ヌーカラ皮下注用100mg

製造販売承認申請書添付資料

第２部（モジュール２）CTDの概要（サマリー）

2.6. 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1.　緒言
2.6.2.　薬理試験の概要文
2.6.3.　薬理試験概要表

グラクソ・スミスクライン株式会社

Feb 12 2016 14:15:10

非臨床概要 薬理試験の目次

項目 - 頁

2.6.1. 緒言 ..... 2.6.1 - p.1

2.6.2. 薬理試験の概要文 ..... 2.6.2 - p.1

2.6.2.1. まとめ ..... 2.6.2 - p.1

2.6.2.2. 効力を裏付ける試験 ..... 2.6.2 - p.3

2.6.2.3. 副次的薬理試験 ..... 2.6.2 - p.20

2.6.2.4. 安全性薬理試験 ..... 2.6.2 - p.20

2.6.2.5. 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 2.6.2 - p.21

2.6.2.6. 考察及び結論 ..... 2.6.2 - p.21

2.6.2.7. 図表 ..... 2.6.2 - p.25

2.6.2.8. 参考文献 ..... 2.6.2 - p.25

2.6.3. 薬理試験概要表 ..... 2.6.3 - p.1

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表 ..... 2.6.3 - p.1

2.6.3.2. 効力を裏付ける試験 ..... 2.6.3 - p.3

2.6.3.3. 副次的薬理試験 ..... 2.6.3 - p.3

2.6.3.4. 安全性薬理試験 ..... 2.6.3 - p.3

2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 2.6.3 - p.3

2.6.1、2.6.2 及び 2.6.3 の略号等一覧

略語（略称）	内容
クローン 2B6	マウス抗ヒト IL-5 モノクローナル抗体 (メポリズマブの親抗体)
Ala	アラニン
Asn	アスパラギン
Asp	アスパラギン酸
BALF	気管支肺胞洗浄液
CCR	CC ケモカイン受容体
C_{DYN}	動的コンプライアンス
CHO	チャイニーズハムスター卵巣細胞株
Cmax	最高血漿中濃度
COS	アフリカミドリザル腎由来細胞株
EC50	50%有効濃度
$E^{89}R^{90}R^{91}R^{92}$	アミノ酸配列 89 番目のグルタミン酸及び 90～92 番目のアルギニン
Fab	可変領域（抗原結合領域）
Fc	定常領域
G-CSF	顆粒球コロニー刺激因子
Glu	グルタミン酸
Gly	グリシン
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
His	ヒスチジン
IC50	50%阻害濃度
Ig	免疫グロブリン
IL	インターロイキン
IL-5CH	キメラ抗ヒト IL-5 モノクローナル抗体
IL-5R	インターロイキン-5 受容体
Kd	解離定数
koff	解離速度定数
kon	結合速度定数
LyH7.B13	マウスプレ B 細胞株
Lys	リシン
OA	オボアルブミン
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
QTc	補正 QT
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
R_L	肺抵抗
S2	ショウジョウバエ胚由来細胞株
SB-240683	ヒト化抗ヒト IL-4 モノクローナル抗体
SB-264091	ラット抗ヒト IL-5 モノクローナル抗体 (メポリズマブの相同抗体)
sGaw	気道コンダクタンス
SP2/0/Ag14	マウスミエローマ細胞株
t1/2	消失半減期
TF-1.28	ヒト赤白血病細胞株 TF-1 細胞のサブクローン
Th2	2 型ヘルパーT 細胞
Thr	スレオニン
Tmax	最高血漿中濃度到達時間
Trp	トリプトファン

2.6.1.　緒言

気管支喘息は気道の慢性炎症、種々の程度の気道狭窄及び気道過敏性の亢進を特徴とする呼吸器疾患であり、症状として繰返し起こる咳、喘鳴及び呼吸困難があげられる[GINA, 2014]。気管支喘息患者の多くはガイドラインに定められたステップに従った治療によって喘息症状のコントロールが可能であるが、重症患者は治療ステップに従ってもコントロールできない喘息症状が持続し、急性増悪を繰り返すことがある[GINA, 2014]。このような重症患者のうち、好酸球性炎症を伴う喘息患者では血中及び肺組織中に好酸球数の増加がみられており[Wenzel, 2005]、気管支喘息の病態形成において気道の好酸球性炎症が重要な役割を果たすと考えられている[Cohn, 2004]。

メポリズマブ（遺伝子組換え）（以下、メポリズマブ）はヒトインターロイキン-5（IL-5）に対する特異的なヒト化 IgG1 モノクローナル抗体製剤であり、重鎖 2 分子と軽鎖 2 分子がジスルフィド結合でつながれた糖蛋白質である（図 2.6.1-1）。重鎖及び軽鎖はいずれもヒト IgG1 の定常領域及びマウス抗ヒト IL-5 抗体の相補性決定領域を含むヒト IgG1 の可変領域で構成される。

メポリズマブはヒト IL-5 の IL-5 受容体への結合を強力に阻害して IL-5 の生物活性を中和することにより、気管支喘息患者において増加している喀痰中及び血中好酸球数を減少させる。したがって、メポリズマブは好酸球性の気道炎症を抑制することにより、重症喘息患者の急性増悪及び喘息症状を軽減することが期待される。

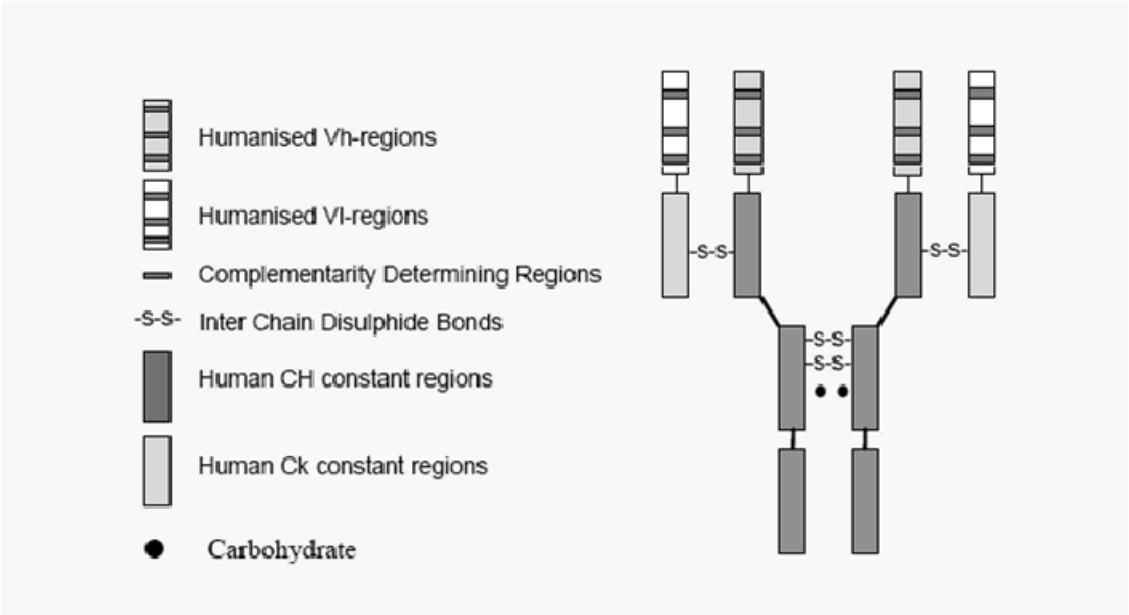


図 2.6.1-1　メポリズマブの構成

今回、効能・効果を「気管支喘息（既存治療によっても喘息症状をコントロールできない難治の患者に限る）」として承認申請を行った。

気管支喘息における申請用法・用量は以下のとおりである。

【用法・用量】

通常、成人及び 12 歳以上の小児にはメポリズマブ（遺伝子組換え）として 1 回 100 mg を 4 週間ごとに皮下に投与する。

参考文献

Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: Mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:789-815.

GINA. Global strategy for asthma management and prevention. *Available at URL(2015.1): http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2014_Aug12.pdf.* 2014:.

Wenzel S. Severe asthma in adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:149-60.

2.6.2.　薬理試験の概要文

2.6.2.1.　まとめ

メポリズマブ（遺伝子組換え）（以下、メポリズマブ）はヒトインターロイキン-5（IL-5）に対する特異的なヒト化 IgG1 モノクローナル抗体製剤であり、既存治療によっても喘息症状をコントロールできない重症喘息患者に対して 1 回 100 mg を 4 週間ごとに皮下投与することにより、急性増悪及び喘息症状を軽減することが期待される。

主な in vivo 試験はヒト化抗ヒト IL-5 モノクローナル抗体であるメポリズマブを用いて実施したが、一部の試験では、メポリズマブを創製するために利用した親抗体であるマウス抗ヒト IL-5 モノクローナル抗体（クローン 2B6）及びマウスで薬理活性を示す相同抗体のラット抗ヒト IL-5 モノクローナル抗体（SB-264091）を使用した。

メポリズマブはマウス及びウサギ IL-5 の生物活性に対して影響を示さず、カニクイザル IL-5 の生物活性に対してのみ抑制作用を示したことから、安全性薬理試験はカニクイザルを用いて GLP 適合試験として実施した。

本項におけるすべての用量は精製抗体の名目濃度として表した。

効力を裏付ける試験

受容体結合試験において、メポリズマブは[^{125}I]ヒト IL-5 の IL-5 受容体（IL-5R）α 鎖への結合を濃度依存的に阻害し、その IC50 は 940 pM であった。結合特性の解析により、メポリズマブはヒト IL-5（ホモ二量体）に 1：1 の分子比で高親和性（解離定数（Kd）：100～258 pM）に結合することが示された。また、メポリズマブ Fab:ヒト IL-5 複合体の結晶構造解析により、メポリズマブ Fab は分子内の 5 つの相補性決定領域（重鎖 H1～3、軽鎖 L1 及び L3）で広範囲にわたってヒト IL-5 分子と相互作用し、このうち重鎖 H2 でヒト IL-5 の IL-5Rβ 鎖結合に必要なアミノ酸である Glu13 と直接的に相互作用することが示された。

メポリズマブはヒト IL-5 による TF-1.28 細胞（ヒト赤白血病細胞株）の増殖を濃度依存的に抑制し、その IC50 は 150 pM 未満であり、300 pM では 90%超の抑制作用を示した。また、ヒト IL-5 による B13 細胞（マウスプレ B 細胞株）の増殖を濃度依存的に抑制し、その IC50 は 31 pM であった。

メポリズマブは 10 nM の高濃度でもマウス IL-5 による TF-1.28 及び B13 細胞の増殖に対して阻害作用を示さなかった。また、ウサギへの 125 mg/kg の単回静脈内投与によって血中好酸球数は変化せず、250 mg/kg の単回静脈内投与でもヒト IL-2 投与による血中好酸球数の増加に対して影響を及ぼさなかった。ヒト及びカニクイザル IL-5 のアミノ酸配列を比較した結果、115 アミノ酸残基のうち相異は 27 及び 40 番目の 2 ヵ所のみであり、両種は非常に高い相同性を示した。メポリズマブはヒト又はカニクイザル IL-5 による TF-1.28 及び B13 細胞の増殖、並びにヒト及びカニクイザル骨髄単核細胞の好酸球分化をいずれも同程度の IC50 で濃度依存的に抑制し、メポリズマブの効力にヒト及びカニクイザル IL-5 間で大きな違いはみられなかった。

正常サルにメポリズマブの 1 mg/kg を皮下投与すると 1 週間後から血中好酸球数が減少し、3 週間後に最小値を示した。メポリズマブの血中好酸球数減少作用の IC50 は、間接反応モ

デル[1)] を用いた解析により 1.43 μg/mL と推定された。また、約 60 mg/kg を試験 1 及び 15 日に皮下投与すると、血中好酸球数は試験 8～28 日に 52～88%減少した。正常サルにメポリズマブの 0.05～50 mg/kg を試験 1 及び 29 日に静脈内投与した試験では、5 及び 50 mg/kg 群で試験 13 及び 27 日に血中好酸球数は 73～95%減少し、この血中好酸球数減少作用は試験 77 日（2 回目のメポリズマブ投与の 7 週間後）まで持続した。この試験でメポリズマブ群に IL-2 刺激（遺伝子組換えヒト IL-2 を試験 30 日から計 6 回隔日皮下投与）を行うと、媒体群でみられた血中好酸球数の増加は用量依存的に抑制され、0.5 mg/kg 以上の群で試験 41 日に 87%以上の抑制がみられた。また、正常サルにメポリズマブの 10 又は 100 mg/kg を 1 ヵ月間隔で 6 ヵ月間反復静脈内投与あるいは 10 mg/kg を同じレジメンで反復皮下投与すると、いずれの群でも試験 29 日以降に血中好酸球数は 56～100%減少した。この試験において、気管支肺胞洗浄液（BALF）中好酸球数、並びに骨髄中の成熟及び未成熟好酸球数はいずれの群でも減少する傾向がみられた。

