サノフィ株式会社

サリルマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.1 緒言

Total number of pages: 9

目　　次

略号と用語の定義 **4**

1　　諸 言 **5**

参 考 文 献 **9**

表　目　次

表 1 - 名称 5

図　目　次

図 1 -サリルマブの構造模式図 6

略号と用語の定義

CH	Constant region of the heavy chain／重鎖定常領域
CRP	C-reactive protein／C 反応性タンパク
Fc	Fragment crystallizable／結晶化可能断片
gp130	Glycoprotein 130／糖タンパク質 130
IgG	Immunoglobulin G／免疫グロブリン G
IL-1	Interleukin-1／インターロイキン 1
IL-6	Interleukin-6／インターロイキン 6
IL-6Rα	IL-6 receptor α subunit／IL-6 受容体 α サブユニット
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell／末梢血単核細胞
Q2W	Once every two weeks／2 週に 1 回
RA	Rheumatoid arthritis／関節リウマチ
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3／シグナル伝達兼転写活性化因子 3
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha／腫瘍壊死因子 α

1　諸 言

サリルマブは、VelocImmune®マウスを用いて創製されたヒトモノクローナル抗体であり、インターロイキン6受容体αサブユニット(IL-6Rα)の強力かつ選択的な阻害剤である。サリルマブがヒトIL-6Rαに結合すると、インターロイキン 6（IL-6）を介するシグナル伝達を阻害し、抗炎症作用を示す。サリルマブは 150 mg あるいは 200 mg の用量で 2 週間に 1 回の皮下投与により関節リウマチ（RA）の治療薬として開発中である。

本薬の名称を表 1 に示す。

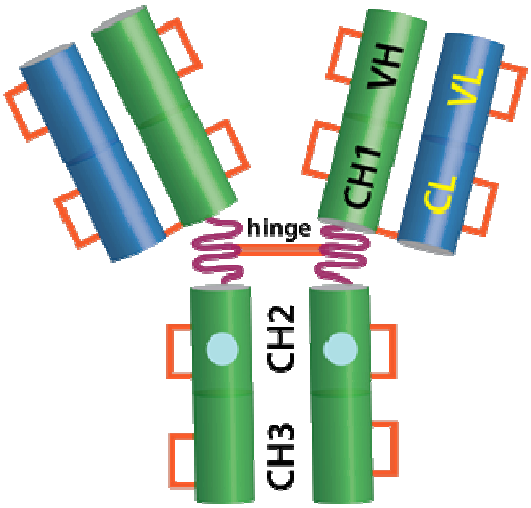
表 1 - 名称

原薬の一般名	**（日本名）**	**サリルマブ（遺伝子組換え）**
	（英名）	Sarilumab (Genetical Recombination)
開発コード		SAR153191、REGN88
本質		**サリルマブは、ヒトインターロイキン-6 受容体の α サブユニットに対する遺伝子組換えヒト IgG1 モノクローナル抗体である。サリルマブは、チャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される。サリルマブは、446 個のアミノ酸残基からなる H 鎖（γ1 鎖）2 本及び 214 個のアミノ酸残基からなる L 鎖（κ 鎖）2 本で構成される糖タンパク質（分子量：約 150,000）である。**
化学名		
• Chemical Abstract Index		Immunoglobulin G1, anti-(Human interleukin-6 receptor subunit alpha) (human REGN88 heavy chain), disulfide with human REGN88 κ light chain, dimer
• World Health Organization (WHO)		Immunoglobulin G1-kappa, anti-[Homo sapiens IL-6Rα (interleukin-6 receptor alpha)], Homo sapiens monoclonal antibody; gamma1 heavy chain (1-445) [Homo sapiens VH (IGHV3-9*01 (94.90%) -(IGHD)-IGHJ3*02 [8.8.11] (1-116) -IGHG1*01 CHS K2>del (117-445)], (219-214')-disulfide with kappa light chain (1'-214') [Homo sapiens V-KAPPA (IGKV1-12*01 (96.84%) -IGKJ2*01) [12.3.9] (1'-107') -IGKC*01 (108'-214')]; (225-225":228-228")-bisdisulfide dimer
番号		*1189541-98-7*

サリルマブは、ジスルフィド結合で連結した 2 本のヒト免疫グロブリンの重鎖を有し、さらに重鎖のそれぞれがヒト免疫グロブリンのκ軽鎖とジスルフィド結合で連結したヘテロ四量体である(図 1)。サリルマブの重鎖は、免疫グロブリン G1（IgG1）サブクラスの定常領域を有する。重鎖それぞれに 1 個の N-結合型糖鎖付加部位（Asn^{296}）を有し、これは定常領域の Fc 領域のうち領域 2（CH2）に位置

する。一次構造を元に（N-結合型糖鎖を含めない）、16 個のジスルフィド結合を含めて各重鎖 C 末端の Lys^{446} を除くと、この抗体の分子量は約 150 kDa である。1 分子中の重鎖及び軽鎖のそれぞれの可変領域が組み合わさって、標的である IL-6Rα との相補的結合部位を形成している。重鎖及び軽鎖の一次構造アミノ酸配列は M3.2.S.1.2 に示す。

図 1 -サリルマブの構造模式図



サリルマブの分子内及び分子間ジスルフィド結合部位をオレンジの線で示す。重鎖（緑）及び軽鎖（青）は分子間ジスルフィド結合で結ばれている；重鎖同士はヒンジ部位の分子間ジスルフィド結合で二量体化されている。Fc 領域の糖鎖付加部位は水色で示す。
略号：CH=重鎖定常領域、CL=軽鎖定常領域、VH=重鎖可変領域、VL=軽鎖可変領域

サリルマブは RA を含むリウマチ性疾患の治療薬として開発中である。IL-6 はリウマチ性疾患の発症機序における主要な要素である。RA に関連する炎症誘発性サイトカインには腫瘍壊死因子α（TNF-α）、インターロイキン 1（IL-1）及び IL-6 がある。IL-6 はリウマチ滑膜の大部分の細胞に発現し、RA 患者の血清及び滑液では IL-6 値の上昇が認められる。RA、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎を含む多様な炎症性疾患においては可溶性 IL-6α の上昇も観察されている(1)。可溶性 IL-6Rα は IL-6 と可溶性複合体を形成し、表面に gp130 を発現する細胞をトランスシグナリングにより活性化し、RA の主要な発生機序をなす(2)。IL-6 は炎症性サイトカインカスケードにおいて TNF-α や IL-1 より下流に位置し、そのため広範な炎症プロセスにおける最終段階の共通のシグナル伝達経路である可能性がある。

RA は、複数の関節における持続性滑膜炎と軟骨及び骨の進行性破壊を特徴とする慢性の炎症性疾患である。関連する全身性の炎症症状には、発熱、疲労、貧血、赤血球沈降速度上昇、C 反応性タン

パク（CRP）並びに血清アミロイド A（SAA）といった急性期反応物質の増加、並びにリウマチ因子などの自己抗体の発現がある(3)。

In vitro での SPR-Biacore 試験において、サリルマブはヒト及びカニクイザルの IL-6Rα に高い親和性で結合し、その K_D 値はそれぞれ 54 pmol/L 及び 123 pmol/L であったことから、非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験に用いる動物種としてサルが適切であることが裏付けられた。また、フローサイトメトリー試験において、サリルマブはヒト及びアカゲザルの末梢血単核細胞（PBMC）上の IL-6Rα に結合したが、イヌ、ヒツジ、ミニブタ、ウサギ、ハムスター、モルモット、ラット及びマウスの PBMC への結合は検出されなかった。

In vitro での SPR-Biacore 試験及び競合的 ELISA 試験において、サリルマブは IL-6 の IL-6Rα への結合を直接阻害した。In vitro セルベースアッセイにおいて、サリルマブはヒト肝細胞がん HepG2 細胞株での IL-6 依存性シグナル伝達兼転写活性化因子 3（STAT3）活性化、及び gp130 過剰発現／IL-6Rα 非発現の遺伝子組換え HEK-293 細胞株でのトランスシグナリング（IL-6 と可溶性 IL-6Rα の結合により誘導される）を阻害した。抗体依存性細胞傷害及び補体依存性細胞傷害作用の in vitro セルベースアッセイにおいて、サリルマブに関連した Fc エフェクター機能活性は検出されなかった。これらの in vitro データから、サリルマブの in vivo 作用の基礎となる主な作用機序は、IL-6/IL-6Rα 相互作用の直接阻害であることが裏付けられた。

ヒト IL-6 及びヒト IL-6Rα の細胞外ドメインをそれに相当するマウスの遺伝子産物の代わりに発現するダブルヒト化（$Il6^{hu/hu}$ $Il6ra^{hu/hu}$）マウスを用いて、サリルマブの病態モデル試験を実施した。野生型マウスの病態モデル試験には、マウス相同抗体の REGN844 を使用した。サリルマブ及び REGN844 は、それぞれ $Il6^{hu/hu}$ $Il6ra^{hu/hu}$ マウス及び野生型マウスにおいて、テレビン油投与により誘発された急性期炎症反応の主要なバイオマーカーである SAA の増加を抑制した。サリルマブ又は REGN844 を投与したマウスにおいて、循環血中 IL-6 濃度（それぞれヒト又はマウスの IL-6）が上昇する傾向がみられたが、これは予想される薬理作用であり、ヒト及びサルで抗 IL-6Rα 処置後に観察されているとの報告と一致する(4)(5)(6)。このサリルマブ存在下でみられた血清中 IL-6 濃度の上昇は、サリルマブにより IL-6Rα が阻害された結果、IL-6 クリアランスが低下したことによるものと考えられる。また、REGN844 は野生型マウスのコラーゲン誘発関節炎モデルで関節炎の発現率、重症度及び骨侵食を抑制した。サリルマブ及び相同抗体 REGN844 を用いた上記 in vitro 及び in vivo 薬理試験から、REGN844 はサリルマブと同様の薬理学的特性を示し、マウス毒性試験で REGN844 を使用することは妥当であることが確認された。

サルにおいては、サリルマブは標的分子を介した消失によって特徴づけられる、非線形の標的分子を介した薬物動態を示した。サリルマブ濃度が標的分子との結合が飽和する濃度より高いとき、サリルマブの消失半減期は 9.42～9.71 日であった。サルに皮下投与したときのバイオアベイラビリティは遊離型及び総サリルマブで 68.9～86.7%であった。毒性試験においてサリルマブを週 1 回反復投与したとき、投与期間及び回復期間中ほとんどすべてのサルにおいて持続的に総サリルマブの曝露を受け

ていることが観察された。10 mg/kg/週以下の用量では総サリルマブの持続的な曝露がみられなかったが、これは抗薬物抗体の発現あるいは標的分子を介したクリアランスに起因していると考えられた。全体として、5〜100 mg/kg/週の用量では、総サリルマブ曝露量の用量に比例した増加がみられた。サルに反復投与することによる総サリルマブの濃度上昇が認められ、性差はみられなかった。

サリルマブの安全性は、サルを用いた GLP 適用毒性試験並びにマウスを用いた相同抗体 REGN844 の試験において評価した。サリルマブを 6 ヵ月まで反復静脈内投与、又は 3 ヵ月まで反復皮下投与したとき、毒性学的に意義のある影響はみられなかった。サリルマブ関連の主要な変化は、既知の薬理作用機序である IL-6 シグナル伝達阻害に一致するものであり、以下の所見が認められた：一過性かつ多くは軽微〜中等度であり可逆的又は一部可逆的な、好中球絶対数の減少、並びに血清フィブリノゲン濃度又は CRP 濃度の低下；可逆性の循環血中 IL-6 濃度上昇；並びに血清免疫グロブリン濃度（IgA、IgG、IgE、IgM）及び末梢血中リンパ球と単球の変化を伴わない、抗体感作に対する一次及び二次 IgG 反応の軽度低下。サルにおけるサリルマブ及びマウスにおける REGN844 の生殖発生毒性試験において、生殖系に対する影響は認められなかった。

RA の現在の治療法には、非ステロイド性抗炎症薬、副腎皮質ステロイド、生物学的製剤を含む疾患修飾性抗リウマチ薬が用いられている。しかし、これら薬物療法のオプションがあるにもかかわらず、この疾患を普遍的又は完全にコントロールできる治療法はなく、患者ごとに治療の調整あるいは変更をしなければならないのが実態である。サリルマブは、IL-6Rα に対するヒトモノクローナル抗体であり、IL-6 シグナル伝達を強力に阻害することが in vitro 及び in vivo で示されている。本モジュールに示すように、サリルマブのプロファイルは一連の非臨床薬理試験、薬物動態試験、及び毒性試験により広範に評価及び検討されている。本モジュールに示す非臨床開発パッケージは、サリルマブが良好な効果と安全性プロファイルを有し、RA 患者における 200 mg までの用量の 2 週に 1 回の慢性投与に関する臨床評価と製造販売承認申請が支持されることを示している。

参 考 文 献

1. Lipsky PE. Interleukin-6 and rheumatic diseases. Arthritis Res Ther. 2006;8 (Suppl 2):S4;1-5.
2. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. J Leukoc Biol. 2006;80:227-36.
3. Kishimoto T. Interleukin-6 (IL-6), In The Cytokine Handbook (Forth Edition), Thomson AW and Lotze MT, ed. (London: Academic Press). 2003;281-304.
4. Galeotti C, Boucheron A, Guillaume S, Kone-Paut I. Sustained remission of multicentric Castleman Disease in children treated with tocilizumab, an anti-interleukin-6 receptor antibody. Mol Cancer Ther. 2012;11:1623-6.
5. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. Blood. 2008;112:3959-64.
6. Uchiyama Y, Yoshida H, Koike N, Hayakawa N, Sugita A, Nishimura T, et al. Anti-IL-6 receptor antibody increases blood IL-6 level via the blockade of IL-6 clearance, but not via the induction of IL-6 production. Int Immunopharmacol. 2008;8:1595-601.

サノフィ株式会社

サリルマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 49

目　　次

略号と用語の定義 6

1　まとめ 8

2　効力を裏付ける試験 12

2.1　サリルマブの in vitro 薬理試験 12
2.1.1　IL-6Rα に対するサリルマブの平衡解離定数 12
2.1.2　初代培養末梢血単核細胞の細胞表面 IL-6Rα に対するサリルマブの結合 12
2.1.3　サリルマブの Fc エフェクター機能活性の有無 14
2.1.4　サリルマブによるヒト IL-6 とヒト IL-6Rα の結合阻害 19
2.1.4.1　固定化ヒト IL-6 に対するヒト IL-6Rα の結合阻害（ELISA 試験） 19
2.1.4.2　表面捕捉ヒト IL-6Rα に対するヒト IL-6 の結合阻害（SPR-Biacore 試験） 20
2.1.5　IL-6Rα 及び gp130 活性化を介した IL-6 シグナル伝達阻害及び細胞増殖抑制 20
2.1.6　sIL-6Rα 介在性 IL-6 トランスシグナリング阻害 22

2.2　サリルマブの in vivo 薬理試験 23
2.2.1　マウス急性炎症モデルにおけるサリルマブの作用 23

2.3　REGN844 の in vitro 薬理試験 25
2.3.1　抗マウス IL-6Rα 相同抗体（REGN844）の作製 25
2.3.2　REGN844 とマウス IL-6Rα の相互作用に関する平衡解離定数 25
2.3.3　REGN844 による固定化ヒト IL-6 に対するマウス IL-6Rα 二量体の結合阻害 26
2.3.4　REGN844 による IL-6 介在性マウス B 細胞増殖の抑制 27

2.4　REGN844 の in vivo 薬理試験 28
2.4.1　REGN844 によるマウスにおけるテレビン油誘発急性炎症の抑制 28

2.4.2 REGN844 による DBA/1J マウス CIA における関節の炎症及び骨侵食の軽減 31

3 副次的薬理試験 35

3.1 In vitro 試験 35

3.1.1 腫瘍細胞における STAT3 の構成的及び外因性 IL-6 誘発リン酸化の抑制 35

3.2 In vivo 試験 37

3.2.1 免疫不全マウスにおけるヒト異種移植腫瘍の増殖抑制 37

3.2.2 免疫不全マウスにおける DU145 ヒト異種移植腫瘍のアポトーシス誘導 38

3.2.3 免疫不全マウスの DU145 異種移植腫瘍における STAT3 リン酸化抑制 39

4 安全性薬理試験 41

4.1 中枢神経系 41

4.2 心血管系 41

4.3 呼吸系 41

5 薬力学的薬物相互作用試験 42

6 考察及び結論 43

7 図表 46

参 考 文 献 47

表　目　次

表 1 - 表面捕捉サリルマブと遺伝子組換え IL-6Rα 単量体タンパク質の 25°C、pH 7.4 での相互作用に関する結合パラメータの要約 12

表 2 - REGN844 のマウス IL-6Rα（マウス IL-6Rα-mmH）単量体との 25°C、pH 7.4 での 相互作用に関する結合パラメータの要約 26

表 3 - 関節の炎症スコア 31

表 4 - 骨侵食スコア 31

図　目　次

図 1 - IL-6 による IL-6Rα/gp130 シグナル伝達経路活性化 9

図 2 - ヒト及び非ヒト動物種由来初代 PBMC 上の IL-6Rα に対するビオチン化キメラサリルマブの結合 . 13

図 3 - サリルマブは KG-1、XG-1 又は HepG2 細胞において ADCC を誘発しない 15

図 4 - サリルマブは HepG2、KG-1 又は XG-1 細胞において CDC を誘発しない 17

図 5 - サリルマブによるマイクロタイタープレート上固定ヒト IL-6 への ヒト IL-6Rα-hFc の結合阻害..... 19

図 6 - サリルマブによる HepG2 レポーター細胞アッセイにおける IL-6 介在性シグナル伝達の阻害..... 21

図 7 - サリルマブによる IL-6 刺激 DS-1 細胞増殖の抑制 21

図 8 - サリルマブによる遺伝子組換え HEK293 細胞における IL-6 / sIL-6Rα 介在性トランスシグナリングの阻害 23

図 9 - サリルマブによる *Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスにおけるテレビン油誘発 SAA 上昇の抑制、 及び循環血中ヒト IL-6 の上昇 24

図 10 - REGN844 によるヒト IL-6 へのマウス IL-6Rα-hFc の結合阻害 27

図 11 - REGN844 による IL-6 介在性 B9 細胞増殖の抑制 28

図 12 - テレビン油投与 C57BL/6 及び CD-1 マウスにおける血清中 SAA 濃度上昇の REGN844 による抑制30

図 13 -テレビン油投与 C57BL/6 及び CD1 マウスにおける循環血清中マウス IL-6 濃度の REGN844 による上昇 30

図 14 - REGN844 によるマウスコラーゲン誘発関節炎の発症抑制 32

図 15 - REGN844 によるマウスコラーゲン誘発関節炎モデルの炎症抑制 33

図 16 - REGN844 による骨侵食の重症度低下 33

図 17 - サリルマブによる培養腫瘍細胞における STAT3 の構成的及び 外因性 IL-6 誘発リン酸化の抑制 .. 36

図 18 - サリルマブによる免疫不全マウスにおける DU145、NCI-H1650、A549 及び Calu3 ヒト異種移植腫瘍の増殖抑制 37

図 19 - サリルマブ投与 DU145 異種移植腫瘍における開裂カスパーゼ 3 の免疫組織化学分析 39

図 20 - サリルマブによる DU145 異種移植腫瘍の STAT3 リン酸化抑制 40

略号と用語の定義

ADAM17	A disintegrin and metalloproteinase domain 17／ディスインテグリン・メタロプロテアーゼドメイン 17
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity／抗体依存性細胞傷害
CDC	Complement-dependent cytotoxicity／補体依存性細胞傷害
CIA	Collagen-induced arthritis／コラーゲン誘発関節炎
CRP	C-reactive protein／C 反応性タンパク
µCT	Micro computed tomography／マイクロコンピュータトモグラフィー
EC_{50}	Half maximal effective concentration／50%有効濃度
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay／酵素免疫測定法
Fc	Fragment crystallizable／結晶化可能断片
gp130	Glycoprotein 130／糖タンパク質 130
HRP	Horseradish peroxidase／ホースラディッシュペルオキシダーゼ
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration／50%阻害濃度
IgG	Immunoglobulin G／免疫グロブリン G
IL-6	Interleukin-6／インターロイキン 6
IL-6Rα	IL-6 receptor α subunit／IL-6 受容体 α サブユニット
INN	International nonproprietary name／国際一般名
IV	Intravenous／静脈内
K_D	Equilibrium dissociation constant／平衡解離定数
NHS	Normal human serum／正常ヒト血清
LLD	Lower limit of detection／検出下限未満
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell／末梢血単核細胞
PBS	Phosphate buffered saline／リン酸緩衝生理食塩液
RA	Rheumatoid arthritis／関節リウマチ
RLU	Relative light units／相対発光量
SAA	Serum amyloid A／血清アミロイド A
SCID	Severe combined immune deficient／重症複合免疫不全
sIL-6Rα	Soluble IL-6 receptor α subunit／可溶性 IL-6 受容体 α サブユニット
SPR	Surface plasmon resonance／表面プラズモン共鳴

STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3／シグナル伝達兼転写活性化因子 3
$t_{1/2}$	Half-life／消失半減期

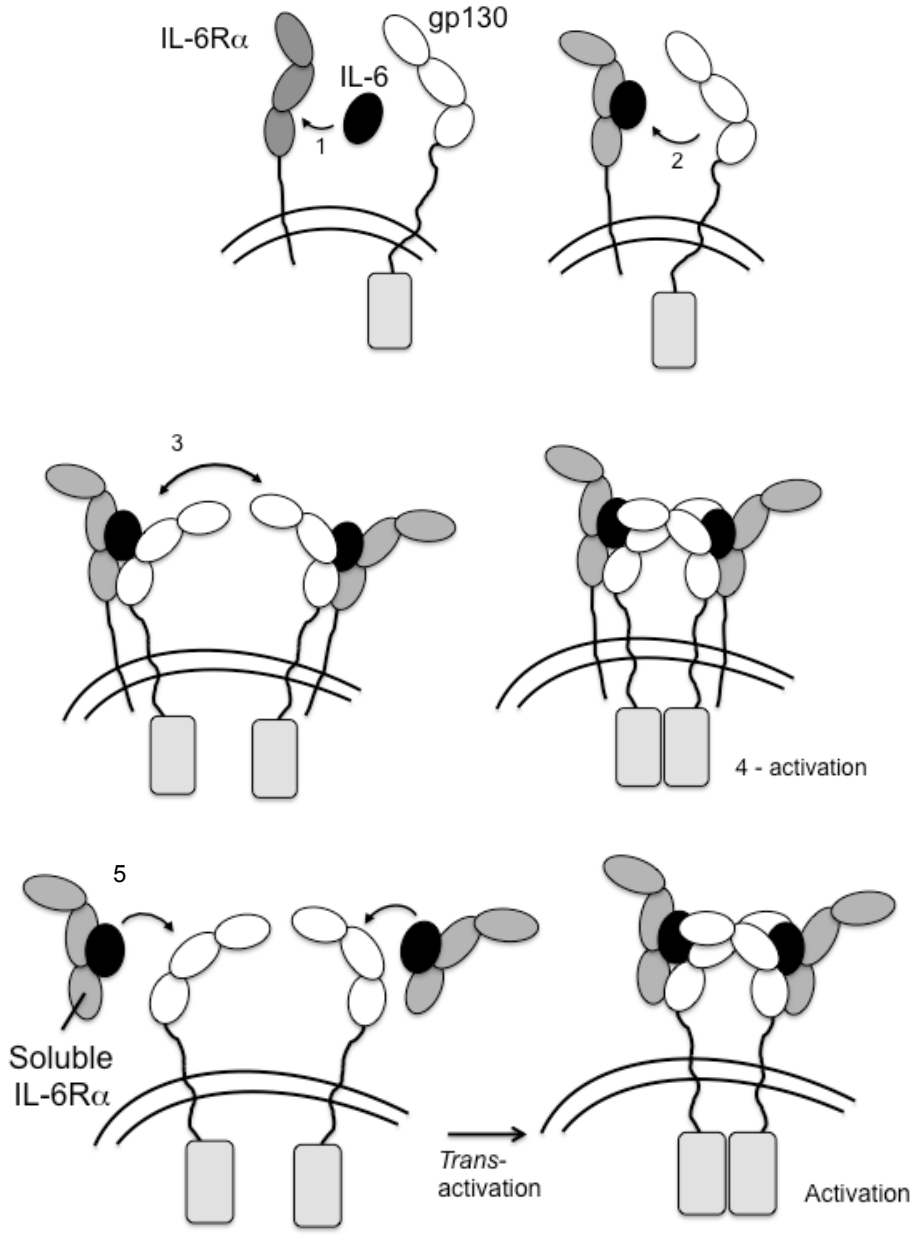
1　まとめ

関節リウマチ（RA）は、複数の関節における持続性滑膜炎と軟骨及び骨の進行性破壊を特徴とする慢性の炎症性疾患である(1)。関連する全身性の炎症症状には、発熱、疲労、貧血、赤血球沈降速度及びC反応性タンパク（CRP）の増加といった臨床検査値異常、並びにリウマチ因子や抗シトルリン化タンパク抗体などの自己抗体の発現がある(1)。RAに関連する炎症誘発性サイトカインには、腫瘍壊死因子α（TNF-α）、インターロイキン1（IL-1）及びインターロイキン6（IL-6）がある(2)。RA患者の血清及び滑液中ではIL-6が増加していることが示されている(3)。IL-6受容体に対するヒト化マウスモノクローナル抗体の臨床試験では、RAを対象として有効性及び安全性の良好なデータが得られている(4)(5)(6) (7)。

IL-6はマウス形質細胞腫(8)及びヒト骨髄腫(9)に対して強い増殖刺激作用を示すことから、当初はB細胞分化因子とされていた。このサイトカインは多面発現性であり、後に複数の免疫及び炎症細胞に対して増殖、分化、生存及びアポトーシスなどの多様な反応を刺激することが示された(10)。例えば、IL-6は肝細胞を刺激して、CRP、フィブリノーゲン及び血清アミロイドA（SAA）といった急性期タンパク質を放出させる(10)。IL-6は、制御性T細胞（Treg）産生の阻害作用を有し、かつnaïve T細胞から17型ヘルパーT細胞（Th17）への分化に関与することが示唆されている(11)。また、IL-6受容体阻害により、RA患者の血中のTh17細胞とTregの間の不均衡が是正されることも示されているが(12)(13)、このことがRAにおいて抗IL-6受容体抗体療法で得られる長期ベネフィットに与える影響は不明である。

IL-6は2つの受容体成分、すなわち80kDaのIL-6結合性α鎖（IL-6Rα）と130kDaのシグナル伝達性β鎖受容体（gp130）を必要とするシグナル伝達機序を介して細胞を活性化する(14)。IL-6はIL-6Rαサブユニットと直接相互作用し、IL-6/IL-6Rα複合体はgp130サブユニットと細胞表面で高親和性複合体を形成する（図1）。これによりシグナル伝達兼転写活性化因子3（STAT3）がリン酸化され、二量体化し、核に移行してSTAT3応答配列を含む遺伝子の転写を活性化する。“シスシグナリング（あるいは古典的シグナリング）”と呼ばれる過程では、上記の高親和性IL-6/IL-6Rα/gp130複合体が同じ複合体と二量体化することにより六量体複合体が形成され、シグナル伝達が開始される(10)。IL-6Rαは可溶性IL-6Rα（sIL-6Rα）も存在し、sIL-6Rαはメタロプロテアーゼのディスインテグリン・メタロプロテアーゼドメイン17（ADAM17）による膜結合型IL-6受容体タンパク質の切断(15)、又は選択的スプライシングを受けたmRNAの翻訳(16)のいずれかにより生成する。sIL-6RαとIL-6の複合体（IL-6/sIL-6Rα複合体）は、gp130を発現し膜結合型IL-6Rαを発現していない細胞の活性化を促進する。これは“トランスシグナリング”と呼ばれる(17)(18)。トランスシグナリングは、関節の滑膜細胞など、IL-6Rαを発現していない細胞及び組織において、重要な活性化経路として機能していると考えられている(18)。

図 1 - IL-6 による IL-6Rα/gp130 シグナル伝達経路活性化



IL-6 は、細胞に発現している膜結合型 IL-6Rα 及び gp130 を介して、又は gp130 のみを発現している細胞では IL-6/sIL-6Rα によってシグナル伝達を開始する。IL-6 は IL-6Rα に中等度の親和性で結合し、IL-6/IL-6Rα/gp130 高親和性複合体を形成する（1 及び 2）。次に、この三量体複合体が別の三量体複合体と二量体化し（3）、gp130 細胞質ドメインの二量体化によりシグナル伝達が進行する（4）。また、gp130 のみを発現している細胞でも、IL-6 は sIL-6Rα と複合体を形成し、トランスシグナリングを活性化する（5）。

サリルマブ（日本名：JAN）は、ヒト IgG1 重鎖及びヒトκ軽鎖からなるヒトモノクローナル抗体であり、ヒト IL-6R 複合体のαサブユニットに高い親和性で結合し、IL-6 シグナル伝達を強力に阻害する。本モジュールにおいて、国際一般名（INN）の sarilumab、Regeneron 社の開発コード REGN88、

サノフィ社の開発コード SAR153191 は同一のサリルマブ分子を指す。サリルマブは新規技術 VelocImmune®を用いて創製された(19)(20)。VelocImmune®マウスは、マウスの生殖系列細胞においてマウス免疫グロブリンの可変領域をコードする遺伝子配列を取り出し、その遺伝子座をヒト生殖系列細胞のヒト免疫グロブリン可変領域をコードする遺伝子配列に正確に置き換え、一方マウスの重鎖定常領域はそのまま残すことにより作製された（M3.2.S.2.3 参照）。これらのマウスはヒトの可変領域及びマウスの定常領域を有する抗体を産生する。VelocImmune®マウスをヒト IL-6Rα で免疫し、得られた抗体から in vitro で高親和性阻害薬をスクリーニングしたところ、サリルマブのヒト可変ドメインを有するマウス定常領域とのキメラ抗体が選択された。この選択されたリード抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域を、それぞれヒト IgG1 重鎖定常領域及び κ 定常領域を含有するプラスミドベクターにクローニングした。選択した抗体、すなわちサリルマブを CHO 細胞で産生し、親和性及び効力を評価する in vitro アッセイで更に特性を検討した。

ヒト及びカニクイザル由来遺伝子組換え sIL-6Rα 単量体タンパク質に対するサリルマブの結合親和性を、表面プラズモン共鳴（SPR）-Biacore 技術により測定した（2.1.1項）。サリルマブはヒト及びカニクイザルの IL-6Rα に結合し、その K_D 値はそれぞれ 54 pmol/L 及び 123 pmol/L と大きく異ならなかったことから、非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験に用いる動物種としてサルが適切であることが裏付けられた。サリルマブはマウスの IL-6Rα には結合しなかった。また in vitro のフローサイトメトリー試験において、サリルマブはヒトの末梢血単核細胞（PBMC）上の内因性ヒト IL-6Rα に結合するが、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ及びイヌ由来 IL-6Rα には結合しないことが示された（2.1.2項）。

In vitro の SPR-Biacore 測定試験において、サリルマブはヒト IL-6Rα への一定濃度 200 nmol/L のヒト IL-6 の結合を完全に阻害した（2.1.4.2項）。また、競合的酵素免疫測定法（ELISA）試験において、サリルマブは IL-6 に対する一定濃度 100 pmol/L の二量体ヒト IL-6Rα の結合を阻害し、その IC_{50} は 108 pmol/L であった（2.1.4.1項）。In vitro セルベースアッセイにおいて、サリルマブはヒト肝細胞がん HepG2 細胞株において IL-6 依存性 STAT3 活性化を阻害し（2.1.5項）、gp130 を過剰発現しているが IL-6Rα は発現していない遺伝子組換えヒト胎児腎（HEK-293）細胞株において IL-6 と sIL-6Rα の結合により誘導されるトランスシグナリングを阻害した（2.1.6項）。抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び補体依存性細胞傷害（CDC）を評価する in vitro セルベースアッセイにおいて、サリルマブに関連した結晶化可能断片（Fc）エフェクター機能活性は検出されなかった（2.1.3項）。全体として、これらの in vitro データから、サリルマブが IL-6/IL-6Rα 相互作用の阻害により作用を発揮することが示された。

野生型マウスを用いた毒性及び薬理試験を実施するため、サリルマブのヒト IgG1 に類似の抗体であるマウス IgG2a サブクラスの相同 IL-6Rα 抗体 REGN844 を作製した。SPR-Biacore 測定試験において、REGN844 は遺伝子組換えマウス sIL-6Rα 単量体に結合し、その K_D 値は 193 pmol/L であった（2.3.2項）。競合 ELISA 試験において、REGN844 はマウス IL-6Rα がヒト IL-6 への結合するのを強力に阻害し、その IC_{50} 値は約 5 nmol/L であった（2.3.3項）。REGN844 は in vitro においてヒト及びマウスの IL-6 によ

り誘発されたマウスB細胞ハイブリドーマB9細胞株の増殖も抑制し、そのIC_{50}値はそれぞれ約60 pmol/L及び110 pmol/Lであった（2.3.4項）。

サリルマブはマウスIL-6Rαに結合しないことから、サリルマブを用いたin vivo薬理試験は、ヒトIL-6及びヒトIL-6Rαの細胞外ドメインをそれに相当するマウスの遺伝子産物の代わりに発現するダブルヒト化 *Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスを用いて実施した（2.2.1項）。*Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスにおいて、サリルマブはテレビン油投与により誘発された、急性期炎症反応の主要なバイオマーカーであるSAAの増加を抑制した。野生型マウスの試験ではREGN844を用いた。*Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスにおけるサリルマブの薬理作用と同様に、REGN844はテレビン油誘発炎症モデルにおいてSAAの増加を抑制し（2.4.1項）、野生型マウスのコラーゲン誘発関節炎（CIA）モデルで疾患の発現率、重症度及び骨侵食を抑制した（2.4.2項）。

IL-6及びその下流エフェクターSTAT3は、発がんイニシエーション及び腫瘍増殖にも関与していると多くのデータから示唆されている(21)。これらの知見と一致して、探索的試験において、サリルマブはin vitro（3.1.1項）及びin vivo（3.2.2項）で腫瘍細胞のSTAT3リン酸化を抑制した。またIL-6は腫瘍細胞の発生、細胞遊走、浸潤、増殖、アポトーシス、血管新生及び分化に関与することが示されている(21)。これらは、少なくとも部分的には、IL-6により炎症環境が作られることで腫瘍増殖を刺激する増殖因子が放出されることに起因すると考えられる。腫瘍増殖におけるIL-6の役割に関して、免疫不全マウスにおけるヒト前立腺がん（DU145）及び肺がん（NCI-H1650、A549及びCalu3）の異種移植腫瘍の増殖に対する作用を検討するin vivo試験を実施した結果、サリルマブはその増殖を抑制した（3.2.1項）。In vitroでサリルマブによるSTAT3リン酸化抑制傾向が観察されたことからも、これらの結果が裏付けられている（3.1.1項）。これらの試験結果は、サリルマブのがん原性リスク評価の裏付けに用いている [M2.6.6の5項]。

独立したサリルマブの安全性薬理試験は実施していないが、カニクイザルにサリルマブを100 mg/kg/週までの用量で13週間皮下投与、又は50 mg/kg/週までの用量で6ヵ月間静脈内投与した毒性試験の一部として安全性薬理評価項目を評価した（4項）。これらの試験において、中枢神経系、心血管系及び呼吸系にサリルマブに関連した影響はみられなかった。

2　効力を裏付ける試験

2.1　サリルマブの in vitro 薬理試験

2.1.1　IL-6Rα に対するサリルマブの平衡解離定数

[REGN88-MX-07016 試験]、[M2.6.3.2.1 A]

ヒト、カニクイザル及びマウス由来遺伝子組換え sIL-6Rα 細胞外ドメイン単量体タンパク質に対するサリルマブの結合親和性を SPR-Biacore 法で測定した。ヒト IL-6Rα 細胞外領域のアミノ酸配列は、カニクイザル及びマウスの配列とそれぞれ 96%及び 53%の相同性を示す。

方法

SPR-Biacore 試験は 25℃、pH 7.4 で実施し、センサーチップ表面に固定した抗ヒト Fc（hFc） 抗体によりサリルマブを捕捉し、それに対する sIL-6Rα 単量体の結合を評価した。

結果

サリルマブはヒト及びカニクイザルの IL-6Rα に結合し、その K_D 値はそれぞれ 54 pmol/L 及び 123 pmol/L であった。これらの条件下で、サリルマブはヒト IL-6Rα に高い親和性で結合し、カニクイザル IL-6Rα にも同様に結合したが、親和性はわずかに低かった（K_D 値は約 2.3 倍、表 1）。このヒトとサルの IL-6Rα におけるサリルマブへの K_D 値の違いは、サル IL-6Rα の k_d がヒト IL-6Rα の約 2 倍を示すことに一致する。サリルマブはマウスの IL-6Rα には結合しなかった。

表 1 - 表面捕捉サリルマブと遺伝子組換え IL-6Rα 単量体タンパク質の 25°C、pH 7.4 での相互作用に関する結合パラメータの要約

サリルマブ ロット番号	IL-6R リガンド	k_a ($[mol/L]^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (mol/L)	R_{max} (RU)	$t_{1/2}$ (h)
[redacted]	ヒト	$8.52x10^5$	$4.63x10^{-5}$	$5.44x10^{-11}$	55	4.2
	サル	$7.28x10^5$	$8.93x10^{-5}$	$1.23x10^{-10}$	53	2.2
	マウス	結合なし				

K_D = 平衡解離定数；k_d = 解離速度定数；k_a = 結合速度定数；R_{max} = 最大反応；RU = 反応単位

2.1.2　初代培養末梢血単核細胞の細胞表面 IL-6Rα に対するサリルマブの結合

[REGN88-MX-11078 試験]、[M2.6.3.2.2]

サリルマブの安全性評価に用いる動物種を決定するため、ヒト、アカゲザル、マーモセット、ヒツジ、イヌ、ウサギ、ミニブタ、モルモット、ハムスター、ラット及びマウスの全血由来 PBMC 表面の IL-6Rα に対するサリルマブの結合をフローサイトメトリーで測定した。

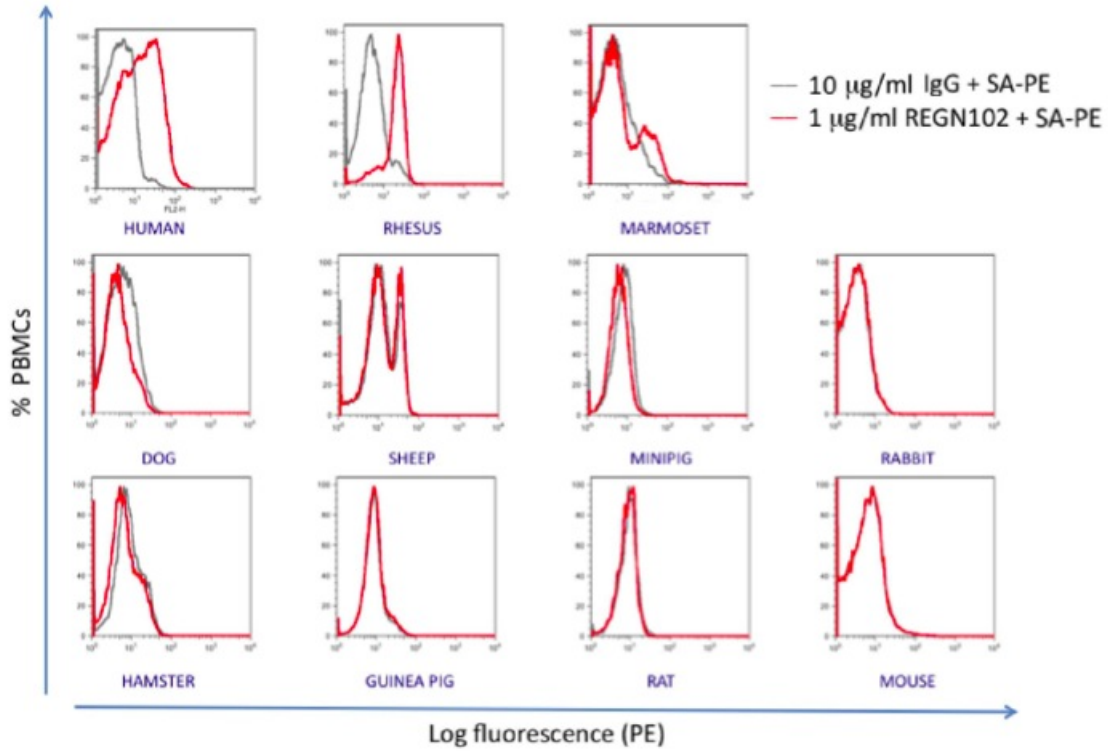
方法

サリルマブの可変領域とマウスの定常領域を含むビオチン化キメラサリルマブ（REGN102）を作製した。ビオチン化サリルマブの結合は、フィコエリスリン蛍光色素分子標識ストレプトアビジン（SA-PE）を用いて検出した。結合親和性は可変領域を介したものであるため、キメラ化してもサリルマブの結合特異性への影響はないと考えられる。

結果

ビオチン化キメラサリルマブはヒト、アカゲザル及びマーモセット PBMC に結合した（図 2）。ヒツジ、イヌ、ウサギ、ミニブタ、モルモット、ハムスター、ラット及びマウス PBMC に対する結合は検出されなかったことから、これらの動物種はサリルマブの非臨床 in vivo 試験では使用しなかった。

