg/日までの用量を投与したラットでは、受胎能及び生殖能に有害な影響は認められなかった。胚・胎児発生に関する試験において、発生中の胚・胎児が胎盤を介してアナキンラに曝露されることが示されており（McDuffie 2001、Goshen 2007）、高用量（最高 200 mg/kg/日）を投与したにもかかわらず、有害な影響（構造的欠陥や成長及び生存性への影響）は検出されなかった。出生前及び出生後の発生に関する試験では、出生児（母動物に 200 mg/kg/日まで投与）の成長、成熟、出生後の発生及び生殖能に影響は認められなかった。総合すると、データはアナキンラが発生／発育中の生物に直接的な毒性を引き起こす可能性は非常に低いか、全くないことを示している。

アナキンラを用いた標準的ながん原性試験は実施しなかったが、アナキンラが新規又は既存の腫瘍と相互作用する可能性は、直接的な腫瘍発生（変異原性又はがん原性）、直接的な腫瘍刺激（腫瘍細胞受容体刺激を介して）、及び間接的な腫瘍増殖への影響（免疫調節など）に特に重点を置いて検討されている。アナキンラは遺伝子組換えヒトタンパク質であるため、直接 DNA を損傷する物質である可能性は低い。アナキンラは一連の変異原性試験で評価され、変異原性はないと判断された。また、Sprague-Dawley ラットにアナキンラを 200 mg/kg/日まで 6 ヵ月間反復投与した試験では、アナキンラに関連した前腫瘍性病変も腫瘍も認められなかった。したがって、アナキンラが腫瘍形成を促進するような証拠はない。

アナキンラは免疫調節機能を介して腫瘍増殖に間接的な影響を及ぼす可能性もある。ラット及びサルを用いた非臨床毒性試験において、免疫抑制を示す所見は認められなかった。加えて、アナキンラは感染に対する宿主防御を含む免疫機能を著しく損なわない。したがって、アナキンラ

が腫瘍細胞を認識して殺傷する免疫能を大きく損なう可能性は低く、NK 細胞活性を強化すると推察される。

胎生 12 日から脳内で IL-1Ra を異所的に過剰発現（星状膠細胞発現）させたトランスジェニックマウスにおいて、学習・記憶機能に対する負の影響が認められている（Spulber 2009a、Spulber 2011）。皮下移植浸透圧ミニポンプによりアナキンラを連続的に投与した妊娠ラットの試験から、学習及び記憶機能への影響は、IL-1Ra への出生後曝露ではなく、出生前曝露と関連していることが明らかになった（Goshen 2007）。正常ラットを用いた試験と比較した場合、胚・胎児発生期の IL-1 シグナル伝達の破壊の期間と程度は、後年の転帰に極めて重要と考えられる。アナキンラを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験（SY05-T93-02 試験）では、学習・記憶機能に対する投与の影響は認められなかった（複式 T 字型水迷路試験）。しかし、その試験で授乳児の出生後曝露が不十分であった可能性も否定できない。そこで、発育中の海馬依存性学習及び記憶機能の発達に対するアナキンラ処置による影響を検討するため、幼若ラットを用いた追加試験を実施した（498001 試験）。幼若ラットの認知能力を複式 Y 字型水迷路試験で検討した。死亡例、一般状態及び体重に変化は認められなかった。全てのアナキンラ投与群において、Y 字型水迷路学習試験の成績は、投与及び回復期間中、いずれの群でも同程度であった。この試験は、出生児期から成熟前期（思春期）までアナキンラに曝露されたラット出生児の空間記憶及び学習機能に有害な影響はなく、幼若ラットに 1 日 2 回アナキンラを投与しても脳内の IL-1 活性に有害な影響を及ぼさないことを示した。

ヒト及び動物において、入手可能なデータにより、IL-1 経路が出生時から既に存在すること、すなわち、ヒト新生児由来の血清中に高レベルの IL-1Ra（Romero 1994、Müller 1997、Chow 2008）を有することが示されている。また、動物（Fox 2010）及びヒト（03-AR-0298 臨床試験、[5.3.5.1]）のいずれにおいても、アナキンラは静脈内投与後及び皮下投与後に脳脊髄液（CSF）コンパートメントに分布することが示されている。妊娠ラットに移植した浸透圧ミニポンプを介して皮下投与した試験では、アナキンラが胎盤関門を通過したことから、胎児は全身的にアナキンラのタンパク質に曝露され、胎児の脳からアナキンラが検出された（Goshen 2007）。