アスカリス抗原に対して気管支収縮反応を示すサルにメポリズマブの 10 mg/kg を単回静脈内投与すると、投与 24 時間後、並びに 3 及び 6 週間後のアスカリス抗原チャレンジによる BALF 中好酸球数の増加は顕著に抑制された。投与 24 時間後に行ったチャレンジの 24 時間後に測定した BALF 中好酸球数は、メポリズマブ群で媒体群と比較して約 60%低値であった。投与 3 及び 6 週間後に行ったチャレンジによる BALF 中好酸球数の増加は、メポリズマブ群ではそれぞれチャレンジ前の 2 及び 4 倍であったのに対して、媒体群ではいずれも 5 倍であった。媒体群において、チャレンジ 24 時間後の BALF 中好酸球数及び総細胞数の増加は同程度であったことから、チャレンジによって肺内に浸潤した主な細胞種は好酸球であることが示された。また、ベースライン値と比べて媒体群では試験期間中に血中好酸球数の増加がみられたが、メポリズマブ群では約 50%まで減少した。このメポリズマブによる血中好酸球数減少作用は投与 48 時間後までに発現し、6 週間後まで持続した。一方で、チャレンジ直後の急性気管支収縮反応（R_L の増加及び C_{DYN} の減少）に対しては、メポリズマブはいずれの時点においても抑制作用を示さなかった。

アスカリス抗原に対して気管支収縮反応を示すサルにメポリズマブ（10 mg/kg）と抗 IL-4 抗体である SB-240683 を併用で単回静脈内投与したときに、投与 24 時間後のチャレンジによる気管支収縮反応（R_L の増加及び C_{DYN} の減少）に対する作用は認められなかったが、血中好酸球数は投与 48 時間後から 3 週間後まで顕著に減少し、BALF 中好酸球数の増加も投与 3 週間後に顕著に抑制された。また、BALF 中 RANTES（regulated on activation, normal T cell expressed and secreted）濃度の低下、及び BALF 中 IL-6 濃度の低下傾向がみられた。これらの併用投与の成績はメポリズマブ単独投与の試験成績と一致しており、メポリズマブ及び抗 IL-4 抗体を併用投与することで効果の増強は認められなかった。

---

1)　薬効となる生理反応が生理活性物質等によって起こり、薬物がその生理活性物質の反応を阻害又は促進することで間接的に薬効が発現する場合に、薬効と薬物濃度の関係を解析する目的で用いられるモデル

安全性薬理試験

サルにメポリズマブの 100 mg/kg までを単回静脈内投与したときに、一般状態、体重、直腸温、動脈圧、心拍数、呼吸数及び腎機能パラメータに影響はみられなかった。また、サルの最長 6 ヵ月間の反復投与毒性試験において、メポリズマブの最高 100 mg/kg までを静脈内投与したときに中枢及び末梢神経系に関する所見は認められず、投与約 4 週間後の心電図に影響はみられなかった（2.6.6.3.）。

2.6.2.2.　効力を裏付ける試験

気管支喘息は気道の慢性炎症、種々の程度の気道狭窄及び気道過敏性の亢進を特徴とする呼吸器疾患であり、症状として繰返し起こる咳、喘鳴及び呼吸困難があげられる[GINA, 2014]。気管支喘息患者の多くはガイドライン[GINA, 2014]に定められたステップに従った治療によって喘息症状のコントロールが可能であるが、重症患者は治療ステップに従ってもコントロールできない喘息症状が持続しており、急性増悪を起こして高用量の経口ステロイドの投与や入院を必要とすることがある。

IL-5 は Th2 細胞、好酸球、肥満細胞、好塩基球等の種々の炎症性細胞で産生され、好酸球の増殖、分化、生存及び活性化に関与するサイトカインである[Clutterbuck, 1989; Antoniu, 2013; Lopez, 1988]。また、IL-5 は骨髄の好酸球プールから循環血中への好酸球の放出を促進し、ケモカイン受容体である CCR3 に結合して作用するエオタキシンとともに、微小血管から肺への好酸球の動員に大きく寄与している[Wang, 1989; Collins, 1995; Garcia, 2013]。メポリズマブはヒト化抗ヒト IL-5 抗体であり、IL-5 の生物活性を中和してヒト骨髄由来好酸球の分化を抑制し、肺組織等への好酸球の動員及び好酸球の生存を低下させる[Flood-Page, 2003]。

気管支喘息の病態形成において、気道の好酸球性炎症が重要な役割を果たすと考えられている[Cohn, 2004]。IL-5 等によって気道に動員されて活性化した好酸球は、顆粒蛋白質を分泌して気道上皮を傷害し、血管透過性の亢進及び平滑筋収縮を起こして粘液分泌を増加させることで気道過敏性を亢進させ、喘息症状及び気道狭窄を誘発する。また、持続的な好酸球数の高値と喘息の重症化との関連性が示唆されており、実際に、コルチコステロイド投与を受けている重症喘息患者集団の半数以上で持続性の好酸球性気道炎症が認められている[Wenzel, 2005]。このような重症喘息患者では循環血中及び肺組織中において好酸球数の増加がみられ、好酸球性の炎症がその病態形成に重要な役割を果たしていると考えられることから、メポリズマブは好酸球性炎症を伴う重症喘息に対して治療効果を示すことが期待される。

2.6.2.2.1.　In vitro 試験

メポリズマブのヒト IL-5 結合特性及びヒト IL-5 の生物活性に対する作用を一連の in vitro 試験で検討した。対照物質として、クローン 2B6（親抗体であるマウス抗ヒト IL-5 抗体）及び IL-5CH（キメラ抗ヒト IL-5 抗体）を使用した。

2.6.2.2.1.1.　　IL-5 受容体 alpha 鎖へのヒト IL-5 結合に対する作用

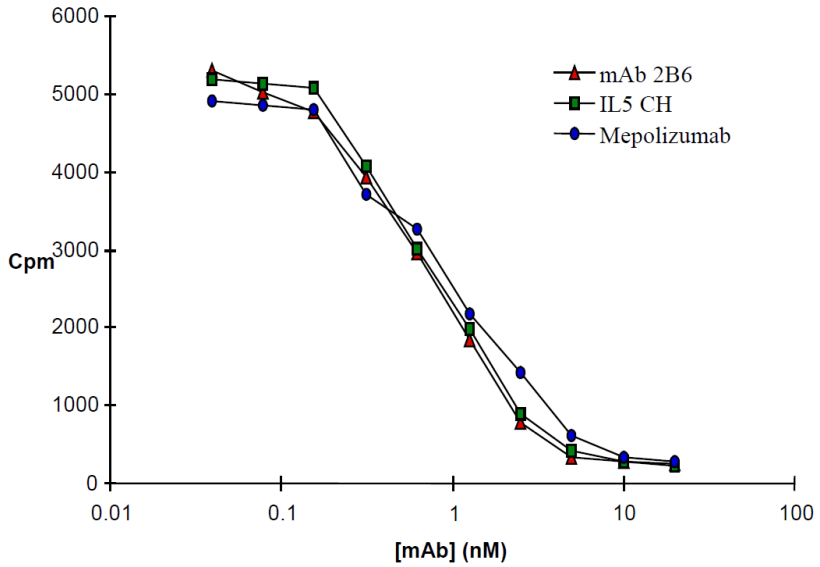
IL-5 受容体（IL-5R）はα及びβ鎖によるヘテロダイマーとして構成されており、α鎖は単独で IL-5 と低親和性で結合し、β鎖はα鎖とともに高親和性受容体を構成して受容体シグナルを伝達する[Tavernier, 1991]。そこで、[^{125}I]ヒト IL-5 を用いた受容体結合試験により、IL-5 の IL-5Rα 鎖結合に対するメポリズマブの作用を検討した（SB-240563/RSD-100LD3/1）。

方法

種々の濃度のメポリズマブ、クローン 2B6 又は IL-5CH に[^{125}I]ヒト IL-5 を添加して室温で 20 分間前処理した後、遺伝子組換えヒト IL-5Rα 鎖を発現させたショウジョウバエ細胞に加えて 60 分間反応させた。反応液をフタレート油液中で遠心分離して細胞を沈降させ、細胞膜結合[^{125}I]ヒト IL-5 の放射線をガンマカウンターで計数した。[^{125}I]ヒト IL-5 の特異的結合は、非標識ヒト IL-5 非存在下での結合量（総結合）と 300 倍量の非標識ヒト IL-5 存在下での結合量（非特異的結合）の差として算出した。

結果

メポリズマブは[^{125}I]ヒト IL-5 の IL-5Rα 鎖結合を濃度依存的に阻害し、その IC50 は 940 pM であった。クローン 2B6 及び IL-5CH もメポリズマブと同程度の阻害作用を示した（図 2.6.2-1、表 2.6.2-1）。



縦軸：[^{125}I]ヒト IL-5 の特異的結合、横軸：抗体濃度、mAb 2B6：クローン 2B6

図 2.6.2-1　　メポリズマブ又は関連抗体存在下での[^{125}I]ヒト IL-5 の IL-5Rα 鎖結合

Data source: SB-240563/RSD-100LD3/1 の Figure 3

表 2.6.2-1　[^{125}I]ヒト IL-5 の IL-5Rα 鎖結合に対するメポリズマブ及び関連抗体の阻害作用

抗体	IC50 (pM)		n
	個別値又は平均	範囲	
メポリズマブ (ヒト化抗ヒト IL-5 抗体)	940	700-1200	3
クローン 2B6 (マウス抗ヒト IL-5 抗体)	700	-	1
IL-5CH (キメラ抗ヒト IL-5 抗体)	570	390-750	2

-：該当なし
Data source: SB-240563/RSD-100LD3/1 の Table 2

2.6.2.2.1.2.　ヒト IL-5 に対する結合特性

2.6.2.2.1.2.1.　速度論的解析

表面プラズモン共鳴法を用い、メポリズマブ及びヒト IL-5 の結合特性を速度論的に解析した（SB-240563/RSD-100LD3/1、SH2009/00010/00）。

方法

ヒト IL-5（100 nM）を固定化したセンサーチップを表面プラズモン共鳴バイオセンサーに装着し、種々の濃度のメポリズマブを 25℃で流路に注入してヒト IL-5 に結合させた。各濃度でのメポリズマブ結合量の変化を反映する共鳴シグナルを測定し、結合・解離速度定数を算出した（SB-240563/RSD-100LD3/1）。

別の試験では、センサーチップに固定化した抗ヒト IgG 抗体にメポリズマブを捕捉させた後にバイオセンサーに装着し、種々の濃度のヒト IL-5 を 25℃で流路に注入して共鳴シグナルを測定した（SH2009/00010/00）。

結果

固定化ヒト IL-5 へのメポリズマブ結合の結合速度定数（kon）は 1.6×10^{5} $M^{-1}s^{-1}$ であった。メポリズマブの固定化ヒト IL-5 からの解離は非常に緩徐であり、正確な解離速度定数（koff）を算出できなかったが、その推定値は 1.7×10^{-5} s^{-1} であった。これらの値から解離定数（Kd＝koff/kon）は約 100 pM と算出された。

抗ヒト IgG 抗体を介して固定化したメポリズマブへのヒト IL-5 結合の Kd は 110～258 pM であった。

2.6.2.2.1.2.2.　熱力学的解析

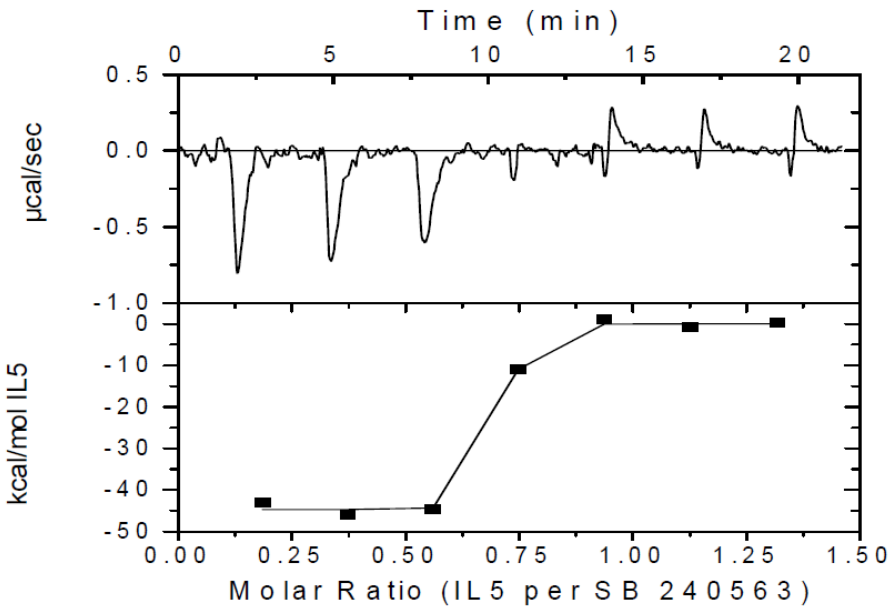
方法

等温滴定カロリメトリーによりメポリズマブ又はクローン 2B6 とヒト IL-5 との結合に伴う熱量変化を測定し、結合特性を解析した（SB-240563/RSD-100LD3/1）。

結果

メポリズマブにヒト IL-5 を滴定すると、約 1：1 のモル比で当量点が得られたことから、メポリズマブ 1 分子にヒト IL-5（ホモ二量体）1 分子が結合することが示された（図 2.6.2-2 の下図）。種々の温度条件（25～58℃）で検討した結果、等温線からは Kd の上限のみが得られ、正確な数値は算出できなかったことから、メポリズマブ及び IL-5 の結合は非常に強