図 2 - ヒト及び非ヒト動物種由来初代 PBMC 上の IL-6Rα に対するビオチン化キメラサリルマブの結合



フォワード及びサイドスキャッターでゲーティングした PBMC の蛍光強度を測定した。灰色線（IgG+SA-PE）は過剰量のヒト IgG とプレインキュベートし、SA-PE で染色した試料の蛍光強度、赤線（REGN102+SA-PE）はビオチン化キメラサリルマブ（サリルマブの可変領域及びマウス IgG2a 定常領域）とインキュベートし、SA-PE で染色した試料の蛍光強度を示す。

2.1.3 サリルマブの Fc エフェクター機能活性の有無

[REGN88-MX-07015 試験]、[M2.6.3.2.1B] [M2.6.3.2.2]

CDC 及び ADCC は生体内で病原体及び腫瘍細胞の排除に関与する重要な機序であり、主に IgG1 及び IgG3 サブタイプなどの抗体の Fc 領域によって媒介される(22)。エフェクター機能は通常、多価抗体又は細胞表面標的との相互作用による抗体Fc領域の多量体化又はクラスター化によって活性化される。In vivo におけるサリルマブの主な作用機序は受容体－リガンド相互作用の阻害であり、エフェクター機能を介するものではないが、IgG1 モノクローナル抗体であるため、in vivo において目的としない抗体依存性機序による作用を示す可能性がある。したがって、in vitro セルベースアッセイを用いて、サリルマブの Fcγ 受容体への結合能、及びエフェクター細胞による ADCC 又は CDC 促進作用の有無を評価した。アッセイの標的細胞株には、フローサイトメトリーによる測定結果を元に、さまざまなレベルの IL-6Rα を発現する KG-1（IL-6Rα 発現高）、XG-1（発現中）及び HepG2 細胞（発現低）を用いた。

方法 1

ADCC は、in vivo において活性化又は阻害活性を有する複数の Fcγ 受容体により媒介される。サリルマブの高及び低親和性 Fcγ 受容体への結合を、SPR-Biacore 法を用いて in vitro で測定した。

方法 2

ADCC アッセイでは、PBMC（エフェクター細胞）と標的細胞を [redacted] 対 1 の比で混合し、各種濃度（0.169 pmol/L～10 nmol/L）のサリルマブと 37°C で 4 時間インキュベートした。対照として、標的細胞を PBMC 非存在下でサリルマブとともにインキュベートした。ADCC 活性による標的細胞の溶解は、乳酸脱水素酵素（LDH）の放出を測定することにより確認した。陽性対照には CD20 発現 Daudi 標的細胞と抗 CD20 IgG1 抗体のリツキシマブを用いた。

方法 3

CDC アッセイでは、方法 2 と同じ標的細胞懸濁液に各種濃度（0.845 pmol/L～50 nmol/L）のサリルマブを添加した後、補体成分を含む 5%正常ヒト血清（NHS）を添加した。対照として、標的細胞及びサリルマブを NHS 非存在下でインキュベートした。陽性対照には CD20 発現 Daudi 標的細胞と抗 CD20 IgG1 抗体のリツキシマブを用いた。37°C で 2 時間インキュベートした後、CellTiter Blue（Promega 社）を用いて励起波長 560 nm、蛍光波長 590 nm で蛍光シグナルを測定することにより細胞の生存を評価した。細胞傷害率は Triton X-100 で溶解した細胞試料との比較により測定した。

結果 1

サリルマブは一連の高及び低親和性 Fcγ 受容体に結合し、その親和性の範囲はヒト IgG1 抗体について文献に報告されているものと同程度であった(22)(23)(24)。IL-6Rα の結合又はサリルマブと抗ヒト IgG1

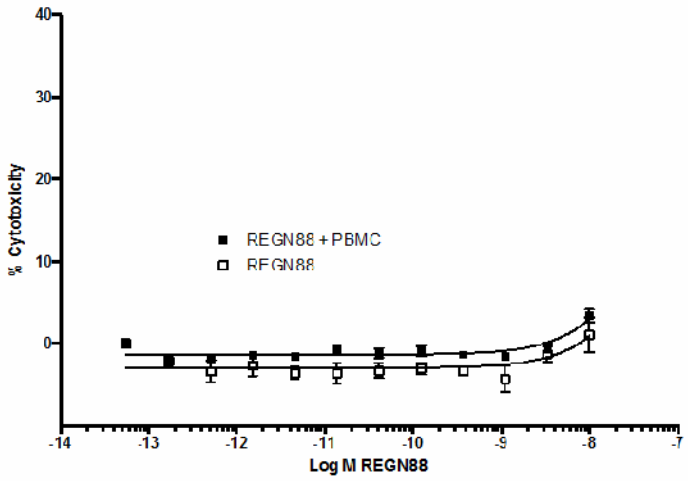
抗体とのクラスター化が、サリルマブの Fcγ 受容体への結合能に及ぼす影響も検討したが、影響は軽度であった [M2.6.3.2.1B]。

結果 2

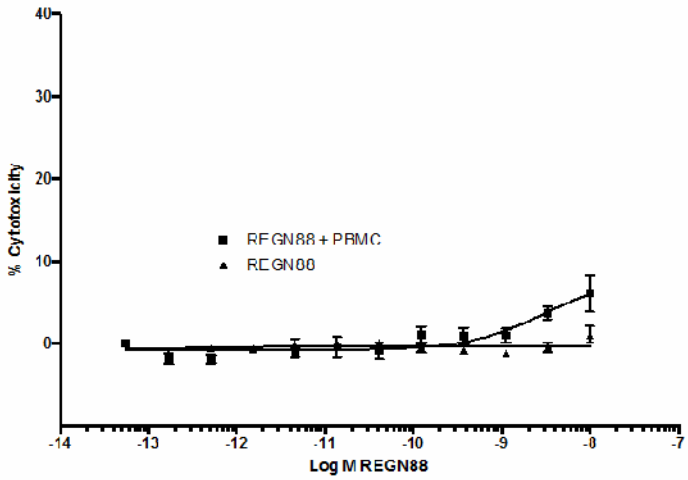
サリルマブは、Fcγ 受容体への結合能を示したにもかかわらず、検討した標的細胞株において PBMC 介在性 ADCC 誘発作用をほとんど又はまったく示さなかった（図 3A～C）。一方、陽性対照として PBMC を Daudi 細胞とともにリツキシマブ存在下でインキュベートしたとき、濃度依存的な強い ADCC がみられた（図 3D）。PBMC 非存在下では、リツキシマブは ADCC を誘発しなかったことから、本アッセイに用いた PBMC は細胞傷害誘発に必要であり、細胞傷害誘発活性を有していることが確認された [M2.6.3.2.2]。

図 3 - サリルマブは KG-1、XG-1 又は HepG2 細胞において ADCC を誘発しない

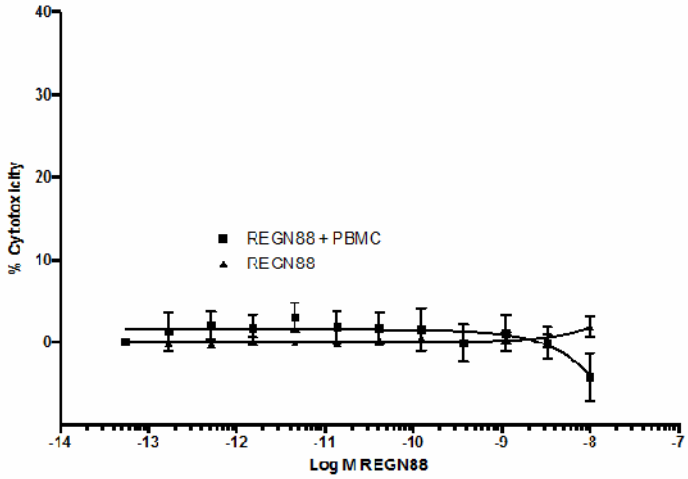
A) KG-1 細胞



B) XG-1 細胞



C) HepG2 細胞



D) Daudi 細胞

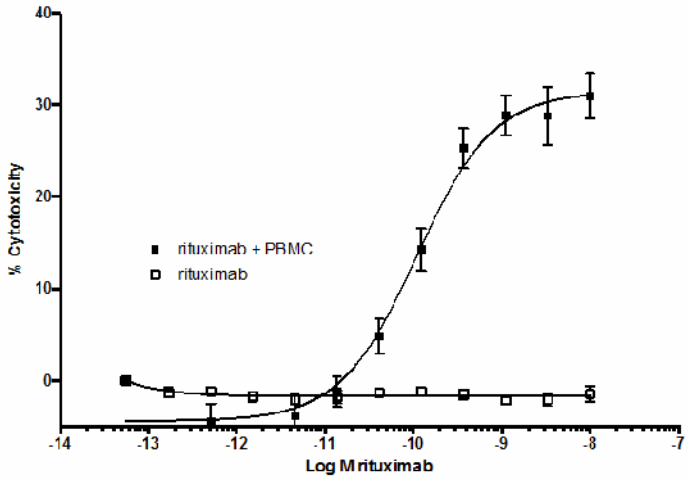


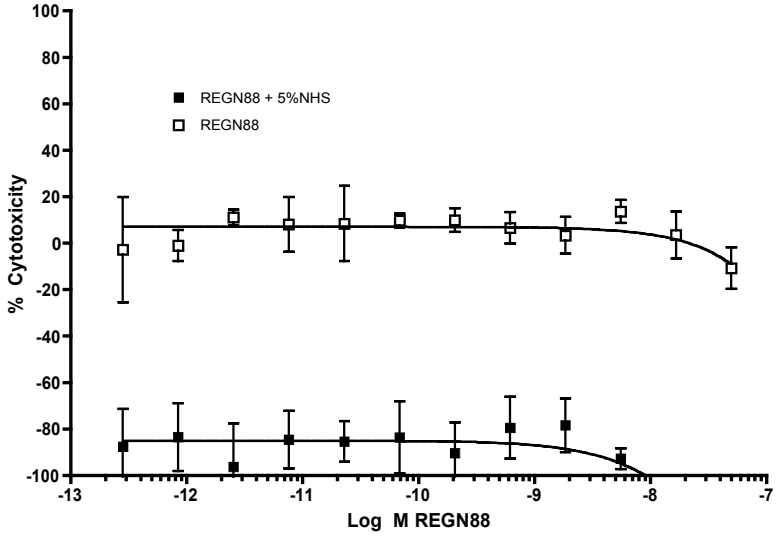
図 A～C：それぞれ KG-1 細胞、XG-1 細胞及び HepG2 細胞（±ヒト PBMC）をサリルマブ存在下でインキュベートした。図 D：Daudi 細胞（±ヒト PBMC）をリツキシマブ存在下でインキュベートした（陽性対照）。各プロットの最低濃度のポイントは緩衝液対照の細胞傷害の測定値を示す。

結果 3

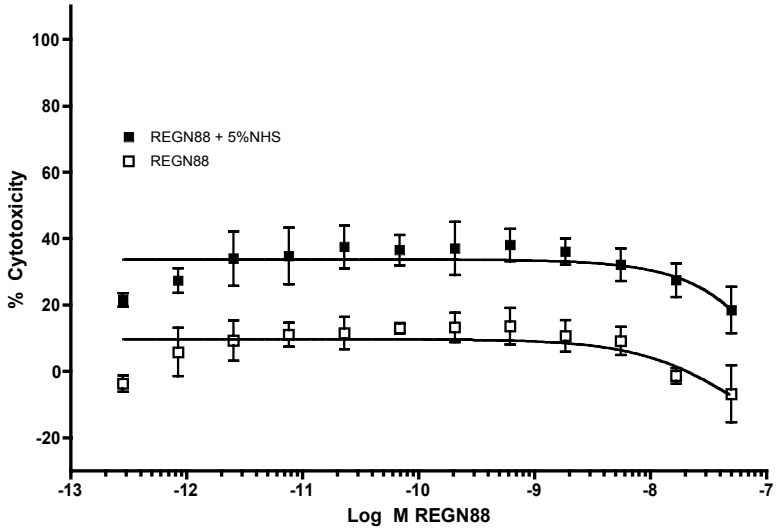
図 4A～C に示す通り、サリルマブによる各標的細胞株の CDC 誘発も認められなかった。一方、陽性対照として Daudi 細胞を NHS とともにリツキシマブ存在下でインキュベートしたとき、濃度依存的な強い CDC がみられた（図 4D）[M2.6.3.2.2]。

図 4 - サリルマブは HepG2、KG-1 又は XG-1 細胞において CDC を誘発しない

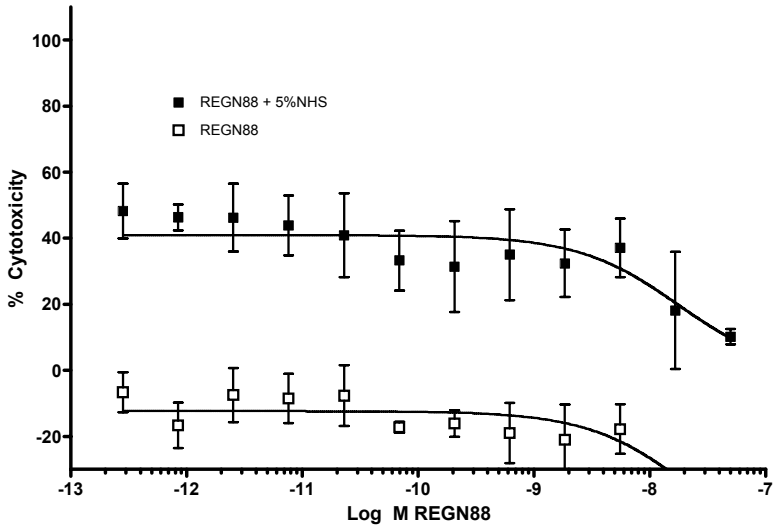
A) HepG2 細胞



B) KG-1 細胞



C) XG-1 細胞



D) Daudi 細胞

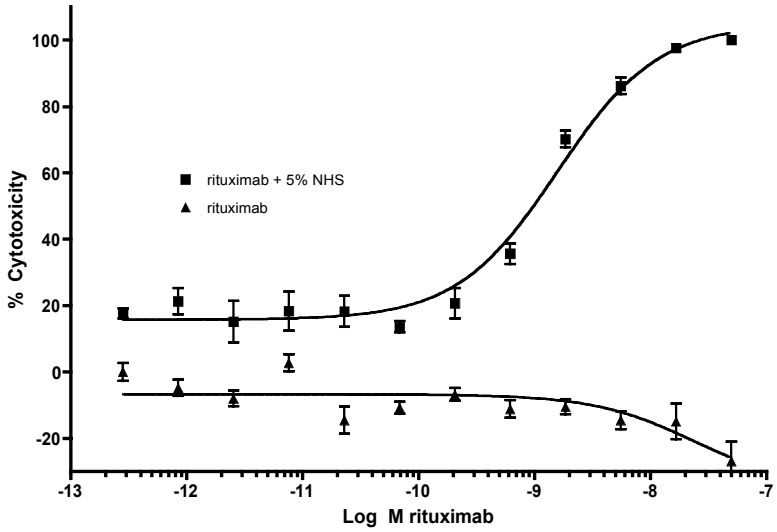


図 A～C）それぞれ HepG2 細胞、KG-1 細胞及び XG-1 細胞（±5% NHS）をサリルマブ存在下でインキュベートした。
図 D）Daudi 細胞（±5% NHS）をリツキシマブ存在下でインキュベートした。各プロットの最低濃度のポイントは緩衝液対照における細胞傷害の測定値を示す。

結果のまとめ

サリルマブは ADCC 及び CDC を誘導しなかった。一方、標的細胞を同じ実験条件下でリツキシマブとともにインキュベートすると ADCC 及び CDC が引き起こされ、文献データと一致した(25)(26)。サリルマブの Fc 介在性作用の欠如は、カニクイザルを用いた in vivo 反復投与毒性試験（[M2.6.6 の 3 項]、[M2.6.6 の 6 項]）において、サリルマブ投与後に（好中球を除く）IL-6Rα 発現末梢血免疫細胞の

減少がみられなかったこととも一致する。抗 IL-6Rα 抗体投与の結果として起こる好中球減少症は、ADCC 及び CDC のいずれによるものでもなく、薬理学的作用機序に関連するものと考えられる。

2.1.4 サリルマブによるヒト IL-6 とヒト IL-6Rα の結合阻害

2.1.4.1 固定化ヒト IL-6 に対するヒト IL-6Rα の結合阻害（ELISA 試験）

[REGN88-MX-14072 試験]、[M2.6.3.2.2]

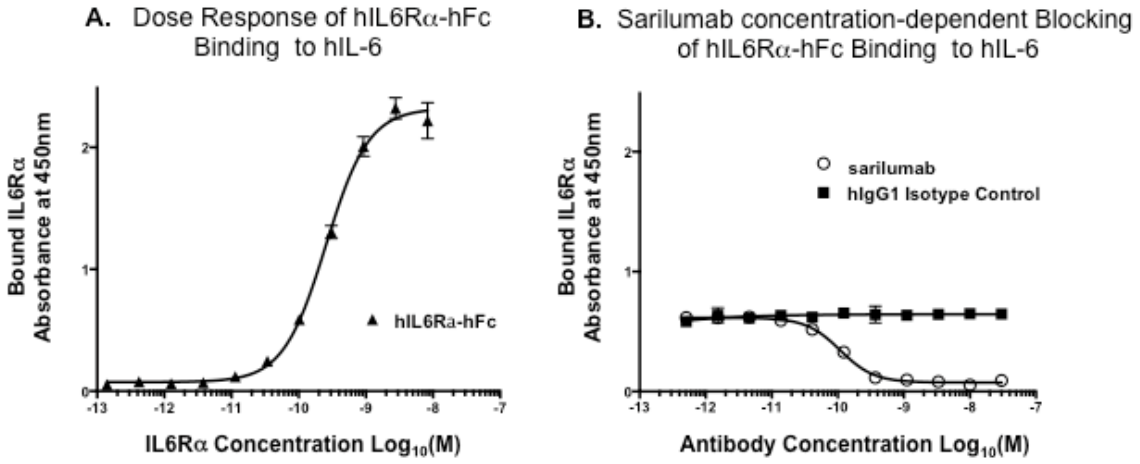
方法

ヒト IL-6 とヒト IL-6Rα の結合に対するサリルマブの阻害作用を競合 ELISA 法にて測定した。本検討では IL-6 をマイクロタイタープレートに固定化し、C 末端にヒト Fc を融合した IL-6Rα（IL-6Rα-hFc）の二量体 100 pmol/L とサリルマブを作用させた。プレートに結合した IL-6Rα-Fc は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体を用いて検出した。

結果

IL-6Rα-hFc 二量体はマイクロタイタープレートに固定化した IL-6 に濃度依存的に結合し、その EC_{50} 値は 255 pmol/L であった（図 5）。サリルマブはプレートに固定化したヒト IL-6 に対する一定濃度 100 pmol/L のヒト IL-6Rα-hFc 二量体の結合を強力に阻害し、その IC_{50} 値は 108 pmol/L であった。

図 5 - サリルマブによるマイクロタイタープレート上固定ヒト IL-6 への
ヒト IL-6Rα-hFc の結合阻害



図（A）：ヒト IL-6Rα-hFc はマイクロタイタープレートにコートしたヒト IL-6 リガンドに濃度依存的に結合し、その EC_{50} 値は 255 pmol/L であった。図（B）：サリルマブはマイクロタイタープレートにコートした IL-6 への 100 pmol/L の IL-6Rα-hFc の結合を濃度依存的に阻害し、その IC_{50} 値は 108 pmol/L であった。IC_{50} の算出には 4 パラメータシグモイド用量反応モデルを用いた。IgG1 アイソタイプ対照抗体は結合を阻害しなかった。プレートに結合した IL-6Rα-Fc は、HRP 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体を用いて検出した。各データポイントのプロットは測定値（n=2）の平均を示す。

2.1.4.2　表面捕捉ヒト IL-6Rα に対するヒト IL-6 の結合阻害（SPR-Biacore 試験）

[REGN88-MX-14072 試験]、[M2.6.3.2.2]

方法

SPR-Biacore 技術を用いた IL-6 阻害アッセイで、ヒト IL-6Rα へのヒト IL-6 結合に対するサリルマブの阻害作用を評価した。試験は 25°C、pH 7.4 で実施し、C 末端に myc-myc-ヘキサヒスチジンタグを有するヒト IL-6Rα 細胞外ドメイン（IL-6Rα-mmH）単量体を抗ペンタヒスチジン抗体でセンサーチップ上に捕捉した。この捕捉 IL-6Rα-mmH 表面に、333 nmol/L のサリルマブを結合能の飽和がみられるまで添加したのち、200 nmol/L 一定濃度のヒト IL-6 を添加した。