多くの試験から、IL-1 シグナル伝達は正常な条件下及び初期発生において脳内で重要な役割を果たすことが示されている（Goshen 2007、Avital 2003、Burgess 2002、Kent 1992、Spulber 2009b、Yirmiya 2002）。IL-1 は、ヒトの妊娠中期に相当するヒツジの胎生 60～80 日の発達中の大脳新皮質で検出可能である（Dziegielewska 2000）。しかし、ラットでは、IL-1 の最高濃度は出生前及び出生後早期に大脳皮質に出現したが、正常な成獣の脳には測定可能な IL-1 活性は認められなかった（Giulian 1988）。

曝露量ベースでの安全域を算出した。ヒト曝露量については、アナキンラを 100 mg の用量で投与したときの $C_{max}$ は 773 ng/mL、$AUC_{0-\infty}$ は 10188 ng·h/mL であった（20000268 試験）。

ラット 6 ヵ月間投与毒性試験（SY05-T94-04 試験）では、アナキンラの 20 mg/kg（無毒性量：NOAEL）を皮下投与したときの投与 2 時間後の平均血漿中濃度は 16415 ng/mL であった。雌ラ

ット 4 週間投与毒性試験（960048 試験）では、アナキンラの 100 mg/kg（NOAEL）を皮下投与したときの $C_{max}$ は 210000 ng/mL、$AUC_{0-24}$ は 1440000 ng·h/mL であった。したがって、ラット 6 ヵ月間投与試験の血漿中濃度で比較した場合の安全域は約 21 倍、ラット 4 週間投与試験の $C_{max}$ で比較した場合の安全域は約 272 倍、同試験の AUC で比較した場合の安全域は約 141 倍であった。

サルを用いた 4 週間投与毒性試験（960040 試験）では、アナキンラの 100 mg/kg（NOAEL）を皮下投与したときの 28 日目における $C_{max}$ は 38390 ng/mL、$AUC_{0-24}$ は 375600 ng·h/mL であった。これにより、サルの $C_{max}$ で比較した場合の安全域は約 50 倍、AUC で比較した場合の安全域は約 37 倍であった。

結論として、アナキンラの薬理学的、薬物動態学的及び毒性学的特徴は、現行の規制及び ICH ガイドラインに準拠して実施した非臨床試験により明確にされ、文書化されている。非臨床安全性評価により、小児及び成人集団のいずれにおいてもアナキンラの皮下投与での安全性が担保されている。非臨床安全性評価において、申請用法・用量では、若年患者及び成人患者に有害な影響を及ぼす可能性を示唆する所見は認められなかった。全体として、非臨床安全性試験の結果は、臨床試験計画を支持し、申請する適応症に対するアナキンラの製造販売承認を裏付ける安全性データを提供するものである。

### 2.4.6　参考文献

Avital A, Goshen I, Kamsler A, Segal M, Iverfeldt K, Richter-Levin G, et al. Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. Hippocampus. 2003;13(7):826-834.

Bendele A, Colloton M, Vrkljan M, Morris J, Sabados K. Cutaneous mast cell degranulation in rats receiving injections of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rhIL-1ra) and/or its vehicle: possible clinical implications. J Lab Clin Med. 1995;125(4):493-500.

Bendele A, McAbee T, Sennello G, Frazier J, Chlipala E, McCabe D. Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis: comparison of efficacy in animal models with human clinical data. Arthritis Rheum. 1999a;42(3):498-506.

Bendele A, Sennello G, McAbee T, Frazier J, Chlipala E, Rich B. Effects of interleukin 1 receptor antagonist alone and in combination with methotrexate in adjuvant arthritic rats. J Rheumatol. 1999b;26(6):1225-1229.

Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. Neuron. 2002; 35(4):625-641.

Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP, et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. Mol Cell. 2003;11(3):591-604.

Chow SS, Craig ME, Jones CA, Hall B, Catteau J, Lloyd AR, et al. Differences in amniotic fluid and maternal serum cytokine levels in early midtrimester women without evidence of infection. Cytokine. 2008;44(1):78-84.

Cominelli F, Bortolami M, Pizarro TT, Monsacchi L, Ferretti M, Brewer MT, et al. Rabbit interleukin-1 receptor antagonist. Cloning, expression, functional characterization, and regulation during intestinal inflammation. J Biol Chem. 1994;269(9):6962-6971.

Dinarello CA, Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. Immunol Today. 1991;Nov;12(11):404-410.

Dripps DJ, Brandhuber BJ, Thompson RC, Eisenberg SP. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. J Biol Chem. 1991;266(16):10331-10336.

Dziegielewska KM, Moller JE, Potter AM, Ek J, Lane MA, Saunders NR. Acute-phase cytokines IL-1β and TNF-α in brain development. Cell Tissue Res. 2000;299(3):335-345.

Eisenberg SP, Brewer MT, Verderber E, Heimdal P, Brandhuber BJ, Thompson RC. Interleukin 1 receptor antagonist is a member of the interleukin 1 gene family: evolution of a cytokine control mechanism. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88:5232-5236.