いことが示され、25℃での Kd の上限は 130 pM 以下であった。クローン 2B6 もメポリズマブと同様に、ヒト IL-5 と 1：1 の分子比で高親和性に結合することが示された。



上図：結合による熱量変化 (熱量変化を結合エンタルピー変化のデータに変換して下図を作成)、
下図：縦軸；IL-5 モル当たりの結合エンタルピー変化、横軸；モル比 (IL-5/メポリズマブ)、
SB240563：メポリズマブ

図 2.6.2-2　　メポリズマブにヒト IL-5 を滴定したときのマイクロカロリメトリー

Data source: SB-240563/RSD-100LD3/1 の Figure 1

2.6.2.2.1.2.3.　　結晶構造解析

方法

メポリズマブをパパイン処理し、1 分子当たり 2 つの Fab フラグメントと 1 つの Fc フラグメントに切断した後、Fab フラグメントのみを精製した。メポリズマブ Fab フラグメント及びヒト IL-5（ホモ二量体）を 2 対 1 のモル比で混合してメポリズマブ Fab:ヒト IL-5 複合体を形成させ、シッティング・ドロップ法を用いて結晶化させた。メポリズマブ Fab:ヒト IL-5 複合体の結晶構造を X 線回折法により解析した（2014N189114_00）。

結果

メポリズマブ Fab:ヒト IL-5 複合体は、1 分子当たり 2 つのメポリズマブ Fab 及び 1 つのヒト IL-5（ホモ二量体）で構成され、二量体を形成するそれぞれのヒト IL-5 の対称となる領域にメポリズマブ Fab が 1 つずつ結合していることが示された。また、メポリズマブ Fab の 6 つの相補性決定領域（重鎖 H1～3 及び軽鎖 L1～3）のうち、L2 以外の 5 つのループはヒト IL-5 と近接して位置していたことから、これらの 5 つのループにおいてヒト IL-5 分子と相互作用することが示され、このうち H2 においてヒト IL-5 の IL-5Rβ 鎖結合に必要なアミノ酸である Glu13[Graber, 1995]と直接的に相互作用することが示された。一方、メポリズマブ Fab はヒト IL-5 の IL-5Rα 鎖結合に関連する $E^{89}R^{90}R^{91}R^{92}$ 部位[Graber, 1995]とは相互作用を示さなかった。

2.6.2.2.1.2.4.　　ヒト IL-5 に対する結合特性のまとめ

表面プラズモン共鳴法を用いて検討したメポリズマブとヒト IL-5 との結合の Kd は 100～258 pM であった。等温滴定カロリメトリー及び結晶構造解析から、メポリズマブはヒト IL-5（ホモ二量体）に 1：1 の分子比で高親和性に結合することが示された。メポリズマブ Fab:ヒト IL-5 複合体の結晶構造解析により、メポリズマブ Fab は分子内の 5 つの相補性決定領域で広範囲にわたってヒト IL-5 分子と相互作用し、このうち H2 はヒト IL-5 の IL-5Rβ 鎖結合に必要なアミノ酸である Glu13 と直接的に相互作用することが示された。

2.6.2.2.1.3.　　ヒト IL-5 の生物活性に対する作用

2.6.2.2.1.3.1.　　ヒト IL-5 による TF-1.28 細胞の増殖に対する作用

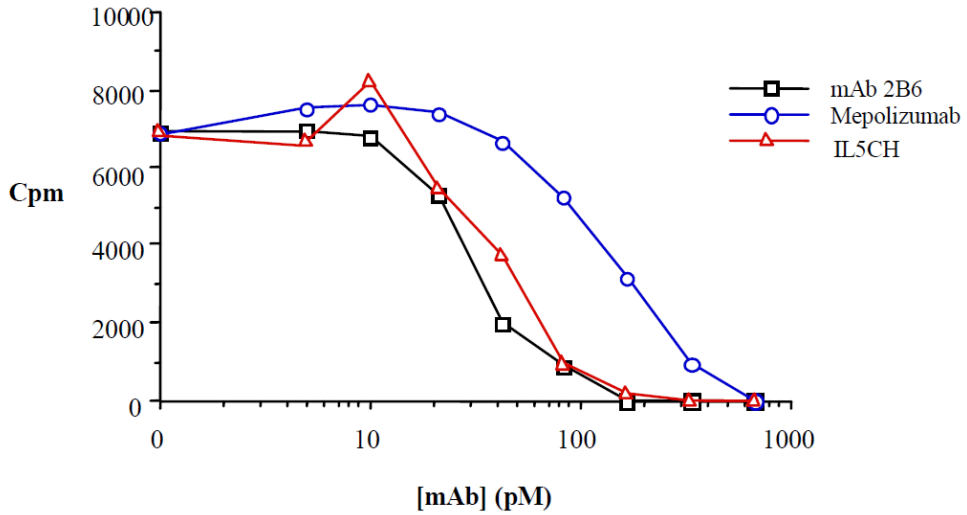
ヒト赤白血病細胞株 TF-1 細胞のサブクローンである TF-1.28 細胞は、機能的な IL-5Rα 鎖及び β 鎖を発現し、IL-5 依存性の増殖を示す。そこで、TF-1.28 細胞を用いてヒト IL-5 による増殖に対するメポリズマブの作用を検討した（SB-240563/RSD-100LD3/1）。

方法

TF-1.28 細胞（5000 cells/well）を 96-well プレートに播種し、ヒト IL-5（35 pM）存在下で種々の濃度（0～640 pM）のメポリズマブ、クローン 2B6 又は IL-5CH を添加して 48 時間培養した。培養終了の 4 時間前に[^{3}H]チミジンを加えて培養を継続し、細胞に取り込まれた放射線をシンチレーションカウンターで計数して細胞増殖の指標とした。

結果

メポリズマブはヒト IL-5 による TF-1.28 細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、その IC50 は 150 pM 未満であり、300 pM では 90%超の抑制作用を示した（図 2.6.2-3）。



縦軸：培養終了前 4 時間に DNA に取り込まれた[^{3}H]チミジンの放射線量（細胞増殖の指標）、
横軸：抗体濃度、mAb 2B6：クローン 2B6

図 2.6.2-3　　ヒト IL-5 による TF-1.28 細胞増殖に対するメポリズマブ及び関連抗体の抑制作用

Data source: SB-240563/RSD-100LD3/1 の Figure 5

2.6.2.2.1.3.2.　　ヒト IL-5 による B13 細胞の増殖に対する作用

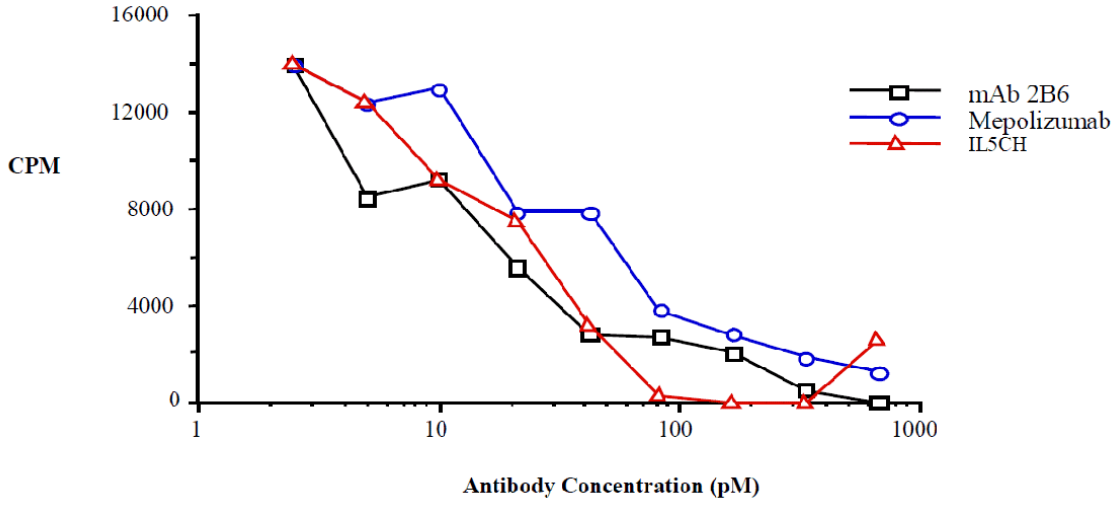
マウスプレ B 細胞株 LyH7.B13 細胞はヒト及びマウスの IL-5 に応答して増殖する。B13 細胞を用いてヒト IL-5 による増殖に対するメポリズマブの作用を検討した（SB-240563/RSD-100LD3/1）。

方法

B13 細胞（5000 cells/well）を 96-well プレートに播種し、ヒト IL-5（7 pM）存在下で種々の濃度（2.5～640 pM）のメポリズマブ、クローン 2B6 又は IL-5CH を添加して 48 時間培養した。培養終了の 4～6 時間前に[^{3}H]チミジンを加えて培養し、細胞に取り込まれた放射線をシンチレーションカウンターで計数して細胞増殖の指標とした。

結果

メポリズマブはヒト IL-5 による B13 細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、その IC50 は 31 pM であった（図 2.6.2-4）。



縦軸：培養終了前 4～6 時間に DNA に取り込まれた[^{3}H]チミジンの放射線量（細胞増殖の指標）、
横軸：抗体濃度、mAb 2B6：クローン 2B6

図 2.6.2-4　　ヒト IL-5 による B13 細胞増殖に対するメポリズマブ及び関連抗体の抑制作用

Data source: SB-240563/RSD-100LD3/1 の Figure 4

2.6.2.2.1.3.3.　　ヒト IL-5 の生物活性に対する作用のまとめ

ヒト IL-5 による細胞増殖に対するメポリズマブ、クローン 2B6 及び IL-5CH の抑制作用を表 2.6.2-2 にまとめた。メポリズマブ、クローン 2B6 及び IL-5CH の TF-1.28 及び B13 細胞増殖に対する抑制作用の IC50 はいずれの細胞においても約 2 倍の範囲内にあり、3 種類の抗体はヒト IL-5 依存性の増殖を同程度の効力で抑制することが示された。

表 2.6.2-2　　ヒト IL-5 による細胞増殖に対するメポリズマブ及び関連抗体の抑制作用

抗体	TF-1.28 細胞増殖			B13 細胞増殖		
	IC50 (pM)		n	IC50 (pM)		n
	個別値又は平均	範囲		平均	範囲	
メポリズマブ	73	38-130	3	31	15-55	5
クローン 2B6	30	-	1	74	26-200	6
IL-5CH	38	-	1	34	25-53	3

-：該当なし
Data source: SB-240563/RSD-100LD3/1 の Table 2

2.6.2.2.2.　　交差反応性

メポリズマブのマウス、ウサギ及びサルに対する交差反応性を in vitro 又は in vivo で検討した。

2.6.2.2.2.1.　　マウス IL-5 による細胞増殖に対する作用

方法

TF-1.28 及び B13 細胞を用いてマウス IL-5 による細胞増殖に対するメポリズマブの作用を検討した（CH2005/00951/00 及び SB-240563/RSD-100LD3/1）。TF-1.28 及び B13 細胞にマウス IL-5 の存在下でメポリズマブ（0～10 nM）を添加して 48 時間培養した。2.6.2.2.1.3.と同様の方法で細胞増殖を評価した。

結果

TF-1.28 及び B13 細胞はいずれもマウス IL-5 に応答して増殖した。メポリズマブは 10 nM の高濃度でも、マウス IL-5 による TF-1.28 及び B13 細胞の増殖に対して阻害作用を示さなかった。

2.6.2.2.2.2.　　ウサギの好酸球数に対する作用

メポリズマブのウサギでの薬物動態、薬理作用及び免疫原性を評価する試験の一部として、静脈内投与したときの薬理作用を検討した（SB-240563/RSD-100XMR/1）。

方法

雌 New Zealand white ウサギ（3 匹）に、試験 1 日に媒体（20 mM リン酸ナトリウム、6.2%スクロース、0.02%ポリソルベート 80 含有水溶液、pH 7.0）を、試験 8 日にメポリズマブの 125 mg/kg を耳翼辺縁静脈へボーラス投与した。試験開始前、試験 8 日のメポリズマブ投与前、並びに試験 15、22 及び 29 日に血液学的検査を実施した。

別の試験として、雌 New Zealand white ウサギ（3 匹/群）に媒体（40 mM リン酸ナトリウム、12.4%スクロース、0.04%ポリソルベート 80 含有水溶液、pH 7.0）又はメポリズマブの 250 mg/kg を試験 1 日に耳翼辺縁静脈へボーラス投与し、T リンパ球を刺激して二次的に好酸球産生を誘発するサイトカインである遺伝子組換えヒト IL-2[MacDonald, 1990]の 22 µg/kg を、試験 2、4 及び 6 日に皮下投与した。試験開始前及び試験 7 日に血液学的検査を実施した。

結果

メポリズマブはウサギへの 125 mg/kg の単回静脈内投与により、いずれの測定時点においても血中好酸球数及びその他の血液学的パラメータを変化させなかった。

試験 2 日にウサギにヒト IL-2 を投与すると、試験 7 日の平均赤血球量は投与前と比較して低下し、有核赤血球数、総白血球数及び好酸球数は増加した。メポリズマブは 250 mg/kg の単回静脈内投与によっても、ヒト IL-2 による血液学的パラメータの変化に対して影響を及ぼさなかった。