結果

これらの条件下で、サリルマブは捕捉 IL-6Rα-mmH 表面への IL-6 の結合を完全に阻害したことから、サリルマブは IL-6/IL-6Rα 相互作用を直接阻害することが示された。IL-6Rα への結合特異性を示すが阻害作用を示さない対照抗体は、IL-6Rα-mmH 受容体センサーチップ表面への IL-6 の結合を阻害しなかった。

2.1.5　IL-6Rα 及び gp130 活性化を介した IL-6 シグナル伝達阻害及び細胞増殖抑制

[REGN88-MX-11077 試験]、[M2.6.3.2.2]

方法

STAT3（応答配列 5 コピー）－ルシフェラーゼ－IRES－eGFP レポーター遺伝子を一過性に形質導入したヒト肝細胞がん由来細胞株（HepG2）を用いて、IL-6 による STAT3 シグナル伝達経路の活性化に対するサリルマブの阻害作用を測定した。

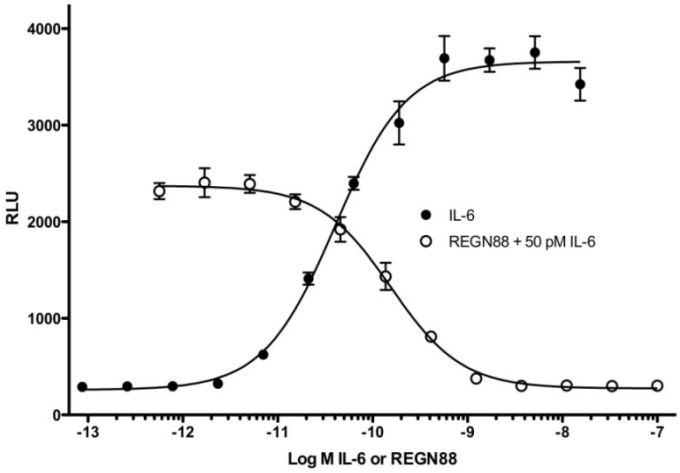
また、IL-6 は in vitro で B 細胞の増殖を誘発することが示されていることから(10)、ヒト B 細胞由来 DS-1 細胞株を用いてサリルマブの細胞増殖に対する作用を検討する試験を実施した。

結果

HepG2 細胞は IL-6Rα 及び gp130 を内因性に発現している。この細胞株において、サリルマブは一定濃度 50 pmol/L の IL-6 存在下でシグナル伝達（シスシグナリング）を阻害し、その IC_{50} は約 150 pmol/L であった（図 6）。サリルマブは IL-6 非存在下でアゴニスト作用を示さなかった。

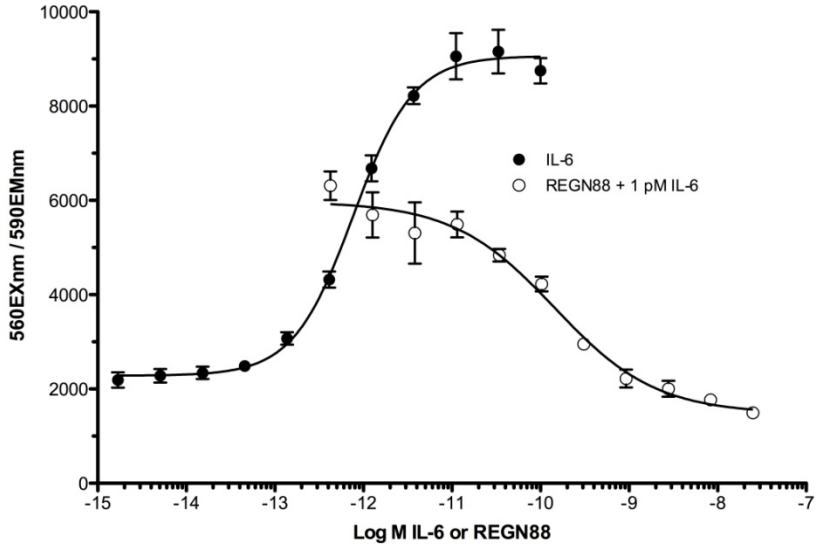
サリルマブは一定濃度 1 pmol/L の IL-6 で刺激した DS-1 細胞の増殖を抑制し、その IC_{50} は約 140 pmol/L であった（図 7）。

図 6 - サリルマブによる HepG2 レポーター細胞アッセイにおける
IL-6 介在性シグナル伝達の阻害



サリルマブ（REGN88、〇）は細胞表面上 IL-6Rα に結合し、一定濃度 50 pmol/L の IL-6 存在下で IL-6 シグナル伝達を阻害することが、ルシフェラーゼ活性（相対発光量［RLU］として測定）の阻害により確認された。本アッセイにおいて、IL-6 は細胞を刺激し（●）、その EC_{50} は 30 pmol/L であった。各データポイントのプロットは測定値の平均±標準偏差（n=3）を示す。

図 7 - サリルマブによる IL-6 刺激 DS-1 細胞増殖の抑制



ヒト IL-6 で刺激した DS-1 細胞の増殖（●）及びそれに対するサリルマブの阻害作用（〇）。サリルマブの IC_{50} は約 140 pmol/L。IL-6 は細胞増殖を刺激し、その EC_{50} は 0.7 pmol/L であった。本アッセイでは増殖の指標として AlamarBlue を使用した（蛍光強度として測定；560 nm で励起、590 nm で蛍光）。AlamarBlue は代謝活性に応じて変色する酸化還元指示薬で、増殖に関連して AlamarBlue が還元されると、酸化還元指示薬が酸化型（非蛍光、青）から還元型（蛍光、赤）に変化する。AlamarBlue の蛍光強度は Victor X5 マルチラベルプレートリーダーで測定した。用量反応曲線は 4 パラメータロジスティック方程式により解析した（GraphPad Prism）。

2.1.6　sIL-6Rα 介在性 IL-6 トランスシグナリング阻害

[REGN88-MX-14072 試験]、[M2.6.3.2.2]

方法

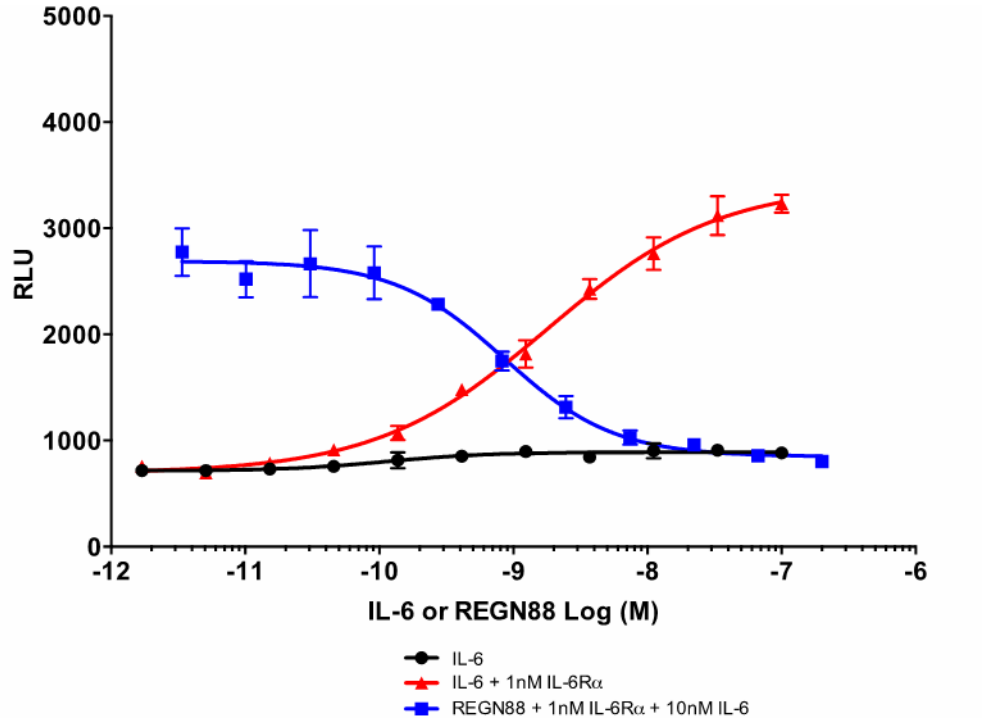
細胞表面にヒト gp130 を発現し、IL-6Rα を発現していないヒト胎児腎（HEK293）STAT3 ルシフェラーゼレポーター細胞株（HEK293/gp130/STAT3-Luc 細胞）において、IL-6 と sIL-6Rα の結合により誘発される STAT3 シグナル伝達経路の活性化（トランスシグナリング）に対するサリルマブの阻害作用を測定した。この細胞株は、ヒト IL-6 と sIL-6Rα-mmH の複合体の存在下では活性化されるが、IL-6 単独では活性化されない。

漸増濃度のサリルマブと 1 nmol/L のヒト IL-6Rα-mmH を室温で 30 分間プレインキュベートし、HEK293/gp130/STAT3-Luc 細胞に 12.5 nmol/L の IL-6 とともに添加し、5 時間後に反応を測定した。対照として、HEK293/gp130/STAT3-Luc 細胞を定常濃度 1 nmol/L のヒト IL-6Rα-mmH 及び漸増濃度の IL-6 とともに 5 時間にわたり刺激した。

結果

IL-6 は一定濃度 1 nmol/L の sIL-6Rα とともにインキュベートしたとき、HEK293 において gp130 依存性 STAT3 ルシフェラーゼレポーター遺伝子活性を刺激し、その EC_{50} 値は 2.2 nmol/L であった。1 nmol/L の sIL-6Rα-mmH と 12.5 nmol/L の IL-6 の存在下でサリルマブはトランスシグナリングを阻害し、その IC_{50} 値は 860 pmol/L であった（図 8）

図 8 - サリルマブによる遺伝子組換え HEK293 細胞における
IL-6 / sIL-6Rα 介在性トランスシグナリングの阻害



赤線（▲）：HEK293/gp130/STAT3-Luc 細胞を定常濃度 1 nmol/L のヒト IL-6Rα-mmH 及び漸増濃度の IL-6 とともに 5 時間にわたり刺激した。青線（■）：さまざまな濃度のサリルマブと 1 nmol/L のヒト IL-6Rα-mmH を室温で 30 分間プレインキュベートし、細胞に 12.5 nmol/L の IL-6 とともに添加し、5 時間後に反応を測定した。黒線（●）：漸増濃度の IL-6 のみでは細胞の活性化はみられなかった。平均±標準偏差を示す。

2.2　サリルマブの in vivo 薬理試験

2.2.1　マウス急性炎症モデルにおけるサリルマブの作用

[REGN88-MX-13129 試験]、[M2.6.3.2.3]

ダブルヒト化 *Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスを用いて、テレビン油誘発急性全身性炎症に対するサリルマブの抑制作用を評価した。テレビン油誘発全身性炎症モデルにおいて、IL-6 は急性期炎症反応に主要な役割を果たす。本モデルの循環血中 SAA 濃度は炎症の程度に直接関連していることから、SAA は炎症の有用なバイオマーカーである(27)。循環血中 SAA 濃度の増加は主に急性炎症反応でみられるが、アミロイドーシス、アテローム性動脈硬化症及び関節リウマチなど多くの慢性炎症性疾患でも認められている(28)。

方法

ダブルヒト化 *Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスでは、VelociGene®技術により、マウス *Il6* 遺伝子座がそれに相当するヒト *IL6* 遺伝子のエクソン領域を含むゲノム配列で置換されている(29)。また、マウス *Il6ra* 遺

伝子の IL-6Rα 細胞外ドメインをコードする部分が、それに相当するヒト IL-6Rα の細胞外ドメインをコードするヒト *IL6RA* 遺伝子断片で置換されている。この方法により得られたキメラ受容体は、マウス受容体の細胞内ドメインを保存しているが、細胞外ドメインはヒトの配列を有しているため、ヒト IL-6 で活性化され、その活性がサリルマブで阻害される。

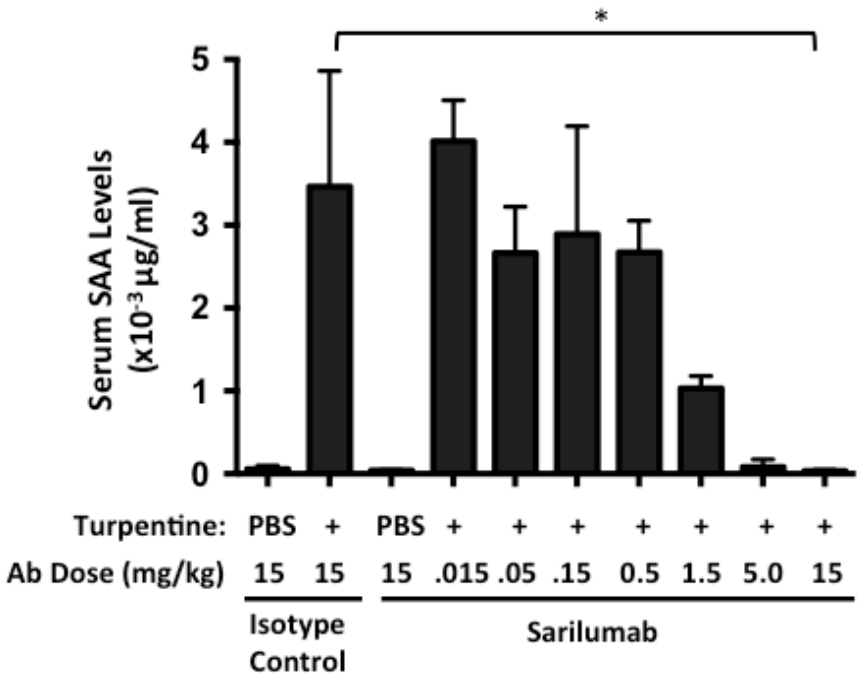
Il6$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスに 0.015～15 mg/kg のサリルマブ又は 15 mg/kg のアイソタイプ対照抗体を皮下投与し、その 24 時間後にテレビン油またはリン酸緩衝生理食塩液を投与した。テレビン油チャレンジの 20 時間後に血液試料を採取し、血清中 SAA 濃度及び IL-6 濃度を測定した。

結果

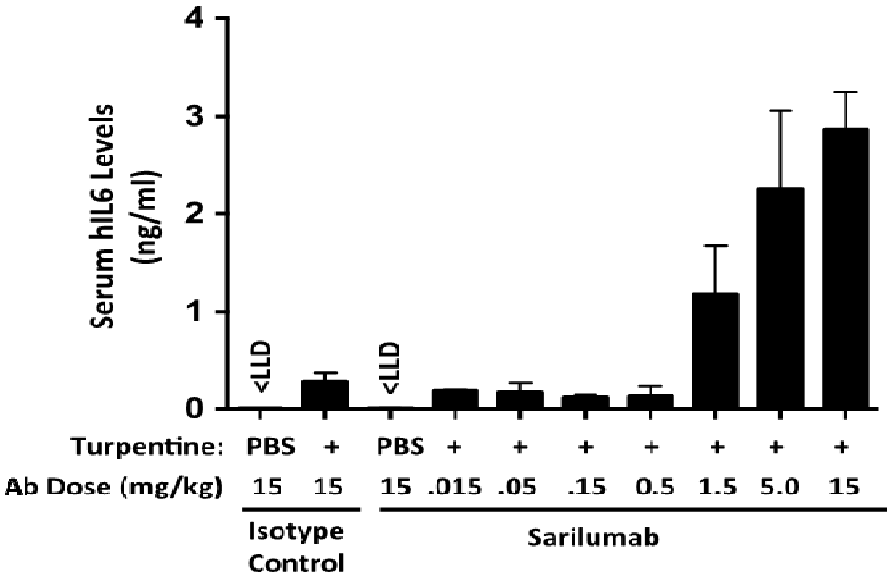
サリルマブの投与により、テレビン油誘発 SAA 濃度上昇が対照抗体を投与したマウスと比較して有意に抑制された。サリルマブの 15 mg/kg までの用量で、循環血中 SAA 濃度が用量依存的に低下する傾向がみられた（図 9A）。サリルマブの 1.5 mg/kg 以上の用量では、IL-6 の受容体結合に対する拮抗作用と一致して、循環血中ヒト IL-6 濃度の増加傾向も認められた（図 9B）。サリルマブ投与後にみられた循環血中ヒト IL-6 濃度の増加は、IL-6Rα の阻害による IL-6 クリアランスの低下に起因すると考えられる(30)。

図 9 - サリルマブによる *Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスにおけるテレビン油誘発 SAA 上昇の抑制、及び循環血中ヒト IL-6 の上昇

A



B



マウス急性炎症モデルにおいて、サリルマブの前投与により血清中 SAA 濃度が低下する。ヒト IL-6 とヒト IL-6Rα 細胞外ドメイン導入のホモ接合型マウスにサリルマブ（0.015～15 mg/kg）又はアイソタイプ対照抗体を皮下投与し、その 24 時間後にテレビン油（100 µL）又はリン酸緩衝生理食塩液（PBS；対照）を皮下投与して炎症を誘発した。テレビン油チャレンジの 20 時間後に血液試料を採取し、SAA（パネル A）及び IL-6（パネル B）を ELISA により測定した。一元配置 ANOVA 後 Dunn の多重比較検定で得られた統計学的有意性を示す（*p<0.05）。平均±SD（n=3）。

2.3 REGN844 の in vitro 薬理試験

2.3.1 抗マウス IL-6Rα 相同抗体（REGN844）の作製

サリルマブはマウスの IL-6Rα に結合しないため、ダブルヒト化 *Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ VelociGene®マウス(29)を用いて、マウス IL-6Rα に特異性を有するマウスモノクローナル相同抗体 REGN844 を作製した。このマウスはマウス IL-6Rα 細胞外ドメインが欠如しているため（2.2.1項参照）、マウス IL-6Rα に特異的な相同抗体を作製するのに有用なツールである。REGN844 の重鎖及び軽鎖の可変領域を産生するハイブリドーマを単離し、可変領域をそれぞれマウス IgG2a 重鎖定常領域及び κ 定常領域を含有するプラスミドベクターにクローニングした。マウス IgG2a サブクラスは、サリルマブの Fcγ 受容体結合及びエフェクター機能に一致した機能を有するアナログとして選択した。REGN844 を CHO 細胞で生産し、以下の項に記載するように、更に特性を検討した。

2.3.2 REGN844 とマウス IL-6Rα の相互作用に関する平衡解離定数

[REGN844-MX-09073 試験]、[M2.6.3.2.2]

方法

SPR-Biacore 法にて、遺伝子組換えマウス sIL-6Rα 単量体タンパク質に対する REGN844 の結合親和性を測定した。特性評価に用いた REGN844 のロットは毒性試験でも使用した。Biacore フォーマットは、ウサギ抗マウス Fc で捕捉した REGN844 表面にマウス sIL-6Rα-mmH 単量体タンパク質を 25°C、pH 7.4 で添加した。

結果

結合速度定数及び平衡解離定数を表 2 に要約する。これらの条件下で REGN844 はマウス IL-6Rα に結合し、その K_D は 1.93×10^{-10} mol/L であった。

表 2 - REGN844 のマウス IL-6Rα（マウス IL-6Rα-mmH）単量体との 25°C、pH 7.4 での相互作用に関する結合パラメータの要約

REGN844 ロット番号	標的抗原	k_a ($[mol/L]^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (mol/L)	$t_{1/2}$ (h)
[redacted]（製剤）	マウス IL-6Rα-mmH	6.52×10^{5}	1.26×10^{-4}	1.93×10^{-10}	1.5

K_D = 平衡解離定数；k_d = 解離速度定数；k_a = 結合速度定数

2.3.3 REGN844 による固定化ヒト IL-6 に対するマウス IL-6Rα 二量体の結合阻害

[REGN844-MX-09074 試験]、[M2.6.3.2.2]

方法

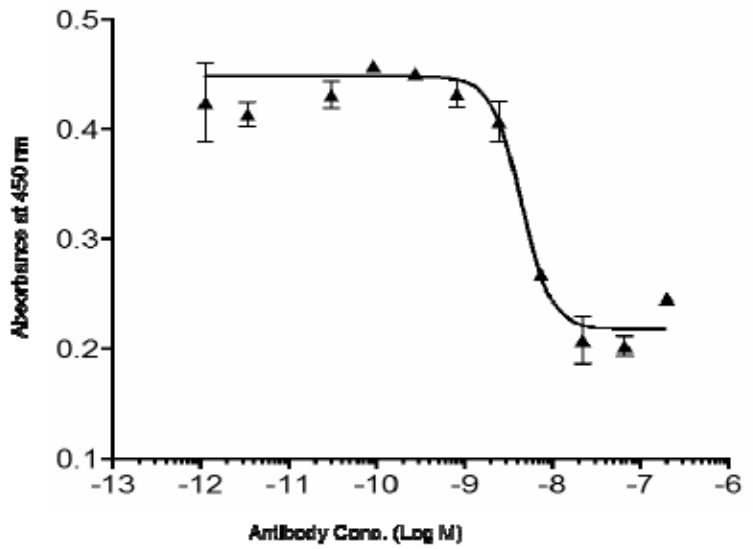
マウス IL-6Rα と固定化 IL-6 との相互作用に対する REGN844 の阻害作用を競合 ELISA 法により検討した。マウス IL-6 よりもヒト IL-6 のほうがアッセイの感度が高かったことから、本試験ではヒト IL-6 を使用した。