Feige U, Hu YL, Gasser J, Campagnuolo G, Munyakazi L, Bolon B. Anti-interleukin-1 and anti-tumor necrosis factor-α synergistically inhibit adjuvant arthritis in Lewis rats. Cell Mol Life Sci. 2000;57:1457-1470.

Fox E, Jayaprakash N, Pham TH, Rowley A, McCully CL, Pucino F, et al. The serum and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of anakinra after intravenous administration to non-human primates. J Neuroimmunol. 2010;223(1-2):138-140.

Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. J Neurosci. 1988;8(2):709-714.

Goshen I, Kreisel T, Ounallah-Saad H, Renbaum P, Zalzstein Y, Ben-Hur T, et al. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. Psychoneuroendocrinology. 2007;32(8-10):1106-1115.

Hirsch E, Irikura VM, Paul SM, Hirsh D. Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93(20):11008-11013.

Johnson RJ, Alpers CE, Pritzl P, Schulze M, Baker P, Pruchno C, et al. Platelets mediate neutrophil-dependent immune complex nephritis in the rat. J Clin Invest. 1988;82(4):1225-1235.

Kent S, Bluthe RM, Dantzer R, Hardwick AJ, Kelley KW, Rothwell, NJ, et al. Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin 1. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89(19):9117-9120.

Lachmann HJ, Lowe P, Felix SD, Rordorf C, Leslie K, Madhoo S, et al. In vivo regulation of interleukin 1β in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. J Exp Med. 2009;206(5):1029-1036.

McDuffie RS Jr, Davies JK, Leslie KK, Lee S, Sherman MP, Gibbs RS. A randomized controlled trial of interleukin-1 receptor antagonist in a rabbit model of ascending infection in pregnancy. Infect Dis Obstet Gynecol. 2001;9(4):233-237.

McIntyre KW, Stepan GJ, Kolinsky KD, Benjamin WR, Plocinski JM, Kaffka KL, et al. Inhibition of interleukin 1 (IL-1) binding and bioactivity in vitro and modulation of acute inflammation in vivo by IL-1 receptor antagonist and anti-IL-1 receptor monoclonal antibody. J Exp Med. 1991; Apr 1;173(4):931-939.

Miesel R, Ehrlich W, Wohlert H, Kurpisz M, Kröger H. The effect of interleukin-1 receptor antagonist on oxidant-induced arthritis in mice. Clin Exp Rheumatol. 1995:13;595-601.

Müller K, Zak M, Nielsen S, Pedersen FK, de Nully P, Bendtzen K. Interleukin-1 receptor antagonist in neonates, children and adults, and in patients with pauci- and polyarticular onset juvenile chronic arthritis. Clin Exp Rheumatol. 1997;15(4):439-444.

Omenetti A, Carta S, Delfino L, Martini A, Gattorno M, Rubartelli A. Increased NLRP3-dependent interleukin 1β secretion in patients with familial Mediterranean fever: correlation with MEFV genotype. Ann Rheum Dis. 2014;73(2):462-469.

Pascual V, Allantaz F, Arce E, Punaro M, Banchereau J. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. J Exp Med. 2005;201(9):1479-1486.

Romero R, Gomez R, Galasso M, Mazor M, Berry SM, Quintero RA, et al. The natural interleukin-1 receptor antagonist in the fetal, maternal, and amniotic fluid compartments: the effect of gestational age, fetal gender, and intrauterine infection. Am J Obstet Gynecol. 1994;171(4):912-921.

Sharma D, Sharma BR, Vogel P, Kanneganti T-D. IL-1β and Caspase-1 Drive Autoinflammatory Disease Independently of IL-1α or Caspase-8 in a Mouse Model of Familial Mediterranean Fever. Am J Pathol. 2017;187(2):236-244.

Spulber S, Bartfai T, Schultzberg M. IL-1/IL-1ra balance in the brain revisited - Evidence from transgenic mouse models. Brain Behav Immun. 2009a;23(5):573-579.

Spulber S, Bartfai T, Winblad B, Schultzberg M. Morphological and behavioral changes induced by transgenic overexpression of interleukin-1ra in the brain. J Neurosci Res. 2011; 89(2):142-152.

Spulber S, Mateos L, Oprica M, Cedazo-Minguez A, Bartfai T, Winblad B, et al. Impaired long term memory consolidation in transgenic mice overexpressing the human soluble form of IL-1ra in the brain. J Neuroimmunol. 2009b;208(1-2):46-53.

Wikén M, Hallén B, Kullenberg T, Koskinen LO. Development and effect of antibodies to anakinra during treatment of severe CAPS: sub-analysis of a long-term safety and efficacy study. Clin Rheumatol. 2018;37(12):3381-3386.

Yirmiya R, Winocur G, Goshen I. Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. Neurobiol Learn Mem. 2002;78(2):379-389.