2.6.2.2.2.3.　サル IL-5 の生物活性に対する作用

ヒト及びサル IL-5 の生物活性に対するメポリズマブの作用を、両種の IL-5 誘発の細胞増殖及び骨髄単核細胞の好酸球分化を指標に比較検討した（CH2008/00044/00）。

方法

カニクイザル IL-5 遺伝子をクローニングし、遺伝子組換えカニクイザル IL-5 をショウジョウバエ S2 細胞に安定発現させて精製した。

TF-1.28 及び B13 細胞に、ヒト又はカニクイザル IL-5 の存在下でメポリズマブ（0～100 nM）を添加して 48 時間培養した。2.6.2.2.1.3.と同様の方法で細胞増殖を評価した。

ヒト及びカニクイザルの骨髄単核細胞に、ヒト又はカニクイザル IL-5 の存在下でメポリズマブを添加して 21 日間培養した。好酸球ペルオキシダーゼの発色基質を添加し、ペルオキシダーゼ活性を反映する 492 nm の吸光度を測定して好酸球分化の指標とした。

結果

ヒト及びカニクイザル IL-5 の 115 個のアミノ酸配列のうち、相異は 27 及び 40 番目の 2 ヵ所であり、両種は非常に高い相同性を示した[Hart, 2001]。

ヒト及びカニクイザル IL-5 は TF-1.28 細胞に対して同程度の増殖作用を示し、B13 細胞に対する増殖作用にも両種の IL-5 で差はみられなかった（表 2.6.2-3）。メポリズマブはヒト又はカニクイザル IL-5 による TF-1.28 及び B13 細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、その IC50 はいずれも同程度であった（表 2.6.2-4）。

ヒト及びカニクイザル骨髄単核細胞において、ヒト又はカニクイザル IL-5 はいずれの種の骨髄単核細胞に対しても好酸球分化を誘発し、その EC50 はいずれも同程度であった（表 2.6.2-3）。メポリズマブはヒト及びカニクイザルのいずれの骨髄単核細胞においても、ヒト又はカニクイザル IL-5 による好酸球分化を同程度の IC50 で濃度依存的に抑制した（表 2.6.2-4）。

表 2.6.2-3　ヒト及びカニクイザル IL-5 による細胞増殖及び骨髄単核細胞の好酸球分化

IL-5	細胞増殖 EC50 (pM)		好酸球分化 EC50 (pM)	
	TF-1.28 細胞	B13 細胞	ヒト骨髄単核細胞	カニクイザル骨髄単核細胞
ヒト	0.7	2.7	13.3	13.3
カニクイザル	0.7	6.0	13.3	13.3

Data source: CH2008/00044/00 の Table 1, [Hart, 2001]の TABLE I

表 2.6.2-4　ヒト及びカニクイザル IL-5 による細胞増殖及び骨髄単核細胞の好酸球分化に対するメポリズマブの抑制作用

IL-5	細胞増殖抑制 IC50 (pM)		好酸球分化抑制 IC50 (pM)	
	TF-1.28 細胞	B13 細胞	ヒト骨髄単核細胞	カニクイザル骨髄単核細胞
ヒト	75	83	70	104
カニクイザル	84	79	83	116

Data source: CH2008/00044/00 の Table 2, [Hart, 2001]の TABLE I

2.6.2.2.2.4.　交差反応性のまとめ

メポリズマブは 10 nM の高濃度でもマウス IL-5 による TF-1.28 及び B13 細胞の増殖に対して阻害作用を示さなかった。また、ウサギへの 125 mg/kg の単回静脈内投与によって血中好酸球数は変化せず、250 mg/kg の単回静脈内投与でもヒト IL-2 投与による血中好酸球数の増加に対して影響を及ぼさなかった。ヒト及びカニクイザル IL-5 のアミノ酸配列を比較した結果、115 アミノ酸残基のうち相異は 27 及び 40 番目の 2 ヵ所であり、両種は非常に高い相同性を示した。それを反映して、メポリズマブはヒト又はカニクイザル IL-5 による TF-1.28 及び B13 細胞の増殖、並びにヒト及びカニクイザル骨髄単核細胞の好酸球分化をいずれも同程度の IC50 で濃度依存的に抑制し、メポリズマブの効力にヒト及びカニクイザル IL-5 間で大きな違いはみられなかった。

2.6.2.2.3.　In vivo 試験

IL-5 は好酸球の増殖・生存に関与する主要なサイトカインであることから、IL-5 の中和抗体の in vivo での薬理作用は、血中好酸球数の減少を指標に評価することが可能と考えられる。In vitro 試験において、メポリズマブはヒト以外の動物種ではサル IL-5 の生物活性に対して阻害作用を示したことから、薬理作用の検討にはサルを用いた。

2.6.2.2.3.1.　正常サルの好酸球数に対する作用

2.6.2.2.3.1.1.　皮下投与での薬理作用及び血漿中濃度の関係

メポリズマブをサルに皮下投与したときの、血中好酸球数に対する作用及び血漿中メポリズマブ濃度の相関性を検討した（SB-240563/RSD-100LKP/2）。

方法

雌カニクイザル（4 匹）にメポリズマブの 1 mg/kg を静脈内投与し、約 3 ヵ月後に 1 mg/kg を皮下投与した。それぞれの投与 8 週間後まで経時的に採血し、電気化学発光免疫測定法（定量限界：10 ng/mL）を用いて血漿中メポリズマブ濃度を測定し、薬物動態パラメータをノンコンパートメント法で解析した。これとは別に、静脈内投与前、静脈内投与約 10 週間後、皮下投与前及び投与 1～14 週間後までの各時点で採血して血中好酸球数を測定した。皮下投与したときの血中好酸球数と血漿中メポリズマブ濃度の関係について間接反応モデル [Dayneka, 1993]を用いて解析を行い、血中好酸球数減少作用の IC50 を推定した。

結果

サルにメポリズマブの 1 mg/kg を静脈内及び皮下投与したときの消失半減期（t1/2）は、それぞれ 13.1 及び 14.5 日と同程度に長かった。

メポリズマブの静脈内投与前及び 1 mg/kg の静脈内投与約 10 週間後の血中好酸球数は同程度であった。その後、1 mg/kg の皮下投与 1 週間後以降に血中好酸球数を最大で皮下投与前値の 81～96%減少させ、この最大作用は皮下投与 3 週間後に認められた。一方、皮下投与したときの最高血漿中濃度到達時間（Tmax）の中央値は 3.5 日であったことから、メポリズマブの血中好酸球数に対する減少作用の経時変化は、血漿中メポリズマブ濃度の経時変化よりも遅れることが示された。そこで、血中好酸球数及び血漿中メポリズマブ濃度の関係を間接反応モデルを用いて解析した結果、メポリズマブの血中好酸球数減少作用の IC50 は 1.43±0.21 μg/mL（平均±標準偏差）と推定された。

2.6.2.2.3.1.2.　局所刺激性試験での皮下投与による作用

サルでの局所刺激性試験（2.6.6.7.）において皮下投与による血中好酸球数に対する作用を検討した（SB-240563/RSD-100ZHH/1）。

方法

雌カニクイザル（3 匹）に媒体（80 mM リン酸ナトリウム、24.8%スクロース及び 0.08%ポリソルベート 80 含有水溶液、pH 6.7）及びメポリズマブの約 60 mg/kg を、それぞれ左及び右大腿部へ試験 1 及び 15 日に皮下投与した。投与開始前（試験-8 日）、試験 8、14、22 及び 28 日に血液学的検査を実施した。

結果

メポリズマブのサルへの皮下投与により、血中好酸球数は投与開始前（平均 0.25×10^9 cells/L）と比較して試験 8～28 日（平均 0.03～0.12×10^9 cells/L）に 52～88%減少した。その他の血液学的パラメータに影響はみられなかった。

2.6.2.2.3.1.3.　ヒト IL-2 刺激による好酸球増加に対する作用

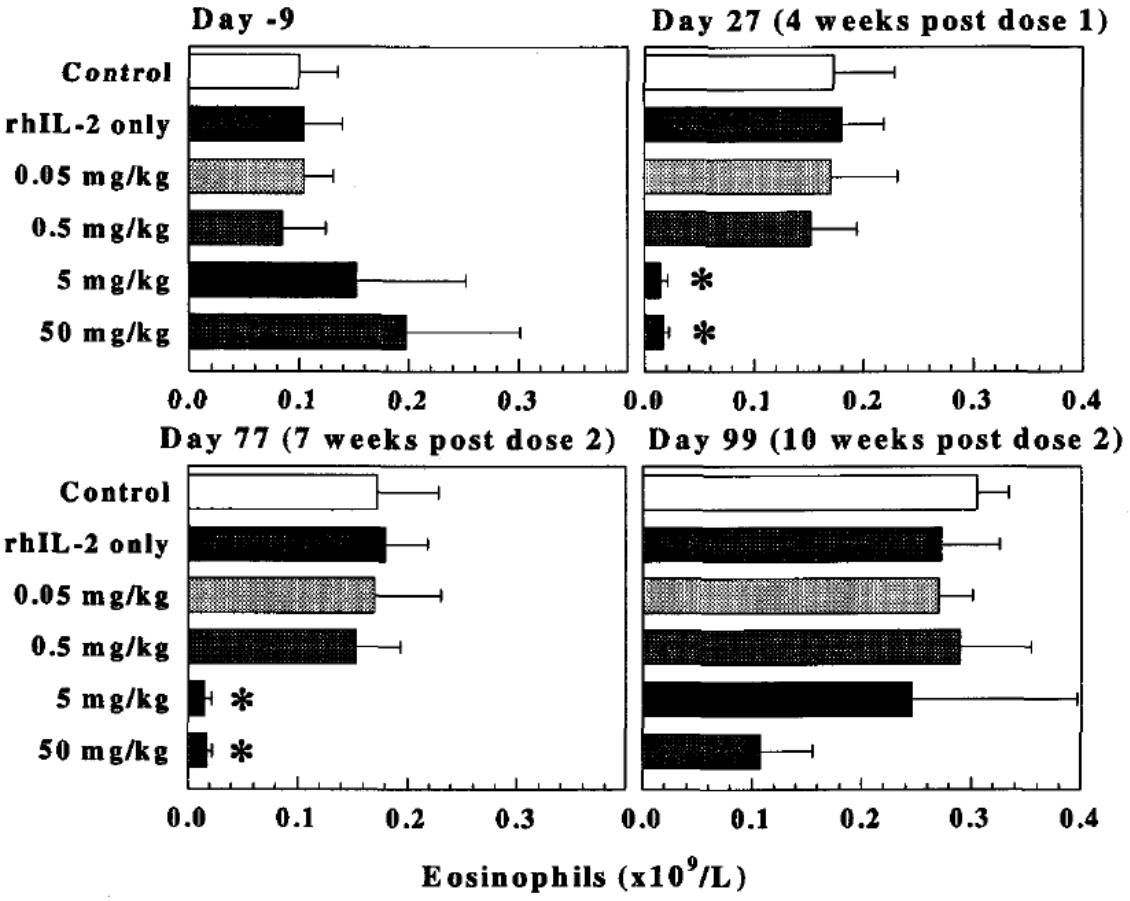
ヒトに遺伝子組換えヒト IL-2 を投与すると好酸球増加が誘発されるが、これは IL-2 が T 細胞を活性化することで放出された IL-5 が、骨髄の好酸球産生を刺激することによるものと考えられている[MacDonald, 1990]。そこで、サルの 2 ヵ月間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.）において、ヒト IL-2 刺激による好酸球増加に対するメポリズマブの影響を検討した（SB-240563/RSD-100KN9/1）。

方法

雌雄カニクイザル（2 匹/性/群）にメポリズマブの 0.05、0.5、5 又は 50 mg/kg を試験 1 及び 29 日に静脈内投与した。媒体群及び IL-2 対照群に媒体（20 mM リン酸ナトリウム、6.2%スクロース及び 0.02%ポリソルベート 80 含有水溶液、pH 7.0）を同じレジメンで静脈内投与した。試験 30 日より、メポリズマブ群及び IL-2 対照群に遺伝子組換えヒト IL-2（22 μg/kg）を計 6 回隔日皮下投与した（試験 30、32、34、36、38 及び 40 日）。媒体群には同じレジメンで IL-2 の媒体（5%デキストロース水溶液）を皮下投与した。投与前（試験-9 日）、試験 13、27、35、41、56、77、99 及び 120 日に血液学的検査を実施した。