プレートにヒト IL-6 を固定化し、それに対する IL-6Rα-hFc（C 末端 Fc 融合体マウス IL-6Rα-ヒト Fc として作製）の結合を、HRP 標識ヤギ抗 hFc 抗体を用いて検出した。

結果

マウス IL-6Rα-hFc 二量体はプレート上の固定化ヒト IL-6 に結合し、その EC_{50} 値は 80 nmol/L であった。REGN844 はマウス IL-6Rα-Fc（10 nmol/L）の固定化ヒト IL-6 への結合を強力に阻害し、その IC_{50} 値は 4 nmol/L（使用したリガンド量に対する理論上の最低値）であった（図 10）。

図 10 - REGN844 によるヒト IL-6 へのマウス IL-6Rα-hFc の結合阻害



REGN844（ロット番号[redacted]）はマイクロプレートにコートしたヒト IL-6 へのマウス IL-6Rα-hFc（10 nmol/L）の結合を濃度依存的に阻害し、その IC_{50} 値は 4 nmol/L（使用したリガンド量に対する理論上の最低値）であった。本試験条件下でのヒト IL-6 に対するマウス IL-6Rα-hFc 結合の EC_{50} 値は 80 nmol/L であった。プレート上の IL-6 に結合した IL-6Rα-hFc は HRP 標識ヤギ抗 hFc 抗体を用いて検出し、IC_{50} は 4 パラメータシグモイド用量反応モデルを用いて算出した。

2.3.4 REGN844 による IL-6 介在性マウス B 細胞増殖の抑制

[REGN844-MX-09075 試験]、[M2.6.3.2.2]

方法

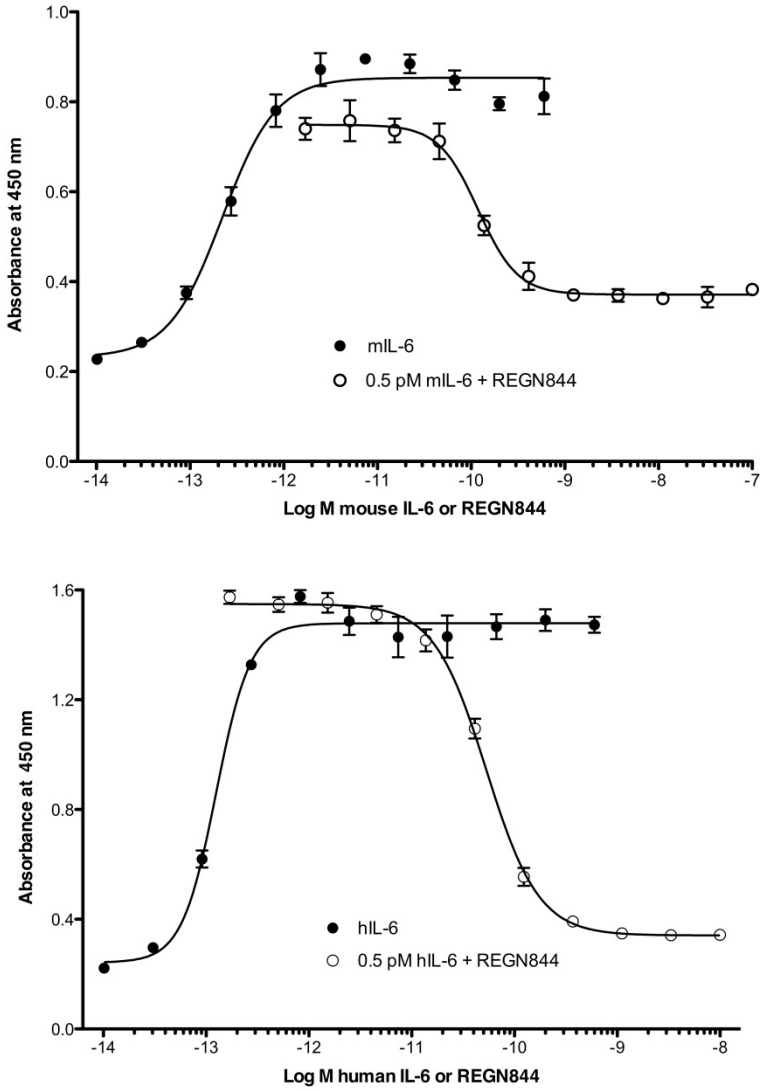
IL-6 は in vitro で B 細胞増殖を誘発することが示されていることから(10)、マウス B 細胞ハイブリドーマ B9 細胞株増殖に対する REGN844 の作用を検討する試験を実施した。

ヒト及びマウスの IL-6（いずれも 0.5 pmol/L）を B9 細胞に添加しインキュベートした。増殖（細胞数）のモニタリングには、細胞内脱水素酵素によりテトラゾリウム塩 WST-8 が黄色ホルマザン色素に変換されて生じる 450 nm における吸光度の増加を指標とした。

結果

本アッセイにおいて、ヒト及びマウスの IL-6 はいずれも B9 細胞増殖を濃度依存的に促進し、その EC_{50} 値はそれぞれ 0.21 pmol/L 及び 0.17 pmol/L と同程度であった。一定濃度 0.5 pmol/L のヒト IL-6 又はマウス IL-6 のいずれかの存在下で、REGN884 は B9 細胞の増殖を抑制し、その IC_{50} 値はそれぞれ約 60 pmol/L 及び 110 pmol/L であった（図 11）。

図 11 - REGN844 による IL-6 介在性 B9 細胞増殖の抑制



マウス IL-6（上図、●）及びヒト IL-6（下図、●）で刺激した B9 細胞の増殖、並びに REGN844（上下図、○）による抑制。REGN844 はヒト及びマウスの IL-6（いずれも 0.5 pmol/L）に対する反応を阻害し、その IC_{50} 値はそれぞれ 60 pmol/L 及び 110 pmol/L であった。増殖（細胞数）のモニタリングには、細胞内脱水素酵素によりテトラゾリウム塩 WST-8 が黄色ホルマザン色素に変換されて生じる 450 nm における吸光度の増加を指標とした。各データポイントのプロットは測定値（n=3）の平均±SD を示す。

2.4 REGN844 の in vivo 薬理試験

2.4.1 REGN844 によるマウスにおけるテレビン油誘発急性炎症の抑制

[REGN844-MX-09076 試験]、[M2.6.3.2.3]

方法

2.2.1項に詳述したように、ダブルヒト化 *Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスにテレビン油を皮下投与することにより、急性全身性炎症反応に対するサリルマブの作用を検討するために適切なモデルが得られた。REGN844 の薬理作用の評価には、野生型マウスを用いたこの急性炎症モデルを使用した。

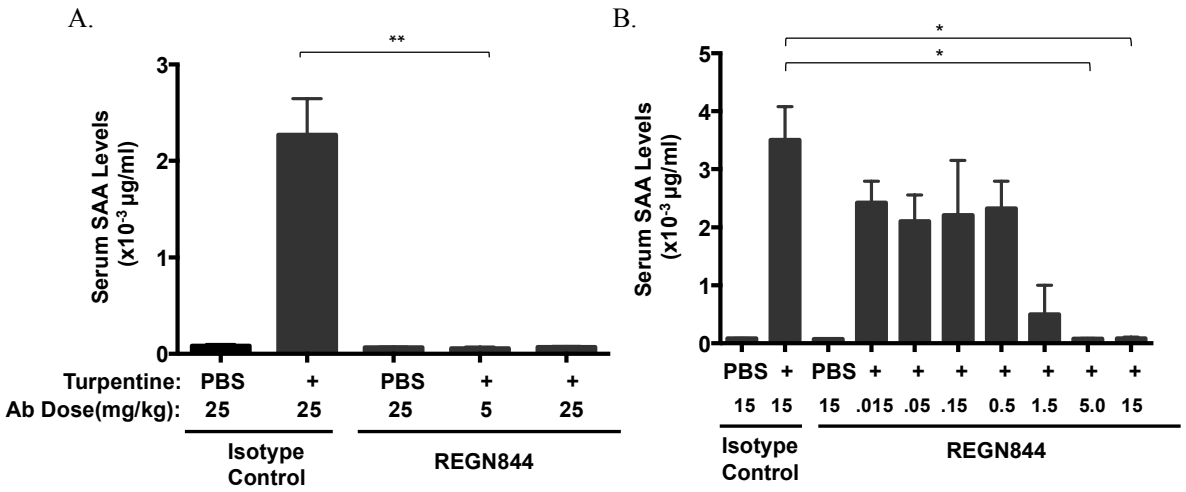
野生型雌 C57BL/6 マウスに REGN844 の 5、25 mg/kg あるいはアイソタイプ対照抗体 25 mg/kg を単回皮下投与で前投与し、6 時間後にテレビン油又は PBS を投与した。また野生型雌 CD-1 マウスに REGN844 の 0.015～15 mg/kg 又は対照抗体 15 mg/kg を単回皮下投与し、1 日後にテレビン油又は PBS を投与した。いずれもテレビン油チャレンジの 24 時間以内に血清試料を採取し、SAA 濃度及び IL-6 濃度を ELISA により測定した。

結果

Il6$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスにおいてサリルマブ投与により得られた結果と同様に、C57BL/6 マウスにおいて 5 又は 25 mg/kg の REGN844 の前投与により血清中 SAA 濃度の上昇が抑制された。5 mg/kg の変化は 25 mg/kg のアイソタイプ対照抗体／テレビン油群と比較して統計学的に有意（$p<0.01$）であった（図 12A）。CD-1 マウスにおいて、5 又は 15 mg/kg の REGN844 を投与すると、テレビン油誘発血清中 SAA 濃度の上昇が抑制された（$p<0.05$、図 12B）。1.5 mg/kg の REGN844 を投与したときにも血清中 SAA 濃度が低下したが、この変化はアイソタイプ対照抗体と比較して有意ではなかった。低用量（0.5 mg/kg 以下）では変化がほとんどみられなかった。

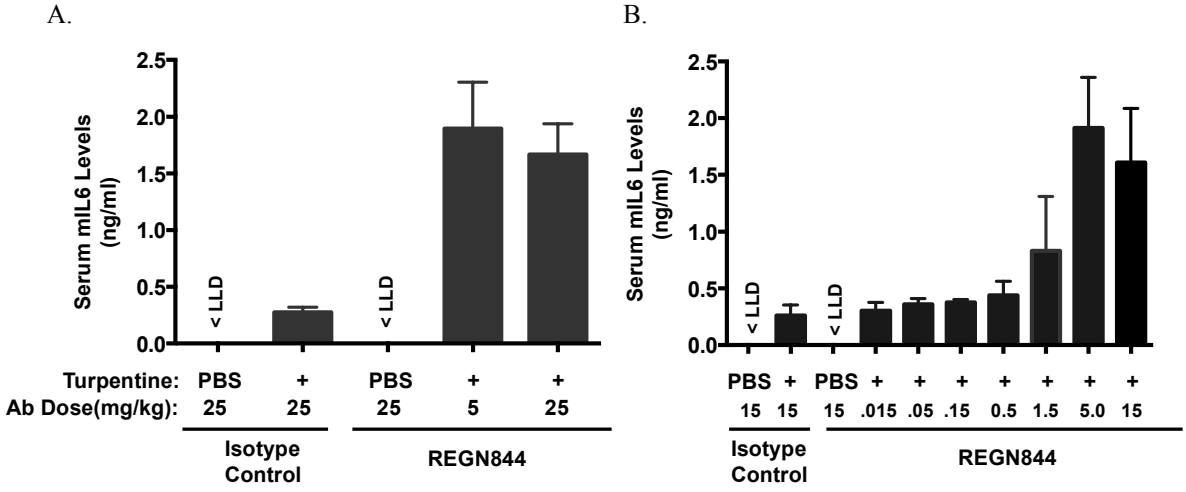
また、*Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスにおけるサリルマブの試験と同様に、C57BL/6（図 13A）及び CD-1（図 13B）マウスにおいて、テレビン油投与前に REGN844 をそれぞれ 5 又は 25 mg/kg 及び 1.5～15 mg/kg で投与したところ、循環血中マウス IL-6 濃度の上昇傾向が認められた。しかし、CD-1 マウスに REGN844 を 0.5 mg/kg 以下の用量で投与したときには、循環血中マウス IL-6 濃度の変化はみられなかった。REGN844 投与後にみられた循環血中マウス IL-6 濃度の上昇傾向は、IL-6Rα の阻害によるマウス IL-6 クリアランスの低下に起因すると考えられる(30)。

図 12 - テレビン油投与 C57BL/6 及び CD-1 マウスにおける血清中 SAA 濃度上昇の REGN844 による抑制



野生型雌 C57BL/6 マウス（図 A）又は雌 CD-1 マウス（図 B）に REGN844 又はアイソタイプ対照抗体を所定の用量で前投与した後、テレビン油を皮下投与でチャレンジした。チャレンジ後 24 時間以内に血清試料を採取し、SAA 濃度を ELISA により測定した。データは平均血清中 SAA 濃度±SD（n=3）を示す。統計学的有意性は、一元配置 ANOVA 後 Dunn の多重比較検定で評価し、*p<0.05、**p<0.01 で示す。

図 13 -テレビン油投与 C57BL/6 及び CD1 マウスにおける循環血清中マウス IL-6 濃度の REGN844 による上昇



野生型雌C57BL/6マウス（パネルA）又は雌CD-1マウス（パネルB）にREGN844又はアイソタイプ対照抗体（REGN654）を前投与した後、テレビン油を皮下投与でチャレンジした。チャレンジ後 24 時間以内に血清中 IL-6 濃度を ELISA により測定した。データは平均血清中マウス IL-6 濃度±SD（n=3）を示す（<LLD = 検出下限未満）。

2.4.2　REGN844 による DBA/1J マウス CIA における関節の炎症及び骨侵食の軽減

[REGN844-MX-14076 試験]、[M2.6.3.2.3]

方法

CIA はヒト RA の動物モデルとして広く用いられている(31)。コラーゲンに対する自己免疫が滑膜性関節の炎症、軟骨の破壊及び骨侵食を誘発する。DBA/1J マウスを用いた CIA モデルでは、コラーゲン免疫の 3～4 週後に RA 様症状が発現する(31)。

本 CIA モデルでは、雄 DBA/1J マウスを、尾の近位端へニワトリ II 型コラーゲン及び完全フロイントアジュバントを単回皮内投与することにより免疫した。0 日目の免疫直後にマウスを無作為に 1 群 10 匹の 3 群に割り付け、10 又は 30 mg/kg の REGN844 若しくは 30 mg/kg のマウスアイソタイプ対照抗体を免疫日から週 2 回 5 週間皮下投与した。

関節の炎症の発現について、炎症及び腫脹を目視観察により毎週 2 回測定し、表 3に示すようにスコア化した。最大スコアは各肢で 4、合計 16 である。試験終了時（61 日目）には骨侵食を評価した。各マウスの四肢すべてについて、マイクロコンピュータトモグラフィー（μCT）Quantum FX μCT スキャナーで測定し、3D Viewer ソフトウエアを用いて盲検下で可視化及びスコア化した。骨侵食のスコア化システムを表 4に示す。

表 3 - 関節の炎症スコア

スコア	所見
0	正常
1	軽度の指趾の腫脹
2	中等度の指趾及び掌蹠の発赤及び腫脹
3	重度の指趾及び掌蹠の発赤及び腫脹
4	複数の関節で最大の発赤及び腫脹

表 4 - 骨侵食スコア

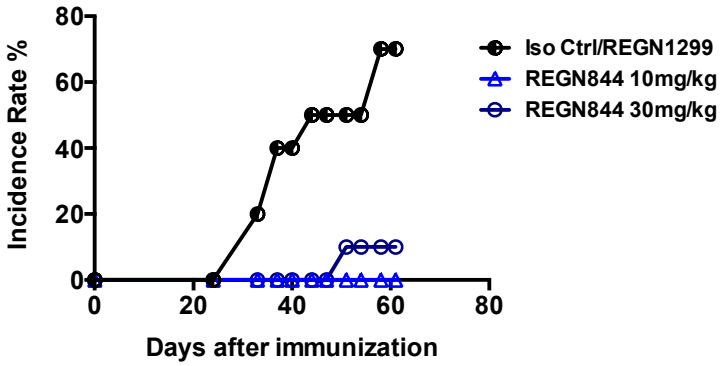
スコア	所見
0	正常
1	指骨／趾骨の 1 つの骨のみの侵食
2	指骨／趾骨の複数の骨、又は 指骨／趾骨の 1 つの骨と中手骨／中足骨又は手根骨／足根骨部位における 1 つの骨の侵食
3	中手骨／中足骨及び手根骨／足根骨の両方の部位における複数の骨の侵食
4	指骨／趾骨、中手骨／中足骨及び手根骨／足根骨を含む すべての部位における複数の骨の侵食

結果

DBA/1J マウスを用いたマウス CIA モデルは、ダブルヒト化 *Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスを用いたテレビン油誘発全身性炎症モデル（2.2.1項参照）よりも強い炎症反応を引き起こした。REGN844 は、このモデルの関節炎及び骨侵食を抑制した。

アイソタイプ対照群では、コラーゲン投与後 4 週目から 2/10 例で関節の炎症及び腫脹の初期の兆候がみられた（図 14）。58 日目までにこの対照群の 7/10 例でさまざまな程度の関節の炎症が発現した。一方、10 mg/kg REGN844 投与群では、10 例のマウスのいずれにおいても炎症はみられなかった。30 mg/kg REGN844 投与群では、1/10 例で 7 週目から試験終了時まで 1 つの足指のみにおいて炎症がみられた。

図 14 - REGN844 によるマウスコラーゲン誘発関節炎の発症抑制



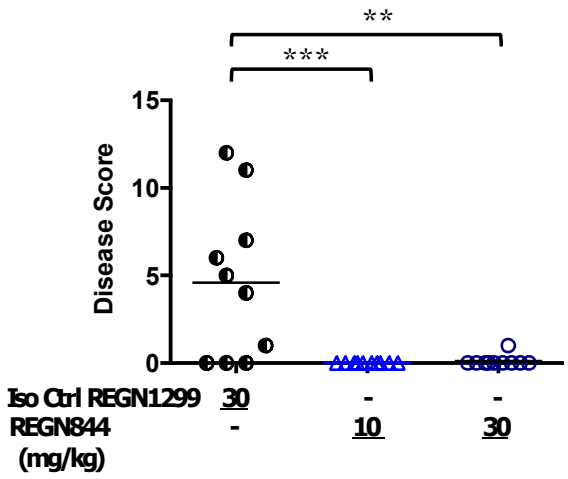
0 日目にマウス（1 群 n=10）を II 型コラーゲン及び完全フロイントアジュバントの乳濁液の皮内投与により免疫し、関節炎を誘発した後、10 mg/kg REGN844（△）、30 mg/kg REGN844（○）又は 30 mg/kg アイソタイプ対照（◐）を週 2 回 5 週間皮下投与した。マウスにおける関節炎誘発後の炎症及び腫脹を、表 3 に示すスコア化システムを用いて目視で評価した。データは、百分率（%）=［総炎症スコアが 0 を超えるマウスの数/ n］× 100 で表した。

試験 61 日における個々のマウスの炎症及び骨侵食スコアのプロットをそれぞれ図 15 及び図 16 に投与群別に示す。

アイソタイプ対照群において、1 肢以上に炎症がみられたマウスは 7/10 例であり、大半（5/7 例）は試験終了時に 2 肢以上に炎症が認められた（図 15）。一方、10 mg/kg REGN844 投与群ではいずれのマウスにも炎症はみられず、30 mg/kg REGN844 投与群では 1 例のみで、7 週目から試験終了時まで 1 つの足指のみに炎症がみられた。

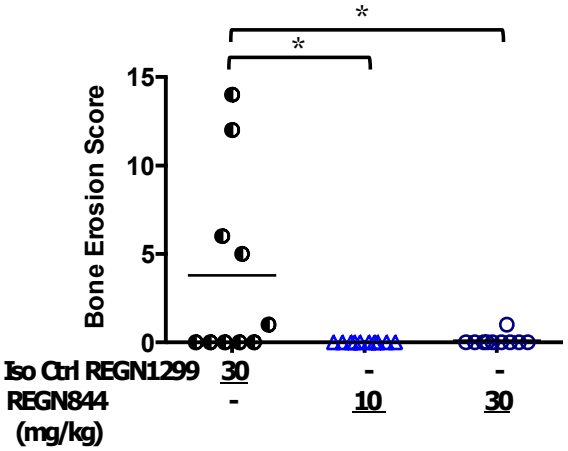
アイソタイプ対照群において、1 肢以上に骨侵食がみられたマウスは 5/10 例であった。骨侵食がみられたマウスのうち、4/5 例は 2 肢以上に骨侵食が認められた（図 16）。一方、10 mg/kg REGN844 投与群ではいずれのマウスにも骨侵食はみられなかった。30 mg/kg REGN844 投与群では 1/10 例（炎症がみられたものと同じマウス）のみで、1 肢のみに骨侵食がみられた。