結果

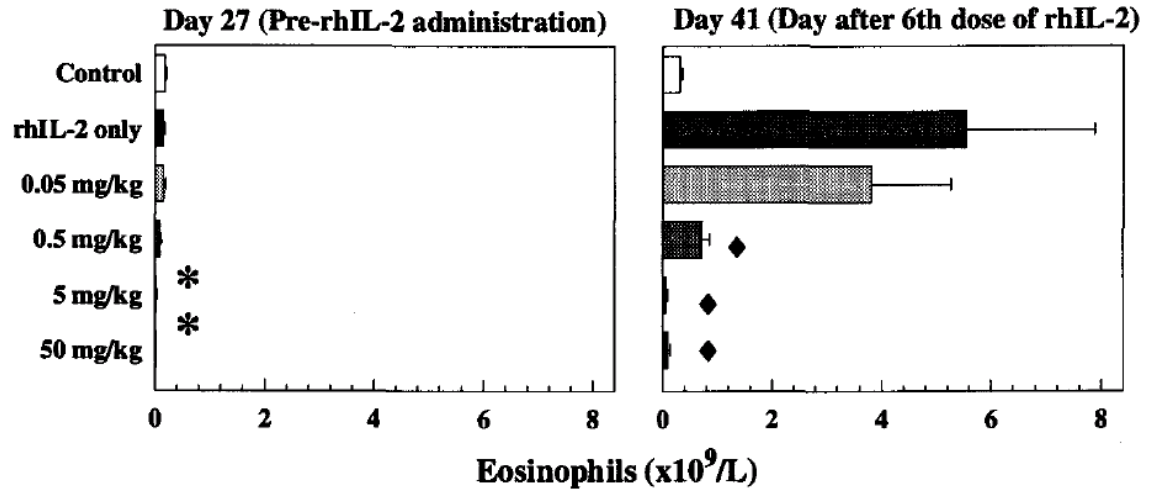
メポリズマブの 0.05 及び 0.5 mg/kg 群では試験 27 日までに血中好酸球数の減少はみられなかった。5 及び 50 mg/kg 群では試験 13 及び 27 日に血中好酸球数は投与前（平均 0.15～0.20×10^9 cells/L）と比較して 73～95%減少（平均 0.01～0.04×10^9 cells/L）し、試験 77 日（2 回目のメポリズマブ投与の 7 週間後）においても、作用は持続した（媒体群（平均 0.17×10^9 cells/L）と比較して 82～88%の減少（平均 0.02～0.03×10^9 cells/L））（図 2.6.2-5）。2 回目のメポリズマブ投与の翌日（試験 30 日）からヒト IL-2 を計 6 回隔日皮下投与すると、IL-2 対照群では試験 41 日までに血中好酸球数は著しく増加した（平均 5.54×10^9 cells/L）。メポリズマブは IL-2 刺激による血中好酸球数の増加を用量依存的に抑制し、試験 41 日に 0.5 mg/kg 以上の群で 87%以上の抑制率を示した（平均 0.07～0.71×10^9 cells/L）（図 2.6.2-6）。その他の血液学的パラメータに影響はみられなかった。



平均値+標準誤差 (n=4)、Control：媒体群、rhIL-2 only：IL-2 対照群、*：p<0.05 vs Control (t 検定)

図 2.6.2-5　　静脈内投与によるカニクイザルの血中好酸球数に対する作用

Data source: SB-240563/RSD-100KN9/1 の Figure A



平均値+標準誤差 (n=4)、Control：媒体群、rhIL-2 only：IL-2 対照群、*：p<0.05 vs Control (t 検定)、
◆：p<0.05 vs rhIL-2 only (t 検定)

図 2.6.2-6　　ヒト IL-2 刺激によるカニクイザルの血中好酸球の増加に対する作用

Data source: SB-240563/RSD-100KN9/1 の Figure B

2.6.2.2.3.1.4.　　6 ヵ月間反復投与毒性試験での静脈内又は皮下投与による作用

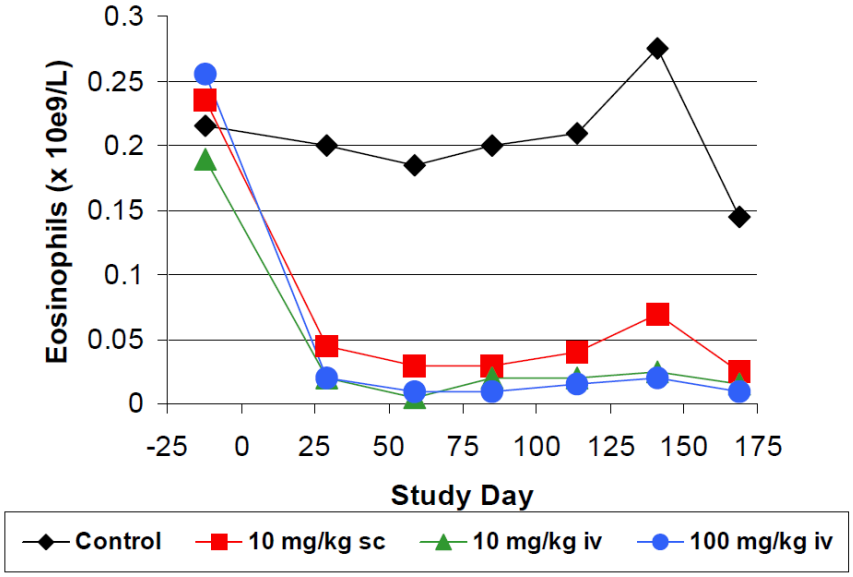
サルの 6 ヵ月間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.）での血液学的検査として、血中好酸球数に対する作用を検討した（SB-240563/RSD-100X0L/2）。

方法

雌雄カニクイザル（3 匹/性/群）にメポリズマブの 10 又は 100 mg/kg を 1 ヵ月間隔で 6 ヵ月間反復静脈内投与した（試験 1、29、59、85、114、141 及び 169 日）。また、皮下投与群（3 匹/性/群）として 10 mg/kg を同じレジメンで反復皮下投与した。媒体群には媒体（20 mM リン酸ナトリウム、6.2%スクロース及び 0.02%ポリソルベート 80 含有水溶液、pH 7.0）を静脈内及び皮下投与した。投与開始前（試験-12 日）、試験 29、59、85、114、141 及び 169 日に血液学的検査を実施した。また、投与開始前及び試験 104 日に麻酔下で気管支肺胞洗浄液（BALF）を採取して肺の好酸球数を測定し、試験終了時に肋骨切片標本を作製して骨髄中の好酸球系（成熟及び未成熟）細胞数を評価した。

結果

投与前及び媒体群の血中好酸球数は平均 0.12～0.38×10^9 cells/L であった。メポリズマブの 10 mg/kg の皮下及び静脈内投与群、並びに 100 mg/kg の静脈内投与群の血中好酸球数は、投与前と比較してそれぞれ 56～94%（平均 0.02～0.07×10^9 cells/L）、75～100%（平均 0.00～0.03×10^9 cells/L）及び 85～97%（平均 0.01～0.02×10^9 cells/L）減少した（図 2.6.2-7）。BALF 中好酸球数は、いずれのメポリズマブ群においても投与前と比較して減少する傾向がみられた。また、骨髄中の成熟及び未成熟好酸球数は変動幅が大きく、メポリズマブ群及び媒体群との間で計数値のレンジが重なっており、メポリズマブ群で好酸球系の細胞数が減少する傾向がみられたものの、その程度は小さく好酸球前駆細胞の枯渇は認められなかった。



平均値 (n=6)、Control：媒体群

図 2.6.2-7　　カニクイザルの 6 ヵ月間反復投与毒性試験での血中好酸球数に対する作用

Data source: SB-240563/RSD-100X0L/2 の Figure B

2.6.2.2.3.1.5.　　正常サルの好酸球に対する作用のまとめ

サルにメポリズマブの 1 mg/kg を皮下投与すると 1 週間後から血中好酸球数が減少し、3 週間後に最小値を示した。メポリズマブの血中好酸球数減少作用の IC50 は 1.43 µg/mL と推察された。また、メポリズマブの約 60 mg/kg を試験 1 及び 15 日に皮下投与すると、血中好酸球数は試験 8～28 日に 52～88%減少した。

メポリズマブの 0.05～50 mg/kg を試験 1 及び 29 日に静脈内投与した試験では、5 及び 50 mg/kg 群で試験 13 及び 27 日に血中好酸球数は 73～95%減少し、この血中好酸球数減少作用は試験 77 日（2 回目のメポリズマブ投与の 7 週間後）まで持続した。この試験においてメポリズマブ群に IL-2 刺激（遺伝子組換えヒト IL-2 を試験 30 日から計 6 回隔日皮下投与）を行うと、媒体群でみられた血中好酸球数の増加は用量依存的に抑制され、0.5 mg/kg 以上の群で試験 41 日に 87%以上の抑制がみられた。

メポリズマブの 10 又は 100 mg/kg を 1 ヵ月間隔で 6 ヵ月間反復静脈内投与あるいは 10 mg/kg を同じレジメンで反復皮下投与すると、いずれの群でも試験 29 日以降に血中好酸球数は 56～100%減少した。この試験において BALF 中好酸球数、並びに骨髄中の成熟及び未成熟好酸球数はいずれのメポリズマブ群でも減少する傾向がみられた。

2.6.2.2.3.2.　　サルの抗原誘発喘息モデルに対する作用

2.6.2.2.3.2.1.　　単回静脈内投与による抗原誘発喘息モデルに対する作用

カニクイザルの抗原誘発喘息モデルに対するメポリズマブの単回静脈内投与による作用を検討した（SB-240563/RSD-1013L8/1）。

方法

雄カニクイザルにアスカリス抗原を吸入させ、気管支収縮反応（肺抵抗（R_L）が 40%以上上昇かつ動的コンプライアンス（C_{DYN}）が 40%以上低下）が確認された 8 匹を選択して 2 群に分けた。被験物質投与の 2 週間前に、リン酸緩衝液に懸濁したアスカリス抗原を各動物に噴霧してチャレンジ（15 吸入）し、各評価項目のベースライン値を測定した。試験 1 日に媒体（20 mM リン酸ナトリウム、6.2%スクロース及び 0.2%ポリソルベート 80 含有水溶液、pH 7.0）又はメポリズマブの 10 mg/kg を単回静脈内投与した。投与 24 時間後、並びに 3 及び 6 週間後に上記と同様にアスカリス抗原をチャレンジして喘息反応を誘発させた。各チャレンジの直前及び約 24 時間後に気管支肺胞洗浄液（BALF）及び血液を採取し、BALF 中の各種細胞数の測定及び血液学的検査を実施した。また、各チャレンジ時に肺機能値（R_L 及び C_{DYN}）を測定した。

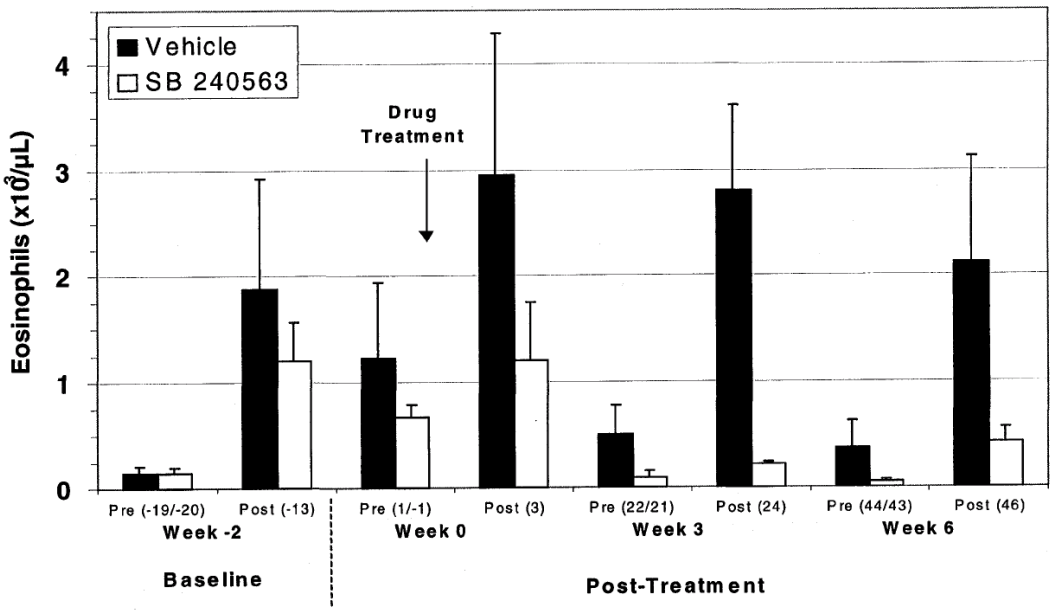
結果

試験期間を通じて、体重及び一般状態に被験物質投与と関連した影響はみられなかった。

アスカリス抗原チャレンジによって誘発される喘息反応に伴って 24 時間後にみられる BALF 中好酸球数の増加は、チャレンジ 24 時間前のメポリズマブ投与では顕著に抑制された（図 2.6.2-8）。メポリズマブ投与 2 週間前のチャレンジ（ベースライン値の測定）では、BALF 中好酸球数はチャレンジ後に 6～10 倍（0.2×10^3 cells/μL から $1.2\sim1.9\times10^3$ cells/μL）に増加した。試験 1 日に媒体又はメポリズマブを投与し、その 24 時間後にアスカリス抗原をチャレンジしたときに BALF 中好酸球数は両群ともチャレンジ前の 2 倍に増加したが、チャレンジ後のメポリズマブ群の BALF 中好酸球数は、媒体群よりも約 60%低値であった（媒体群：2.9×10^3 cells/μL、メポリズマブ群：1.2×10^3 cells/μL）。投与 3 及び 6 週間後ではメポリズマブ群でのチャレンジによる BALF 中好酸球数の増加はそれぞれ 2 倍（0.1×10^3 cells/μL から 0.2×10^3 cells/μL）及び 4 倍（0.1×10^3 cells/μL から 0.4×10^3 cells/μL）であったのに対して、媒体群ではいずれも約 5 倍（0.5×10^3 cells/μL から 2.8×10^3 cells/μL 及び 0.4×10^3 cells/μL から 2.1×10^3 cells/μL）であった。また、媒体群においてチャレンジ 24 時間後の BALF 中好酸球数及び総細胞数の増加は同程度であったことから、チャレンジによって肺内に浸潤した主な細胞種は好酸球であることが示された。

媒体群の血中好酸球数は試験期間中に増加（0.20×10^3 cells/μL から 0.54×10^3 cells/μL）したが、メポリズマブ群では投与後にベースライン値と比べて約 50%まで減少（0.21×10^3 cells/μL から 0.11×10^3 cells/μL）した（図 2.6.2-9）。このようなメポリズマブによる血中好酸球数減少作用は投与 48 時間後までに発現し、6 週間後においても持続していた。他の血液学的パラメータに影響はみられなかった。

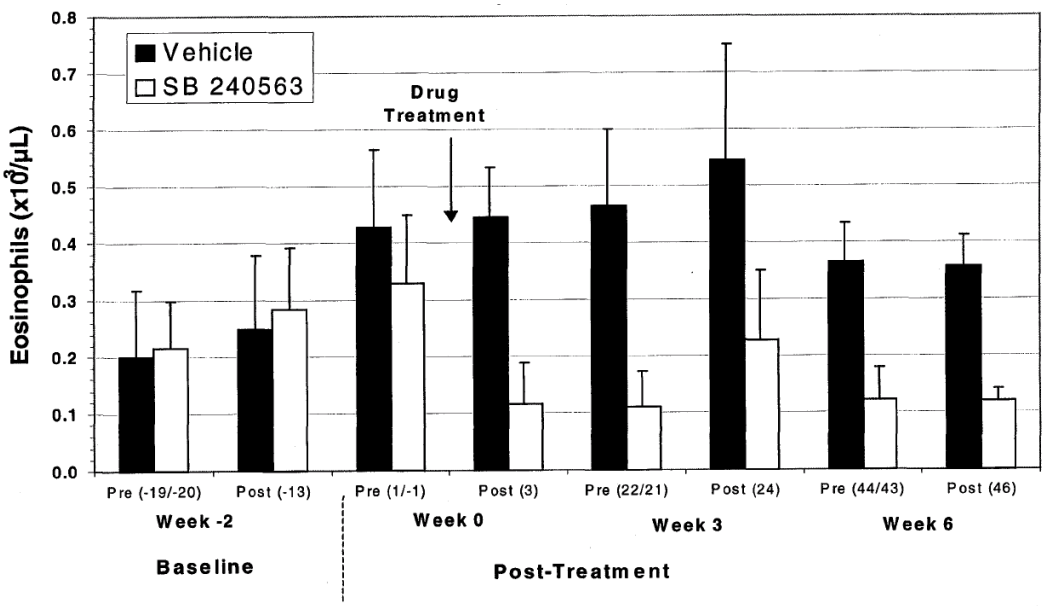
メポリズマブはいずれの時点においても、チャレンジ直後の急性気管支収縮反応（R_L の増加及び C_{DYN} の減少）に対して作用を示さなかった。



平均値+標準誤差 (n=4)

図 2.6.2-8　　カニクイザルの抗原誘発喘息モデルの BALF 中好酸球数に対する作用

Data source: SB-240563/RSD-1013L8/1 の Figure 3



平均値+標準誤差 (n=4)

図 2.6.2-9　　カニクイザルの抗原誘発喘息モデルの血中好酸球数に対する作用

Data source: SB-240563/RSD-1013L8/1 の Figure 4

2.6.2.2.3.2.2.　　抗 IL-4 抗体との併用投与による抗原誘発喘息モデルに対する作用

IL-4 は Th2 細胞で産生されるサイトカインであり、B 細胞に作用して IgE を産生させることから、抗 IL-4 抗体は抗原誘発アレルギー反応を抑制する可能性が考えられる[Hart, 2002]。そこで、カニクイザルの抗原誘発喘息モデルを用いて、メポリズマブ及び SB-240683（ヒト化抗 IL-4 抗体）の単独又は併用投与による作用を検討した（CD2005/00631/00）。

方法

アスカリス抗原の吸入により十分な気管支収縮反応が誘発されることが確認されているカニクイザル 12 匹（雄 9 匹、雌 3 匹）を選択し、3 群（1 群雄 3 匹、雌 1 匹）に配した。試験 1 日に媒体（生理食塩液）、SB-240683 の 10 mg/kg 単独又はメポリズマブの 10 mg/kg との併用で単回静脈内投与した。試験 2 日にアスカリス抗原の吸入によりチャレンジし、肺機能値（R_L 及び C_{DYN}）を測定した。試験 1 及び 3 日（チャレンジの 24 時間後）に BALF 及び血液を採取し、BALF 中の細胞種の形態学的同定、BALF 中のサイトカイン濃度の測定及び血液学的検査を実施した。主要評価項目として肺機能及び BALF 中好酸球数を、副次的評価項目として血液学的パラメータ及びサイトカイン濃度をそれぞれ評価した。また、投与 3 週間後に再度チャレンジし、同様の評価を行った。

結果

媒体群では、チャレンジにより R_L の増加及び C_{DYN} の減少を伴う重篤な気管支収縮反応が認められ、チャレンジの 24 時間後までに BALF 中及び血中好酸球数の増加がみられた。SB-240683 単独群では、すべての動物でチャレンジ直後の肺機能（R_L 及び C_{DYN}）に対する影響はみられず、BALF 中好酸球数及び血液学的パラメータにも有意な変化はみられなかったが、BALF 中 RANTES（regulated on activation, normal T cell expressed and secreted、好酸球の動員に関与するサイトカイン）濃度は軽度上昇した。メポリズマブ及び SB-240683 併用群では、チャレンジ直後の肺機能に対する影響はみられなかったが、投与 48 時間後から 3 週間後まで血中好酸球数は顕著に減少し、投与 3 週間後に BALF 中好酸球数の増加に対する顕著な抑制が認められた。また、BALF 中 RANTES 濃度の低下、及び BALF 中 IL-6 濃度の低下傾向がみられた。

2.6.2.2.3.2.3.　サルの抗原誘発喘息モデルに対する作用のまとめ

アスカリス抗原に対して気管支収縮反応を示すサルにメポリズマブの 10 mg/kg を単回静脈内投与すると、投与 24 時間後、並びに 3 及び 6 週間後のアスカリス抗原チャレンジによる BALF 中好酸球数の増加を顕著に抑制した。投与 24 時間後に行ったチャレンジの 24 時間後に測定した BALF 中好酸球数は、メポリズマブ群で媒体群と比較して約 60%低値であった。投与 3 及び 6 週間後に行ったチャレンジによる BALF 中好酸球数の増加は、メポリズマブ群ではそれぞれ 2 及び 4 倍であったのに対して、媒体群ではいずれも 5 倍であった。媒体群において、チャレンジ 24 時間後の BALF 中好酸球数及び総細胞数の増加は同程度であったことから、チャレンジによって肺内に浸潤した主な細胞種は好酸球であることが示された。また、ベースライン値と比べて媒体群では試験期間中に血中好酸球数の増加がみられたが、メポリズマブ群では約 50%まで減少した。このメポリズマブによる血中好酸球数減少作用は投与 48 時間後までに発現し、6 週間後まで持続した。一方で、チャレンジ直後の急性気管支収縮反応（R_L の増加及び C_{DYN} の減少）に対しては、メポリズマブはいずれの時点においても抑制作用を示さなかった。

サルにメポリズマブの 10 mg/kg を抗 IL-4 抗体である SB-240683 との併用で単回静脈内投与したときに、投与 24 時間後のチャレンジによる気管支収縮反応（R_L の増加及び C_{DYN} の減少）に対する作用は認められなかったが、血中好酸球数は投与 48 時間後から 3 週間後ま

で顕著に減少し、BALF 中好酸球数の増加も投与 3 週間後に顕著に抑制された。また、BALF 中 RANTES 濃度の低下、及び BALF 中 IL-6 濃度の低下傾向がみられた。これらの併用投与の成績はメポリズマブ単独投与の成績と同程度であった。

2.6.2.2.4.　関連抗体の薬理作用

メポリズマブの開発初期段階において薬理試験に使用可能な動物種を選択するため、関連抗体であるクローン 2B6 及び SB-264091（マウス IL-5 に交差反応を示す相同抗体のラット抗ヒト IL-5 モノクローナル抗体）を用いて薬理作用の検討を in vitro 及び in vivo で実施した。

2.6.2.2.4.1.　クローン 2B6 の in vitro での作用

メポリズマブの親抗体であるクローン 2B6 はマウス抗ヒト IL-5 モノクローナル抗体であり、以下に示す方法で作製した（SB-240563/RSD-100LD3/1）。ショウジョウバエ細胞に発現させた遺伝子組換えヒト IL-5 を精製し、アジュバントで乳化させて CAF1 マウスに 4 ヵ月間で 3 回皮下免疫した。免疫したマウスから採取した脾臓細胞をミエローマ細胞株 SP2/0/Ag14 と細胞融合させてハイブリドーマ 2B6 を得た後、サブクローニングを繰り返してクローン 2B6 を産生する安定細胞株を樹立した。

クローン 2B6 の IL-5 に対する作用を in vitro で検討した（SB-240563/RSD-100LD3/1）。その結果、クローン 2B6 は種々の細胞（COS 細胞、CHO 細胞、昆虫細胞及び大腸菌）に発現させた遺伝子組換えヒト IL-5 及びヒト T 細胞株で産生された天然ヒト IL-5 を認識し、それらの生物活性を抑制した。また、クローン 2B6 は IL-5 等のサイトカイン産生を誘発する phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）/イオノマイシン[Löhning, 1998]で刺激したカニクイザル腸管膜リンパ節細胞の培養上清による B13 細胞増殖に対して抑制作用を示した。

したがって、クローン 2B6 はヒト IL-5 の生物活性を抑制し、カニクイザル IL-5 による B13 細胞の増殖を中和する可能性があると考えられた。

2.6.2.2.4.2.　モルモットの抗原誘発アレルギーモデルに対するクローン 2B6 の作用

モルモットで抗ヒト IL-5 抗体の薬理作用の評価が可能であるかを検討するため、クローン 2B6 を用い、抗原チャレンジによるモルモットの気管支収縮及び気道の好酸球増加に対する作用を検討した（CH2005/00956/00）。

方法

雄 Hartley モルモット（8 匹／群）にニワトリオボアルブミン（OA）抗原（50 mg/mL）を試験 1 及び 4 日に筋肉内投与して感作した。試験 21 日以降に媒体（リン酸緩衝生理食塩液）、クローン 2B6（0.3 mg/kg）又はマウス IgG1 コントロール（0.3 mg/kg）を腹腔内投与し、その約 100 分後にクロルフェニラミン（0.1 mg/kg）を皮下投与して動物を覚醒下でダブルフロー・プレチスモグラフチャンバーに移した。更に、20 分後にエアゾール化した OA 抗原（1%）を 250 mL/min の流速で 10 秒間噴霧（チャレンジ）した。抗原チャレンジによって誘発される急性の気管支収縮を評価するため、全身プレチスモグラフ法により気道コンダクタンス（sGaw）をチャレンジから 10 分間測定した。また、チャレンジ後に肺内で起こ

る好酸球浸潤が最大に達することが示されている 24 時間後に、動物を安楽死させて肺を摘出し、BALF 中好酸球数を測定した。

結果

クローン 2B6 は、覚醒モルモットへの抗原チャレンジによる気道コンダクタンスの低下を変化させず、急性の気管支収縮に対して抑制作用を示さなかった。また、クローン 2B6 はチャレンジ 24 時間後の BALF 中好酸球数の増加を軽度に抑制したが、抑制の程度はマウス IgG1 コントロールと同程度であった。

2.6.2.2.4.3.　マウスへの相同抗体の反復静脈内投与による作用

抗ヒト IL-5 抗体のマウスでの薬物動態、薬理作用及び免疫原性を評価する試験において、マウス IL-5 に交差反応を示す相同抗体のラット抗ヒト IL-5 モノクローナル抗体（SB-264091）の反復静脈内投与による薬理作用を検討した（SB-240563/RSD-100MZP/2）。

方法

雌 CD-1 マウス（15 匹/群、3 群）に媒体（20 mM リン酸ナトリウム及び 150 mM 塩化ナトリウム含有水溶液、pH 7.0）、SB-264091 の 5 又は 50 mg/kg（5 mL/kg）を週 1 回 3 週間（試験 1、8 及び 15 日）のレジメンで静脈内投与し、試験 8、15 及び 29 日に血液学的検査を実施した。

結果

SB-264091 の 5 及び 50 mg/kg 群における試験 8、15 及び 29 日の好酸球数は平均 0.03～0.08×10^9cells/L であり、媒体群（0.14～0.36×10^9cells/L）と比べて低値であった。いずれの投与群でも、総白血球数及び赤血球数に変化は認められなかった。

2.6.2.3.　副次的薬理試験

メポリズマブはモノクローナル抗体であり、ヒト組織交差反応性試験（2.6.6.8.5.）及び in vitro 薬理試験で示されているように IL-5 に対して高度な特異的結合を示し、それ以外の薬理学的に意義のある標的分子に結合する可能性はほとんどないと考えられることから、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