図 15 - REGN844 によるマウスコラーゲン誘発関節炎モデルの炎症抑制



0 日目にマウス（1 群 n=10）を II 型コラーゲン及び完全フロイントアジュバントの乳濁液の皮内投与により免疫し、関節炎を誘発した後、10 mg/kg REGN844（△）、30 mg/kg REGN844（〇）又は 30 mg/kg アイソタイプ対照抗体（◐ ）を週 2 回 5 週間皮下投与した。試験終了時（61 日目）のマウスにおける炎症及び腫脹を目視で評価した結果を示す。最大スコアは各肢で 4、計 16 である。水平に引いた線はアイソタイプ対照（4.8）、REGN844 10 mg/kg（0）及び REGN844 30 mg/kg（0.1）の平均炎症スコアを示す。Iso Ctrl=アイソタイプ対照。一元配置 ANOVA 後 Dunn の多重比較検定（**p<0.01、***p<0.001）。

図 16 - REGN844 による骨侵食の重症度低下



0 日目にマウス（1 群 n=10）を II 型コラーゲン及び完全フロイントアジュバントの乳濁液の皮内投与により免疫し、関節炎を誘発した後、10 mg/kg REGN844（△）、30 mg/kg REGN844（〇）又は 30 mg/kg アイソタイプ対照抗体（◐ ）を週 2 回 5 週間皮下投与した。試験終了時（61 日目）にマウスにおける骨侵食を評価した。最大スコアは各肢で 4、計 16 である。水平に引いた線はアイソタイプ対照（4.0）、REGN844 10 mg/kg（0）及び REGN844 30 mg/kg（0.1）の平均骨侵食スコアを示す。Iso Ctrl=アイソタイプ対照。REGN844 群とアイソタイプ対照群の比較、一元配置 ANOVA 後 Kruskal Wallis 検定（*p<0.05）（GraphPad Prism Version 6.0）

これらの結果から、REGN844 はマウス CIA モデルにおいて関節炎の発現を抑制することが示された。アイソタイプ対照群では炎症及び骨侵食がそれぞれ 7/10 例及び 5/10 例で発現したのに対して、REGN844 は炎症（図 15）及び骨侵食（図 16）の発現を合わせて 19/20 例で抑制し、統計学的有意な有効性を示した。

3　副次的薬理試験

腫瘍増殖の開始及び進行において、IL-6 及びその下流エフェクターSTAT3 が関与していることを示す多くのエビデンスがある(21)。IL-6 は腫瘍細胞の発生、細胞遊走、浸潤、増殖、アポトーシス、血管新生及び分化に関与することが示されている(21)。これらは、少なくとも部分的には、IL-6 により炎症環境が作られることにより、腫瘍増殖を刺激する増殖因子が放出されることに起因すると考えられる。腫瘍増殖における IL-6 の役割を考慮して、免疫不全マウスにおける前立腺がん（DU145）及び肺がん（NCI-H1650、A549 及び Calu3）の異種移植腫瘍の増殖に対するサリルマブの作用を検討する in vivo 試験を実施した。IL-6 及び STAT-3 は前立腺及び肺腫瘍モデルのいずれにも関与することがこれまでに報告されている(21)。

免疫不全マウスを用いた in vivo ヒト前立腺腫瘍（DU145）異種移植試験において、STAT3 リン酸化に対するサリルマブの作用を検討した。さらに in vitro 試験において、前立腺がん（DU145、PC3）及び肺がん（NCI-H1975、NCI-H1650）細胞株を用い、非刺激時及び IL-6 刺激時の STAT3 リン酸化に対するサリルマブの作用を評価した。これらの試験結果は、サリルマブのがん原性リスク評価の一部として使用した [M2.6.6 の 5 項]。

3.1　In vitro 試験

3.1.1　腫瘍細胞における STAT3 の構成的及び外因性 IL-6 誘発リン酸化の抑制

[REGN88-MX-11050 試験]、 [M2.6.3.3.1]

方法

種々の培養腫瘍細胞株を用いて、IL-6 刺激の主要なシグナル伝達経路の 1 つである STAT3 活性化に対するサリルマブ の作用を検討した。チロシンリン酸化 STAT3 のウエスタンブロット解析により STAT3 活性化を評価した。STAT3 活性化の検討には、2 つの前立腺がん細胞株 DU145 及び PC3、並びに 2 つの肺がん細胞株 NCI-H1975 及び NCI-H1650 を用いた。

更に別の 2 つの培養肺がん細胞株 A549 及び Calu3 を用いてサリルマブの作用を検討した（図 17）。ウエスタンブロットにより STAT3 リン酸化を評価し、デンシトメトリー分析により定量した。

結果

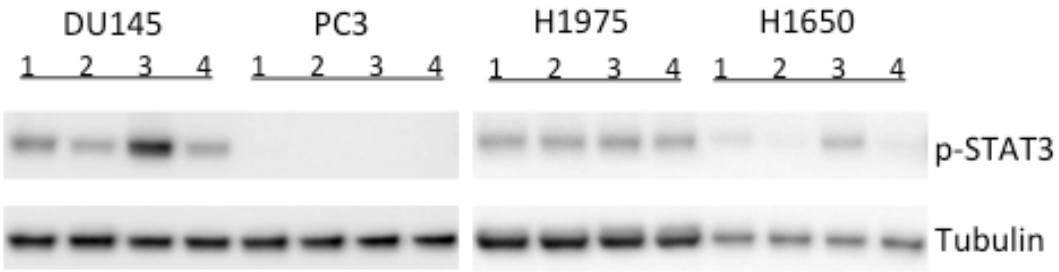
DU145、NCI-H1975 及び NCI-H1650 で非刺激時に STAT3 の構成的活性化が認められた（図 17A［列 1］）。これらのうち 2 つの細胞株（DU145 及び NCI-H1650）でサリルマブによりリン酸化 STAT3 量が低下した（図 17A［列 2］）。DU145 及び NCI-H1650 細胞に外因性 IL-6 を添加すると、リン酸化 STAT3 量が更に増加し（図 17A［列 3］）、これもサリルマブにより抑制された（図 17A［列 4］）。

A549 及び Calu3 細胞株においても非刺激時に STAT3 の構成的リン酸化がみられ（図 17B［列 1］）、その強度がサリルマブにより低下した（図 17 B［列 2］）。いずれの細胞株においても、外因性 IL-6

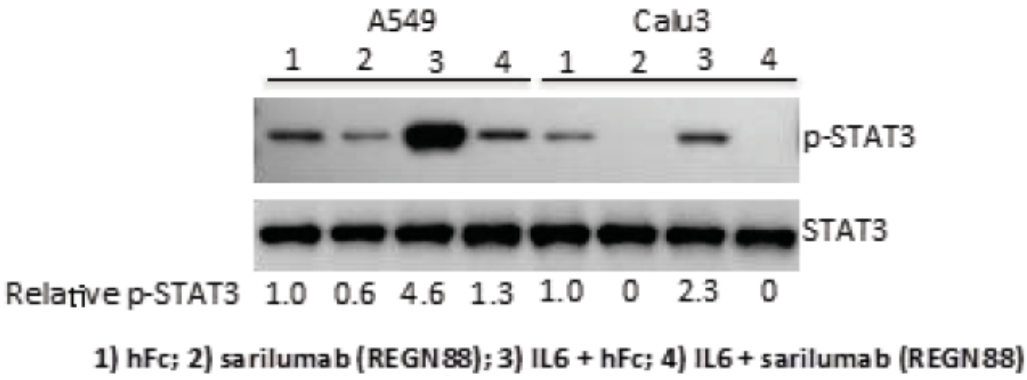
を添加すると、リン酸化 STAT3 量が更に増加し（図 17B［列 3］）、この増加もサリルマブにより抑制された（図 17B［列 4］）。In vitro で腫瘍細胞の STAT3 活性化が示されたこれらの試験結果から、サリルマブによる STAT3 活性化阻害が、後に述べる in vivo での腫瘍増殖抑制作用と関連していることが示唆される。

図 17 - サリルマブによる培養腫瘍細胞における STAT3 の構成的及び外因性 IL-6 誘発リン酸化の抑制

A



B



［列 1］hFc 対照（10 µg/mL）；［列 2］サリルマブ（10 µg/mL）；［列 3］hFc 対照（10 µg/mL）+ IL6（10 ng/mL）；［列 4］サリルマブ（10 µg/mL）+ IL6（10 ng/mL）

腫瘍細胞を通常の増殖条件下で培養した。細胞を hFc 又はサリルマブで一晩処理し、IL-6 の存在下又は非存在下で 30 分間処理した後、細胞を溶解してリン酸化 STAT3 及びチューブリンのウエスタンブロット解析を行った。独立した 4 試験のうちの代表例を示す。図 A：DU145、PC3、H1975 及び H1650 細胞株。図 B：A549 及び Calu3 腫瘍、リン酸化 STAT3 及び総 STAT3 の両方についてウエスタンブロット解析を実施し、リン酸化 STAT3 のバンド強度をデンシトメトリーで測定した。対照（1.0）に対して補正したリン酸化 STAT3 のバンド強度を各列の下に示す。

3.2 In vivo 試験

3.2.1 免疫不全マウスにおけるヒト異種移植腫瘍の増殖抑制

[REGN88-MX-11050 試験]、[M2.6.3.3.2]

方法

本モデルでは、雄 C.B.-17 重症複合免疫不全（SCID）マウスの後側腹に前立腺がん（DU145）又はヒト肺がん（NCI-H1650、A549 及び Calu3）を異種移植し、腫瘍片の総体積が約 100～150 mm^3 になった後、以下のとおり 25 mg/kg サリルマブ又はヒト IgG1 の Fc 断片（hFc 対照）の投与を行った。

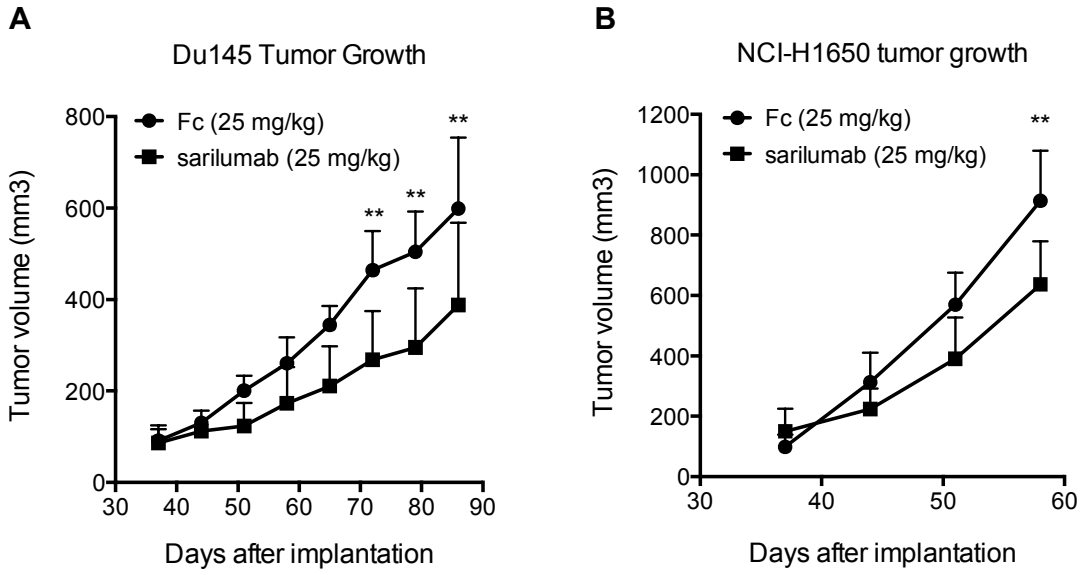
1. DU145 群：被験物質を 49 日間にわたり週 1 回、計 8 回皮下投与
2. NCI-H1650 群：被験物質を 21 日間にわたり週 1 回、計 4 回皮下投与
3. A549 群：被験物質を 18 日間にわたり週 2 回、計 6 回皮下投与
4. Calu3 群：被験物質を 21 日間にわたり週 2 回、計 7 回皮下投与

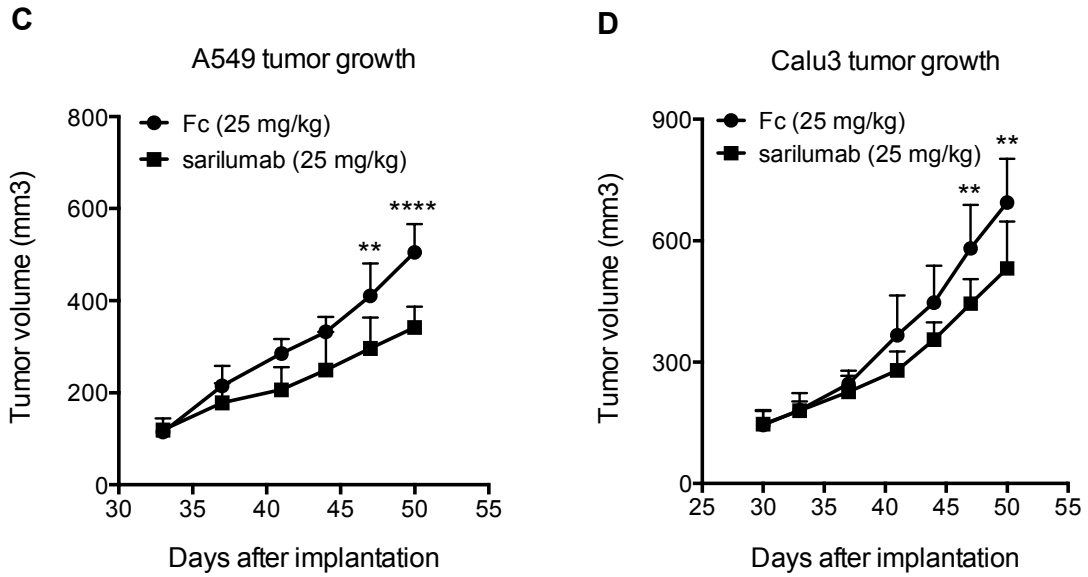
腫瘍サイズはノギスを用いて週 1 回測定した。

結果

C.B.-17 SCID 担がんマウスにサリルマブを週 1 回皮下投与したとき、これらすべての異種移植腫瘍の増殖が、同じレジメンで hFc 対照を投与したマウスと比較して統計学的有意に抑制された（図 18）。

図 18 - サリルマブによる免疫不全マウスにおける DU145、NCI-H1650、A549 及び Calu3 ヒト異種移植腫瘍の増殖抑制





生着した DU145（図 A）、NCI-H1650（図 B）、A549（図 C）及び Calu3（図 D）腫瘍担がんマウス（1 群 n=5、Calu3 は n=6）に hFc 対照タンパク質又はサリルマブを 25 mg/kg で投与した（投与レジメンは本文参照）。グラフは投与期間における平均腫瘍体積±SD の経時変化を示す。対照及びサリルマブ投与マウスにおける腫瘍サイズの差を、二元配置 ANOVA 後 Bonferroni の多重比較検定で解析した（* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.005、**** p<0.001）。

3.2.2　免疫不全マウスにおける DU145 ヒト異種移植腫瘍のアポトーシス誘導

[REGN88-MX-11050 試験]、[M2.6.3.3.2]

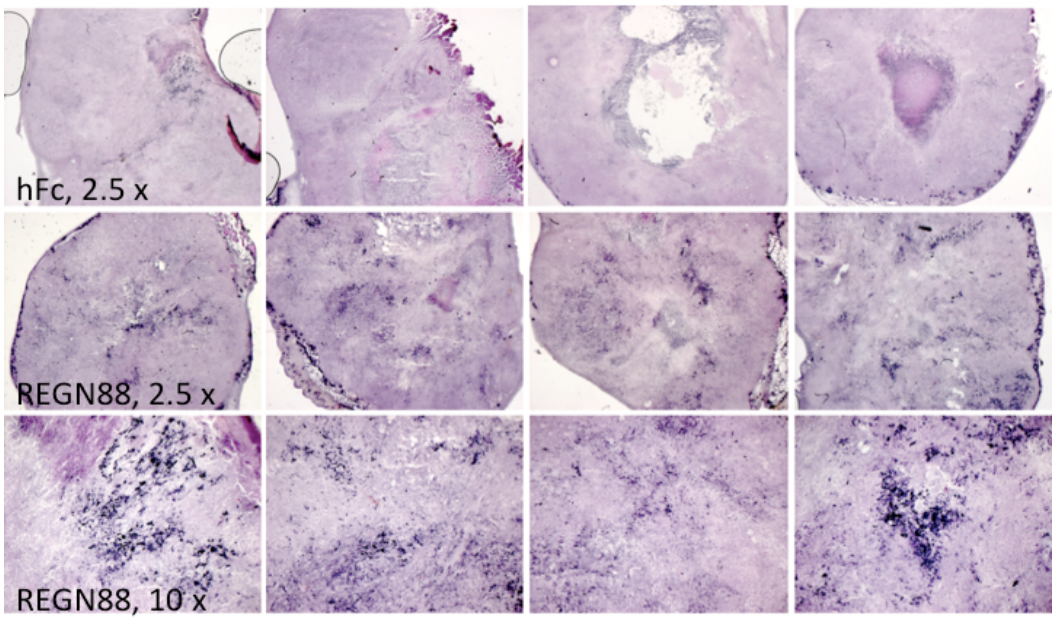
方法

サリルマブの抗腫瘍効果の機序を解明するため、3.2.1項（図 18）に示した実験の DU145 腫瘍を試験終了時に摘出し、アポトーシス（開裂カスパーゼ 3）、増殖（Ki67）及び血管新生（PECAM-1）の各マーカーによる免疫組織化学分析を実施した。

結果

サリルマブは、hFc 対照 DU145 腫瘍と比較して、開裂カスパーゼ 3 の免疫染色を増強したが（図 19）、Ki67 及び PECAM-1 染色への影響は示さなかった（Ki67 及び PECAM-1 のデータは[M4.2.1.2-1] 参照）。これらの結果から、サリルマブの腫瘍増殖抑制作用はアポトーシスの増加を介するものである可能性が示唆された。

図 19 - サリルマブ投与 DU145 異種移植腫瘍における開裂カスパーゼ 3 の免疫組織化学分析



hFc 対照又はサリルマブを投与した DU145 腫瘍（図 18A）を最終投与 24 時間後に摘出し、試料を OCT で包埋し凍結切片を作製した。開裂カスパーゼ 3 に対する免疫組織化学染色は、4 個体（それぞれの画像を横に並べて示す）から作製した凍結切片で実施した。全腫瘍断片をより完全に観察するために低倍率（2.5 倍）、及びサリルマブを投与した腫瘍の陽性染色領域を観察するために高倍率（10 倍）で撮影した。

3.2.3　免疫不全マウスの DU145 異種移植腫瘍における STAT3 リン酸化抑制

[REGN88-MX-11050 試験]、 [M2.6.3.3.2]

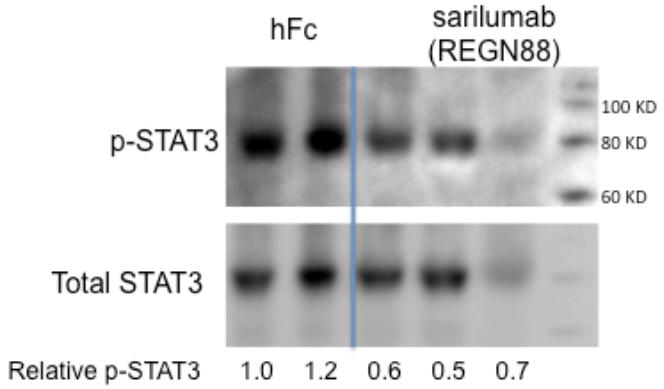
方法

STAT3 活性化に対するサリルマブの作用についても担がんモデルで評価した。DU145 腫瘍担がん C.B.-17 SCID マウスにサリルマブ又は hFc 対照タンパク質を 25 mg/kg の用量で単回皮下投与し、投与 48 時間後に腫瘍を溶解してリン酸化 STAT3 及び総 STAT3 のウエスタンブロット解析を行った。

結果

サリルマブ投与群では、腫瘍溶解物中のリン酸化 STAT3/総 STAT3 比から算出される STAT3 リン酸化が、hFc 対照と比較して約 45%抑制された（図 20）。本試験では例数が少なく統計解析を実施できなかったが、これらのデータから、サリルマブの腫瘍増殖抑制作用の機序と考えられる異種移植腫瘍 STAT3 リン酸化に対するサリルマブの in vivo 作用についての予備的エビデンスが得られた。

図 20 - サリルマブによる DU145 異種移植腫瘍の STAT3 リン酸化抑制



DU145 腫瘍担がんマウスに hFc 対照抗体又はサリルマブを 25 mg/kg で単回投与し、投与 48 時間後に腫瘍を摘出した。2 匹の対照マウスの腫瘍（列 1 及び 2）及び 3 匹のサリルマブ投与マウスの腫瘍（列 3～5）から溶解物を調整した。ウエスタンブロットによりリン酸化 STAT3 及び総 STAT3 レベルを測定し、デンシトメトリーにより定量した。各列の下にリン酸化 STAT3/総 STAT3 比を示す。

4　安全性薬理試験

独立したサリルマブ の安全性薬理試験は実施しなかったが、以下に示すように、サルにサリルマブを 100 mg/kg/週までの用量で 13 週間皮下投与、及び 50 mg/kg/週までの用量で 6 ヵ月間静脈内投与した反復投与毒性試験に安全性薬理評価項目を組み込んだ [M2.6.6 の 3.2 項]。

4.1　中枢神経系

サルを用いた反復投与毒性試験において、サルの生死及び瀕死状態について 1 日 2 回観察した。一般状態観察を非投与日及び休薬期間中は 1 日 1 回行い、投与日の観察は静脈内投与試験では 2 回又は 3 回（投与前又は投与後、及び投与終了約 1～2 時間後）、皮下投与試験では 2 回（投与前及び投与約 1～2 時間後）実施した。すべての個体について詳細な身体検査を週に 1 回以上実施した。

これらの反復投与毒性試験において、被験物質に関連する中枢神経系の一般状態の変化及び体温変化はみられなかった。

4.2　心血管系

サル反復投与毒性試験において、心拍数、血圧及び I、II、III、aVR、aVL 及び aVF 誘導心電図（ECG）を試験前、投与期間中に数回、及び休薬期間中に測定した。投与期間中の測定は、静脈内注入終了又は皮下投与の約 1～2 時間後に行った。ECG 測定は 1 回の測定につき 30 秒間以上にわたって記録した。

これらの試験において、サルの心拍数、血圧及び各誘導 ECG パラメータにサリルマブに関連する変化はみられなかった。

4.3　呼吸系

サルを用いた反復投与毒性試験において、本モジュールの4.1項に示すように一般状態観察を実施した。被験物質に関連する呼吸系の一般状態の変化はみられなかった。

5　薬力学的薬物相互作用試験

サリルマブの薬物相互作用試験は実施していない。

6　考察及び結論

サリルマブは IL-6 のヒト IL-6Rα への結合を阻害し、膜結合型 IL-6Rα 発現細胞におけるシスシグナリング、及び gp130 発現／膜結合型 IL-6Rα 非発現細胞への IL-6/sIL-6Rα の結合を介したトランスシグナリングを阻害するヒト IgG1 モノクローナル抗体である。IL-6 シグナル伝達は急性期炎症反応の誘導に主要な役割を果たしており、また、関節リウマチを含む多くの慢性炎症性疾患の病態に関与することが示されている。

In vitro での SPR-Biacore 試験において、サリルマブはヒト及びカニクイザルの IL-6Rα に高い親和性で結合し、その K_D 値はそれぞれ 54 pmol/L 及び 123 pmol/L であったことから、非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験に用いる動物種としてサルが適切であることが裏付けられた。また、フローサイトメトリー試験において、サリルマブはヒト及びアカゲザルの PBMC 上の IL-6Rα に結合したが、イヌ、ヒツジ、ミニブタ、ウサギ、ハムスター、モルモット、ラット及びマウスの PBMC への結合は検出されなかった。

In vitro での SPR-Biacore 試験及び競合的 ELISA 試験において、サリルマブは IL-6 の IL-6Rα への結合を直接阻害した。In vitro セルベースアッセイにおいて、サリルマブはヒト肝細胞がん HepG2 細胞株での IL-6 依存性 STAT3 活性化及び gp130 過剰発現／IL-6Rα 非発現の遺伝子組換え HEK-293 細胞株でのトランスシグナリング（IL-6 と sIL-6Rα の結合により誘導される）を阻害した。ADCC 及び CDC を評価する in vitro セルベースアッセイにおいて、サリルマブに関連した Fc エフェクター機能活性は検出されなかった。これらの in vitro データを総合すると、サリルマブの in vivo 作用の基礎となる主な作用機序は、IL-6/IL-6Rα 相互作用の直接阻害であることが裏付けられる。

サリルマブはマウスの IL-6Rα に結合しない。したがって、野生型マウスを用いた毒性試験及び in vivo 薬理試験を実施するために、マウス IL-6Rα に対する相同抗体 REGN844 を作製した。REGN844 はマウス IL-6Rα に結合し、その親和性（K_D：193 pmol/L）はサリルマブのヒト（K_D：54 pmol/L）及びサル（K_D：123 pmol/L）の IL-6Rα への親和性と大きく異ならなかった。競合 ELISA において、REGN844 はヒト IL-6 のマウス IL-6Rα への結合を阻害し、その IC_{50} 値は 4 nmol/L（リガンドの使用量に対する理論上の最低値）であった。また、REGN844 は IL-6 により誘発されるマウス B 細胞ハイブリドーマ細胞株の増殖を抑制し、IC_{50} は 110 pmol/L であった。

ヒト IL-6 及びヒト IL-6Rα の細胞外ドメインをそれに相当するマウスの遺伝子産物の代わりに発現するダブルヒト化 *Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウスを用いて、サリルマブの病態モデル試験を実施した。野生型マウスの病態モデル試験には、マウス相同抗体の REGN844 を使用した。サリルマブ及び REGN844 は、それぞれ *Il6*$^{hu/hu}$ *Il6ra*$^{hu/hu}$ マウス及び野生型マウスにおいて、テレビン油投与により誘発された急性期炎症反応の主要なバイオマーカーである SAA の増加を抑制した。サリルマブ又は REGN844 を投与したマウスにおいて、循環血中 IL-6 濃度（それぞれヒト又はマウスの IL-6）が増加する傾向がみられたが、これは予想される薬理作用であり、ヒト及びサルで抗 IL-6Rα 処置後に観察されているとの報

告と一致する(30)(32)(33)。サリルマブ存在下でみられた血清中 IL-6 濃度の上昇は、サリルマブにより IL-6Rα が阻害された結果、IL-6 クリアランスが低下したことによるものと考えられる。また、REGN844 は野生型マウスの CIA モデルで関節炎の発現率、重症度及び骨侵食を抑制した。サリルマブ及び相同抗体 REGN844 を用いた上記 in vitro 及び in vivo 薬理試験から、REGN844 はサリルマブと同様の薬理学的特性を示し、マウス毒性試験で REGN844 を使用することは妥当であることが確認された。

腫瘍進行には IL-6 及び STAT3 シグナル伝達が関与していることから、in vitro での腫瘍細胞増殖、in vitro 及び in vivo での STAT3 リン酸化、並びに in vivo での異種移植腫瘍増殖に対するサリルマブの作用を検討する副次的薬理試験を実施した。In vitro でサリルマブはヒト前立腺がん（DU145）及び肺がん（NCI-H1650）細胞株における IL-6 誘発 STAT3 リン酸化を抑制し、ヒト肺がん（A549 及び Calu3）細胞株における非刺激時及び IL-6 誘発時の STAT3 活性化を阻害した。サリルマブは in vitro で IL-6 により誘発されたヒト B 細胞株（DS-1）の増殖も用量依存的に抑制した。In vivo でサリルマブは免疫不全マウスにおける DU145、A549、Calu3 及び NCI-H1650 異種移植腫瘍の増殖を抑制した。前立腺がん DU145 異種移植腫瘍については、免疫組織化学分析により、増殖抑制が開裂カスパーゼ 3 免疫染色の増強と関連することが示されたことから、サリルマブはアポトーシスを介して腫瘍増殖抑制作用を発揮すると考えられる。DU145 異種移植腫瘍における STAT3 リン酸化の抑制を示唆する予備的 in vivo データから in vitro 結果が裏付けられ、サリルマブ投与後にこの転写因子の活性化が抑制されることが腫瘍増殖の抑制に関与していると考えられる。

独立したサリルマブの安全性薬理試験は実施していないが、サルを用いた反復投与毒性試験においては、中枢神経系パラメータ（一般状態、体温など）、心血管系パラメータ（心拍数、血圧、ECG 検査など）の変化又は呼吸系の一般状態の変化は認められなかった。これらの試験においては、サリルマブを 100 mg/kg/週までの用量で 13 週間皮下投与及び 50 mg/kg/週までの用量で 6 ヵ月間静脈内投与した。

要約すると、サリルマブはヒト IL-6Rα に強力に結合し、IL-6 により誘発される受容体シグナル伝達を阻害した。サリルマブはシスシグナリング経路を阻害するとともに、gp130 発現／膜結合型 IL-6Rα 非発現細胞において IL-6/sIL-6Rα 複合体により誘導されるトランスシグナリングも阻害した。ヒト IL-6 と IL-6Rα を発現するマウスにおいて、サリルマブはテレビン油により誘発される急性期タンパク SAA の増加を抑制したことから、in vivo において薬理学的機序に一致する抗炎症作用が確認された。マウス相同抗体 REGN844 は、野生型マウスの試験で CIA モデルにおける炎症及び骨侵食を抑制し、テレビン油誘発炎症モデルにおける SAA の増加を抑制した。サリルマブは、その作用機序と一致して、SCID マウスにおける異種移植腫瘍の増殖を抑制した。この作用は、がん細胞の増殖の誘発に関与している転写因子 STAT3 のリン酸化の抑制と関連していた。サルを用いた反復投与毒性試験において、サリルマブは中枢神経系、心血管系及び呼吸系に影響を及ぼさなかった。最後に、マウス相同抗体 REGN844 は in vitro 及び in vivo においてサリルマブと同様に作用したことから、マウスを用いた薬理試験及び毒性試験で REGN844 を使用することの妥当性が確認された。

結論として、上述の in vitro 及び in vivo 試験の結果から、サリルマブは意図した IL-6Rα 標的に結合し、IL-6 シグナル伝達を阻害し、疾患に関連する炎症モデルにおいて抗炎症薬として機能することが示され、関節リウマチを予定臨床適応症とする妥当性が確認された。

7　図表

図表は本文中に示した。

参 考 文 献

1. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. N Engl J Med. 2011;365:2205-19.
2. Firestein GS. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. J Clin Rheumatol. 2005;11:S39-44.
3. Srirangan S, Choy EH. The role of interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. Ther Adv Musculoskel Dis. 2010;2:247-56.
4. Choy EHS, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, et al. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. Arthritis Rheum. 2002;46:3143-50.
5. Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 2004;50:1761-9.
6. Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, Pavelka K, Broll J, Balint G, et al. Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. Arthritis Rheum. 2006;54:2817-29.
7. Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, Alecock E, et al. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. Lancet. 2008;371:987-97.
8. Suematsu S, Matsusaka T, Matsuda T, Ohno S, Miyazaki J, Yamamura K, et al. Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:232-5.
9. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. Nature. 1988;332:83-5
10. Kishimoto, T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. Arthritis Res Ther. 2006;8(Suppl2):S2:1-6.
11. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature. 2006;441:235-8.
12. Pesce B, Soto L, Sabugo F, Wurmann P, Cuchacovich M, Lopez MN, et al. Effect of interleukin-6 receptor blockade on the balance between regulatory T cells and T helper type 17 cells in rheumatoid arthritis patients. Clin Exp Immunol. 2012;171:237-42.
13. Samson M, Audia S, Janikashvili N, Ciudad M, Trad M, Fraszczak J, et al. Inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheumatol. 2012;64:2499-503.

14. Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, et al. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. Science. 1988;241:825-8.
15. Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Günther M, Graeve L, Buse G, et al. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. Eur J Immunol. 1993;23:473-80.
16. Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. Cytokine. 1992;4:96-100.
17. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. Cell. 1989;58:573-81.
18. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. J Leukoc Biol. 2006;80:227-36.
19. Macdonald LE, Karow M, Stevens S, Auerbach W, Poueymirou WT, Yasenchak J, et al. Precise and in situ genetic humanization of 6 Mb of mouse immunoglobulin genes. Proc Natl Acad Sci USA. 2014;111:5147-52.
20. Murphy AJ, Macdonald LE, Stevens S, Karow M, Dore AT, Pobursky K, et al. Mice with megabase humanization of their immunoglobulin genes generate antibodies as efficiently as normal mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2014;111:5153-8.
21. Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang, Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. Cancer Treat Rev. 2012;38:904-10.
22. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology: The immune system in health and disease. Chapter 9. 5th ed. New York: Garland Science; 2001.
23. Maenaka K, van der Merwe PA, Stuart DI, Jones EY, Sondermann P. The human low affinity Fc gamma receptors IIa, IIb, and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties. J Biol Chem. 2001;276:44898-904.
24. Sondermann P, Kaiser J, Jacob U. Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. J Mol Biol. 2001;309:737-49.
25. Gazzano-Santoro H, Ralph P, Ryskamp TC, Chen AB, Mukku, VR. A non-radioactive complement-dependent cytotoxicity assay for anti-CD20 monoclonal antibody. J Immunol Methods. 1997;202:163-71.
26. Flieger D, Renoth S, Beier I, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf I. Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. Cell Immunol. 2000;204:55-63.
27. Gershenwald JE, Fong YM, Fahey TJ, Calvano SE, Chizzonite R, Kilian PL, et al. Interleukin 1 receptor blockade attenuates the host inflammatory response. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87:4966-70.
28. Zhang N, Ahsan MH, Purchio AF, West DB. Serum amyloid A-luciferase transgenic mice: response to sepsis, acute arthritis, and contact hypersensitivity and the effects of proteasome inhibition. J. Immunol. 2005;174:8125-34.

29. Valenzuela DM, Murphy AJ, Frendewey D, Gale NW, Economides AN, Auerbach W, et al. High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat Biotechnol. 2003;21:652-9.
30. Uchiyama Y, Yoshida H, Koike N, Hayakawa N, Sugita A, Nishimura T, et al. Anti-IL-6 receptor antibody increases blood IL-6 level via the blockade of IL-6 clearance, but not via the induction of IL-6 production. Int Immunopharmacol. 2008;8:1595-601.
31. Cho YG, Cho ML, Min SY, Kim HY. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. Autoimmun Revi 2007;7:65-70
32. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. Blood. 2008;112:3959-64.
33. Galeotti C, Boucheron A, Guillaume S, Kone-Paut I. Sustained remission of multicentric Castleman Disease in children treated with tocilizumab, an anti-interleukin-6 receptor antibody. Mol Cancer Ther. 2012;11:1623-6.

サノフィ株式会社

サリルマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.3 薬理試験概要表

Total number of pages: 22

目　　次

表　目　次 3

1　　薬理試験一覧表 4

2　　効力を裏付ける試験 10

3　　副次的薬理試験 19

4　　安全性薬理試験 21

5　　薬力学的薬物相互作用試験 22

表　目　次

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program 4
表 2.6.3.2.1 A - Primary Pharmacodynamics – Binding Affinity (SPR-BiaCore) 10
表 2.6.3.2.1 B - Primary Pharmacodynamics – Binding Affinity (SPR-BiaCore) 11
表 2.6.3.2.2 - Primary pharmacodynamics - in vitro 13
表 2.6.3.2.3 - Primary pharmacodynamics - in vivo 17
表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics – in vitro 19
表 2.6.3.3.2 - Secondary pharmacodynamics – in vivo 20
表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology 21

1　薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – Overview - study program

Overview of Studies				**Test Article: Sarilumab**
Type of Study	**Test System**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Primary Pharmacodynamics				
Determination of the kinetic binding parameters for the interaction of sarilumab with recombinant human, cynomolgus monkey, and mouse IL-6Rα under neutral conditions (non-GLP).	Using Surface Plasmon Resonance (SPR)-Biacore, sarilumab was captured on the chip surface by an immobilized anti-human Fcγ antibody; IL-6 receptor alpha proteins (with C-terminal His tags) were injected over the captured sarilumab surface. Study conducted at pH 7.4.	[redacted] USA	REGN88-MX-07016	[4.2.1.1-1]
Determination of the in vitro binding ability of sarilumab to IL-6Rα expressed on PBMCs from 11 mammalian species, including rodents, non-rodents, non-human primates and humans (non-GLP).	Using a biotinylated chimeric version of sarilumab, binding of sarilumab to PBMCs from various species was determined by fluorescent flow cytometry.	[redacted] USA	REGN88-MX-11078	[4.2.1.1-2]

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – Overview - study program (Continued)

Overview of Studies				**Test Article: Sarilumab**
Type of Study	**Test System**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Evaluation of effector function activity via the sarilumab Fc domain (ADCC and CDC) (non-GLP).	In vitro cell-based assays were developed for measurement of ADCC and CDC. KG-1, XG-1, and HepG2 cells were chosen as target cells based on their relative expression level of IL6-Rα determined by flow cytometry (high, medium and low, respectively). Daudi lymphoma cells, treated with rituximab, were used as a positive control. For ADCC assay:Target cells (KG-1, XG-1 or HepG2) were pre-incubated with serial dilutions of REGN88 prior to the addition of human PBMCS at a ratio of [redacted]:1 (target cell:PBMC). After a four hour incubation, cell lysis was determined by measuring release of lactate dehydrogenase into the co-culture supernatant. For CDC assay: Target cells (KG-1, XG-1 or HepG2) were incubated with serial dilutions of REGN88 prior to the addition of normal human serum containing complement components. Daudi cells treated with rituximab were used as a positive control. Cell survival was measured using fluorometric assay, CellTiter-Blue® (Promega).	[redacted] USA	REGN88-MX-07015	[4.2.1.1-3]
Evaluation of complement activation due to the formation of immune complexes (non-GLP).	Using Surface Plasmon Resonance (SPR)-BiaCore, recombinant human C1q protein was captured on the chip surface by immobilized sarilumab.	[redacted] USA	REGN88-MX-07015	4.2.1.1-3
Determination of the kinetic binding parameters for the interaction of sarilumab with recombinant human high- and low-affinity Fcγreceptors.	Using Surface Plasmon Resonance (SPR)-BiaCore, sarilumab was captured on the chip surface by immobilized recombinant human Fcγ receptors.	[redacted] USA	REGN88-MX-07015	4.2.1.1-3

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – Overview - study program (Continued)

Overview of Studies				**Test Article: Sarilumab**
Type of Study	**Test System**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Determination of sarilumab blockade of IL-6Rα binding to IL-6	Two assays were developed to determine the ability of sarilumab to block binding of human IL-6 to human IL-6Rα: 1. A SPR-(Biacore) assay was used to determine the ability of Sarilumab to block human IL-6 binding to the extracellular domain of monomeric human IL-6Rα with a C terminal myc-myc-hexahistidine tag (IL-6Rα-mmH) captured on a sensor chip. 2. A microtiter plate-based competition ELISA was used to determine the potency (IC50 value) of Sarilumab in blocking the binding of dimeric human IL-6Rα with a C-terminal human IgG1 Fc tag (IL 6Rα-hFc) to plate-coated human IL-6.	[redacted] USA	REGN88-MX-14072	[4.2.1.1-4]
Determination of sarilumab inhibition of IL-6 induced *trans*-signaling by specifically binding to soluble IL-6Rα	To assess the ability of sarilumab to block IL-6 *trans*-signaling in vitro, a human gp130-overexpressing human embryonic kidney/STAT3/ luciferase reporter cell line (HEK293/gp130/STAT3-Luc) was developed which is activated when incubated with the complex of human IL-6 and soluble human IL-6Rα, but not with human IL-6 alone.	[redacted] USA	REGN88-MX-14072	4.2.1.1-4

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – Overview - study program (Continued)

Overview of Studies				**Test Article: Sarilumab**
Type of Study	**Test System**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Effect of sarilumab on IL-6-induced signal transduction in HepG2 cells	A human hepatocytic cell line (HepG2) endogenously expressing IL-6Rα and gp130 was transiently transfected with a STAT3-luciferase reporter plasmid and used to evaluate the ability of sarilumab to block human IL-6-induced receptor signaling.	[redacted] USA	REGN88-MX-11077	[4.2.1.1-5]
Evaluation of the ability of sarilumab to inhibit IL-6-induced proliferation of a human B-cell line in vitro	The ability of sarilumab to block IL-6-induced proliferation of human DS-1 cells (a B-cell line derived from an immunodeficient patient with intestinal lymphangiectasia and lymphoma) was evaluated in vitro in the presence of exogenous human IL-6.	[redacted] USA	REGN88-MX-11077	4.2.1.1-5
In vivo pharmacodynamic effect of Sarilumab in a murine acute inflammation model	The pharmacodynamic effect of sarilumab on Serum Amyloid A (SAA) and circulating human IL-6 concentrations was evaluated in a mouse model of turpentine-induced inflammation using double humanized IL-6/IL-6Rα mice.	[redacted] USA	REGN88-MX-13129	[4.2.1.1-6]

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – Overview - study program (Continued)

Overview of Studies				**Test Article: REGN844**
Type of Study	**Test System**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Determination of the kinetic binding parameters for the interaction of anti-mouse IL-6Rα, REGN844, with mouse recombinant IL-6Rα monomer and dimer under neutral conditions (non-GLP).	Using Surface Plasmon Resonance (SPR)-Biacore, REGN844 was captured on the chip surface by an immobilized anti-mouse Fcγ antibody and IL-6Rα monomer (with MMH tag) or dimer (with hFc tag) were injected over the captured REGN844 surface. Study conducted at pH 7.4.	[redacted] USA	REGN844-MX-09073	[4.2.1.1-7]
Evaluation of the inhibition of human IL-6 binding to mouse IL-6Rα by REGN844.	A competition ELISA blocking assay was used to evaluate and compare the ability of REGN844 to antagonize mIL-6Rα-hFc binding to plate-coated human IL-6.	[redacted] USA	REGN844-MX-09074	[4.2.1.1-8]
Evaluation of the ability of REGN844 to inhibit exogenous IL-6-induced proliferation of mouse B-cell hybridoma cells in vitro.	REGN844 inhibition of mouse B9 cell (a subclone of the hybridoma cell line B13.29) proliferation induced by exogenous IL-6 was determined with a WST-8 colorimetric assay.	[redacted] USA	REGN844-MX-09075	[4.2.1.1-9]
In vivo pharmacodynamic effect of IL-6Rα blockade in mice by REGN844	The pharmacodynamic effect of REGN844 on SAA and circulating mouse IL-6 concentrations was evaluated in a mouse model of turpentine-induced inflammation using wild type mice.	[redacted] USA	REGN844-MX-09076	[4.2.1.1-10]
In vivo pharmacodynamics activity of mouse IL-6Rα blockade in a murine model of rheumatoid arthritis by REGN844 antibody	The pharmacodynamics effect of REGN844 on the development of joint inflammation and bone erosion in the collagen induced arthritis mouse model in wild type mice.	[redacted] USA	REGN844-MX-14076	[4.2.1.1-11]

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – Overview - study program (Continued)

Overview of Studies				**Test Article: Sarilumab**
Secondary Pharmacodynamics				
Type of Study	**Test System**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Determination of the effects of sarilumab on the activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in cultured tumor cells.	The effect of sarilumab on the activation of STAT3 was evaluated in cultured tumor cells by western blotting for tyrosine-phosphorylated STAT3.	[redacted] USA	REGN88-MX-11050	[4.2.1.2-1]
Determination of the effect of sarilumab on the growth of human tumor xenografts in immunocompromised mice.	Human tumor xenografts were established in C.B.-17 SCID mice and tumor size was measured weekly following treatment with sarilumab.	[redacted] USA	REGN88-MX-11050	4.2.1.2-1
Determination of the effects of sarilumab on apoptosis in DU145 tumor xenografts in immunocompromised mice by immunohistochemistry measurement of cleaved caspase-3	The effect of sarilumab on tumor growth was evaluated in a mouse model. DU145 prostate tumor xenografts implanted in the hind flank of male C.B.-17 SCID mice and grown to ~100-125 mm^3 total volume. Sariumab or an isotype control antibody (25 mg/kg SC) was then administered for a total of 8 doses over 49 days. Tumors were harvested 24 hours after the last sarilumab dose and embedded and frozen for immunohistochemistry staining for cleaved caspase-3.	[redacted] USA	REGN88-MX-11050	4.2.1.2-1
Safety Pharmacology				
Safety pharmacology endpoints were integrated into the GLP-compliant toxicology studies conducted in cynomolgus monkeys (see [M2.6.6.3.2]).				
Pharmacodynamic Drug Interactions				
Pharmacodynamic drug interaction studies with sarilumab and other drugs were not conducted.				

SC=subcutaneous, GLP=Good Laboratory Practice, SPR=surface plasmon resonance, IL-6Rα=interleukin-6 receptor alpha subunit, STAT=signal transduction and activator of transcription, IL-6=interleukin-6, ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay, ADCC=antibody-dependent cellular cytotoxicity, CDC=complement-dependent cytoxicity, HepG2 cells= A human hepatocellular liver carcinoma cell line, KG-1 cells= myelogenous CD34+ leukemia cell line, XG-1 cells=human myeloma cell line, PBMCs=peripheral blood mononuclear cells, DS-1 cells=a human lymphoma B cell line

2　効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2.1 A - Primary Pharmacodynamics – Binding Affinity (SPR-BiaCore)

Binding Affinity Studies				**Test Article: Sarilumab**	
Summary of Kinetic Binding Parameters for the Interaction of Sarilumab with IL-6 receptor Proteins at pH 7.4, 25°C (sarilumab captured by anti-human Fc sensor surface)				**Study Number: REGN88-MX-07016** **Location: [4.2.1.1-1]**	
IL-6 receptor Species	**pH**	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (nmol/L)**	**$t_{1/2}$ (minutes)**
Human	7.4	8.25×10^5	4.63×10^{-5}	0.0544	252
Monkey		7.28×10^5	8.93×10^{-5}	0.123	132
Mouse		No binding observed			

k_a=association rate constant, k_d= dissociation rate constant, K_D=equilibrium dissociation constant, $t_{1/2}$ = half-life

表 2.6.3.2.1 B - Primary Pharmacodynamics – Binding Affinity (SPR-BiaCore)

Binding Affinity Studies		**Test Article: Sarilumab**
Summary of Kinetic Binding Parameters for the Interaction of Sarilumab with Recombinant Human Fcγ and C1q Proteins at pH 7.4, 25°C (sarilumab captured by polyclonal goat anti-human kappa chain $(Fab')_2$ fragment sensor surface)		**Study Number: REGN88-MX-07015** **Location: [4.2.1.1-2]**
Fcγ Protein	**pH**	**K_D (nmol/L)**
		Sarilumab (2899 RU)	**Sarilumab (2841 RU) + human IL-6 receptor (1230 RU)**
FcγRI	7.4	0.5	0.4
FcγRIIa (R131)		700	900
FcγRIIa (H131)		2000	2800
FcγRIIb		1700	3400
FcγRIIIa (V176)		900	1200
FcγRIIIa (F176)		1100	1500
FcγRIIIb		3100	4000
C1q		ND[a]	ND[a]

表 2.6.3.2.1 B - Primary Pharmacodynamics – Binding Affinity (SPR-BiaCore) (Continued)

Binding Affinity Studies						**Test Article: Sarilumab**
Summary of Kinetic Binding Parameters for the Interaction of Sarilumab Alone or Bound to IL-6 in the Absence or Presence of Clustering Antibody at pH 7.4 (complexed and clustered forms of sarilumab captured by polyclonal goat anti-human kappa chain $(Fab')_2$ fragment sensor surface)						
Fcγ Protein	**pH**	**K_D (nmol/L)**				
		Sarilumab	**Sarilumab + $(Fab')_2$[b]**	**Sarilumab + hIL-6R-mFc[c]**	**Sarilumab + hIL-6R-mFc + $(Fab')_2$[d]**	**hIL-6R-mFc[e]**
FcγRI	7.4	5.9	6.3	4.1	4.8	5.7
FcγRIIa (R131)		7600	4200	2100	800	500
FcγRIIa (H131)		5700	3200	1800	1500	300
FcγRIIb		19100	7600	12800	30000	300
FcγRIIIa (V176)		2500	700	300	400	400
FcγRIIIa (F176)		8200	5000	2900	2100	1000
FcγRIIIb		13300	5700	9900	5200	ND

RU=response units, K_D=equilibrium dissociation constant

a ND=Not determined. K_D could not be calculated due a minimal level of detectable binding interaction.

b Sarilumab was clustered with an anti-human kappa $(Fab')_2$ antibody.

c Sarilumab was complexed with soluble IL-6 receptor His-tagged monomer.

d Sarilumab complexed to soluble IL-6 receptor His-tagged monomer was clustered with an anti-human kappa $(Fab')_2$ antibody.

e Soluble IL-6 receptor His-tagged monomer.

表 2.6.3.2.2 - Primary pharmacodynamics - In vitro

In Vitro Studies	**Test Article: Sarilumab**
Sarilumab binding to IL-6Rα expressed on PBMCs from multiple species	**Study Number: REGN88-MX-11078** **Location: [4.2.1.1-2]**
Parameter Measured	**Noteworthy Findings**
The binding of sarilumab to IL-6Rα endogenously expressed on PBMCs from 11 mammalian species, including rodents, non-rodents, non-human primates and humans, was evaluated by fluorescent flow cytometry.	Chimeric sarilumab binds to human and rhesus PBMCs as well as a subset of marmoset PBMCs. Chimeric sarilumab did not bind PBMCs from dog, sheep, rabbit, mini-pig, hamster, guinea pig, rat or mouse.
Evaluation of effector function activity via the sarilumab Fc domain (ADCC and CDC)	**Study Number: REGN88-MX-07015** **Location: [4.2.1.1-3]**
Parameter Measured	**Noteworthy Findings**
PBMC-induced ADCC and serum complement-induced CDC measured by determination of intracellular LDH release, which occurs following cell death or a cell viability assay.	Sarilumab (0.169 pmol/L to 10 nmol/L) did not induce ADCC or CDC in HepG2, XG-1, or KG-1 cells.

表 2.6.3.2.2 - Primary pharmacodynamics - In vitro (Continued)

In Vitro Studies	**Test Article: Sarilumab**
Sarilumab blocks binding of human IL-6 to human IL-6Rα (ELISA)	**Study Number: REGN88-MX-14072** **Location: [4.2.1.1-4]**
Parameter Measured	**Noteworthy Findings**
The ability of sarilumab to block binding of dimeric IL-6Rα-hFc to plate-coated human IL-6 was determined in a competition ELISA. Plate-bound human IL-6Rα-hFC was detected with an HRP-conjugated goat anti-human Fc antibody and measurement of absorbance at 450nm.	Sarilumab blocked binding of dimeric IL-6Rα-Fc (100pM fixed concentration) to plate-coated IL-6 with an IC_{50} of 108 pmol/L.
Sarilumab blocks binding of human IL-6 to human IL-6Rα (SPR-BiaCore)	**Study Number: REGN88-MX-14072** **Location: 4.2.1.1-4**
Parameter Measured	**Noteworthy Findings**
The ability of sarilumab to prevent the binding of human IL-6 to surface-captured monomeric human IL-6Rα was determined with SPR-BiaCore	Sarilumab completely blocked binding of 200 nmol/L human IL-6 to surface-captured monomeric human IL-6Rα extracellular domain with a C-terminal myc-myc-hexahistidine tag (IL-6Rα-mmH) at 25°C and pH 7.4.
Sarilumab blocks gp130-dependent trans-signaling induced by a combination of IL-6 and soluble IL-6Rα in IL-6Rα-deficient cells	**Study Number: REGN88-MX-14072** **Location: 4.2.1.1-4**
Parameter Measured	**Noteworthy Findings**
A luminescence assay was used to quantify IL-6-induced STAT3 activation in a gp130-expressing luciferase reporter cell line.	Sarilumab completely blocked signaling in a human gp130-overexpressing human embryonic kidney/STAT3/ luciferase reporter cell line (HEK293/gp130/STAT3-Luc) induced by a mixture of 1 nmol/L IL-6Rα and 12.5 nmol/L IL-6, with an IC_{50} of 860 pmol/L; signaling could not be induced by IL-6 alone in this assay system.

表 2.6.3.2.2 - Primary pharmacodynamics - In vitro (Continued)

In Vitro Studies	**Test Article: Sarilumab**
Sarilumab inhibits IL-6 signal transduction via IL-6R and gp130 activation in HepG2 cells	**Study Number: REGN88-MX-11077** **Location: [4.2.1.1-5]**
Parameter Measured	**Noteworthy Findings**
The ability of sarilumab to block IL-6 activation of the STAT3 signaling pathway was measured in a reporter gene assay using HepG2 human hepatocarcinoma cells, transiently transfected with a STAT3 (response element X5)-luciferase-IRES-eGFP reporter gene.	Sarilumab inhibited IL-6 (50 pmol/L fixed concentration)-mediated luciferase activity in transiently transfected HepG2 cells (IC_{50} of ~ 150 pmol/L) No increased luciferase activity was detected in the cells when incubated with sarilumab in the absence of IL-6.
Sarilumab to inhibits IL-6-induced proliferation of a human B-cell line in vitro	**Study Number: REGN88-MX-11077** **Location: [4.2.1.1-5]**
The ability of sarilumab to block IL-6-induced cell proliferation was evaluated in the DS-1 human B cell line using the redox indicator, AlamarBlue that undergoes a colorimetric change as a consequence of cellular metabolic activity.	Sarilumab inhibited IL-6 (1.0 pmol/L fixed concentration)-induced proliferation of DS-1 cells in a dose-dependent manner with an IC_{50} of ~ 140 pmol/L.

STAT = Signal transduction and activator of transcription; ADCC = Antibody dependent cellular cytotoxicity; CDC = Complement dependent cytotoxicity; SPR = Surface plasmon resonance; HepG2 cells = A human hepatocellular liver carcinoma cell line; XG-1 cells = A human lymphoma cell line; PBMC = Peripheral blood mononuclear cells; KG-1 cells = A human lymphoma cell line, PBMC=peripheral blood mononuclear cell, KD=equilibrium dissociation constant.

表 2.6.3.2.2 - Primary pharmacodynamics - In vitro (Continued)

In Vitro Studies	**Test Article: REGN844**
Determination of REGN844 binding affinity for mIL-6Rα protein	**Study Number: REGN844-MX-09073** **Location: [4.2.1.1-7]**
Parameter Measured	**Noteworthy Findings**
The K_D value for the binding of captured REGN844 to mouse IL-6Rα monomer (mIL-6Rα-MMH) was determined for REGN844 using SPR-BiaCore at 25°C, pH 7.4.	REGN844 bound mouse IL-6Rα monomer with a K_D of 193 pmol/L.
Inhibition of IL-6 binding to mouse IL-6Ra by REGN844	**Study Number: REGN844-MX-09074** **Location: [4.2.1.1-8]**
Parameter Measured	**Noteworthy Findings**
The ability of REGN844 to block the interaction of dimeric mIL-6Rα-hFc with plate-coated human IL-6 was demonstrated using a competition ELISA.	REGN844 blocks a constant concentration of 10 nmol/L mouse IL-6Rα-Fc from binding plate-coated hIL-6 with an IC_{50} of ~4 nmol/L; (Lot # [redacted] - Labeled Drug Product)
In vitro inhibition of IL-6-induced B cell signaling by REGN844	**Study Number: REGN844-MX-09075** **Location: [4.2.1.1-9]**
Parameter Measured	**Noteworthy Findings**
Mouse B9 cell proliferation in vitro was quantified with a WST-8 colorimetric assay. Proliferation (cell numbers) was monitored as the increase in absorbance at 450 nm as the tetrazolium salt, WST-8, was converted to a yellow formazan dye by intracellular dehydrogenase.	REGN844 inhibited human IL-6 (0.5 pmol/L fixed concentration) and mouse IL-6 (0.5 pmol/L fixed concentration) -stimulated proliferation of mouse B9 cells (a subclone of the hybridoma cell line B13.29) with IC_{50} values of 60 pmol/L and 110 pmol/L, respectively.

STAT = Signal transduction and activator of transcription; ADCC = Antibody dependent cellular cytotoxicity; CDC = Complement dependent cytotoxicity; SPR = Surface plasmon resonance; HepG2 cells = A human hepatocellular liver carcinoma cell line; XG-1 cells = A human lymphoma cell line; PBMC = Peripheral blood mononuclear cells; KG-1 cells = A human lymphoma cell line, PBMC=peripheral blood mononuclear cell, KD=equilibrium dissociation constant.

表 2.6.3.2.3 - Primary pharmacodynamics - In vivo

In Vivo Studies				**Test Article: Sarilumab**
In vivo pharmacodynamics activity of IL-6Rα blockade in humanized mice by sarilumab (REGN88)				**Study Number: REGN88-MX-13129** **Location: [4.2.1.1-6]**
Species/Strain/ Gender/Animals per group	**Method of Sarilumab Administration**	**Dose of Test Article**	**Parameters Measured**	**Noteworthy Findings**
Mice Double humanized *Il6*$^{hu/hu}$*Il6ra*$^{hu/hu}$ Male 3/group	SC	0.015 to 15 mg/kg	SAA protein in serum Human IL-6 in serum	A single 15mg/kg SC dose of sarilumab significantly reduced turpentine-induced SAA, relative to isotype control treated animals, and a dose-dependent trend towards reduction of a turpentine-induced elevation SAA was observed at sarilumab doses of 5 mg/kg and 1.5 mg/kg. A trend towards increased circulating human IL-6 concentrations was observed in mice receiving sarilumab doses of 1.5 mg/kg or greater

SC=subcutaneous, SAA=serum amyloid A, mIl-6=mouse IL-6, IL-6=interleukin-6, IL-6Rα=interleukin-6 receptor alpha subunit

表 2.6.3.2.3 - Primary pharmacodynamics - In vivo (Continued)

In Vivo Studies				**Test Article: REGN844**
REGN844-mediated blockade of of IL-6Rα-mediated signaling in turpentine-challenged mice				**Study Number: REGN844-MX-09076** **Location: [4.2.1.1-10]**
Species/Strain/ Gender/Animals per group	**Method of Sarilumab Administration**	**Dose of Test Article**	**Parameters Measured**	**Noteworthy Findings**
Mice CD-1 C57/BL6 Female 3/group	SC	0.015 to 15 mg/kg	SAA protein in serum Mouse IL-6 in serum	At single doses of either 5mg/kg or 25mg/kg REGN844 significantly reduced turpentine induced elevations in serum SAA protein in C57BL/6 mice. At single doses of either 5mg/kg or 15mg/kg REGN844 significantly reduced turpentine induced elevations in serum SAA protein in CD-1 mice. A trend towards increased circulating mouse IL-6 concentrations was observed in mice receiving REGN844 doses >0.5mg/kg
REGN844 blockade of joint inflammation and bone erosion in mice				**Study Number: REGN844-MX-14076** **Location: [4.2.1.1-11]**
Mice DBA/1J Male 10/group	SC	10 or 30 mg/kg	Paw redness and swelling Bone erosion	Twice-weekly doses of either 10 mg/kg or 30 mg/kg REGN844 blocked collagen-induced paw inflammation and bone erosion

SC=subcutaneous, SAA=serum amyloid A, mIl-6=mouse IL-6, IL-6=interleukin-6, IL-6Rα=interleukin-6 receptor alpha subunit

3 副次的薬理試験

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics – In vitro

In Vitro Studies	**Test Article: Sarilumab**
Determination of the effects of sarilumab on the activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in cultured tumor cells	**Study Number: REGN88-MX-11050** **Location: [4.2.1.2-1]**
Parameter Measured	**Noteworthy Findings**
STAT3 activation was assessed by Western blotting for tyrosine-phosphorylated STAT3.	Sarilumab inhibited constitutive and IL-6 (10ng/ml) - stimulated STAT3 phosphorylation in cultured prostate (Du145) and lung (NCI-H1560, A549, and Calu3) tumor cell lines.

表 2.6.3.3.2 - Secondary pharmacodynamics – In vivo

In Vivo Studies				**Test Article: Sarilumab**
Species/Strain/ Gender/Animals per group	**Method of Sarilumab Administration**	**Doses/Test Article**	**Parameters Measured**	**Noteworthy Findings**
Characterization of the effects of sarilumab on STAT3 activation and tumor xenograft growth				**Study Number: REGN88-MX-11050** **Location: [4.2.1.2-1]**
Mice C.B.-17 SCID Male 5/group [6/group (Calu3 only)]	Subcutaneous	25 mg/kg	Tumor size Phosphorylated STAT3 Cleaved caspase 3	Sarilumab inhibited the growth of Du145 prostate and NCI-H1650, A549, and Calu3 lung tumor xenografts compared to an isotype control antibody and reduced STAT3 phosphorylation in Du145 tumor xenografts. Sarilumab, but not hFc, treatment increased cleaved caspase-3 immunostaining in Du145 xenografts suggesting augmented apoptosis

4　安全性薬理試験

表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology

Safety Pharmacology Studies	**Test Article: Sarilumab**
Safety pharmacology endpoints were integrated into the GLP-compliant toxicology studies conducted in cynomolgus monkeys (see [M 2.6.6.3.2]). There were no adverse effects of sarilumab in monkeys and there was no physical or anatomic evidence of cardiovascular, CNS or respiratory effects following sarilumab IV doses of 50 mg/kg/week for 6 months, or SC doses of 100 mg/kg/week for 13 weeks.	

5　薬力学的薬物相互作用試験

サリルマブと他の薬剤を用いた薬力学的相互作用試験は実施していない。