メポリズマブの安全性薬理作用を、薬理活性を示すサルにおいて評価した。

メポリズマブの中枢神経系に及ぼす影響を、サルの 2 ヵ月間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.）及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.）において評価した結果、メポリズマブの最高 100 mg/kg までを 1 ヵ月間隔で静脈内投与しても、試験期間中の一般状態観察で中枢及び末梢神経系に関連する所見はみられなかった（2.6.6.3.）。

サルの安全性薬理試験において、雄カニクイザル（3 匹）の大腿動脈に血圧・心拍数測定用のカテーテルを装着した後、各動物に 1 週間間隔で媒体（20 mM リン酸ナトリウム、6.2%スクロース及び 0.02%ポリソルベート 80 含有水溶液、pH 7.0）を 2 回、メポリズマブの 10 及び 100 mg/kg を低用量から順に静脈内投与した。各投与の 3 時間後まで一般状態、体重、直腸温、動脈圧（収縮期血圧、拡張期血圧及び平均血圧）、心拍数、呼吸数をモニタリング

し、尿排泄パラメータ（尿量、浸透圧、尿 pH 並びにナトリウム、カリウム、塩素及びクレアチニン排泄率）、血清電解質（血清ナトリウム、カリウム及び塩素）及び血清クレアチニンを測定した（SB-240563/RSD-100SHZ/1）。観察期間中に一般状態、体重、動脈圧及び心拍数に投与による影響はみられなかった。モニタリング中の平均直腸温は 37～39℃の範囲、平均呼吸数は 25～30 回/min であり、メポリズマブの投与による影響はみられなかった。また、尿排泄パラメータ、血清電解質及び血清クレアチニン濃度にメポリズマブの投与による影響はみられなかった。

サルの 2 ヵ月間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.）において、試験 1 日にメポリズマブの 0.05～50 mg/kg を静脈内投与し、試験 26 日に心電図検査を実施した。また、6 ヵ月間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.）において、メポリズマブの 10 又は 100 mg/kg を 4 週間に 1 回（試験 1、29、59、85、114、141 及び 169 日）静脈内投与し、試験 164 日に心電図検査を実施した。両試験において、いずれの投与群においても心電図に影響はみられなかった（2.6.6.3.）。

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ていない。

2.6.2.6.　考察及び結論

2.6.2.6.1.　効力を裏付ける試験

In vitro 試験

メポリズマブのヒト IL-5 に対する結合特性を検討した。メポリズマブはヒト IL-5 に対して高親和性（Kd：100～258 pM）かつ特異的に結合し、受容体結合試験においてヒト IL-5 の IL-5Rα 鎖結合を阻害した（IC50：940 pM）。また、等温滴定カロリメトリーによる解析から、メポリズマブはヒト IL-5（ホモ二量体）と 1：1 の分子比で高親和性に結合することが示された。更に、メポリズマブ Fab:IL-5 複合体の結晶構造解析により、複合体 1 分子は 2 つのメポリズマブ Fab 及び 1 つのヒト IL-5（ホモ二量体）で構成され、二量体を形成するそれぞれのヒト IL-5 の対称となる領域にメポリズマブ Fab が 1 つずつ結合していることが示された。等モルのメポリズマブ及びヒト IL-5（ホモ二量体）を混合したときの超遠心分析においても同様の結果が得られており、メポリズマブ及びヒト IL-5（ホモ二量体）は 2：2 の化学量論比で複合体を形成し、それ以上の凝集はみられなかったことから、メポリズマブ 2 分子にヒト IL-5（ホモ二量体）2 分子が結合することが示されている[Cook, 1998]。メポリズマブ Fab:IL-5 複合体の結晶構造解析の結果、メポリズマブ Fab の 6 つの相補性決定領域（H1～3、L1～3）のうち L2 以外の H1～3、L1 及び L3 が IL-5 と近接していたことから、メポリズマブ Fab は分子内の 5 つの相補性決定領域で広範囲にわたって IL-5 分子と相互作用することが示された。また、メポリズマブ Fab は H2 において IL-5 の IL-5Rβ 鎖結合に必要なアミノ酸である Glu13[Graber, 1995]と直接的に相互作用することが示されたが、いずれの相補性決定領域においても IL-5 の IL-5Rα 鎖結合に関連する $E^{89}R^{90}R^{91}R^{92}$ 部位[Graber, 1995]とは相互作用を示さなかった。この点に関し、これらは 2 つのフラグメントに切断された Fab 領域（分子量：約 50 kDa）を用いて作製したメポリズマブ Fab:IL-5 複合体から得られた結果であり、実際にはメポリズマブの全長はより高分子（分子量：約 149 kDa）であるため、IL-

5（一量体の分子量：約 13 kDa）ホモ二量体の対称領域にそれぞれ別のメポリズマブ分子の Fab 領域が同時に結合する可能性は低いと考えられる。したがって、メポリズマブは IL-5 の IL-5Rβ 鎖結合に必要なアミノ酸である Glu13 と相互作用する可能性は否定できないものの、むしろ IL-5 に結合することによる立体障害によって IL-5 の IL-5Rα 鎖に対する結合を阻害すると考えられる。

ヒト IL-5 刺激によって増殖を示す細胞株を用い、メポリズマブのヒト IL-5 の生物活性に対する作用を検討した。メポリズマブはヒト IL-5 による TF-1.28 細胞（ヒト赤白血病細胞株）及び B13 細胞（マウスプレ B 細胞株）の増殖を濃度依存的に抑制し、その IC50 はそれぞれ 150 pM 未満及び 31 pM であった。

以上の成績から、メポリズマブはヒト IL-5 を特異的に認識し、IL-5 ホモ二量体と高親和性に結合することによって IL-5 の IL-5Rα 鎖に対する結合を阻害し、IL-5 の生物活性を抑制すると考えられる。

交差反応性

生物学的製剤であるメポリズマブの薬理及び毒性試験に用いる適切な動物種を選択するため、種間の交差反応性を評価した。開発初期の試験において、メポリズマブの親抗体であるクローン 2B6 はヒト IL-5 の生物活性を抑制し、IL-5 等のサイトカイン産生を誘導する PMA/イオノマイシン[Löhning, 1998]で刺激したカニクイザル腸管膜リンパ節細胞の培養上清による B13 細胞の増殖に対して抑制作用を示した（SB-240563/RSD-100LD3/1）。したがって、クローン 2B6 はカニクイザル IL-5 による B13 細胞の増殖を中和する可能性があり、クローン 2B6 のヒト化抗体であるメポリズマブにおいてもカニクイザル IL-5 と交差反応を示す可能性があると考えられた。そこで、メポリズマブのカニクイザル IL-5 に対する交差反応性を検討するため、カニクイザル IL-5 のアミノ酸配列を決定した。その結果、ヒト及びカニクイザル IL-5 の 115 アミノ酸残基のうち、相異は 27 及び 40 番目の 2 ヵ所（それぞれヒトでは Ala 及び Asn、並びにカニクイザルでは Gly 及び His）のみであり、両種は非常に高い相同性（98%）を示した。アカゲザル IL-5 のアミノ酸配列は、カニクイザルとは別の 2 ヵ所の 7 及び 80 番目のアミノ酸残基（それぞれヒトでは Thr 及び Asp、並びにカニクイザルでは Ala 及び Gly）がヒト IL-5 と異なっていたが[Sylvin, 2000]、IL-5 の機能発現に重要なアミノ酸残基（IL-5Rβ 鎖結合に必要な Glu13、並びに IL-5Rα 鎖結合に必要な His38、Lys39、His41、Glu110 及び Trp111 [Tavernier, 1995; Graber, 1995; Morton, 1995]）はヒト、アカゲザル及びカニクイザルの IL-5 間で保存されていた。また、メポリズマブはヒト又はカニクイザル IL-5 による TF-1.28 及び B13 細胞の増殖、並びにヒト及びカニクイザル骨髄単核細胞の好酸球分化を濃度依存的に抑制し、その IC50 に大きな違いはみられなかった。したがって、メポリズマブはカニクイザル IL-5 と交差反応を示し、カニクイザルにおいて薬理活性を示すと考えられた。一方、メポリズマブはマウス IL-5 による TF-1.28 及び B13 細胞の増殖に対しては 10 nM の高濃度においても阻害作用を示さなかったことから、マウス IL-5 と交差反応を示さないと考えられた。また、ウサギへの 125 及び 250 mg/kg の単回静脈内投与によって、それぞれ血中好酸球数及びヒト IL-2 投与による血中好酸球数の増加に対して影響を及ぼさなかったことから、ウサギ IL-5 とも交差反応を示さず、ウサギにおいて薬理作用を示さないと考えられた。更に、IL-5 等のサイトカイン産生を誘導するフィトヘマグルチニン、

コンカナバリン A 又はイオノマイシン/PMA[Löhning, 1998; Taguchi, 1990]で刺激したラット及びイヌの脾臓細胞の灌流液による B13 及び TF-1.28 細胞の増殖に対して、メポリズマブは作用を示さなかった（CH2005/00951/00）ことから、ラット及びイヌ IL-5 とも交差反応を示さないものと考えられた。これらの結果から、メポリズマブは種々の動物種の中でサルの IL-5 に対してのみ交差反応を示すことが推察される。

In vivo 試験

いくつかの薬物動態試験及び毒性試験において、正常カニクイザルにメポリズマブを皮下又は静脈内投与し、in vivo での薬理作用を検討した。メポリズマブはサルへの 1 mg/kg の皮下投与により投与 1 週間後から血中好酸球数を減少させ、最大作用は投与 3 週間後に認められた。このときの t1/2 及び Tmax はそれぞれ 14.5 及び 3.5 日であったことから、メポリズマブの血中好酸球数減少作用は血漿中濃度の上昇よりも遅れて発現することが示された。そこで、間接反応モデル[Dayneka, 1993]に血漿中メポリズマブ濃度を当てはめて血中好酸球数の予測を行った結果、血中好酸球数の予測値と実測値は類似し、血中好酸球数減少作用と血漿中メポリズマブ濃度の間に間接反応モデルによく適合した相関性が認められたことから、メポリズマブによる IL-5 生物活性の中和作用によって期待される薬力学的反応は血中好酸球数の減少であることが示された。間接反応モデルを用いて算出した血中好酸球数減少作用の IC50 は 1.43 μg/mL と推定された。また、メポリズマブの約 60 mg/kg を試験 1 及び 15 日に皮下投与したときに、投与 1 週間以降に血中好酸球数は 52～88%減少した。メポリズマブの 0.05～50 mg/kg を試験 1 及び 29 日に静脈内投与した試験では、1 回目の投与後の試験 13 及び 27 日に 5 及び 50 mg/kg 群で血中好酸球数は 73～95%減少した。この血中好酸球数減少作用は試験 77 日（2 回目のメポリズマブ投与の 7 週間後）においても持続しており、サルへの 5 mg/kg 以上の静脈内投与で血中好酸球数減少作用は 2 回目の投与後 7 週間以上持続することが示された。この試験において、メポリズマブは IL-2 刺激（遺伝子組換えヒト IL-2 を試験 30 日から計 6 回隔日皮下投与）による血中好酸球数の増加を用量依存的に抑制し、試験 41 日に 0.5 mg/kg 以上の群で 87%以上の抑制率を示した。ベースラインの血中好酸球数は骨髄の好酸球プールから血中へ放出される好酸球数を反映していると考えられるが、IL-2 刺激による血中好酸球数の増加は、IL-2 刺激によって活性化した T 細胞から放出される IL-5 が、骨髄の好酸球前駆細胞を刺激して好酸球産生を促進することによるものと考えられている[MacDonald, 1990]。0.5 mg/kg 群はベースラインの血中好酸球数に対して影響を及ぼさなかったが、IL-2 刺激による血中好酸球数の増加に対しては抑制作用を示したことから、メポリズマブは IL-2 刺激によって活性化 T 細胞から放出された IL-5 の生物活性に対して、ベースラインの骨髄の好酸球産生に影響を与える用量よりも低用量で抑制作用を示すと考えられた。更に、メポリズマブの 10 又は 100 mg/kg を 1 ヵ月間隔で 6 ヵ月間反復静脈内投与あるいは 10 mg/kg を同じレジメンで反復皮下投与した試験では、試験 29 日以降に血中好酸球数は 56～100%減少した。一方、BALF 中好酸球数、並びに骨髄中の成熟及び未成熟好酸球数はいずれのメポリズマブ群においても減少する傾向がみられたものの、骨髄中の好酸球前駆細胞の枯渇は認められなかったことから、メポリズマブは骨髄から血中へ放出された好酸球の生存及び肺への動員を抑制するが、骨髄中の好酸球分化系列細胞数に対して大きな影響を及ぼさないことが示唆された。In vitro 試験において、骨髄系造血幹細胞から成熟好酸球へ

の分化過程にはIL-5、IL-3及び顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）が関与しており、IL-5は骨髄系造血幹細胞（$CD34^+$細胞）には作用せず、好酸球前駆細胞（$CD34^-CD33^+$細胞）以降の系列細胞に作用して成熟好酸球への分化をサポートすること、並びにIL-3及びG-CSFは骨髄系造血幹細胞からの分化過程全体に作用することが示されている[Ema, 1990]。6ヵ月間反復投与試験においてメポリズマブ群で骨髄中の好酸球分化系列細胞数に対する有意な影響は認められなかったが、これはメポリズマブによって骨髄中のIL-5の生理活性は抑制されたが、一方で、メポリズマブが影響を及ぼさないIL-3及びG-CSFの作用によって好酸球の分化が促進されたためと考えられる。

サルのアスカリス抗原誘発喘息モデルに対するメポリズマブの作用を検討した結果、メポリズマブの10 mg/kgを単回静脈内投与すると、投与24時間後のアスカリス抗原チャレンジによって誘発される投与48時間後のBALF中好酸球数の増加を約60%抑制した。この作用は投与6週間後のチャレンジにおいても認められており、BALF中好酸球数の増加に対するメポリズマブの抑制作用は長期間持続することが示された。媒体群において、チャレンジ24時間後のBALF中好酸球数及び総細胞数の増加は同程度であったことから、チャレンジによって肺内に浸潤した主な細胞種は好酸球であることが示された。また、メポリズマブの投与48時間後までに血中好酸球数は約50%まで減少し、この作用は6週間後においても持続していた。一方、チャレンジ直後の即時型の気管支収縮反応（R_Lの増加及びC_{DYN}の減少）に対しては、メポリズマブはいずれの時点においても影響を及ぼさなかった。感作動物におけるチャレンジ直後の即時型喘息反応は、アレルゲンの刺激によって肥満細胞等から放出されるメディエーターの作用による気道平滑筋収縮が主な原因であり、その後の遅発型喘息反応には気道平滑筋収縮の他、好酸球等の炎症細胞浸潤による気道炎症、及び気道粘膜の浮腫が関与していると考えられている[森田, 1996]。したがって、メポリズマブは抗原誘発性の即時型喘息反応に対しては抑制作用を示さないと考えられるが、遅発性に起こる気道への好酸球動員を長期間にわたって抑制することから、気道での好酸球浸潤に起因する気道炎症、平滑筋収縮、粘膜浮腫を抑制する可能性が考えられる。メポリズマブ及び抗IL-4抗体であるSB-240683の併用試験において、SB-240683（10 mg/kg）の単独投与ではチャレンジによる気管支収縮反応（R_Lの増加及びC_{DYN}の減少）、BALF中及び血中好酸球数の増加に対して作用を示さなかったことから、抗IL-4抗体は能動感作後の投与では抗原誘発アレルギー反応に対して抑制作用を示さないと考えられる。メポリズマブ（10 mg/kg）とSB-240683の併用投与でも、投与24時間後のチャレンジによる気管支収縮反応に対して作用を示さなかったが、投与48時間後から3週間後まで血中好酸球数を顕著に減少させ、投与3週間後にBALF中好酸球数の増加を顕著に抑制した。これらの併用投与の成績はメポリズマブ単独投与の試験成績と一致しており、サルのアスカリス抗原誘発喘息モデルにおいてメポリズマブ及び抗IL-4抗体の併用効果は認められなかった。

2.6.2.6.2.　安全性薬理試験

メポリズマブはサルへの最高 100 mg/kg までの静脈内投与により、中枢神経系、心血管系、呼吸系、腎機能及び直腸温に急性的な影響を及ぼさなかった。また、サルの最長6ヵ月間の反復投与毒性試験において、最高100 mg/kgまでの用量を1ヵ月間隔で静脈内投与しても、

試験期間中の一般状態及び投与約 4 週間後の心電図に影響を及ぼさなかった。サルに 100 mg/kg を静脈内投与したときの Cmax は 1870 μg/mL であり（SB-240563/RSD-100X0L/2）、日本人気管支喘息患者にメポリズマブの予定臨床用量である 100 mg を皮下投与したときの定常状態における推定 Cmax は約 20 μg/mL であった（MEA115588 試験）ことから、メポリズマブは臨床用量の約 90 倍の用量を投与しても中枢神経系、心血管系及び呼吸系に急性的な影響を及ぼさないことが示された。また、サルの 6 ヵ月間反復投与毒性試験でメポリズマブの 100 mg/kg を静脈内投与した群において、心電図検査（試験 164 日）の数日後（試験 168 日）の血漿中メポリズマブ濃度は 637 μg/mL であった（SB-240563/RSD-100X0L/2）ことから、メポリズマブは臨床用量の約 30 倍の用量を投与しても心電図に影響を及ぼさないことが示された。この結果を裏付けるように、メポリズマブの臨床試験において心電図及び心電図パラメータ（QT 及び QTc 間隔）に対するメポリズマブの影響を示唆する所見はみられなかった（2.7.4.4.2.）。

メポリズマブのヒトでの組織交差反応性を検討した免疫組織化学的検査において、交差反応性はリンパ系組織に限定されており心筋組織には認められなかった（2.6.6.8.5.）こと、及びメポリズマブは分子量約 149 kDa の高分子蛋白質であり細胞膜を通過してイオンチャネルの分子内ポアに接近できる可能性は低く、心筋の種々のイオンチャネル、特に hERG チャネルと相互作用する可能性は低いと考えられる[Vargas, 2008]ことから、in vitro での心臓の電気生理学的試験は実施しなかった。

2.6.2.6.3.　結論

メポリズマブはヒト IL-5 に対する特異的なヒト化モノクローナル抗体であり、in vitro においてヒト IL-5 の受容体結合を強力に阻害することによって IL-5 の生物活性を抑制し、in vivo において BALF 中及び血中好酸球数の増加に対して長期間持続性の抑制作用を示した。これらのことから、メポリズマブは重症喘息患者への投与により、好酸球性の気道炎症を長期間持続性に抑制し、急性増悪及び喘息症状を軽減することが期待される。

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

Antoniu SA. Monoclonal antibodies for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13:257-68.

Clutterbuck EJ, Hirst EMA, Sanderson CJ. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: Comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GMCSF. *Blood.* 1989;73:1504-12.

Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: Mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:789-815.

Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, et al. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med.* 1995;182:1169-74.

Cook R, Applebaum R, Cusimano D, et al. Biological and biophysical characteristics of SB 240563, a high affinity humanized monoclonal antibody to IL-5. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:A604.

Dayneka NL, Garg V, Jusko WJ. Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1993;21:457-78.

Ema H, Suda T, Nagayoshi K, et al. Target cells for granulocyte colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5 in differentiation pathways of neutrophils and eosinophils. *Blood.* 1990;76:1956-61.

Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, et al. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:199-204.

Garcia G, Taillé C, Laveneziana P, et al. Anti-interleukin-5 therapy in severe asthma. *Eur Respir Rev.* 2013;22:251-7.

GINA. Global strategy for asthma management and prevention. *Available at URL(2015.1): http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2014_Aug12.pdf.* 2014:.

Graber P, Proudfoot AEI, Talabot F, et al. Identification of key charged residues of human interleukin-5 in receptor binding and cellular activation. *J Biol Chem.* 1995;270:15762-9.

Hart TK, Blackburn MN, Brigham-Burke M, et al. Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma. *Clin Exp Immunol.* 2002;130:93–100.

Hart TK, Cook RM, Zia-Amirhosseini P, et al. Preclinical efficacy and safety of mepolizumab (SB-240563), a humanized monoclonal antibody to IL-5, in cynomolgus monkeys. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108:250-7.

Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:6930-5.

Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, et al. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med.* 1988;167:219-24.

MacDonald D, Gordon AA, Kajitani H, et al. Interleukin-2 treatment-associated eosinophilia is mediated by interleukin-5 production. *Br J Haematol.* 1990;76:168-73.

Morton T, Li J, Cook R, et al. Mutagenesis in the C-terminal region of human interleukin 5 reveals a central patch for receptor α chain recognition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:10879-83.

Sylvin H, Matvienko O, Leonchiks A, et al. Molecular cloning, expression, and purification of pig interleukin-5. *Immunogenetics.* 2000;51:59-64.

Taguchi T, McGhee JR, Coffman RL, et al. Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN-γ, and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. *J Immunol Methods.* 1990;128:65-73.

Tavernier J, Devos R, Cornelis S, et al. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific α chain and a β chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell.* 1991;66:1175-84.

Tavernier J, Tuypens T, Verhee A, et al. Identification of receptor-binding domains on human interleukin 5 and design of an interleukin 5-derived receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:5194-8.

Vargas HM, Bass AS, Breidenbach A, et al. Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2008;58:72-6.

Wang JM, Rambaldi A, Biondi A, et al. Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. *Eur J Immunol.* 1989;19:701-5.

Wenzel S. Severe asthma in adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:149-60.

森田 寛. 気管支喘息:診断と治療の進歩 III.病態生理 1.炎症反応. *日内会誌.* 1996;85:174-7.

2.6.3. 薬理試験概要表

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表

被験物質：メポリズマブ、クローン 2B6 及び SB-264091

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付場所
効力を裏付ける試験					
(In vitro 試験)					
受容体結合試験	遺伝子組換えヒト IL-5α 鎖発現ショウジョウバエ細胞株	in vitro	GSK	SB-240563/RSD-100LD3/1	4.2.1.1
ヒト IL-5 に対する結合特性 (表面プラズモン共鳴法)	遺伝子組換えヒト IL-5	in vitro	GSK	SB-240563/RSD-100LD3/1、SH2009/00010/00	4.2.1.1
ヒト IL-5 に対する結合特性 (等温滴定カロリメトリー)	遺伝子組換えヒト IL-5	in vitro	GSK	SB-240563/RSD-100LD3/1	4.2.1.1
ヒト IL-5 に対する結合特性 (X 線回折法)	遺伝子組換えヒト IL-5	in vitro	GSK	2014N189114_00	4.2.1.1
ヒト IL-5 による細胞増殖に対する作用	TF-1.28 及び LyH7.B13 細胞株	in vitro	GSK	SB-240563/RSD-100LD3/1	4.2.1.1
(交差反応性)					
マウス IL-5 による細胞増殖に対する作用	TF-1.28 及び LyH7.B13 細胞株	in vitro	GSK	CH2005/00951/00、SB-240563/RSD-100LD3/1	4.2.1.1
ウサギの好酸球数に対する作用	ウサギ	静脈内	GSK	SB-240563/RSD-100XMR/1	4.2.1.1
ヒト及びサル IL-5 による細胞増殖及び好酸球分化に対する作用	TF-1.28 及び LyH7.B13 細胞株並びにヒト及びカニクイザルの骨髄単核細胞	in vitro	GSK	CH2008/00044/00	4.2.1.1
(In vivo 試験)					
薬理作用及び血漿中濃度の関係	サル	皮下、静脈内	GSK	SB-240563/RSD-100LKP/2	4.2.1.1
好酸球に対する作用(局所刺激性試験)	サル	皮下	GSK	SB-240563/RSD-100ZHH/1	4.2.1.1
ヒト IL-2 刺激による好酸球増加に対する作用(2 ヵ月間反復投与毒性試験)	サル	静脈内	GSK	SB-240563/RSD-100KN9/1	4.2.1.1
好酸球に対する作用(6 ヵ月間反復投与毒性試験)	サル	皮下、静脈内	GSK	SB-240563/RSD-100X0L/2	4.2.1.1

IL：インターロイキン、TF-1.28：ヒト赤白血病細胞株 TF-1 細胞のサブクローン、LyH7.B13：マウスプレ B 細胞株、[redacted]：[redacted]

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表（つづき）

被験物質：メポリズマブ、クローン 2B6 及び SB-264091

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付場所
効力を裏付ける試験					
(In vivo 試験)つづき					
抗原誘発喘息モデルに対する作用	サル	静脈内	[redacted](米国)	SB-240563/RSD-1013L8/1	4.2.1.1
抗 IL-4 抗体との併用投与による抗原誘発喘息モデルに対する作用	サル	静脈内	[redacted](米国)	CD2005/00631/00	4.2.1.1
(関連抗体の試験)					
クローン 2B6 の IL-5 に対する作用	ヒト IL-5、各種遺伝子組換えヒト IL-5 発現細胞株及び LyH7.B13 細胞株	in vitro	GSK	SB-240563/RSD-100LD3/1	4.2.1.1
クローン 2B6 の抗原誘発アレルギーモデルに対する作用	モルモット	腹腔内	GSK	CH2005/00956/00	4.2.1.1
SB-264091 の好酸球数に対する作用	マウス	静脈内	GSK	SB-240563/RSD-100MZP/2	4.2.1.1
安全性薬理試験					
心血管系、呼吸系及び腎機能に及ぼす影響	サル	静脈内	GSK	SB-240563/RSD-100SHZ/1	4.2.1.3

IL：インターロイキン、TF-1.28：ヒト赤白血病細胞株 TF-1 細胞のサブクローン、LyH7.B13：マウスプレ B 細胞株、[redacted]：[redacted]

2.6.3.2. 効力を裏付ける試験

2.6.3.1 参照

2.6.3.3. 副次的薬理試験

実施していない

2.6.3.4. 安全性薬理試験

被験物質：メポリズマブ

試験の種類	動物種、系統及び性別	投与方法	用量及び濃度	例数及び標本数/群	結果	GLP 適用	添付場所
心血管系、呼吸系及び腎機能に及ぼす影響 (一般状態、体重、直腸温、動脈圧、心拍数、呼吸数及び腎機能パラメータ)	雄カニクイザル	静脈内	10 及び 100 mg/kg	3	影響なし	適	4.2.1.3

2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない