

サノフィ株式会社

デュピルマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 － 非臨床概要

2.6.1 緒言

Total number of pages: 11

目 次

略号と用語の定義	4
参 考 文 献	11

表 目 次

表 1 - 名称	5
----------------	---

図 目 次

図 1 - デュピルマブ構造の模式図	6
図 2 - デュピルマブのアミノ酸配列	7

略号と用語の定義

CDR:	Complementarity-Determining Region／相補性決定領域
HDM:	House Dust Mite／チリダニ
IgG:	Immunoglobulin G／免疫グロブリン G
IL-4:	Interleukin 4／インターロイキン-4
IL-4R α :	Interleukin 4 receptor alpha subunit／インターロイキン-4 受容体 α サブユニット
IL-13:	Interleukin 13／インターロイキン-13
IL-13R α 1:	Interleukin 13 receptor alpha 1 subunit／インターロイキン-13 受容体 α 1 サブユニット
PBMC:	Peripheral Blood Mononuclear Cell／末梢血単核球
SC:	Subcutaneous／皮下
TARC/CCL17:	Thymus and Activation Regulated Chemokine/Chemokine C-C motif Ligand 17／胸腺及び活性化制御ケモカイン／ケモカイン C-C モチーフリガンド 17

2.6.1 緒言

SAR231893 - デュピルマブ (遺伝子組換え)

REGN668 (デュピルマブ) は、XXXXXXXXXXプラットフォームを用いて開発された完全ヒトモノクローナル抗体であり、ヒトインターロイキン-4受容体 α サブユニット (hIL-4R α) の強力な阻害薬である。デュピルマブは、hIL-4R α に結合することによって、I型受容体 (IL-2R γ と IL-4R α の複合体) 及びII型受容体 (IL-13R α 1 と IL-4R α の複合体) による IL-4 シグナル伝達、並びに II 型受容体による IL-13 シグナル伝達を阻害する。IL-4 及び IL-13 は、慢性もしくは過剰な 2 型免疫応答に関連した病態の 1 つであるアトピー性皮膚炎 (AD) の病因に重要な役割を担うと考えられている。

原薬の名称を表 1 に示す。

表 1 - 名称

推奨国際一般名 (INN)	デュピルマブ (dupilumab)
開発コード	REGN668 又は SAR231893
化学名	
ケミカル・アブストラクト索引名	Immunoglobulin, anti-(human interleukin 4 receptor α) (human REGN668 heavy chain), disulfide with human REGN668 κ -chain, dimer ^a
米国一般名 (USAN)	Immunoglobulin G4, anti-(human interleukin-4 receptor subunit alpha (IL-4R- α , CD124)); human monoclonal REGN668 des-452-lysine{CH3 ¹⁰⁷ K>-}[233-proline{H ¹⁰ S>P}] γ 4 heavy chain (139-219')-disulfide with human monoclonal REGN668 κ light chain, dimer (231-231":234-234")-bisdisulfide
世界保健機関 (WHO)	immunoglobulin G4-kappa, anti-[<i>Homo sapiens</i> IL4R (interleukin 4 receptor, IL4RA, IL-4RA, CD124)], <i>Homo sapiens</i> monoclonal antibody; gamma4 heavy chain (1-451) [<i>Homo sapiens</i> VH (IGHV3-23*04 (92.90%) -(IGHD)-IGHJ6*01) [8.8.18] (1-125) -IGHG4*01 (CH1 (126-223), hinge S10>P (233) (224-235), CH2 (236-345), CH3 (346-450), CHS K130>del (451)) (126-451)], (139-219')-disulfide with kappa light chain (1'-219') [<i>Homo sapiens</i> V-KAPPA (IGKV2-28*01(96.00%) -IGKJ2*01) [11.3.9] (1'-112') -IGKC*01 (113'-219')]; dimer (231-231":234-234")-bisdisulfide immunomodulator
ケミカル・アブストラクツ・サービス (CAS) 登録番号	1190264-60-8

^a 本名称は USAN 評議会によって採用された一般名でもある。

デュピルマブ (IgG₄ アイソトープ) は、ジスルフィド結合を介して共有結合しているヒト重鎖 2 本が、それぞれ完全ヒト κ 型軽鎖 1 本ずつとジスルフィド結合によって結合している共有結合性のヘテロ 4 量体である。XXXXXXXXXX、各重鎖の Fc 領域内ヒンジ領域に位置するアミノ酸 233 位のセリンをプロリンに置換している。それぞれの重鎖には N 結合型糖鎖付加部位 (Asn³⁰²) が一箇所あり、分子内 Fc 定常領域の CH2 ドメイン内に位置している。16 個のジス

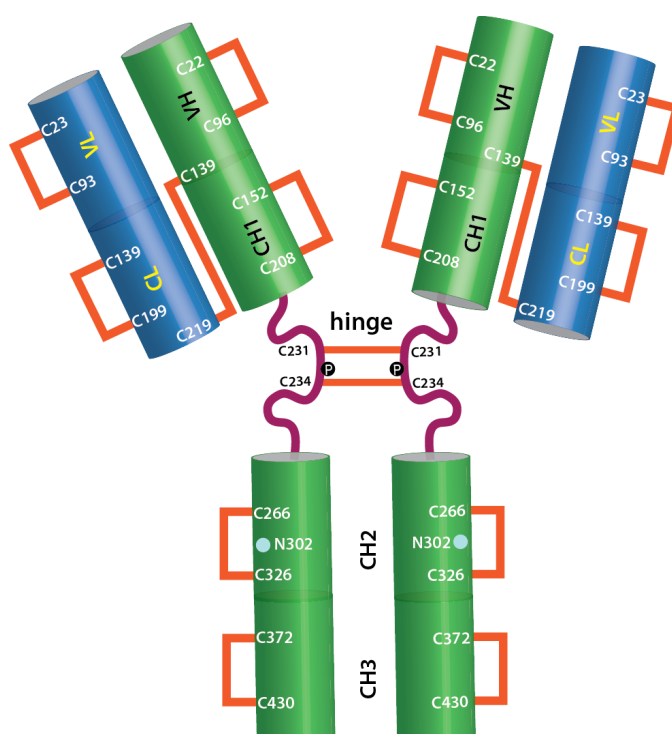
2.6.1 緒言

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

ルフィド結合を有し、各重鎖 C 末端から Lys⁴⁵² が除去されているため、デュピルマブの一次配列（N 結合型糖鎖を除く）に基づく分子量は 146,899.0 Da である。デュピルマブが、標的である IL-4Rα に結合するため、重鎖及び軽鎖の可変領域の組合せにより相補性決定領域（CDR）が形成されている。

デュピルマブの模式図（N 結合型糖鎖付加部位及びジスルフィド結合構造の位置を含む）を図 1 に、アミノ酸配列、糖鎖付加部位及びジスルフィド結合構造は、図 2 に示す。

図 1 - デュピルマブ構造の模式図



デュピルマブ構造の模式図（各鎖内及び鎖間ジスルフィド結合位置は橙色で示す）。重鎖（緑色）及び軽鎖（青色）は、鎖間ジスルフィド結合によって接続しており、ヒンジ領域内に位置する 2 本の重鎖間ジスルフィド結合によって重鎖二量体が形成されている。Fc 領域糖鎖付加部位も示す（淡青色）。ヒンジ領域の置換（セリン²³³からプロリン²³³）は、2 つのヒンジ領域ジスルフィド結合間に位置し、Ⓟ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

図 2 - デュピルマブのアミノ酸配列

Dupilumab Heavy Chain Amino Acid Sequence

EVQLVESGGG LEQPGGSLRL **S**CAGSG**FTFR** **DYAMTWVRQA** PGKGLEWVSS⁵⁰
ISGSGG**N**TYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMSLRAED TAVYY**CAKDR**¹⁰⁰
LSITIRPRYY **GLD**VWGQGT VTVSSASTKG PSVFPLAP**CS** RSTSESTAAL¹⁵⁰
GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPS²⁰⁰
 LGTKTYT**C**NV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP **CP****PC**PAPEFL GGPSVFLFPP²⁵⁰
CP**PC** of heavy chain
 KPKDTLMISR TPEVT**C**VVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ³⁰⁰
FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYK**C**KVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE³⁵⁰
 PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL **T**CLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP⁴⁰⁰
 PVLDSGGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVF**S**C SVMHEALHNH YTQKSLSLSL⁴⁵⁰
GK⁴⁵²

Dupilumab Light Chain Amino Acid Sequence

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS **I**S**CR**SS**QSLL** **YSIGYNYLDW** YLQKSGQSPQ⁵⁰
 LLIY**L**GSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGF YY**CMQALQTP**¹⁰⁰
YTFGQG**T**KLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVV**CL** LNNFY**P**REAK¹⁵⁰
 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVY**ACE**²⁰⁰
 VTHQGLSSPV TKSFNRGE**C**²¹⁹

デュピルマブ重鎖及び軽鎖の配列（CDRは青色で示す）。ジスルフィド結合を形成することが確認されたシステイン残基（赤色）を橙色の実線で結ぶ。FcのAsn³⁰²でのN結合型糖鎖付加部位を緑色で示す。重鎖C末端Lys⁴⁵²（桃色）は、タンパク質発現中に、大部分が除去される。重鎖ヒンジ領域内のセリン²³³（WT IgG₄）をプロリン²³³（淡青色 P）に置換し、デュピルマブ IgG₄分子の安定性を高めた。本置換によって2本の重鎖間のジスルフィド結合が安定化し、半抗体形成が最小限に抑えられている。

デュピルマブは、アレルゲン応答により惹起される慢性もしくは過剰な2型免疫応答に関連した疾患に対する治療効果を期待されている。これらの疾患には、ADのほかに、喘息、鼻茸、アレルギー性鼻炎、好酸球性食道炎、アナフィラキシーが含まれる(1)。ADは、皮膚の重度そう痒性（かゆみ）及び鱗屑性の乾癬性湿疹病変を特徴とする慢性又は再発性炎症性アレルギー疾患であり、しばしば食物アレルギー、アレルギー性鼻炎、及び喘息などのその他のアトピー性疾患を伴う(2)。ADの症状に

2.6.1 緒言

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

は、乾燥性・鱗屑性・そう痒性皮疹（分泌液や滲出液を伴う場合がある）、皮膚感染及び皮膚肥厚などがある(3)。成人 AD 患者の約 10%は、重大な心理的問題や重度の不眠による極度の障害を有する重度の AD に罹患しており、生活の質の低下や高い社会経済的費用の原因となっている。AD の病態生理は、免疫系と環境要因との間の複雑な相互作用によって影響を受けている。

IL-4 及び IL-13 は、2 型免疫応答の惹起及び維持に必要とされる主要なサイトカインである。AD 治療のため、IL-4R α を標的とすることは、各種細胞から、疾患に関連して IL-4 及び IL-13 が遊離すること、hIL-4R α 多型と IgE 濃度上昇及び疾患重症度の増加が相関していること、ヒト単離 B 細胞において IL-4 により CD23 (Fc ϵ RII) 発現が増加することなどにより支持されている(4) (5) (6)(7)。また、IL-4R α 、IL-4 又は IL-13 の遺伝子ノックアウトマウスにおいて、アレルゲン感作に対する IgE 反応の消失及び T_H2 細胞分化の著しい低下がみられることから支持されている(8) (9) (10) (11)(12)。

SPR-Biacore 結合分析により、デュピルマブは、hIL-4R α 受容体単量体及び二量体にそれぞれ K_D 値 33 pmol/L 及び 12 pmol/L で結合するが、マウス IL-4R α には結合せず、カニクイザル、アカゲザル及びコモンマーモセットの IL-4R α への親和性は非常に弱いことが示された。フローサイトメトリー試験では、デュピルマブは、ヒトリンパ球表面の内因性 hIL-4R α に結合するが、ヒト以外の霊長類のリンパ球細胞表面の天然 IL-4R α には結合しないことが示された。これらの特性のため、デュピルマブの毒性試験に、マウス又はヒト以外の霊長類を使用できないことから、マウス IL-4R α 特異的なマウス相同抗体 REGN1103 及びカニクイザル IL-4R α 特異的なサル相同抗体 REGN646 を作製した。細胞を用いた *in vitro* アッセイにおいて、REGN1103 及び REGN646 は、それぞれマウス及びカニクイザル IL-4R α に結合し、IL-4 及び IL-13 シグナル伝達を阻害することが示された。両相同抗体をそれぞれの動物種に用いることにより、デュピルマブの薬理及び安全性を評価する上で生物学的に意義のある薬理、毒性情報が得られた。

I 型及び II 型受容体を介する IL-4 シグナル伝達、並びに II 型受容体のみを介する IL-13 シグナル伝達に対するデュピルマブの阻害作用を評価するために、細胞を用いた *in vitro* アッセイを実施した。レポーター技術を用いたアッセイにおいて、デュピルマブは hIL-4 及び hIL-13 を介する STAT6 シグナル伝達を阻害した。また、デュピルマブは、I 型及び II 型受容体を発現するヒト末梢血単核球 (PBMC)、並びに I 型受容体のみを発現する Ramos Burkitt 細胞において、IL-4 を介する B 細胞活性化マーカー (CD23) のアップレギュレーションを阻害した。ヒト PBMC では、デュピルマブは hIL-4 及び hIL-13 で誘導される胸腺及び活性化制御ケモカイン／ケモカイン C-C モチーフリガンド 17 (TARC/CCL17 : 2 型免疫応答及びヒトのアトピー性疾患と非常に関連しているケモカイン) の分泌を阻害した。細胞を用いた抗体依存性細胞傷害及び補体依存性細胞傷害の *in vitro* アッセイでは、デュピルマブの 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* 試験結果は、デュピルマブが IL-4/IL-13 と IL-4R α との相互作用を阻害することによって作用を発揮することを示すものであった。

デュピルマブの *in vivo* 作用は、二重ヒト化 (IL4ra^{hu/hu} IL4^{hu/hu}) マウスを用いたチリダニ (HDM) アレルゲン誘発性肺炎モデルにおいて確認した。HDM アレルゲンによる炎症は古典的 2 型免疫応答であり、肺好酸球浸潤の増加、杯細胞化生の増加、並びに血清中総 IgE 濃度及び血清中アレルゲン特異的 IgG1 濃度の上昇が誘発される。本モデルにおいて、デュピルマブは、アイソタイプ対照抗体を投与し

2.6.1 緒言

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

たマウスと比較して、2型気道炎症に関連するこれらの病変マーカーを抑制した。マウス相同抗体 REGN1103 も、野生型マウス（Balb/c）の4週間 HDM アレルゲン誘発性肺炎モデルにおいて2型免疫応答の重症度を低下させた。

ラット及びサルにおけるデュピルマブの薬物動態は、線形かつ用量に比例し、標的分子を介したクリアランスはみられなかった。ラット及びサルに皮下投与したときの血清中総デュピルマブの絶対バイオアベイラビリティは、それぞれ 84.2%及び>92.5%であった。

すべての非臨床試験において、デュピルマブ並びに相同抗体 REGN1103 及び REGN646 の薬物動態及びトキシコキネティクスに性差はみられなかった。

サル相同抗体 REGN646 は、カニクイザルにおいて、標的分子を介した非線形の薬物動態を示した。全体的に、REGN646 の薬物動態は、25 mg/kg/週未満の用量で非線形を示したが、25 mg/kg/週以上の用量では線形であったことから、標的との結合の飽和が示唆された。マウス相同抗体 REGN1103 を CD-1 マウスに反復皮下投与したときの血清中 REGN1103 濃度は、投与期間中（最高7週間）、全例において検出された。全体的に、25 mg/kg/週以上の用量で線形の薬物動態が認められ、曝露量はほぼ用量比例性に増加した。25 mg/kg/週未満の低用量における曝露量は、用量比例性を上回る増加を示したことから、標的分子を介した消失が示唆された。これらの毒性及び薬物動態試験の結果から、25 mg/kg/週以上の用量でマウス及びサル IL-4R α 受容体が飽和することが示された。

デュピルマブの安全性プロファイルは、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に準拠して実施した毒性試験において主に評価した。デュピルマブは、一般的に毒性評価で使用される動物種の IL-4R α に結合しないため、これらの毒性試験は、相同抗体の REGN1103（マウス）及び REGN646（カニクイザル）を用いて実施した。CD-1 マウスに REGN1103 を最長7週間投与したときに、意味のある毒性変化はみられなかった。また、サルを用いた反復投与毒性試験では、REGN646 を最長6ヵ月間静脈内持続投与（100 mg/kg/週）又は皮下投与（100 mg/kg/週まで）したときの試験最高用量での忍容性は良好であった。カニクイザルに REGN646 を反復投与したときの血清中 REGN646 濃度は、25 mg/kg/週以上の用量を投与した動物の大半において、投与期間中、定量下限以上であり、回復期間終了時の動物の大半においても定量下限以上であった。トキシコキネティクス評価から、各相同抗体への曝露は、それぞれの投与期間中維持されていたことが確認されるとともに、全試験において25 mg/kg/週以上の用量で標的分子との結合が飽和状態にあったことが示唆された。

REGN1103 及び REGN646 の生殖発生毒性試験において、生殖系に及ぼす影響はみられなかった。CD-1 マウスを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、雌雄受胎能パラメータに対する REGN1103 関連の毒性変化は認められなかった。カニクイザルを用いた拡充型出生前及び出生後の発生毒性試験では、妊娠期間の母体、並びに生後6ヵ月間観察期間中の母体及び出生児において、REGN646 関連の毒性変化は認められなかった。また、試験期間中に評価した発生、行動及び免疫機能パラメータにおいて、出生児の毒性変化は認められなかった。

これらの毒性試験結果及び IL-4/IL-13 受容体に関する公表論文によるデータの重要性に基づいた評価（weight-of-evidence）から、デュピルマブの慢性投与により、がんリスクは増加しないことが示さ

2.6.1 緒言

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

れた。規制当局（欧州医薬品庁ヒト用医薬品委員会、カナダ保健省、米国食品医薬品局）と協議し、
[REDACTED]（[REDACTED]）[REDACTED]ことが合意された。

以上、デュピルマブは、IL-4Rαに結合し、IL-4及びIL-13を介するシグナル伝達を強力に阻害する完全ヒトモノクローナル抗体であることが、*in vitro*（細胞を用いたアッセイ）及び*in vivo*（アレルギー誘発性肺炎マウスモデル）で確認された。デュピルマブ又は相同抗体を用いたこれらの非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験結果に基づくと、デュピルマブの臨床試験実施は妥当なものと考えられ、これらのデータはデュピルマブの承認申請をサポートするものである。

なお、本申請において予定している「効能又は効果」及び「用法及び用量」を以下に示す。

効能又は効果

アトピー性皮膚炎（中等症から重症に限る）

用法及び用量

通常、成人にはデュピルマブ（遺伝子組換え）として 600 mg を投与初日に 1 回皮下投与し、その後は、300 mg を 2 週に 1 回皮下投与する。

参 考 文 献

1. Gandhi NA, Bennett BL, Graham NM, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD. Targeting Key Proximal Drivers of Type 2 Inflammation in Disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(1):35-50.
2. Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, Feldman SR, Hanifin JM, Simpson EL, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(2):338-51.
3. Siegfried EC, Herbert AA. Diagnosis of atopic dermatitis: mimics, overlaps, and complications. *J Clin Med.* 2015; 4(5):884-917.
4. Hershey GKK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med.* 1997; 337(24): 1720-5.
5. Kruse S, Japha T, Tender M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J. et al. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology.* 1999; 96(3): 365-71.
6. Risma KA, Wang N, Andrews RP, Cunningham CM, Ericksen MB, Bernstein JA, et al. V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function. *J Immunol.* 2002; 169(3): 1604-10.
7. Loza MJ, McCall CE, Li L, Isaacs WB, Xu J, Chang BL. Assembly of inflammation-related genes for pathway focused genetic analysis. *PLoS ONE.* 2007; 2(10): e1035.
8. Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science.* 1991; 254(5032): 707-10.
9. Noben-Trauth N, Shultz LD, Brombacher F, Urban JF Jr, Gu H, Paul WE. An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(20): 10838-43.
10. Barner M, Mohrs M, Brombacher F, Kopf M. Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. *Curr Biol.* 1998;8(11):669-72.
11. McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE, Anderson S, Fallon P, Zurawski G, et al. Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity.* 1998; 9(3): 423-32.
12. Fish SC, Donaldson DD, Goldman SJ, Williams CM, Kasaian MT. IgE generation and mast cell effector function in mice deficient in IL-4 and IL-13. *J Immunol.* 2005;174(12):7716-24.

サノフィ株式会社

デュピルマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 － 非臨床概要

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 53

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	14
2.1 デュピルマブの <i>in vitro</i> 薬理作用	14
2.1.1 ヒト及びその他動物種の IL-4Rα との相互作用	14
2.1.2 hIL-4 の hIL-4Rα への結合に対する阻害作用	15
2.1.3 ヒトリンパ球細胞表面の天然 IL-4Rα への結合	16
2.1.4 ヒト以外の霊長類リンパ球細胞表面の天然 IL-4Rα への結合	17
2.1.5 hIL-4 及び hIL-13 シグナル伝達に対する作用	18
2.1.6 Fc エフェクター機能活性	23
2.2 デュピルマブの <i>in vivo</i> 薬理作用	23
2.2.1 <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> マウスの作製及びバリデーション	23
2.2.2 マウス 2 型炎症モデルにおける作用	24
2.2.3 マウス 4 週間アレルゲン誘発性肺炎モデルにおける 2 型免疫応答に対する作用	25
2.3 マウス相同抗体の <i>in vitro</i> 薬理作用	28
2.3.1 マウス抗 IL-4Rα 相同抗体の作製	28
2.3.2 mIL-4Rα への結合	29
2.3.3 mIL-4 及び mIL-13 による細胞増殖に対する作用	29
2.3.4 補体依存性細胞傷害作用	32
2.4 マウス相同抗体の <i>in vivo</i> 薬理作用	32
2.4.1 M2M1869N のハプテン誘発接触過敏症 2 型皮膚炎モデルにおける作用	32

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

2.4.2	REGN1103 のマウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける 2 型免疫応答に対する作用	33
2.5	REGN646 の <i>in vitro</i> 薬理作用	36
2.5.1	サル相同抗体（REGN646）の作製.....	36
2.5.2	MfIL-4Rα への結合	37
2.5.3	IL-4 の MfIL-4Rα への結合に対する阻害作用	37
2.5.4	カニクイザル又はヒトリンパ球細胞表面の天然 IL-4Rα への結合	38
2.5.5	IL-4 及び IL-13 シグナル伝達に対する作用	39
3	副次的薬理試験.....	43
4	安全性薬理試験.....	44
4.1	中枢神経系	44
4.2	心血管系.....	44
4.3	呼吸系	44
5	薬力学的薬物相互作用試験	45
6	考察及び結論	46
参 考 文 献		48

表 目 次

表 1 - デュピルマブと遺伝子組換え IL-4R α 単量体及び二量体タンパク質表面との相互作用（25°C、pH 7.4）	15
表 2 - デュピルマブの TARC 分泌阻害作用の IC ₅₀ 及び IC ₉₀	22
表 3 - M2M1869N 及び REGN1103 の mIL-4R α 単量体タンパク質との相互作用の結合パラメータ（pH 7.4、 25°C）	29
表 4 - REGN1103 の増殖阻害作用の IC ₅₀ 及び IC ₉₀	31
表 5 - REGN646 の MfIL-4R α 単量体及び二量体タンパク質との相互作用の結合パラメータ（pH 7.4、25°C）	37
表 6 - REGN646 の TARC 分泌阻害作用の IC ₅₀ 及び IC ₉₀	42

図 目 次

図 1 - IL-4 及び IL-13 受容体リガンド系	10
図 2 - hIL-4 の固定化 hIL-4R α への結合に対するデュピルマブの阻害作用.....	16
図 3 - デュピルマブのヒトリンパ球表面 IL-4R α への結合	17
図 4 - デュピルマブのヒト以外の霊長類リンパ球上の IL-4R α への結合	18
図 5 - デュピルマブの hIL-4R α 受容体媒介 hIL-4 及び hIL-13 誘発 STAT6 シグナル伝達活性化に対する作用	19
図 6 - デュピルマブの Ramos Burkitt 細胞における hIL-4 刺激 CD23 アップレギュレーションに対する作用.....	20
図 7 - デュピルマブのヒト CD19 陽性 B 細胞における hIL-4 刺激 CD23 アップレギュレーションに対する作用	21
図 8 - デュピルマブの全血培養における hIL-4 及び hIL-13 刺激性 TARC 分泌に対する作用.....	22
図 9 - デュピルマブの <i>in vivo</i> 杯細胞化生及び血清中総 IgE に対する作用	25

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

図 10 - デュピルマブの <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける血中総 IgE 濃度及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度に対する作用.....	26
図 11 - デュピルマブの <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける肺好酸球浸潤に対する作用	27
図 12 - デュピルマブの <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける杯細胞化生に対する作用	28
図 13 - REGN1103 の mIL-4 刺激 HT-2 細胞増殖に対する作用	30
図 14 - REGN1103 の mIL-13 刺激 B9 細胞増殖への作用	31
図 15 - M2M1869N のハプテン誘発過敏症モデルにおける耳介腫脹に対する作用	33
図 16 - REGN1103 の Balb/c マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける血中総 IgE 濃度及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度に対する作用	34
図 17 - REGN1103 の Balb/c マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける肺好酸球浸潤に対する作用	35
図 18 - REGN1103 の Balb/c マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける杯細胞化生に対する作用.....	36
図 19 - REGN646 の MfIL-4 及び hIL-4 の固定化 MfIL-4Rα への結合に対する阻害作用.....	38
図 20 - REGN646 のカニクイザルリンパ球上の MfIL-4Rα への結合	39
図 21 - REGN646 の MfIL-4Rα 媒介 MfIL-4 及び MfIL-13 誘発 STAT6 シグナル伝達活性化に対する作用..	40
図 22 - REGN646 のカニクイザル全血培養における hIL-4 及び hIL-13 刺激性 TARC 分泌に対する作用 ..	41

略号と用語の定義

AD	Atopic dermatitis／アトピー性皮膚炎
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity／抗体依存性細胞傷害
APC	Allophycocyanin／アロフィコシアニン
CD4	Cluster of differentiation 4／分化抗原 4
CDC	Complement-dependent cytotoxicity／補体依存性細胞傷害
CHO	Chinese hamster ovary／チャイニーズハムスター卵巣
Cj	<i>Callithrix jacchus</i> , common marmoset／コモンマーモセット
EC ₅₀	Half Maximal Effective Concentration／50%有効濃度
ECG	Electrocardiogram／心電図
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay／酵素結合免疫吸着測定法
Fc	Fragment crystallizable／Fc 領域
FITC	Fluorescein isothiocyanate／フルオレセインイソチオシアネート
γc	Common gamma chain／共通ガンマ鎖
h	Human／ヒト
HDM	House dust mite／チリダニ
HEK	Human embryonic kidney／ヒト胎児腎臓
IC ₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration／50%阻害濃度
IC ₉₀	90% Maximal Inhibitory Concentration／90%阻害濃度
IgE	Immunoglobulin E／免疫グロブリン E
IgG	Immunoglobulin G／免疫グロブリン G
IL	Interleukin／インターロイキン
IL-4Rα	IL-4 receptor α subunit／IL-4 受容体 α サブユニット
IL-13Rα1	IL-13 receptor α1 subunit／IL-13 受容体 α1 サブユニット
ILC2	Group 2 innate lymphoid cells (ILC2)／グループ 2 自然リンパ球 (ILC2)
INN	International Nonproprietary Name／国際一般名
Jak	Janus kinase／ヤヌスキナーゼ
k _a	Association rate constant／会合速度定数
K _D	Equilibrium dissociation constant／平衡解離定数
k _d	Dissociation rate constant／解離速度定数

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

Mf	<i>Macaca fascicularis</i> , cynomolgus monkey／カニクイザル
Mm	<i>Macaca mulatta</i> , rhesus monkey／アカゲザル
mmH	Myc-myc-hexahistidine／Myc-myc-ヘキサヒスチジン
NHS	Normal human serum／正常ヒト血清
PAS	Periodic acid Schiff／過ヨウ素酸シッフ
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell／末梢血単核球
PBS	Phosphate buffered saline／リン酸緩衝生理食塩液
PE	Phycoerythrin／フィコエリトリン
RLU	Relative light units／相対発光量
RU	Resonance units／共鳴単位
SA	Streptavidin／ストレプトアビジン
SC	Subcutaneous／皮下
SPR	Surface Plasmon Resonance／表面プラズモン共鳴
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6／シグナル伝達兼転写活性化因子 6
$t_{1/2}$	Dissociative half-life／標的滞留半減期
TARC	Thymus and activation-regulated chemokine, also known as Chemokine (C-C motif) ligand 17 [CCL-17]／胸腺及び活性化制御ケモカイン、別名ケモカイン（C-C モチーフ）リガンド 17 [CCL-17]
T_H2	T helper 2 cells／2 型ヘルパーT 細胞
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin／胸腺間質性リンホポエチン

1 まとめ

アトピー性皮膚炎（AD）は、世界的に最も頻度が高くかつ耐え難い皮膚病の1つである(1)(2)(3)。ADは、慢性、全身性の重度そう痒性（かゆみ）炎症性皮膚疾患であり、しばしば食物アレルギー、アレルギー性鼻炎、及び喘息などのその他のアトピー性疾患を伴う(4)。ADの病態進行機序を説明する仮説としては、競合する2つの仮説が存在する。「アウトサイド・インモデル」（outside-in model）では、遺伝的欠陥によって皮膚機能が損なわれ、免疫系を活性化する免疫原性タンパク質が侵入できるようになると考えられている。「インサイド・アウトモデル」（inside-out model）では、免疫調節不全によって皮膚バリアが脆弱化し、表皮過形成が発現すると考えられている(5)。ADの症状には、乾燥性・鱗屑性・そう痒性皮疹（分泌液や滲出液を伴う場合がある）、皮膚感染、及び皮膚肥厚などがある(6)。現在のAD治療薬は、保湿剤、外用ステロイド薬、カルシニューリン阻害薬などであるが(7)(8)、中等症から重症の疾患における有効性は十分ではない(9)(10)。中等症から重症の多くのAD患者では、長期疾患コントロールのための安全かつ有効な選択肢がないために、疾患コントロールが不十分なままである(11)(12)。例えば、外用ステロイド薬治療は、多くの患者に急速な症状緩和をもたらすが、外用ステロイド薬による皮膚萎縮、色素脱失症、二次感染及び毛細血管拡張症といった安全性上の問題のために、長期使用が制限される(13)(14)(15)。

ADは、慢性又は過剰に活性化した2型免疫応答と関連し、多くの場合がアレルゲン応答によって惹起される多くの病態（喘息、鼻ポリポーシス、アレルギー性鼻炎、好酸球性食道炎、食物アレルギーなど）の1つである。2型免疫応答には、自然免疫系と適応免疫系の協力作用が関与する。適応免疫応答は、B細胞及びCD4⁺2型ヘルパーT細胞（T_H2）の動員、活性化及び増殖、並びにB細胞による免疫グロブリンE（IgE）及びIgG4（ヒト）若しくはIgG1（マウス）サブクラスの産生を特徴とする。自然免疫応答は、グループ2自然リンパ球（ILC2）、好酸球、好塩基球、肥満細胞、及びIL-4若しくはIL-13活性化マクロファージの活性化を伴う。いずれの応答も、IL-4、IL-5、IL-9、IL-13、胸腺及び活性化制御ケモカイン（TARC）といった複数のサイトカイン・ケモカインメディエーターのアップレギュレーション、並びに上皮性サイトカイン、胸腺間質性リンホポエチン（TSLP）、IL-25及びIL-33の増加を伴う(16)。

多くのAD患者においては、全身性及び病変皮膚に2型炎症、すなわち、血中IgE濃度の上昇、並びに好酸球、好塩基球、ILC2及び肥満細胞の増加、複数の2型サイトカイン・ケモカイン（TSLP、TARC、IL-4、IL-5、IL-13など）の顕著な増加が認められる(17)(18)。ADをもたらす炎症反応を媒介するサイトカインとして多くのサイトカインが関与しているが、重要なサイトカインはIL-4及びIL-13である。IL-4及びIL-13は、炎症の誘導期及び作用発現期のいずれにおいても、2型免疫応答の強力なメディエーターであり、それらの機能には重複しないものと重複するものがある。IL-4シグナル伝達経路（及び、より程度は少ないがIL-13シグナル伝達経路）の活性化によって、IgE産生及びIgG4（ヒト）若しくはIgG1（マウス）産生へのB細胞免疫グロブリンのクラススイッチが開始、促進されてい

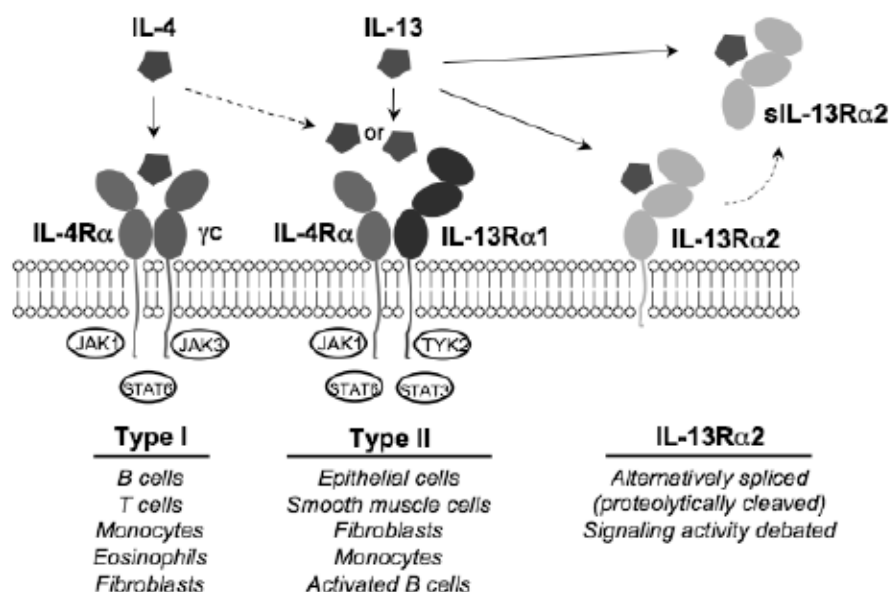
る(19)(20)(21)(22)(23)(24)(25)。IL-4 及び IL-13 は、 T_H2 細胞及び上皮細胞からの好酸球促進因子（IL-5、エオタキシンなど）の産生を誘発することによって、エフェクター細胞（好酸球など）の血中から炎症部位への遊走も促進する(26)(27)。また、IL-4 及び IL-13 のいずれのサイトカインも、皮膚バリア機能に関与するタンパク質（フィラグリン、ロリクリン、インボルクリンなど）レベルを低下させるため、AD の炎症反応の遷延化にも関与している(28)(29)。

2 型免疫応答において、IL-4 及び IL-13 は上述した重複する機能のほかに、異なる機能を有する。IL-4 は、B 細胞、肥満細胞及び好塩基球において T_H2 細胞分化を誘発し、IgE 受容体（CD23 など）を増加させる(30)(31)(32)(33)(34)。IL-13 は、 T_H2 炎症部位において皮膚線維化をもたらす炎症及び組織リモデリングの主要刺激物質として知られている主要線維化促進性サイトカインである(35)。また、IL-13 は、杯細胞の分化及び過形成、粘液産生、線毛運動並びに平滑筋変化も誘発する(36)(37)。

IL-4/IL-13 受容体系は、異なる 2 つのシグナル伝達受容体によって制御されている（図 1）。2 つのヘテロ二量体受容体複合体（I 型及び II 型受容体）が IL-4 シグナル伝達を媒介しているが、その 1 つ（II 型受容体）は IL-13 シグナル伝達も媒介する。IL-4 シグナル伝達では、最初に結合イベント（IL-4 の IL-4R α への結合）が生じ、次に I 型受容体を形成する共通ガンマ鎖（ γ_c ）又は II 型受容体を形成する IL-13R α_1 が動員されてシグナル伝達をもたらされる。IL-13 シグナル伝達の場合には、最初に結合イベント（IL-13 の IL-13R α_1 への結合）が生じ、次に II 型受容体を形成する IL-4R α サブユニットが動員されて、シグナル伝達をもたらされる。IL-13 は IL-13R α_2 （デコイ受容体として機能する可能性がある）へも結合できる。IL-4 及び IL-13 が共有する共通の細胞内シグナル伝達経路には、ヤヌスキナーゼ（Jak）ファミリーの受容体関連キナーゼによる転写因子 STAT ファミリーメンバーのリン酸化が関与する。リン酸化 STAT タンパク質は核に移行する二量体を形成し、DNA 結合時の標的遺伝子転写を制御する(16)。

I 型受容体は主に造血系細胞（リンパ球、単球、マクロファージなど）に局在しているが、II 型受容体は広範に分布し、線維芽細胞、平滑筋細胞及び上皮細胞に発現している。また、骨髓系細胞及び活性化 B 細胞は、I 型受容体及び II 型受容体の両方を発現する(38)(39)(40)。

図 1 - IL-4 及び IL-13 受容体リガンド系



IL-4 及び IL-13 シグナル伝達経路を示す。IL-4 は I 型受容体又は II 型受容体を介してシグナル伝達するが、IL-13 は II 型受容体のみを介してシグナル伝達する。

遺伝子組換えマウスの解析によって、2 型免疫応答の発現には IL-4 及び IL-13 が必要であることが明らかにされており(21)(41)(42)、IL-4 遺伝子及び IL-13 遺伝子を二重不活性化すると、2 型免疫応答が顕著に消失することが示されている(43)(44)。さらに、マウス肺炎モデルの受容体サブユニット欠損動物モデルにおいて、IL-4 及び IL-13 の役割には独立した役割と協力的な役割の両方があることが明確に示されている。共通する IL-4Rα 受容体サブユニットの遺伝子を不活性化した遺伝子組換えマウスでは、IgE のベースライン濃度が低く、抗原感作後の IgE 反応に低下がみられた(45)(46)(44)。これは IL-4 (I 型及び II 型受容体) 及び IL-13 (II 型受容体) シグナル伝達の完全な喪失と一致していた。一方、げっ歯類喘息モデルにおいて IL-13Rα1 サブユニットを欠損すると (I 型受容体を介した IL-4 シグナル伝達に影響することなく、II 型受容体を介した IL-4 又は IL-13 シグナル伝達を消失)、T_H2 反応及び IgE 反応はほとんど損なわれなかったが、肺の病状が軽減された(47)(48)。

デュピルマブは、細胞表面 I 型及び II 型受容体が共有するヒト (h) IL-4Rα サブユニットに特異的な完全ヒトモノクローナル抗体である。デュピルマブは IL-4Rα に特異的に結合するため、IL-4 及び IL-13 の両シグナル伝達に対する二重阻害薬である。デュピルマブは国際一般名 (INN) であり、Regeneron 社における名称は REGN668、サノフィ社における名称は SAR231893 である。デュピルマブは新技術 [] を用いて作製された(49)(50)。[] マウスは、マウス免疫グロブリン遺伝子座の生殖細胞型可変領域にあたるゲノム配列を取り除き、マウス重鎖の定常領域はそのままにしながら、代わりにヒト免疫グロブリン生殖細胞型可変配列を含むヒトゲノム断片でそれらを正確に置換することによって創製された ([Module 3.2.S] 項参照)。作製されたマウスは、[] 抗体を産生する。[] マウスを hIL-4Rα で免疫化して得られた抗体について、

を指標に *in vitro* スクリーニングを行った。リード抗体を選択し、 κ 型軽鎖定常領域及び hIgG4^P 重鎖定常領域を有するプラスミドベクター内でそれぞれ軽鎖及び重鎖可変領域をクローン化した。IgG4^P は、() に、ヒンジ領域のセリンをプロリンにアミノ酸置換した IgG4 定常領域 (EU 番号 S228P、アクセッション番号 P01861) である。選択した抗体デュピルマブをチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で産生し、親和性及び効力を評価する *in vitro* 試験において更に特徴を明らかにした。また、マウス 2 型炎症モデルを用いて、デュピルマブの *in vivo* 有効性を確認した。

デュピルマブは、hIL-4R α 単量体及び二量体と高親和性に結合し、平衡解離定数 (K_D) はそれぞれ 33 pmol/L 及び 12 pmol/L であった (2.1.1 項)。表面プラズモン共鳴法 (SPR) -Biacore 結合分析では、デュピルマブは、IL-4 の hIL-4R α への結合を直接阻害した (2.1.2 項)。フローサイトメトリー試験では、デュピルマブは、ヒト末梢血単核球 (PBMC) 表面の内因性 hIL-4R α に結合して、IL-4 の結合を阻害した (2.1.3 項)。細胞を用いたアッセイでは、デュピルマブは、Ramos Burkitt 細胞 (ヒトリンパ腫細胞株) 及びヒト PBMC において IL-4 で誘導される B 細胞活性化マーカー (CD23) のアップレギュレーション (Ramos Burkitt 細胞では I 型受容体を介し、ヒト PBMC では I 型又は II 型受容体を介した) を阻害した (2.1.5 項)。また、レポーター技術アッセイでは、デュピルマブは IL-4 及び IL-13 を介した STAT6 シグナル伝達も阻害し、IL-4 及び IL-13 で誘導される全血の 2 型ケモカイン TARC 分泌を阻害した (2.1.5 項)。細胞を用いた抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 及び補体依存性細胞傷害 (CDC) のアッセイでは、デュピルマブの Fc エフェクター機能活性は検出されなかった (2.1.6 項)。これらの全 *in vitro* 試験結果から、デュピルマブの薬理活性の主な作用機序は、I 型及び II 型受容体の IL-4R α サブユニットに結合することによる IL-4 及び IL-13 シグナル伝達の直接阻害であることが裏付けられた。

SPR-Biacore 結合分析において、デュピルマブはカニクイザル (Mf)、アカゲザル (Mm) 及びコモンマーモセット (Cj) の IL-4R α に弱い結合性を示したが、マウス (m) IL-4R α には結合しなかった。また、フローサイトメトリー試験から、デュピルマブは、カニクイザル、アカゲザル及びコモンマーモセットのリンパ球に結合しないことが確認された (2.1.4 項)。このため、マウス及びヒト以外の霊長類を用いた毒性試験及び薬物動態試験に用いるため、マウス抗 IL-4R α 相同抗体 (マウス相同抗体) 及びカニクイザル抗 IL-4R α 相同抗体 (サル相同抗体) を作製した。

マウス相同抗体及びサル相同抗体の結合及び活性を評価する *in vitro* 試験を実施した。第 1 世代のマウス相同抗体である M2M1869N は、SPR-Biacore 結合分析において mIL-4R α 単量体に結合した (K_D = 640 pmol/L、2.3.2 項)。第 2 世代のマウス相同抗体である REGN1103 は、SPR-Biacore 結合分析において mIL-4R α 単量体により高親和性で結合し (K_D = 86.7 pmol/L、2.3.2 項)、IL-4 で誘導される T 細胞増殖及び IL-13 で誘導される B 細胞増殖を阻害したが (2.3.3 項)、CDC 活性は示さなかった (2.3.4 項)。サル相同抗体である REGN646 は、MfIL-4R α 単量体 (K_D = 2.5 nmol/L) 及び二量体 (K_D = 31 pmol/L) に高親和性で結合し (2.5.2 項)、SPR-Biacore 結合分析において IL-4 の MfIL-4R α への結合を直接阻害した (2.5.3 項)。また、フローサイトメトリー試験において、REGN646 は、カニクイザルのリンパ球表面の天然 MfIL-4R α に特異的に結合することも示された (2.5.4 項)。さらに、REGN646 は、レ

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

ポーター技術アッセイにおいて IL-4 及び IL-13 で誘導される STAT6 シグナル伝達を阻害し、カンクイザル PBMC では IL-4 及び IL-13 による TARC 分泌を阻害した（2.5.5 項）。REGN646 の Fc はデュピルマブの Fc と同一であるため、REGN646 の Fc エフェクター機能活性は評価しなかった。REGN1103 及び REGN646 の結合及び *in vitro* 活性は、同様の試験におけるデュピルマブの結合及び *in vitro* 活性と同程度であったことから、マウス及びヒト以外の霊長類を用いた毒性試験及び薬物動態試験においてこれらの相同抗体を使用することの妥当性が裏付けられた。

デュピルマブは mIL-4Rα に結合しないため、初期の *in vivo* 薬効薬理試験では、第 1 世代のマウス相同抗体 M2M1869N のハプテン誘発接触過敏性 Balb/c マウスモデルにおける効果を検討した。本モデルでは、マウスをハプテンで感作させた後、同じハプテンを再び局所に塗布することにより急性皮膚炎を惹起させた。使用したハプテン fluorescein isothiocyanate (FITC) は 2 型応答を誘導し、マウスに AD 類似の所見が認められた。FITC はマウスの胸部皮膚及び左耳介両側に塗布し、耳介腫脹に対する M2M1869N 投与の効果を評価した。無感作対照群と比較し、感作したマウスではハプテン塗布 6 及び 24 時間後に顕著な耳介腫脹が認められた。M2M1869N 投与により、陰性対照群（アイソタイプ対照群）と比較し、耳介腫脹の抑制傾向が認められた。この抑制傾向は IL-4 Rα の阻害が AD を含む 2 型炎症に対する効果的な治療法になりうることを示唆した。このため、さらに 2 型炎症マウスモデルを用いた *in vivo* 試験を実施した。これ以降の薬効薬理試験は、毒性試験および薬物動態試験にも用いた第 2 世代のマウス相同抗体 REGN1103 用いて実施した。さらに、2 重ヒト化マウスを用いたデュピルマブの *in vivo* 作用も検討した。

2 型サイトカインの IL-4 及び IL-13 を過剰発現するトランスジェニックマウスは、肺の喘息様病状のほかに、AD 様皮膚病変を自然発症することから、IL-4 及び IL-13 は両疾患において共通する基部の主要誘発因子であると考えられる(51)。AD の病態進行機序に関連する経路に対するデュピルマブの調節作用については、マウス 2 型炎症モデルを用いて確認した。デュピルマブは mIL-4Rα に結合しないため、mIL-4 及び mIL-4Rα 外部ドメインをそれらに相当するヒト配列 (*Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}*) で置換した遺伝子組換えマウスを作製し、デュピルマブの *in vivo* 活性を評価した（2.2.1 項）。また、本遺伝子組換えマウスを用いて、2 型サイトカイン IL-25 の過剰発現で誘導される 2 型免疫応答に対するデュピルマブの阻害作用を評価した（2.2.2 項）。生理的濃度を超える濃度での IL-25 刺激によって IL-4 及び IL-13 を誘導すると、気道の杯細胞化生の増加及び血中総 IgE 濃度の上昇（それぞれ IL-13 及び IL-4 の活性と関連する下流の 2 つの変化）がみられた。デュピルマブ投与によって、アイソタイプ対照抗体（作用はみられなかった）と比較して杯細胞化生及び IgE 濃度が有意に抑制された。

また、アレルゲン誘発性 2 型炎症マウスモデルを用いて、デュピルマブ及びマウス相同抗体 (REGN1103) の *in vivo* 有効性を評価した。デュピルマブの有効性は *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}* マウスを用いて評価し（2.2.3 項）、REGN1103 の有効性は野生型 Balb/c マウスを用いて評価した（2.4.2 項）。両試験において、チリダニ（HDM）アレルゲンとして HDM 抽出物をマウスに反復鼻腔内感作した。HDM アレルゲンによる炎症は古典的 2 型免疫応答であり、肺好酸球浸潤の増加、杯細胞化生の増加、並びに血清中総 IgE 濃度及び血清中アレルゲン特異的 IgG1 濃度の上昇が生じる。この 2 型炎症モデルにおいて、デュピルマブ及び REGN1103 は、いずれも血中 IgE 濃度及び血中アレルゲン特異的 IgG1 濃度を低下させ、肺好酸

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

球浸潤を抑制し、杯細胞化生を抑制した。本モデルにおける REGN1103 の 25 mg/kg での有効性は、デュピルマブの 25 mg/kg での有効性と同程度であった。

独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、カニクイザルを用いて実施した REGN646 の毒性試験の一部として安全性薬理エンドポイントを評価した（4 項）。100 mg/kg/週（皮下投与）までの試験用量で最長 6 ヶ月間実施したいずれの毒性試験においても、REGN646 に関連したカニクイザルの血圧及び心電図に対する作用はなく、また心血管系、呼吸系及び中枢神経系に対する機能的及び器質的障害もみられなかった。

2 効力を裏付ける試験

2.1 デュピルマブの *in vitro* 薬理作用

2.1.1 ヒト及びその他動物種の IL-4R α との相互作用

[Module 4.2.1.1-1: REGN688-MX-024]

Biacore 結合分析を実施し、ヒト、カニクイザル、アカゲザル、コモンマーモセット及びマウス由来の組換え可溶性 IL-4R α 単量体及び二量体の細胞外ドメインタンパク質に対するデュピルマブの結合親和性を検討した。これらの種由来の IL-4R α 細胞外領域のアミノ酸配列は[Module 4.2.1.1-1 図 1]に示す。hIL-4R α の細胞外領域アミノ酸配列は、カニクイザル、アカゲザル、コモンマーモセット及びマウスにおける相当する細胞外配列とそれぞれ 91.8%、91.3%、84%及び 52.2%の相同性を示す。

Biacore 結合分析を 25°C、pH 7.4 で実施し、センサーチップ表面に結合した抗ヒト Fc 抗体で固定化した可溶性 IL-4R α 単量体又は二量体のデュピルマブへの結合を評価した。結果は表 1 に示す。これらの条件下で、デュピルマブは、hIL-4R α 単量体及び二量体に対してピコモル範囲の高親和性の結合を示した。デュピルマブは、MfIL-4R α 二量体に中等度の結合親和性を示し、MfIL-4R α 単量体には非常に弱い結合親和性を示した。アカゲザル及びコモンマーモセットの IL-4R α 単量体への結合親和性も同程度に弱かった。なお、mIL-4R α への結合は検出されなかった。これらの結果から、マウス及びヒト以外の霊長類を用いた毒性試験のための相同抗体として、それぞれマウス相同抗体（REGN1103）及びサル相同抗体（REGN646）を作製した。

表 1 - デュピルマブと遺伝子組換え IL-4Rα 単量体及び二量体タンパク質表面との相互作用 (25°C, pH 7.4)

種	単量体 ^a /二量体 ^b	k_a [(mol/L) ⁻¹ s ⁻¹]	k_d (s ⁻¹)	K_D (mol/L)	$t_{1/2}$
ヒト	単量体	5.56×10^5	1.84×10^{-5}	3.31×10^{-11}	10.5 h
ヒト	二量体	4.74×10^5	5.65×10^{-6}	1.19×10^{-11}	31.1 h
カニクイザル (Mf)	単量体	NA ^c	NA	8.32×10^{-7}	NA
カニクイザル (Mf)	二量体	8.88×10^5	4.70×10^{-3}	5.30×10^{-9}	2.5 min
アカゲザル (Mm)	単量体	NA ^c	NA ^c	5.76×10^{-7}	NA ^c
コモンマーモセット (Cj)	単量体	NA ^c	NA ^c	1.19×10^{-6}	NA ^c
マウス	単量体	NB ^d	NB ^d	NB ^d	NB ^d

分析法の詳細は、[Module 4.2.1.1-1] の 5.1 項を参照。 k_a = 会合速度定数、 k_d = 解離速度定数、 K_D = 平衡解離定数、h = 時間、min = 分、NA = 入手不可、 $t_{1/2}$ = 標的滞留半減期。

a 単量体構造は、MycMycHis タグを有する IL-4Rα 外部ドメイン（1～231 残基）に相当する。

b 二量体構造は、マウス IgG2a Fc を介して融合する 2 つの IL-4Rα 外部ドメイン（1～231 残基）に相当する。SPR-Biacore 結合分析における組換え IL-4Rα 二量体タンパク質へのデュピルマブの結合は、デュピルマブの細胞表面 IL-4Rα への実際の結合をより厳密に示すものである。

c 入手不可データ。本相互作用の K_D は、Biacore 定常状態結合法を用いて算出したが、 k_a 、 k_d 及び $t_{1/2}$ は正確に算出できなかった。

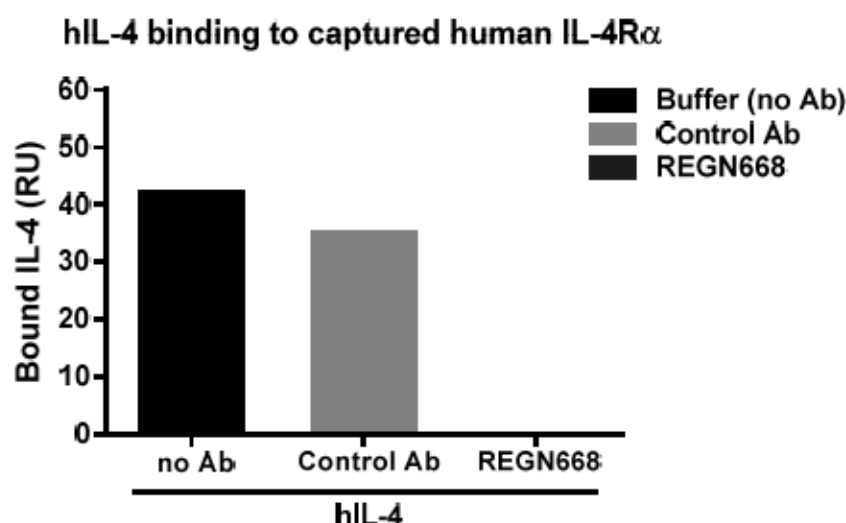
d リガンドの試験最高濃度（800 nmol/L）で結合相互作用は認められなかった。

2.1.2 hIL-4 の hIL-4Rα への結合に対する阻害作用

[Module 4.2.1.1-2: REGN646-MX-055]

Biacore 結合分析を実施して、hIL-4 の hIL-4Rα への結合に対するデュピルマブの阻害作用を評価した。hIL-4Rα 単量体外部ドメインタンパク質 (hIL-4Rα.mmH) を、C 末端 MycMycHis タグによって Biacore センサーチップ上に固定化し、飽和濃度のデュピルマブ又は同等濃度の非結合対照抗体（ベバシズマブ）とインキュベーションした。次に、デュピルマブ又は対照抗体と hIL-4 との混合物を、対応する抗体で予め結合させた固定化 hIL-4Rα 表面に注入した。デュピルマブ存在下において、意義のある hIL-4 の結合は認められなかったことから、デュピルマブは、hIL-4 の hIL-4Rα への結合を完全に阻害することが確認された（図 2）。

図 2 - hIL-4 の固定化 hIL-4Rα への結合に対するデュピルマブの阻害作用



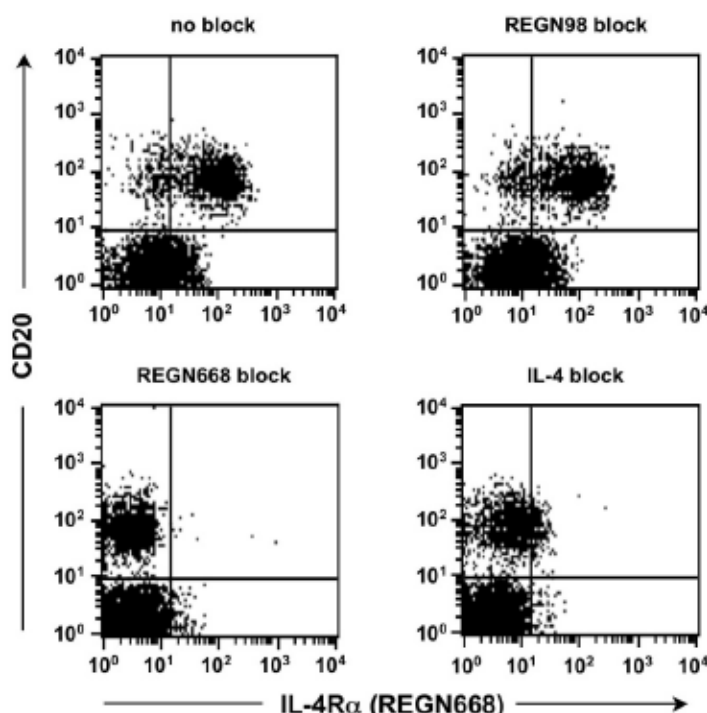
20 µg/mL の濃度の hIL-4Rα 単量体外部ドメインタンパク質 (hIL-4Rα.mmH) を C 末端 MycMycHis タグによって Biacore センサーチップ上に固定化し、飽和濃度 (333 nmol/L) のデュピルマブ (REGN668) 又は同濃度の非結合対照抗体 (ペバシズマブ) とインキュベーションした。並行して、固定化 hIL-4Rα 表面に対照緩衝液を注入した (緩衝液対照)。次に、333 nmol/L のデュピルマブ (青色) 又は対照抗体 (灰色) と 25 nmol/L の hIL-4 との混合物を、対応する抗体で予めインキュベートした固定化 hIL-4Rα 表面に注入した。抗体非存在下で IL-4 を緩衝液対照の受容体表面 (no Ab、黒色) に注入した。共鳴シグナルの変化を RU で記録し、リガンド結合を評価した。抗体非存在下 (緩衝液対照) 又は非結合対照抗体存在下において記録された共鳴シグナルは、それぞれ 42 RU 及び 35 RU であったことから、hIL-4Rα 受容体表面に hIL-4 リガンドが結合することが確認された。hIL-4 の hIL-4Rα への結合の共鳴シグナルは、デュピルマブ存在下で 0 RU であったことから、デュピルマブによって IL-4 の hIL-4Rα への結合は直接阻害されることが示された。RU = 共鳴単位。

2.1.3 ヒトリンパ球細胞表面の天然 IL-4Rα への結合

[Module 4.2.1.1-3: REGN668-MX-025]

デュピルマブは、全血から単離した初代ヒトリンパ球表面の内因性 IL-4Rα に結合した。ビオチン化デュピルマブ及び B 細胞表面マーカー CD20 を用いた二重標識によって、IL-4Rα の相対的発現量は CD20 陰性細胞に比べて CD20 陽性細胞の方が高いことが明らかになった。ビオチン化デュピルマブの IL-4Rα への結合は、細胞を過剰量の hIL-4 又は非標識デュピルマブとプレインキュベーションすることによって阻害されたため、特異的であることが示された (図 3)。過剰量の非結合アイソタイプ対照抗体 (REGN98) と細胞をプレインキュベーションしたときには、ビオチン化デュピルマブの結合に影響はなかった。

図 3 - デュピルマブのヒトリンパ球表面 IL-4Rα への結合



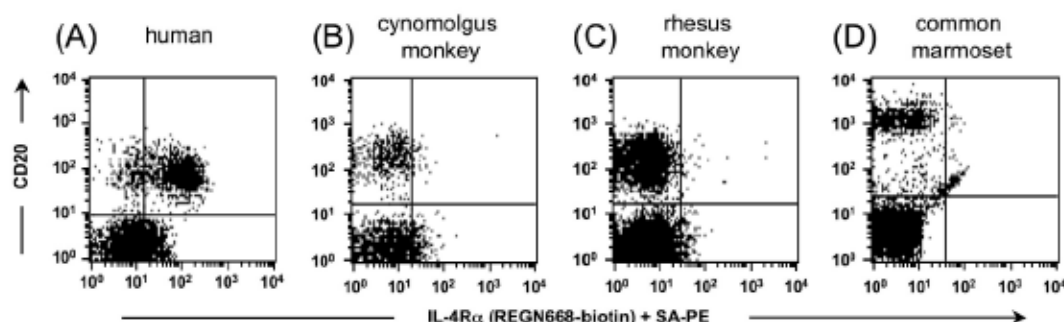
ヒト全血由来リンパ球の細胞表面における IL-4Rα の発現を測定した。細胞は、単独 (no block)、アイソタイプ対照抗体存在下 (REGN98 block、10 µg/mL)、非標識デュピルマブ存在下 (REGN668 block、10 µg/mL) 又は過剰量の hIL-4 存在下 (IL-4 block、10 µg/mL) のいずれかの条件で、アロフィコシアニン (APC) 結合型抗 CD20 (20 µL/検体) 及びビオチン化デュピルマブ (REGN668、1 µg/mL) とインキュベーションした。前方及び側方散乱光でゲーティングしたリンパ球の蛍光強度を測定した後、APC 及び PE [フィコエリトリン (PE) 結合ストレプトアビジン (SA) が結合したビオチン化デュピルマブ] の蛍光強度を測定した。

2.1.4 ヒト以外の霊長類リンパ球細胞表面の天然 IL-4Rα への結合

[Module 4.2.1.1-2: REGN646-MX-055]

Biacore 結合分析において、デュピルマブは MfIL-4Rα に低親和性 ($K_D = 0.83 \mu\text{mol/L}$) の結合を示したが (2.1.1 項)、この結果をヒト以外の霊長類末梢血リンパ球の細胞表面結合解析によって、更に確認した。デュピルマブは、大半の CD20 陽性ヒト末梢血リンパ球を標識したが、カニクイザル、アカゲザル及びコモンマーモセットのリンパ球には結合しなかった (図 4)。この結果から、ヒト以外の霊長類を用いた毒性試験のための相同抗体として、カニクイザル抗 IL-4Rα 相同抗体 (REGN646) を作製する妥当性が更に裏付けられた。

図 4 - デュピルマブのヒト以外の霊長類リンパ球上の IL-4Rα への結合



(A)~(D) ヒト、カニクイザル、アカゲザル又はコモンマーモセットの血液をビオチン化デュピルマブ (REGN668, 1 µg/mL) 及び APC 結合 2H7 抗 CD20 抗体 (ヒト、カニクイザル及びアカゲザル検体に 20 µL/検体) 若しくはフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 結合 H299 (B1) 抗 CD20 抗体 (コモンマーモセット検体に 20 µL/検体) とインキュベーションした。PE 結合 SA を用いて結合したデュピルマブ抗体を検出し、2 色 FACS 解析によって細胞を分析した。前方及び側方散乱光でゲーティングしたリンパ球の蛍光強度を測定した後、PE (SA-PE が結合したビオチン化デュピルマブ) 及び APC 若しくは FITC (CD20) の蛍光強度を測定した。

2.1.5 hIL-4 及び hIL-13 シグナル伝達に対する作用

[Module 4.2.1.1-3: REGN668-MX-025]

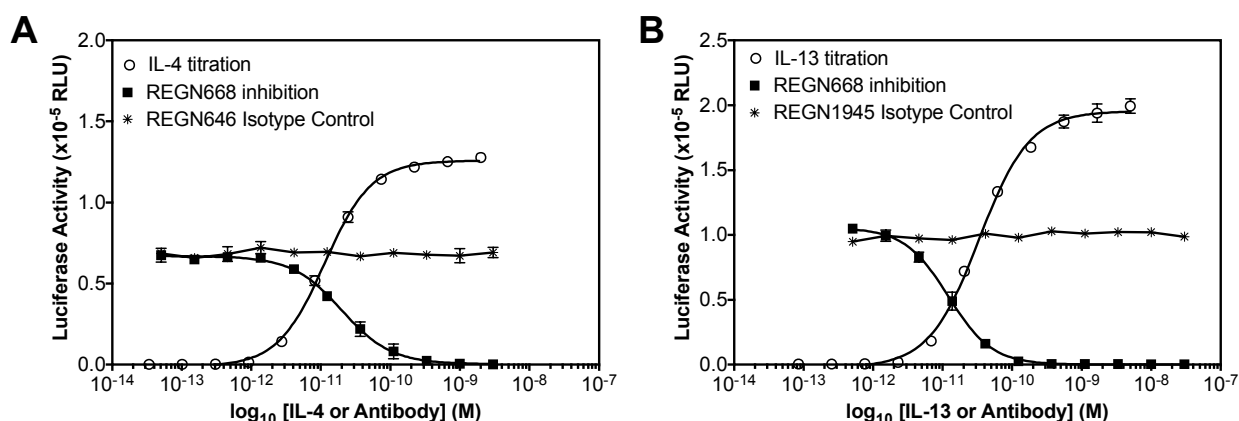
細胞を用いた 4 つのアッセイ、すなわち、STAT6/ルシフェラーゼレポーターをトランスフェクションした HEK293 (ヒト胎児腎臓) 細胞株を用いて hIL-4 又は hIL-13 により誘導されたルシフェラーゼ活性を測定するパイオアッセイ、Ramos Burkitt リンパ腫細胞株及び健康ドナー由来ヒト PBMC を用いて hIL-4 を介した B 細胞活性化/分化マーカー CD23 のアップレギュレーションを測定した 2 つのアッセイ、並びにヒト全血を用いて hIL-4 及び hIL-13 を介した 2 型ケモカイン TARC のアップレギュレーションを測定したアッセイにおいて、デュピルマブは IL-4 及び IL-13 シグナル伝達を阻害した。

デュピルマブの *in vitro* 効力は、IL-4 又は IL-13 で誘導される STAT6 によるルシフェラーゼ活性に依存するレポーター細胞株を用いて検討した。hIL-4 は、STAT6/ルシフェラーゼレポーターをトランスフェクションした HEK293 細胞における STAT6 シグナル伝達を活性化し、その EC₅₀ は 11 pmol/L であった (図 5A)。hIL-13 は同様にシグナル伝達を活性化し、その EC₅₀ は 34 pmol/L であった (図 5B)。デュピルマブは、一定濃度 10 pmol/L の hIL-4 存在下での hIL-4 を介したシグナル伝達を阻害し、その IC₅₀ は 20 pmol/L であった。また、デュピルマブは、一定濃度 40 pmol/L の hIL-13 存在下での hIL-13 を介したシグナル伝達を阻害し、その IC₅₀ は 12 pmol/L であった。いずれのアイソタイプ対照抗体 (REGN646 及び REGN1945) も、IL-4Rα シグナル伝達を介したルシフェラーゼ活性に影響しなかったことから、デュピルマブによる IL-4 及び IL-13 シグナル伝達の阻害は、いずれも特異的であることが示された。

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

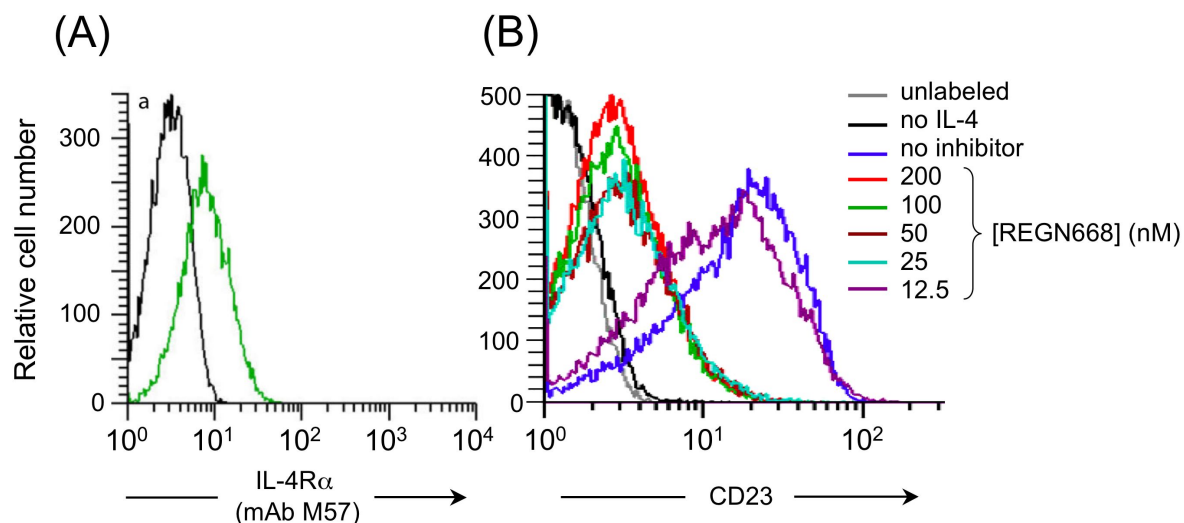
図 5 - デュピルマブの hIL-4Rα 受容体媒介 hIL-4 及び hIL-13 誘発 STAT6 シグナル伝達活性化に対する作用



HEK293/STAT6/Luc（クローン G11）細胞を漸増濃度の hIL-4（パネル A の白丸）又は hIL-13（パネル B の白丸）で処理すると、それぞれ hIL-4 又は hIL-13 のシグナル伝達活性化を示すルミネセンス（RLU）の増加がみられた。hIL-4（34 fmol/L～2 nmol/L）はシグナル伝達を活性化し、その EC₅₀ は 11 pmol/L であった（パネル A）。hIL-13（84 fmol/L～5 nmol/L）は同様にシグナル伝達を活性化し、その EC₅₀ は 34 pmol/L であった（パネル B）。デュピルマブ（REGN668、黒四角、0.051 pmol/L～3 nmol/L）は、10 pmol/L の hIL-4 存在下での hIL-4 シグナル伝達を阻害し、その IC₅₀ は 20 pmol/L であった（パネル A）。デュピルマブ（0.51 pmol/L～30 nmol/L）は、40 pmol/L の hIL-13 存在下での hIL-13 シグナル伝達を阻害し、その IC₅₀ は 12 pmol/L であった（パネル B）。REGN646 アイソタイプ対照を用いた hIL-4 バイオアッセイ（パネル A）及び REGN1945 アイソタイプ対照を用いた hIL-13 バイオアッセイ（パネル B）では、ルシフェラーゼ活性の変化は認められなかった。

デュピルマブは、Ramos Burkitt リンパ腫細胞における hIL-4 を介した低親和性 IgE 受容体 CD23 のアップレギュレーションを阻害した。Ramos Burkitt 細胞表面における CD23 の発現は、IL-4 刺激によって増加し（図 6）、（52）、このアップレギュレーションは、25 nmol/L 以上の濃度のデュピルマブによって阻害された（図 6B）。Ramos Burkitt 細胞における IL-13Rα1 の発現は検出不可能なレベルであるため（38）、本細胞の IL-4 による反応は I 型受容体シグナル伝達によるものである。

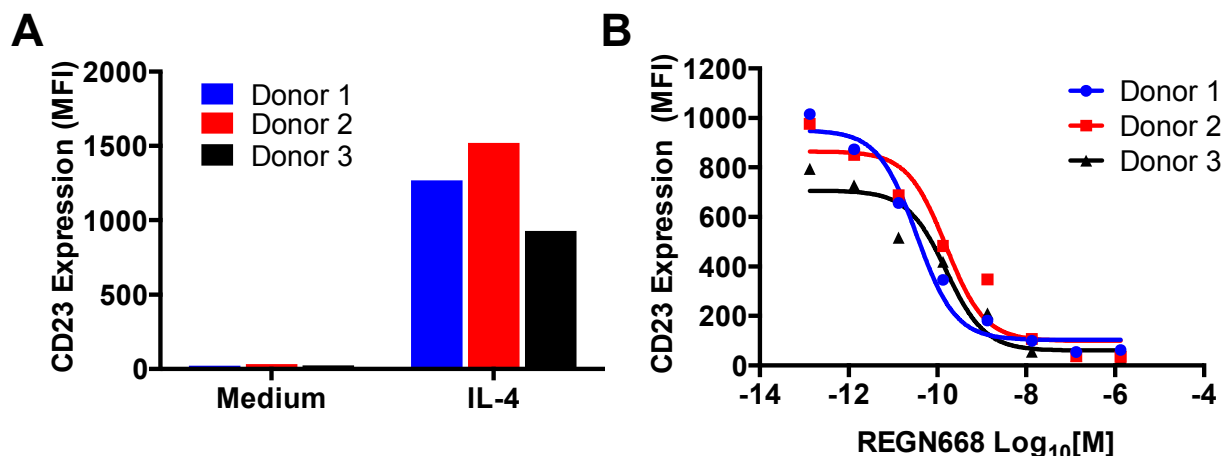
図 6 - デュピルマブの Ramos Burkitt 細胞における hIL-4 刺激 CD23 アップレギュレーションに対する作用



(A) Ramos Burkitt 細胞表面の IL-4R α 発現（緑色線）を PE 結合マウス抗ヒト CD124（クローン IL-4R-M57、BD Pharmingen）で標識することによって確認した。非染色細胞（黒色線）も示す。(B) 細胞を 1 nmol/L の hIL-4 単独又はデュピルマブ存在下で 37°C で 3 日間インキュベーションした。1 nmol/L の hIL-4 単独（濃青色線）並びに 12.5 nmol/L（紫色線）、25 nmol/L（淡青色線）、50 nmol/L（茶色線）、100 nmol/L（緑色線）又は 200 nmol/L（赤色線）の濃度のデュピルマブ存在下で 1 nmol/L の hIL-4 を処理したときの細胞表面における CD23 発現を示す。非染色細胞（灰色線）及び非刺激細胞（黒色線）も示す。

デュピルマブは、ヒト PBMC において hIL-4 で誘導される CD23 のアップレギュレーションも阻害した。健康ドナー由来のヒト PBMC を hIL-4 及び CD40 抗体存在下で培養し、B 細胞の細胞表面活性化/分化マーカー CD23 のアップレギュレーションを評価した(53)(23)。IL-4 は、CD19 陽性 B 細胞上の CD23 発現を増加させたが、アップレギュレーションの程度は、検討した 3 名の各ドナー間で異なっていた（図 7A）。デュピルマブは、hIL-4 で誘導される CD23 のアップレギュレーションを用量依存的に阻害し、その最大阻害は、hIL-4 非存在下で認められる CD23 発現のバックグラウンドレベルに近かった（図 7B）。一定濃度 0.14 nmol/L の hIL-4 存在下におけるデュピルマブの阻害作用の IC₅₀ は、34 pmol/L（ドナー1）、156 pmol/L（ドナー2）及び 157 pmol/L（ドナー3）であった。CD20 陽性 B 細胞は IL-4R α を恒常的に発現し（図 3）、活性化によって IL-13R α 1 サブユニット発現をアップレギュレーションするため(54)(39)、B 細胞で認められた IL-4 による CD23 アップレギュレーションは、I 型又は II 型受容体を介した IL-4 シグナル伝達によるものと推察される。

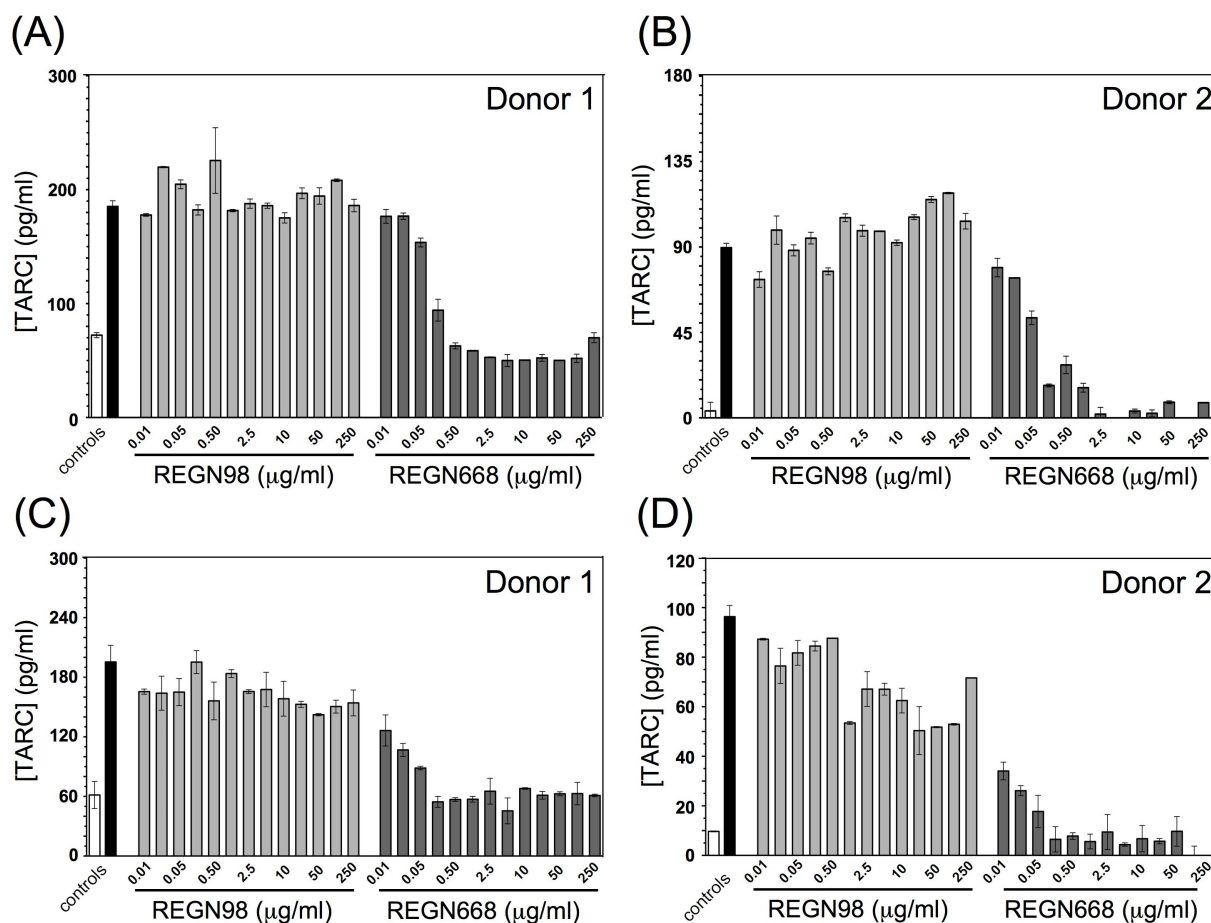
図 7 - デュピルマブのヒト CD19 陽性 B 細胞における hIL-4 刺激 CD23 アップレギュレーションに対する作用



(A) 初代培養ヒト PBMC を、アゴニスト性抗 CD40 mAb (1 µg/mL) 存在下で hIL-4 (2 ng/mL、0.14 nmol/L) と 48 時間インキュベーションした。(B) デュピルマブ (REGN668) の阻害反応を検討するために、hIL-4 及び抗 CD40 の添加前にヒト PBMC をデュピルマブの段階希釈液 (0.13 pmol/L ~ 1.3 µmol/L) とプレインキュベーションした。(A) 及び (B) の培養期間終了時の B リンパ球上の CD23 発現を、抗 CD19 及び抗 CD23 を結合した蛍光プローブを含有する抗体カクテルを用いた 2 色フローサイトメトリーによって分析した。CD23 の平均蛍光強度 (MFI) を、hIL-4 依存的活性化 (A) 又はデュピルマブ依存的阻害 (B) のマーカーとしてプロットした。

デュピルマブは、hIL-4 及び hIL-13 を介した TARC (アトピー性疾患において T_H2 細胞の動員に関与する 2 型ケモカイン) 分泌も阻害した(55)(56)(57)(58)(59)(60)(61)。hIL-4 及び hIL-13 は、いずれも PBMC 培養において TARC mRNA のアップレギュレーションを誘導することが報告されているため(62)、全血を hIL-4 又は hIL-13 で刺激したときの TARC 分泌を測定した。デュピルマブは、アイソタイプ対照抗体と比較して、TARC 分泌 (0.5 nmol/L の IL-4 又は 1 nmol/L の IL-13 で誘導) を用量依存的に阻害した (図 8)。デュピルマブの IL-4 及び IL-13 刺激性 TARC 分泌阻害作用の IC₅₀ 及び IC₉₀ を算出し、表 2 に示す。

図 8 - デュピルマブの全血培養における hIL-4 及び hIL-13 刺激性 TARC 分泌に対する作用



血縁関係のないドナー2名から得た血液を無血清培地で 1:1 希釈し、0.5 nmol/L の hIL-4 (A, B) 又は 1.0 nmol/L の hIL-13 (C, D) 存在下で 24 時間培養した。デュピルマブ (REGN668) 又は陰性対照抗体 (REGN98) を各種濃度 (0.01 ~ 250 µg/mL) で添加した後、IL-4 又は IL-13 を添加した。24 時間の培養後に上清を回収し、ELISA (R&D Systems、米国ミネソタ州ミネアポリス) によって TARC を測定した。IL-4 又は IL-13 非刺激 (白色棒) 並びに阻害抗体非存在下での IL-4 又は IL-13 単独処理 (黒色棒) を対照とした。

表 2 - デュピルマブの TARC 分泌阻害作用の IC₅₀ 及び IC₉₀

デュピルマブ 0.01~250 µg/mL	IL-4 0.5 nmol/L				IL-13 1 nmol/L			
	ドナー1		ドナー2		ドナー1		ドナー2	
	nmol/L	µg/mL	nmol/L	µg/mL	nmol/L	µg/mL	nmol/L	µg/mL
IC ₅₀	0.52	0.08	0.24	0.04	0.27	0.04	0.26	0.04
IC ₉₀	1.07	0.16	2.82	0.43	0.58	0.09	0.67	0.1

2.1.6 Fc エフェクター機能活性

[Module 4.2.1.1-4: REGN668-MX-023]

CDC 及び ADCC は、病原体及び腫瘍細胞の排除に携わる重要な機構である。これらの活性は、一部の抗体 (主に IgG1 及び IgG3 アイソタイプ) の Fc 領域を介している(63)。エフェクター機能は、概して、多価抗体又は細胞表面標的との相互作用によって生じる抗体 Fc 領域の多量体化又はクラスター形成によって活性化される。デュピルマブは、ヒンジ領域のセリンをプロリンに置換することによって、半抗体形成を抑えて安定化させたヒト IgG4 抗体 (IgG4^P) である。IgG4 及び IgG4^P の Fcγ 受容体への結合親和性は、いずれも hIgG1 ほど高くはなく、IgG4 及び IgG4^P は補体成分 C1q にも結合しない(64)(65)。また、IgG4 及び IgG4^P のエフェクター機能活性は、認められるとしても非常に弱い(65)。

したがって、デュピルマブによるエフェクター機能活性は非常に弱いと考えられるが、細胞を用いた *in vitro* アッセイによって評価した。すなわち、内因性又は組換え hIL-4Rα を発現する CHO-K1、HEK293 及び Ramos Burkitt を含む数種の細胞株において、デュピルマブが Fcγ 受容体に結合してエフェクター細胞による ADCC 又は CDC を促進させる作用を有するかについて評価した。これらの細胞株表面の IL-4Rα 発現レベルはフローサイトメトリーによって分析した ([Module 4.2.1.1-4 図 1])。hIL-4Rα を安定的にトランスフェクションした CHO-K1 細胞及び HEK293 細胞は、IL-4Rα をそれぞれ高度及び中等度に発現した。Ramos Burkitt 細胞及び HEK293 細胞の内因性 IL-4Rα 発現レベルは低く、CHO-K1 細胞では検出されなかった。

デュピルマブは、3.3 pmol/L ~ 200 nmol/L の濃度範囲で、検討したいずれの細胞株に対しても PBMC による ADCC を誘発しなかった ([Module 4.2.1.1-4 図 2])。また、デュピルマブは、3.2 pmol/L ~ 188 nmol/L の濃度で、検討したいずれの細胞株に対しても CDC を誘発しなかった ([Module 4.2.1.1-4 図 3])。一方、同様の濃度のリツキシマブ (抗 CD20 IgG1 抗体) と併用したときには、ADCC アッセイで用いた PBMC 及び CDC アッセイで用いた正常ヒト血清 (NHS) は、Daudi 標的細胞 (細胞表面に CD20 を発現する) に対して著しい細胞傷害を誘発した。これらの結果から、本エフェクター機能アッセイで用いた PBMC エフェクター細胞の生存率及び NHS の効力が確認された。また、これらの結果は、本試験で陽性対照抗体として用いたリツキシマブの公表文献における結果と一致するものであった(66)(67)。

2.2 デュピルマブの *in vivo* 薬理作用2.2.1 *Il4ra*^{hu/hu} *Il4*^{hu/hu} マウスの作製及びバリデーション

[Module 4.2.1.1-5: REGN668-MX-051]

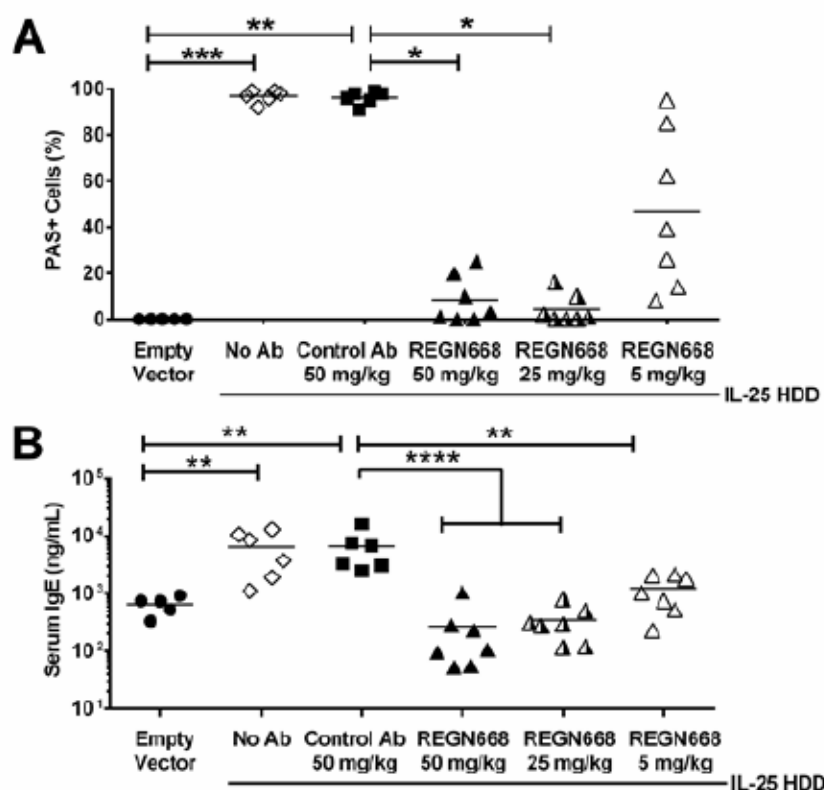
デュピルマブは mIL-4Rα に結合しないため、mIL-4 及び mIL-4Rα 外部ドメインを、それらに相当するヒト配列 (*Il4ra*^{hu/hu} *Il4*^{hu/hu}) で置換した遺伝子組換えマウスを VelociGene[®] 技術を用いて作製した ([Module 4.2.1.1-5 図 1])。*Il4ra*^{hu/hu} *Il4*^{hu/hu} マウスの遺伝的背景は、75% C57BL/6NTac、25% 129S6/SvEvTac である。この方法によって、ヒト配列の細胞外ドメインを維持しつつマウス受容体の細胞内ドメインを保持するキメラ受容体を得られる。このキメラ受容体は、hIL-4 によって活性化されるとともに、その活性がデュピルマブによって阻害される。

Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} マウスにおける hIL-4 及び hIL-4Rα の発現については、フローサイトメトリー ([Module 4.2.1.1-5 図 3]) 及び RNA 転写解析 ([Module 4.2.1.1-5 図 4]) を用いて確認した。本マウスのアレルゲンに対する機能的反応を検討するために、HDM 感作に対する反応を評価した。アレルゲンに対する液性免疫応答は、HDM 感作マウスにおける血清中総 IgE 濃度及び血清中 HDM 特異的 IgG1 濃度の測定によって評価した ([Module 4.2.1.1-5 図 5])。HDM 誘発性肺炎は、肺好酸球浸潤 ([Module 4.2.1.1-5 図 6]) 及び杯細胞化生 ([Module 4.2.1.1-5 図 7]) の測定によって評価した。*Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}* マウスを用いて検討した、HDM 感作によるアレルギー応答の特徴は、いずれも野生型対照動物と区別できないものであった。これらの結果から、*Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}* マウスはデュピルマブの *in vivo* 有効性を評価するモデル系として妥当であることが確認された。

2.2.2 マウス 2 型炎症モデルにおける作用

[Module 4.2.1.1-3: REGN668-MX-025]

Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} マウスを用い、2 型サイトカイン IL-25 による IL-4 及び IL-13 の発現誘導とそのシグナル伝達による変化(68)を指標とし、2 型サイトカイン応答に対するデュピルマブの阻害作用を評価した。流体力学的 DNA 送達 (HDD) 法を用いて、IL-25 を直接発現させ、IL-4 及び IL-13 発現のアップレギュレーションを誘導した。生理的濃度を超える濃度の IL-25 で IL-4 及び IL-13 を誘導すると、気道の杯細胞化生が増加し (図 9A)、血中総 IgE 濃度が上昇した (図 9B)。これら 2 つの変化は、それぞれ IL-13 及び IL-4 と関連するシグナル伝達による変化である(69)(20)(23)。デュピルマブ投与によって、杯細胞化生は有意に抑制され (図 9A)、IgE 濃度は有意に低下した (図 9B)。一方、アイソタイプ対照抗体の投与では、杯細胞化生及び IgE 濃度に対する作用はみられなかった。

図 9 - デュピルマブの *in vivo* 杯細胞化生及び血清中総 IgE に対する作用

Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} マウス (1 群 $n=5\sim7$) に、陰性対照 DNA (Empty Vector) 又はマウス IL-25 を HDD で導入し、0、2、4 及び 7 日目に非結合アイソタイプ対照抗体又はデュピルマブ (REGN668) を各用量投与した。非投与対照群も設けた (Empty Vector、No Ab)。マウスを 9 日目に安楽殺し、肺組織を採取して過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色した。また、血中抗体濃度を解析するために、安楽殺時に血清も採取した。杯細胞化生 (A) は、気管支上皮 1 mm あたりの PAS 陽性上皮細胞の百分率として示す。安楽殺時 (9 日目) の血清中総 IgE (B) を測定した。各シンボルは個別値を示す。杯細胞化生 (A) 及び血清中総 IgE 濃度 (B) のデータの正規性を Kolmogorov-Smirnov 検定によって評価した。杯細胞化生のデータは正規分布ではなく、一元配置 ANOVA 後の Kruskal-Wallis 多重比較検定によって統計的有意性を検討した。血清中総 IgE 濃度データの対数変換値は正規分布を示し、一元配置 ANOVA 後の Tukey の多重比較検定によって統計的有意性を検討した。統計的有意性は、**** $p<0.0001$ 、*** $p<0.001$ 、** $p<0.01$ 又は* $p<0.05$ で示す。ND = 検出されず。

2.2.3 マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける 2 型免疫応答に対する作用

[Module 4.2.1.1-6: REGN668-MX-052]

Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} マウスを用いて、4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおけるデュピルマブの効果を評価した。本マウス肺炎モデルでは、HDM アレルゲンとして、HDM 抽出物を用い、反復鼻腔内感作した(70)。HDM アレルゲンは屋内アレルギーの重要な原因となっている(71)。HDM アレルゲンによる本炎症は古典的 2 型免疫応答を示し、肺好酸球浸潤の増加、気道の杯細胞化生の増加並びに血清中総 IgE 濃度及び血清中アレルギー特異的 IgG1 濃度の上昇が誘発される。

Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} マウスを 4 群に分け、生理食塩液又は HDM 抽出物を週 3 回、連続 4 週間鼻腔内投与した。2 群の HDM 感作マウスに、25 mg/kg のデュピルマブ又はアイソタイプ対照抗体を、1 週目から 4 週目まで週 2 回皮下投与した。有効性及び作用機序を確認するために、本試験では高投与用量を選

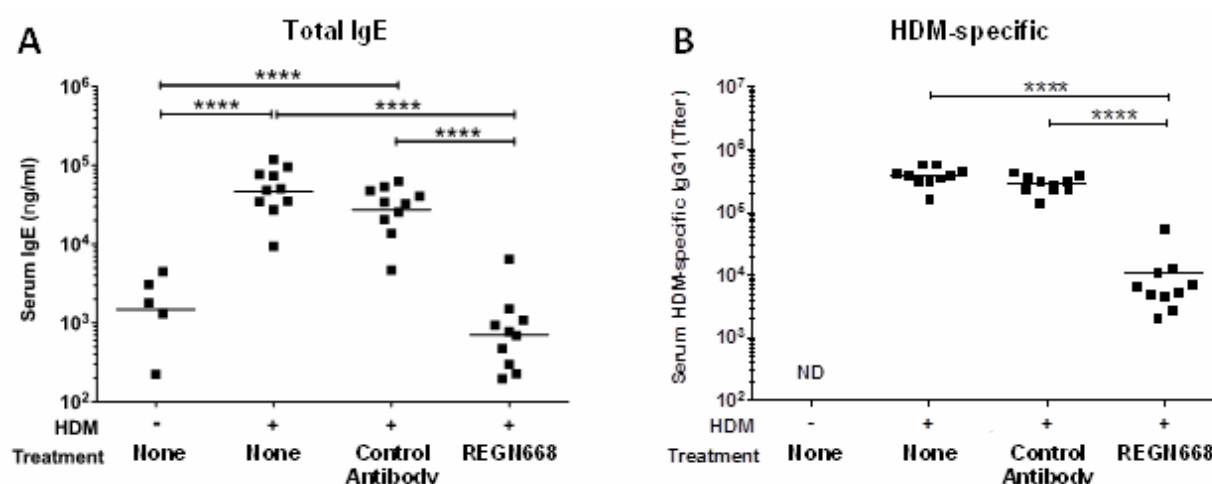
2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

扱した。試験の 30 日目に、すべてのマウスを安楽殺し、血液を心臓穿刺によって採取し、血清中総 IgE 濃度、血清中 HDM 特異的 IgG1 濃度及びデュピルマブの血清中濃度の測定に供した。また、同マウスから肺を採取して、肺好酸球の割合をフローサイトメトリーで解析するとともに、杯細胞化生について組織学的に検査した。

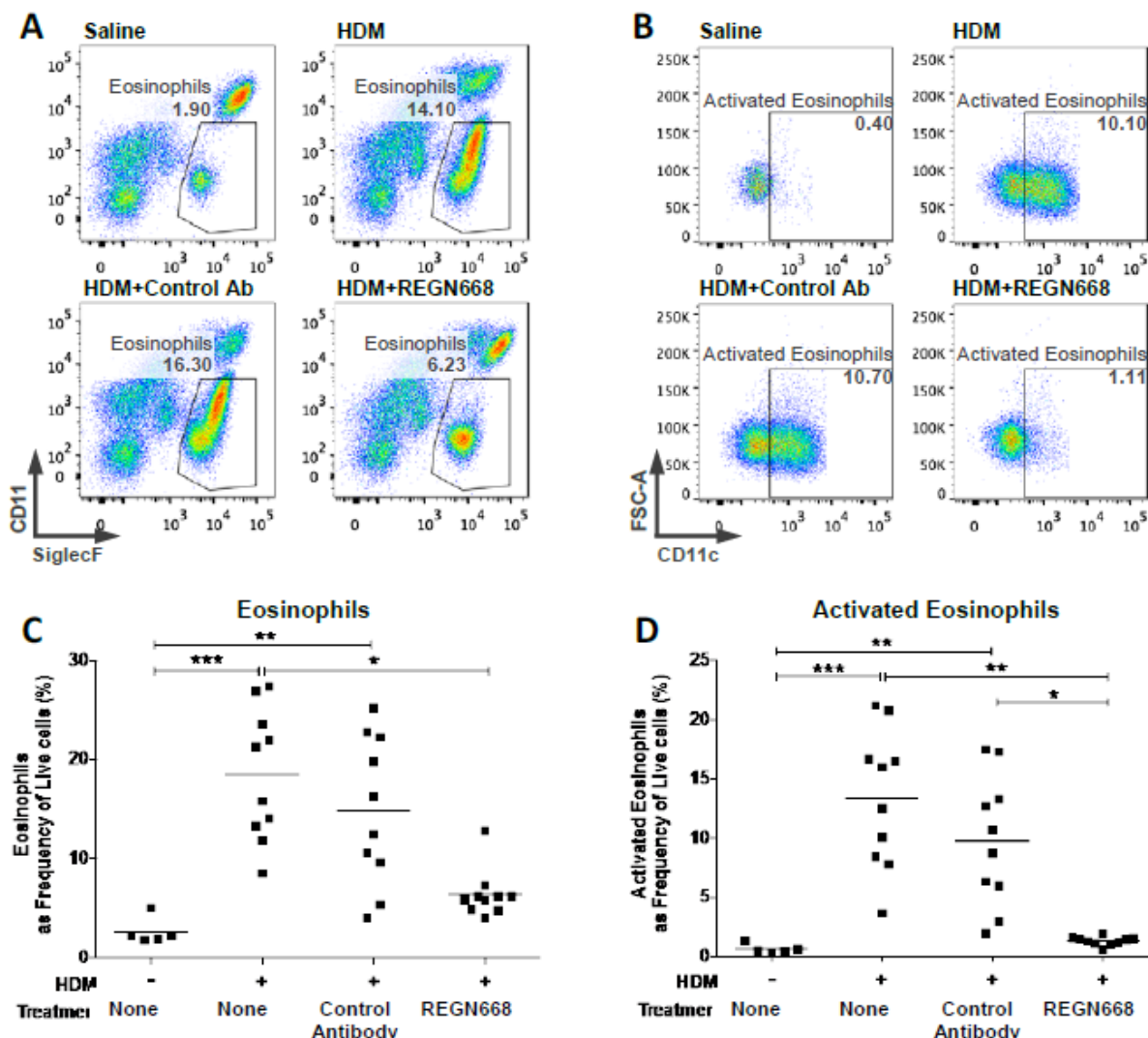
デュピルマブを投与した HDM 感作 *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}* マウスは、非投与 HDM 感作マウス及び対照抗体を投与した HDM 感作マウスと比較して、血中 IgE 濃度及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度が有意に低かった（図 10）。デュピルマブ投与マウスは、対照抗体投与マウスと比較して、肺における総好酸球の割合の低下傾向を示し、活性化好酸球の浸潤が有意に少なかった（図 11）。また、デュピルマブを投与した HDM 感作マウスは、対照抗体投与マウスと比較して、杯細胞化生も有意に少なかった（図 12）。以上のように、本アレルゲン誘発性肺炎モデルにおいて、デュピルマブは、25 mg/kg の週 2 回投与により、2 型気道炎症に関連するこれらの病理マーカーを抑制し、有効性を示した。安楽殺時に採取した血清中の平均デュピルマブ濃度は 377.5 µg/mL であった（抗 hIgG 抗体の ELISA を用いて測定）。

図 10 - デュピルマブの *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}* マウス 4 週間アレルゲン誘発性肺炎モデルにおける血中総 IgE 濃度及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度に対する作用



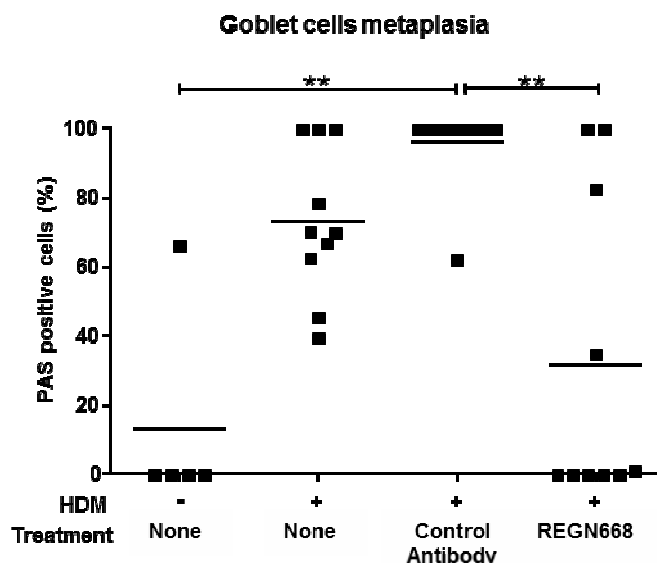
Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} マウスに、生理食塩液 (n=5) 又は HDM 抽出物 (1 群 n=10) を週 3 回、4 週間鼻腔内感作した。2 群のマウスに、25 mg/kg の対照抗体又はデュピルマブ (REGN668) を 1 週目から 4 週目まで週 2 回皮下投与した。最後の HDM 感作及びデュピルマブ投与を行ってから 4 日後の 30 日目に全血を採取し、血清を分離した。血中総 IgE 濃度（パネル A）及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度（パネル B）を ELISA によって測定した。HDM 非感作群では、HDM 特異的 IgG1 抗体は、検討した最低希釈 (1:100) で検出不可能であった (ND)。各シンボルは個別値を示す。データは GraphPad Prism (バージョン 6) を用いて解析した。一元配置 ANOVA 後の Tukey の多重比較検定によって検討した統計的有意性を、血中総 IgE 濃度（パネル A、*** : p<0.001、**** : p<0.0001）及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度（パネル B、**** : p<0.0001）について示す。

図 11 - デュピルマブの $Il4ra^{hu/hu}$ $Il4^{hu/hu}$ マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける肺好酸球浸潤に対する作用



$Il4ra^{hu/hu}$ $Il4^{hu/hu}$ マウスに、生理食塩液 (n=5) 又は HDM 抽出物 (1 群 n=10) を週 3 回、4 週間鼻腔内感作した。2 群のマウスに、25 mg/kg の対照抗体又はデュピルマブ (REGN668) を 1 週目から 4 週目まで週 2 回皮下投与した。最後の HDM 感作及びデュピルマブ投与を行ってから 4 日後の 30 日目にマウスを安楽殺し、肺を採取、分離して単細胞懸濁液とし、好酸球のフリーサイトメトリー分析に供した。好酸球は、単一生存 CD45⁺、F4/80⁺、Ly6G⁻、CD11c^{lo-int}、SiglecF^{hi} とした。各投与群の肺好酸球の典型的プロットを示す (パネル A)。活性化好酸球は、単一生存 CD45⁺、F4/80⁺、Ly6G⁻、CD11c^{lo-int}、SiglecF^{hi} とした。パネル A の CD11c^{lo-int}、SiglecF^{hi} 集団からゲーティングした各投与群の活性化好酸球の典型的プロットを示す (パネル B)。肺の好酸球 (パネル C) 及び活性化好酸球 (パネル D) は、細胞懸濁液中の生細胞の割合として示す。各シンボルは個別値を示す。データは GraphPad Prism (バージョン 6) を用いて解析した。Kruskal-Wallis の一元配置 ANOVA 後の Dunn の多重比較検定によって検討した好酸球の統計的有意性を示す (パネル C、* : p<0.05、** : p<0.01、*** : p<0.001)。一元配置 ANOVA 後の Tukey の多重比較検定によって検討した活性化好酸球の統計的有意性を示す (パネル D、* : p<0.05、** : p<0.01、*** : p<0.001)。

図 12 - デュピルマブの $Il4ra^{hu/hu}$ $Il4^{hu/hu}$ マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける杯細胞化生に対する作用



$Il4ra^{hu/hu}$ $Il4^{hu/hu}$ マウスに、生理食塩液 (n=5) 又は HDM 抽出物 (1 群 n=10) を週 3 回、4 週間鼻腔内感染した。2 群のマウスに、25 mg/kg の対照抗体又はデュピルマブ (REGN668) を 1 週目から 4 週目まで週 2 回皮下投与した。最後の HDM 感作及びデュピルマブ投与を行ってから 4 日後の 30 日目にマウスを安楽殺し、肺を採取して、組織学的検査に供した。主気管支 1 mm 長 (約 100 個の上皮細胞) における PAS 陽性杯細胞及び総上皮細胞を計数した。杯細胞化生は、気管支上皮 1 mm における PAS 陽性上皮細胞の百分率として示す。各シンボルは個別値を示す。データは GraphPad Prism (バージョン 6) を用いて解析した。Kruskal-Wallis の一元配置 ANOVA 後の Dunn の多重比較検定によって検討した統計的有意性を示す (** : p<0.01)。

2.3 マウス相同抗体の *in vitro* 薬理作用

2.3.1 マウス抗 IL-4Rα 相同抗体の作製

デュピルマブは mIL-4Rα に結合しないため、 $Il4ra^{hu/hu}$ VelociGene[®] マウスを用いて、mIL-4Rα 特異的なマウスモノクローナル相同抗体を作製した (72)。本マウスには mIL-4Rα 外部ドメインがないため、mIL-4Rα 特異的相同抗体作製のため用いた。 $Il4ra^{hu/hu}$ マウス ([Module 4.2.1.1-5] の 4.2 項) を mIL-4Rα で免疫化して得られた抗体について、高親和性阻害作用を指標として *in vitro* スクリーニングを行い、M2M1869N 及び REGN1103 を選択した。M2M1869N 又は REGN1103 の重鎖及び軽鎖可変領域を産生するハイブリドーマを単離し、これら可変領域を、それぞれマウス IgG1 重鎖定常領域及び κ 型軽鎖定常領域を含有するプラスミドベクター内でクローン化した。Fcγ 受容体への結合性が低く、エフェクター機能が低いデュピルマブを模倣するために、Fc 部位について、ヒト IgG4^P アイソタイプに相同するマウスアイソタイプとして、マウス IgG1 アイソタイプを選択した。以下の項で示すように、M2M1869N 及び REGN1103 を CHO 細胞で産生し、特徴を更に明らかにした。

2.3.2 mIL-4Rα への結合

[Module 4.2.1.1-7a: REGN668-MX-003]

[Module 4.2.1.1-8: REGN1103-MX-049]

Biacore 結合分析を実施して、M2M1869N 及び REGN1103 の組換え可溶性 mIL-4Rα 単量体への結合親和性を測定した。Biacore フォーマットを用いて、ポリクローナル抗マウス Fc で固定化した M2M1869N もしくは REGN1103 表面に mIL-4Rα 単量体タンパク質 (mIL-4Rα.mmH) を 25°C、pH 7.4 で注入した。M2M1869N もしくは REGN1103 の mIL-4Rα タンパク質との相互作用の速度論的結合パラメータの一覧を表 3 に示す。M2M1869N は mIL-4Rα.mmH に結合し、その K_D は 640 pmol/L であった。REGN1103 は mIL-4Rα.mmH に M2M1869N よりも高親和性で結合し、その K_D は 86.7 pmol/L であった。このため、マウスを用いた毒性試験及び薬物動態学試験では、REGN1103 をマウス相同抗体として用いた。

表 3 - M2M1869N 及び REGN1103 の mIL-4Rα 単量体タンパク質との相互作用の結合パラメータ (pH 7.4、25°C)

相同抗体	リガンド	k_a [(mol/L) ⁻¹ s ⁻¹]	k_d (s ⁻¹)	K_D (pmol/L)	$t_{1/2}$ (分)
M2M1869N	mIL-4Rα.mmH	3.04×10^5	1.96×10^{-4}	640	59
REGN1103	mIL-4Rα.mmH	3.84×10^5	3.33×10^{-5}	86.7	347

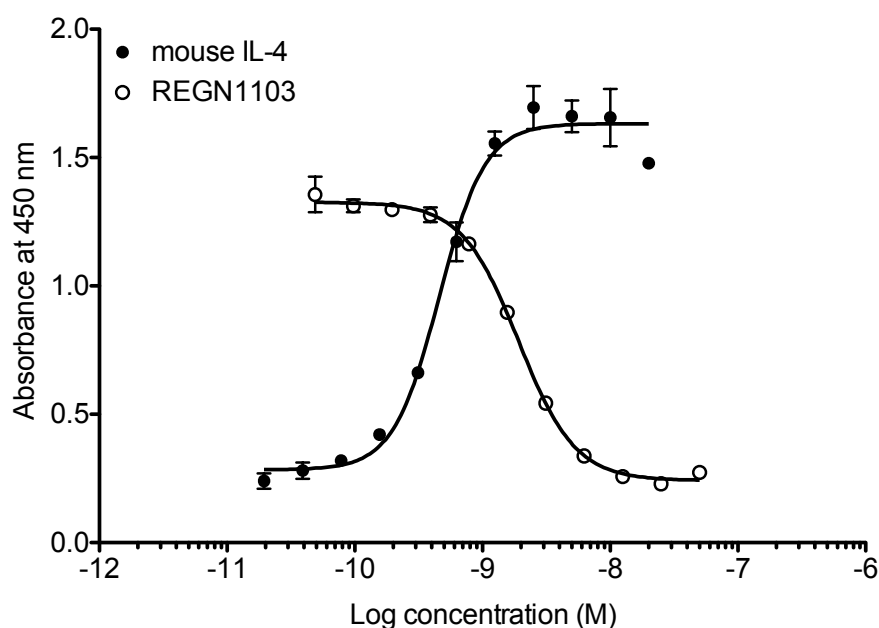
分析法の詳細は [Module 4.2.1.1-7] 5 項及び [Module 4.2.1.1-8] 5.1 項を参照。 k_a = 会合速度定数、 k_d = 解離速度定数、 K_D = 平衡解離定数、 $t_{1/2}$ = 標的滞留半減期。

2.3.3 mIL-4 及び mIL-13 による細胞増殖に対する作用

[Module 4.2.1.1-8: REGN1103-MX-049]

IL-4 は T 細胞増殖を促進することが明らかになっている (73)。REGN1103 は、mIL-4 で誘導される T 細胞増殖を阻害した。IL-4Rα を発現するマウス T 細胞株 HT-2 (74) を用いて、REGN1103 の I 型 IL-4Rα シグナル伝達阻害作用を評価した。mIL-4 は細胞増殖を促進し、その EC_{50} は 0.5 nmol/L であった (図 13)。REGN1103 の HT-2 細胞増殖阻害作用の IC_{50} 及び IC_{90} を算出し、表 4 に示す。

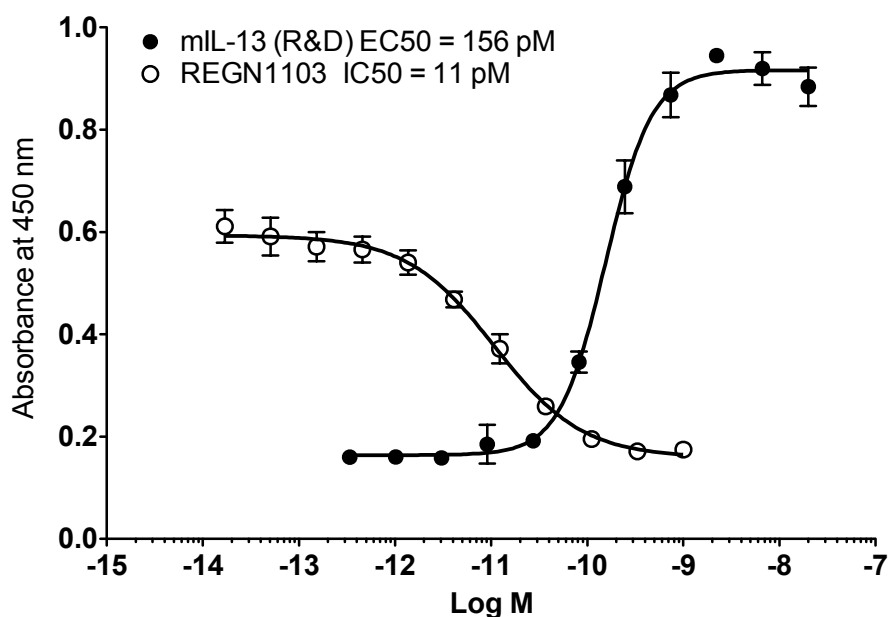
図 13 - REGN1103 の mIL-4 刺激 HT-2 細胞増殖に対する作用



mIL-4 を 0.02~20 nmol/L (黒丸) の濃度添加 (3 回測定) したときの HT-2 細胞増殖の用量反応曲線を作成した。REGN1103 の阻害効力を算出するために、REGN1103 を 0.05 nmol/L~50 nmol/L (白丸) の濃度で添加した後、mIL-4 を 1 nmol/L 添加した (3 回測定)。その後、細胞を 3 日間インキュベーション (37°C、5%CO₂) して増殖させた。細胞増殖は、CCK-8 (代謝活性を検出する比色試薬) を添加して 2 時間インキュベーション (37°C、5%CO₂) 後に測定した。450 nm での吸光度を Perkin Elmer Victor X5 プレートリーダーで測定した。データは Prism 5.0 ソフトウェアを用いた非線形回帰によって解析した。

IL-13 は B 細胞増殖を促進することが明らかになっている(75)。REGN1103 は、mIL-13 で誘導される B 細胞増殖も阻害した。マウス B 細胞株 B9 を用いて、REGN1103 の II 型 IL-4R α シグナル伝達阻害作用を評価した。mIL-13 は細胞増殖を促進し、その EC₅₀ は 156 pmol/L であった (図 14)。REGN1103 の B9 細胞増殖阻害作用の IC₅₀ 及び IC₉₀ を算出し、表 4 に示す。

図 14 - REGN1103 の mL-13 刺激 B9 細胞増殖への作用



mL-13 を、0.3 pmol/L～20 nmol/L（黒丸）の濃度添加（3 回測定）したときの B9 細胞増殖の用量反応曲線を作成した。REGN1103 の阻害効力を算出するために、REGN1103 を 0.02 pmol/L～1 nmol/L（白丸）の濃度で添加した後、mL-13 を 100 pmol/L 添加した（3 回測定）。その後、細胞を 3 日間インキュベーション（37°C、5%CO₂）して増殖させた。細胞増殖は、CCK-8 を添加して 3 時間インキュベーション（37°C、5%CO₂）後に測定した。450 nm での吸光度を Perkin Elmer Victor X5 プレートリーダーで測定した。データは Prism 5.0 ソフトウェアを用いた非線形回帰によって解析した。

表 4 - REGN1103 の増殖阻害作用の IC₅₀ 及び IC₉₀

	IL-4 ^a 1 nmol/L		IL-13 ^b 100 pmol/L	
	REGN1103 0.05 nmol/L～50 nmol/L		REGN1103 0.2 pmol/L～1 nmol/L	
	nmol/L	μg/mL	pmol/L	μg/mL
IC ₅₀	1.9	0.29	11	0.0017
IC ₉₀	5.9	0.89	110	0.017

^a HT-2 細胞で実施した細胞増殖アッセイ

^b B9 細胞で実施した細胞増殖アッセイ

以上のように、細胞を用いたアッセイにおいて、REGN1103 は IL-4 及び IL-13 を介したシグナル伝達を阻害した。REGN1103 で認められた結合親和性及び活性は、同様のアッセイにおいてデュピルマブで認められたものと同程度であった（2.1 項）。

2.3.4 補体依存性細胞傷害作用

[Module 4.2.1.1-8: REGN1103-MX-049]

マウス血清補体とインキュベーションした標的細胞株において、REGN1103 が CDC を促進する可能性について評価した。REGN1103 は、IL-4Rα を発現する HT-2 細胞及び IL-4Rα を発現しない MG87 細胞（陰性対照細胞株）に対して CDC を誘発しなかった（[Module 4.2.1.1-8 図 4]）。また、アイソタイプ対照抗体（REGN653）は、いずれの細胞株に対しても CDC を誘発しなかった。一方、陽性対照抗体の REGN168（mIgG2a Fc 領域を含有する抗 CD20 抗体）は、RL 細胞 [CD20 を発現することが報告されているヒト非ホジキンリンパ腫 B 細胞株(76)] とインキュベーションしたときに CDC を誘発した。

2.4 マウス相同抗体の *in vivo* 薬理作用

2.4.1 M2M1869N のハプテン誘発接触過敏症 2 型皮膚炎モデルにおける作用

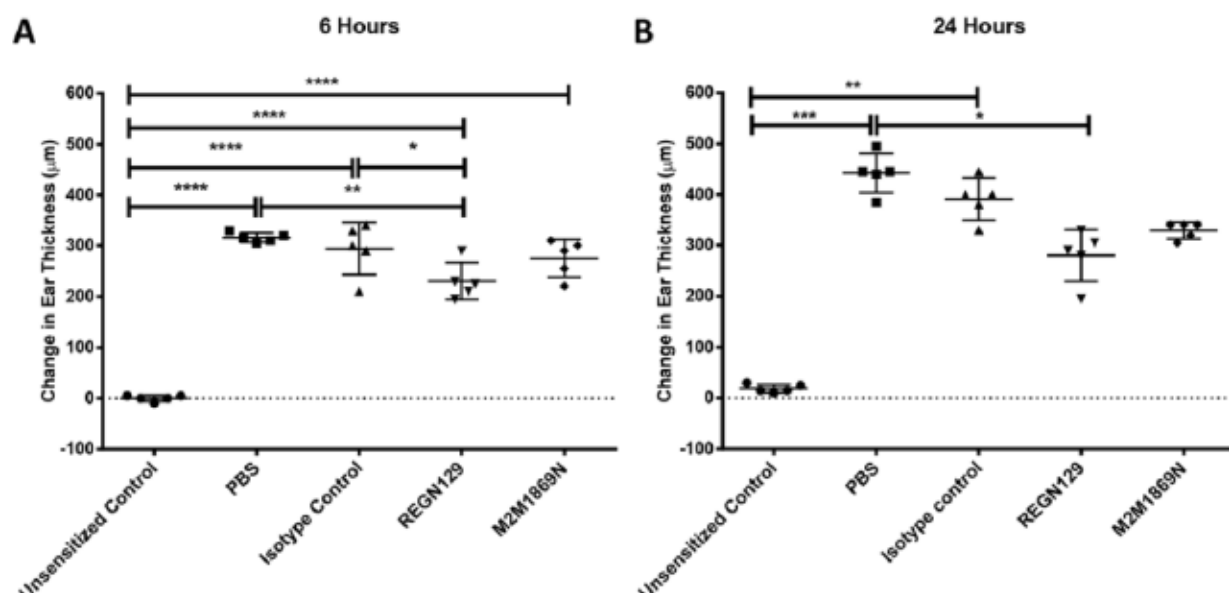
[Module 4.2.1.1-7a: REGN668-MX-003]

M2M1869N の IL-4 及び IL-13 誘発 2 型炎症抑制効果を、AD 様炎症モデルであるハプテン誘発接触過敏マウスモデルを用いて評価した。迅速に結果が評価できること及び再現性が高いことから、接触過敏モデルは候補化合物の薬効評価に繁用されている。本モデルでは、皮膚にハプテンを塗布して感作させ、その後同じハプテンを再度塗布することにより急性皮膚炎症を惹起させる(77)。種々のアレルゲン (FITC、dinitrofluorobenzene (DNFB)、trinitrochlorobenzene (TNCB)、dinitrothiocyanobenzene (DNTB) (78)) を用いた過敏性マウスモデルが開発されている。FITC はマウスにおいて 2 型反応を誘導し、そのモデルにおいて AD の特徴、すなわち、局所好酸球、マスト細胞浸潤、抗 FITC IgE の産生、CD4⁺T 細胞からの IL-4 及び IL-10 の産生が認められる(77)(78)(79)(80)。さらに、即時型及び遅延型応答も認められる。Dibutyl phthalate (DBP) は樹状細胞を流入領域リンパ節に動員することにより FITC 誘発接触過敏モデルにおいて、アジュバントとして機能すると考えられる(81)。DBP による樹状細胞の動員は TSLP のアップレギュレーションにより媒介される(82)。同様の所見が、AD 患者の皮膚で報告されている(83)。

BALB/c マウスは、未処置（無感作対照群）もしくは、感作（第 1 日）30 分前に、M2M1869N (20 mg/kg)、アイソタイプ抗体 (20 mg/kg) もしくはリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) を皮下投与された。第 1 日及び 2 日に、胸部皮膚に 0.5% FITC を DBP とアセトン (1:1) 溶液に溶解した溶液を投与した。第 6 日に、PBS、アイソタイプ抗体、M2M1869N を再び皮下投与し、その後、左耳介両側に 0.5% FITC を塗布した。右耳には溶媒を塗布した。耳厚を FITC 塗布の 0、6、24 時間後に測定した（図 15）。

その結果、FITC/DBP 溶液で感作したマウスでは、無感作対照群と比較して顕著な左耳介腫脹が FITC/DBP 塗布（FITC 惹起）6 及び 24 時間後に認められた。耳介腫脹は誘発 6 時間後よりも 24 時間後の方が顕著であった。M2M1869N 投与は、アイソタイプ対照群（陰性対照群）に比べ、耳介腫脹抑制傾向を示した。この抑制傾向は、IL-4 Rα の阻害が AD を含む 2 型炎症の効果的な治療法である可能性を示唆した。

図 15 - M2M1869N のハプテン誘発過敏症モデルにおける耳介腫脹に対する作用



マウスにPBS、アイソタイプ対照抗体（20 mg/kg）、マウス IL-13Rα2-Fc 融合タンパク質（REGN129、20 mg/kg）、又は M2M1869N（20 mg/kg）を感作 30 分前に皮下投与した（day 0）。ワックスを用いて脱毛したマウス胸部皮膚に、0.5% FITC 溶液（フタル酸ジブチル：アセトン=1:1 溶液で溶解）を塗布することにより 2 回感作した（day 0 及び day 1）。6 日後（day 6）、マウスに再び PBS、アイソタイプ対照抗体（20 mg/kg）、REGN129（20 mg/kg）又は M2M1869N（20 mg/kg）を皮下投与した後、左耳介両側に 0.5% FITC 溶液を塗布した。右耳介には溶媒を塗布した。FITC 塗布 0（ベースライン値）、6（パネル A）及び 24 時間後（パネル B）に耳厚を測定した。非感作対照群も設けた。図中の各シンボルは個別値を示す。データは GraphPad Prism（バージョン 6）を用いて解析した。パネル A では、一元配置 ANOVA 後の Tukey post hoc 多重比較検定により、パネル B では、Kruskal-Wallis の一元配置 ANOVA 後の Dunn の多比較検定により統計的有意差を検討した（*：p<0.05、**：p<0.01、***：p<0.001、****：p<0.0001）。

2.4.2 REGN1103 のマウス 4 週間アレルゲン誘発性肺炎モデルにおける 2 型免疫応答に対する作用

[Module 4.2.1.1-9: REGN1103-MX-050]

2.2.1 項に示した 4 週間 HDM 誘発性肺炎モデルを用いて、野生型 Balb/c マウスの気道炎症マーカーに対する REGN1103 の薬理作用を評価した。マウスを 4 群に分け、生理食塩液又は HDM 抽出物を週 3 回、連続 4 週間鼻腔内投与した。2 群の HDM 感作マウスに、25 mg/kg の REGN1103 又はアイソタイプ対照抗体を、1 週目から 4 週目まで週 2 回皮下投与した。この投与用量は、デュピルマブの試験用量と合わせるため、また有効性及び作用機序を確認するために選択した。試験 30 日目に、すべてのマウスを安楽殺し、血液を心臓穿刺によって採取し、血清中総 IgE 濃度、血清 HDM 特異的 IgG1 濃度及び REGN1103 の血清中濃度の測定に供した。また、同マウスから肺を採取して、肺好酸球の割合をフローサイトメトリーで解析するとともに、気道の杯細胞化生について組織学的に検査した。

REGN1103 を投与した HDM 感作野生型 Balb/c マウスは、非投与 HDM 感作マウス及び対照抗体を投与した HDM 感作マウスと比較して、血中 IgE 濃度及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度が有意に低かった（図 16）。REGN1103 投与マウスでは、非投与 HDM 感作マウス及び対照抗体を投与した HDM 感作マウスと比較して、肺における総好酸球及び活性化好酸球の割合が有意に低かった（図 17）。また、

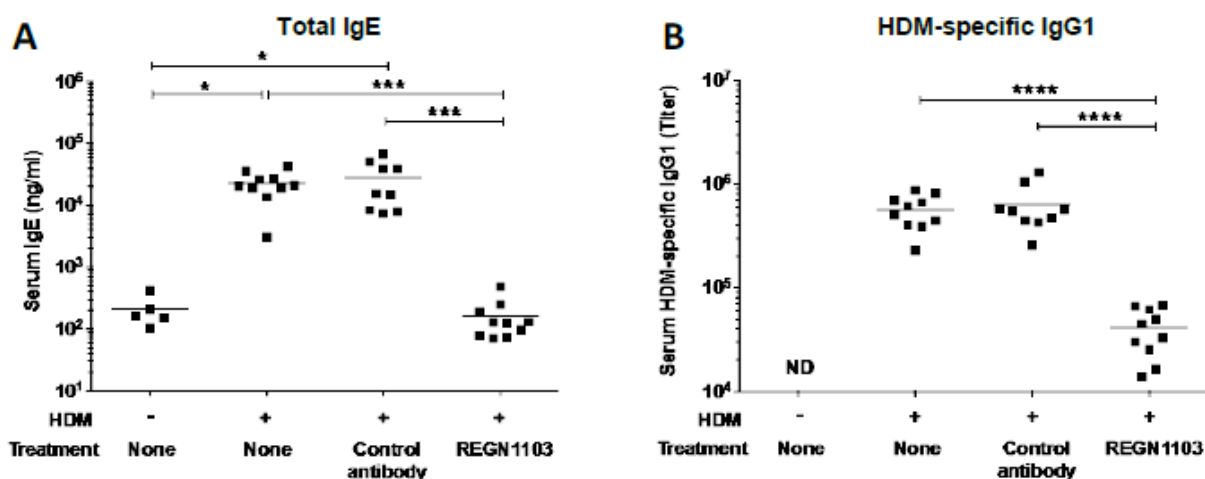
2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

REGN1103 を投与した HDM 感作マウスは、対照抗体投与マウスと比較して、杯細胞化生も有意に少なかった（図 18）。25 mg/kg の用量を週 2 回投与して評価したすべてのエンドポイントにおいて有効性が認められた。抗 mIL-4R α 抗体の ELISA により測定した安楽殺時の平均血清中 REGN1103 濃度は 387.07 μ g/mL であった。

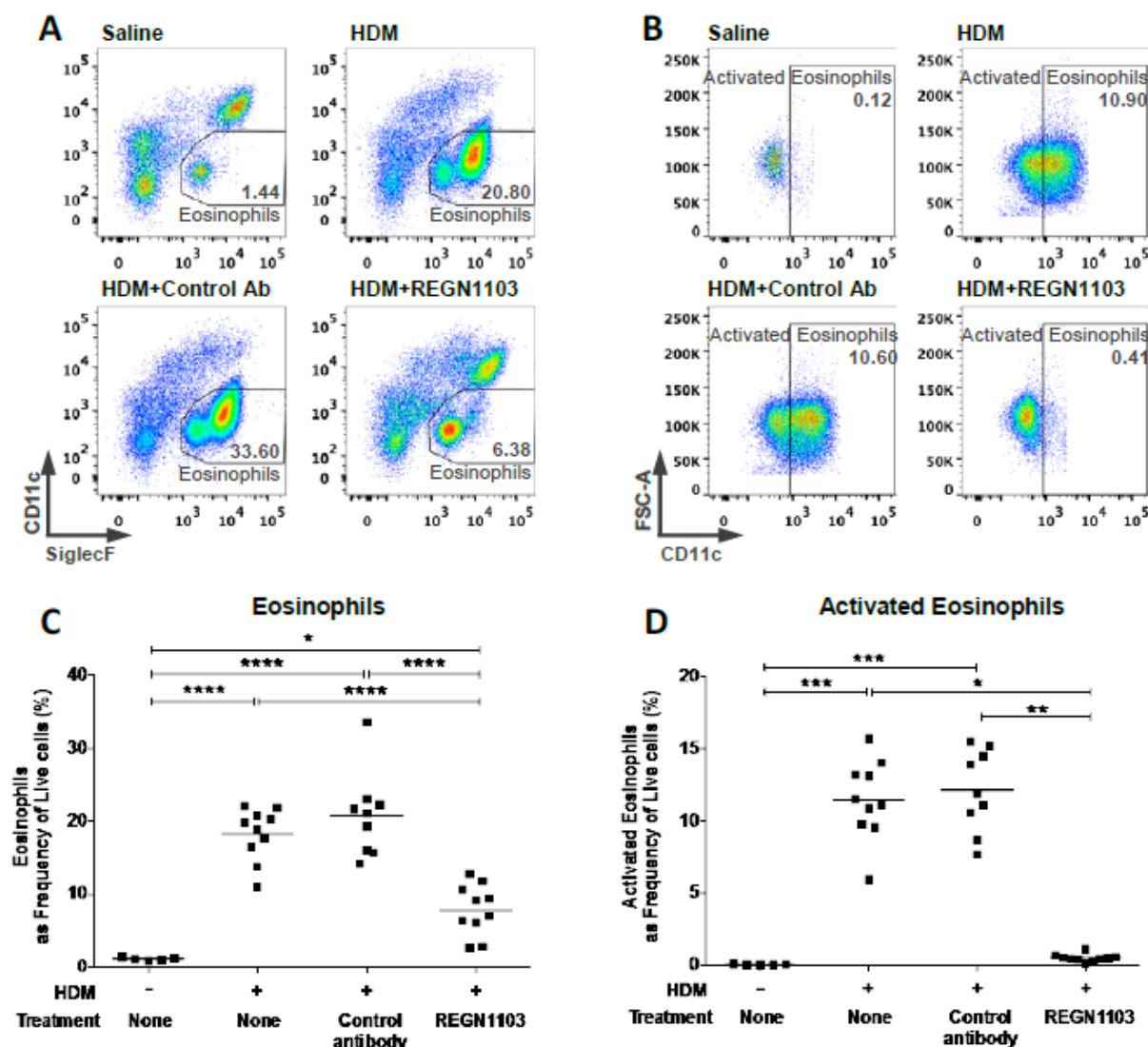
Balb/c マウスを用いた HDM 誘発性肺炎モデルにおける REGN1103 の有効性は、*Il4ra*^{hu/hu} *Il4*^{hu/hu} マウスにおけるデュピルマブの有効性（2.2.1 項）と同程度であった。デュピルマブの試験では、REGN1103 の試験で用いたマウスと比較して、投与群内の個体間変動が大きかった。これは、REGN1103 の試験は同種（homogenous）遺伝子型のマウスを用いて実施したのに対して、デュピルマブの試験では混合系（mixed strain）遺伝子型のマウスを用いて実施したためと考えられる。

図 16 - REGN1103 の Balb/c マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける血中総 IgE 濃度及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度に対する作用



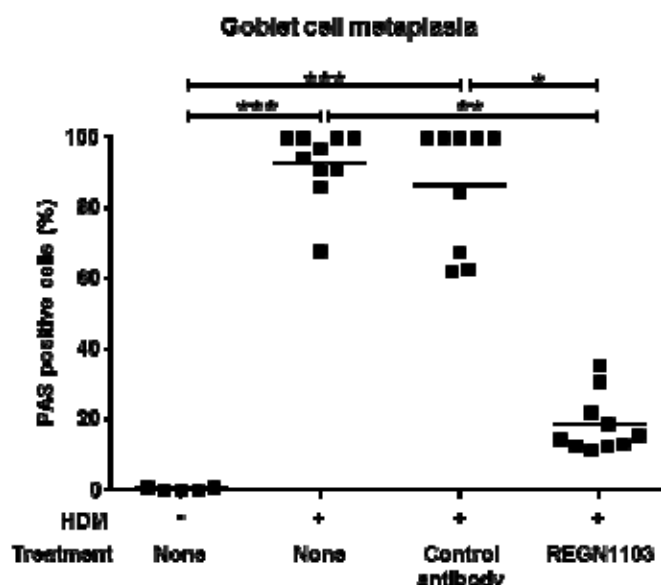
野生型 Balb/c マウスに、生理食塩液（n=5）又は HDM 抽出物（1 群 n=9~10）を週 3 回、4 週間鼻腔内感作した。2 群のマウスに、25 mg/kg の対照抗体又は REGN1103 を 1 週目から 4 週目まで週 2 回皮下投与した。最後の HDM 感作及び REGN1103 投与を行ってから 3 日後の 30 日目に全血を採取し、血清を分離した。血中総 IgE 濃度（パネル A）及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度（パネル B）を ELISA によって測定した。HDM 非感作群では、HDM 特異的 IgG1 抗体は、検討した最低希釈（1:100）で検出不可能であった（ND）。各シンボルは個別値を示す。データは GraphPad Prism（バージョン 6）を用いて解析した。Kruskal-Wallis の一元配置 ANOVA 後の Dunn の多重比較検定によって検討した血中総 IgE 濃度の統計的有意性を示す（パネル A、* : p<0.05、*** : p<0.001）。一元配置 ANOVA 後の Tukey の多重比較検定によって検討した血中 HDM 特異的 IgG1 濃度の統計的有意性を示す（パネル B、**** : p<0.0001）。

図 17 - REGN1103 の Balb/c マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける肺好酸球浸潤に対する作用



野生型 Balb/c マウスに、生理食塩液 (n=5) 又は HDM 抽出物 (1 群 n=9~10) を週 3 回、4 週間鼻腔内感作した。2 群のマウスに、25 mg/kg の対照抗体又は REGN1103 を 1 週目から 4 週目まで週 2 回皮下投与した。最後の HDM 感作及び REGN1103 投与を行ってから 3 日後の 30 日目にマウスを安楽殺し、肺を採取、分離して単一細胞懸濁液とし、好酸球のフリーサイトメトリー分析に供した。好酸球は、単一生存 CD45⁺、F4/80⁺、Ly6G⁻、CD11c^{lo-int}、SiglecF^{hi} とした。各投与群の肺好酸球の典型的プロットを示す (パネル A)。活性化好酸球は、単一生存 CD45⁺、F4/80⁺、Ly6G⁻、CD11c^{int}、SiglecF^{hi} とした。パネル A の CD11c^{lo-int}、SiglecF^{hi} 集団からゲーティングした各投与群の活性化好酸球の典型的プロットを示す (パネル B)。肺の好酸球 (パネル C) 及び活性化好酸球 (パネル D) は、細胞懸濁液中の生細胞の割合として示す。各シンボルは個別値を示す。データは GraphPad Prism (バージョン 6) を用いて解析した。一元配置 ANOVA 後の Tukey の多重比較検定によって検討した好酸球の統計的有意性を示す (パネル C、*: p<0.05、****: p<0.0001)。Kruskal-Wallis の一元配置 ANOVA 後の Dunn の多重比較検定によって検討した活性化好酸球の統計的有意性を示す (パネル D、*: p<0.05、**: p<0.01、***: p<0.001)。

図 18 - REGN1103 の Balb/c マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける杯細胞化生に対する作用



野生型 Balb/c マウスに、生理食塩液 (n=5) 又は HDM 抽出物 (1 群 n=9~10) を週 3 回、4 週間鼻腔内感作した。2 群のマウスに、25 mg/kg の対照抗体又 REGN1103 を 1 週目から 4 週目まで週 2 回皮下投与した。最後の HDM 感作及び REGN1103 投与を行ってから 3 日後の 30 日目にマウスを安楽殺し、肺を採取して、組織学的検査に供した。主気管支 1 mm 長 (約 100 個の上皮細胞) における PAS 陽性杯細胞及び総上皮細胞を計数した。杯細胞化生は、気管支上皮 1 mm における PAS 陽性上皮細胞の百分率として示す。各シンボルは個別値を示す。データは GraphPad Prism (バージョン 6) を用いて解析した。Kruskal-Wallis の一元配置 ANOVA 後の Dunn の多重比較検定によって検討した統計的有意性を示す (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)。

2.5 REGN646 の *in vitro* 薬理作用

2.5.1 サル相同抗体 (REGN646) の作製

[Module 4.2.1.1-2: REGN646-MX-055]

デュピルマブのカニクイザル IL-4Rα タンパク質への結合性は弱く、カニクイザル細胞表面 IL-4Rα には結合しないため、MfIL-4Rα 特異的なヒトモノクローナル相同抗体 (REGN646) を作製した。

マウスを MfIL-4Rα で免疫化して得られた抗体について、高親和性阻害作用を指標として *in vitro* スクリーニングを行った ([Module 4.2.1.1-2] 4.1 項)。

選択した抗体 REGN646 を、CHO 細胞で産生し、親和性及び効力を評価する *in vitro* 試験によって特徴を更に明らかにした。なお、REGN646 の Fc はデュピルマブの Fc と同一であるため、REGN646 の Fc エフェクター機能活性は評価しなかった。

2.5.2 MfIL-4Rα への結合

[Module 4.2.1.1-2: REGN646-MX-055]

Biacore 結合分析を実施して、REGN646 の組換え可溶性 MfIL-4Rα 単量体及び二量体への結合親和性を測定した。Biacore フォーマットを用いて、センサーチップ表面に結合した抗ヒト Fc 抗体で固定化した REGN646 表面に、MfIL-4Rα 単量体及び二量体タンパク質（それぞれ MfIL-4Rα.mmH 及び MfIL-4Rα.mFc）を 25°C、pH 7.4 で注入した。REGN646 の MfIL-4Rα 単量体及び二量体タンパク質との相互作用の速度論的結合パラメータの一覧を表 5 に示す。REGN646 は、MfIL-4Rα 単量体に結合し、その K_D は 2.5 nmol/L であった。また、REGN646 は、MfIL-4Rα 二量体に結合し、認められた K_D は 31 pmol/L であった。MfIL-4Rα 単量体及び二量体への結合親和性において認められた差異は、結合活性を増強する二価結合に起因するものである。

表 5 - REGN646 の MfIL-4Rα 単量体及び二量体タンパク質との相互作用の結合パラメータ (pH 7.4、25°C)

単量体 ^a /二量体 ^b	k_a [(mol/L) ⁻¹ s ⁻¹]	k_d (s ⁻¹)	K_D (nmol/L)	$t_{1/2}$ (分)
単量体	4.4×10^5	1.1×10^{-3}	2.5	11
二量体	5.9×10^5	1.8×10^{-5}	0.031	640

分析法の詳細は[Module 4.2.1.1-2]の 5.2 項を参照。 k_a = 会合速度定数、 k_d = 解離速度定数、 K_D = 平衡解離定数、 $t_{1/2}$ = 標的滞留半減期。

^a 単量体構造は、MycMycHis タグを有する MfIL-4Rα 外部ドメインに相当する。

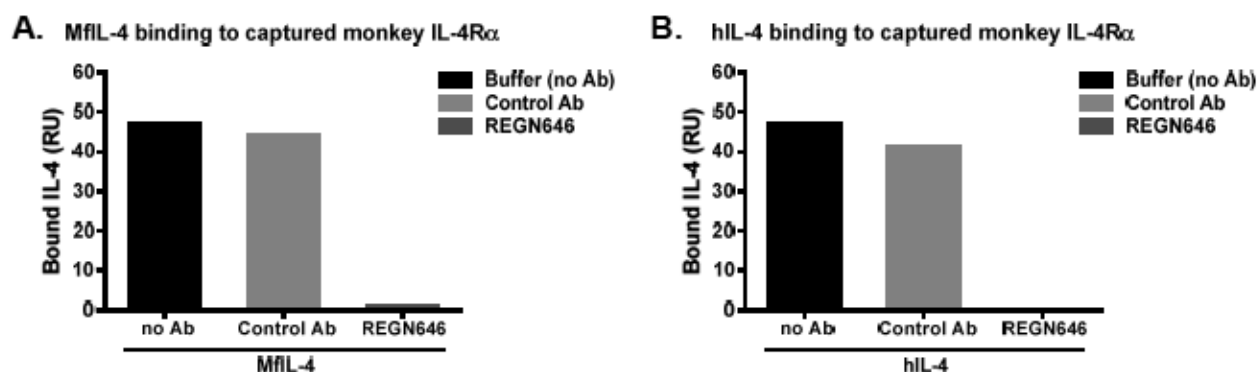
^b 二量体構造は、マウス IgG2a Fc によって融合した 2 つの MfIL-4Rα 外部ドメインに相当する。SPR-Biacore 結合分析における組換え IL-4Rα 二量体タンパク質への REGN646 の結合は、REGN646 の細胞表面 IL-4Rα への実際の結合をより厳密に示すものである。

2.5.3 IL-4 の MfIL-4Rα への結合に対する阻害作用

[Module 4.2.1.1-2: REGN646-MX-055]

Biacore 結合分析を実施して、hIL-4 又は MfIL-4 の MfIL-4Rα への結合に対する REGN646 の阻害作用を評価した。MfIL-4Rα 外部ドメインタンパク質を MycMycHis タグによってセンサーチップ表面に固定化し、飽和濃度の REGN646 又は同等濃度の非結合対照抗体（ペバシズマブ）とインキュベーションした。次に、hIL-4 又は MfIL-4 と REGN646 又はペバシズマブとの混合物を、対応する抗体で予め結合させた固定化 IL-4Rα.mmH 表面に注入した。REGN646 存在下において、意義のある MfIL-4 及び hIL-4 の結合は認められなかったことから、これらリガンドの MfIL-4Rα への結合は完全に阻害されることが確認された（図 19）。

図 19 - REGN646 の MfIL-4 及び hIL-4 の固定化 MfIL-4Rα への結合に対する阻害作用



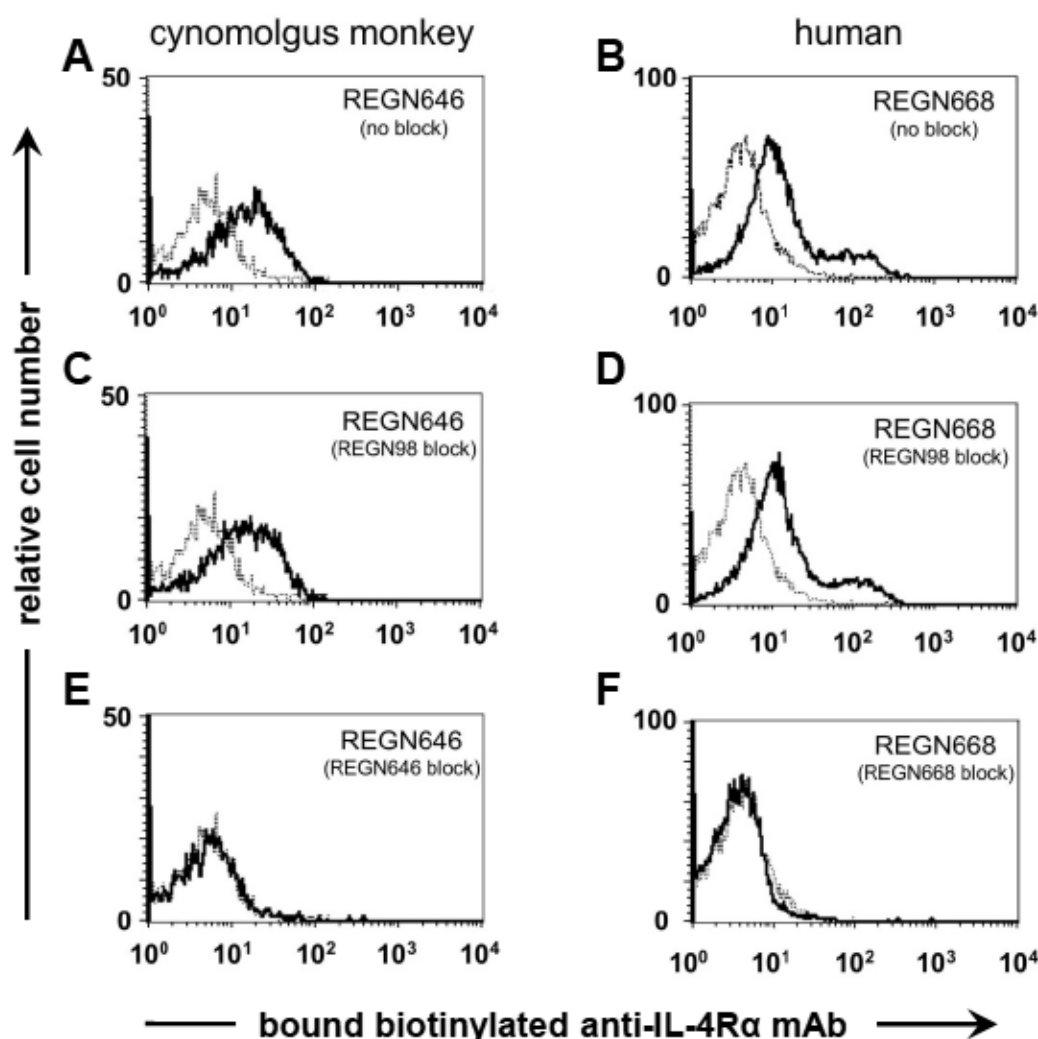
MfIL-4Rα 単量体外部ドメインタンパク質 (MfIL-4Rα.mmH) を C 末端 MycMycHis タグによって Biacore センサーチップ上に固定化し、飽和濃度 (333 nmol/L) の REGN646 又は同濃度の非結合対照抗体 (ペバシズマブ) とインキュベーションした。並行して、固定化した MfIL-4Rα 表面に対照緩衝液を注入した (緩衝液対照)。次に、333 nmol/L の REGN646 (赤色) 又は対照抗体 (Ctrl Ab、灰色) と 25 nmol/L の MfIL-4 (A) 又は hIL-4 (B) との混合物を、対応する抗体で予めインキュベーションした固定化 MfIL-4Rα 表面に注入した。抗体非存在下で IL-4 を緩衝液対照の受容体表面 (no Ab、黒色) に注入した。共鳴シグナルの変化を RU で記録し、リガンド結合を評価した。抗体非存在下 (緩衝液対照) 又は非結合対照抗体存在下において記録された共鳴シグナルは 41~47 RU であったことから、MfIL-4Rα 受容体表面に IL-4 リガンドが結合することが確認された。MfIL-4 及び hIL-4 の MfIL-4Rα への結合の共鳴シグナルは、REGN646 存在下でそれぞれ 1 RU 及び 0 RU であったことから、REGN646 によって IL-4 の MfIL-4Rα への結合は直接阻害されることが示された。RU = 共鳴単位。

2.5.4 カニクイザル又はヒトリンパ球細胞表面の天然 IL-4Rα への結合

[Module 4.2.1.1-2: REGN646-MX-055]

REGN646 は、カニクイザル末梢血リンパ球表面の内因性 MfIL-4Rα に結合した。ビオチン化 REGN646 の MfIL-4Rα への結合は、細胞を過剰量の hIL-4 又は非標識 REGN646 とプレインキュベーションすることによって阻害されたが、非結合アイソタイプ対照抗体 (REGN98) とプレインキュベーションしたときには影響を受けなかったため、特異的であることで示された (図 20)。デュピルマブ及びヒトリンパ球を用いた標識試験を並行して実施し、同様の結果が認められた (図 20)。

図 20 - REGN646 のカニクイザルリンパ球上の MfIL-4Rα への結合



カニクイザル又はヒトの全血をビオチン化 REGN646 IL-4Rα 抗体 (1 µg/mL) 又はビオチン化デュピルマブ (REGN668) IL-4Rα 抗体 (1 µg/mL) と阻害薬非存在下 (no block)、非結合アイソタイプ対照存在下 (REGN98 block、10 µg/mL) 又は非結合型抗体存在下 [(REGN646 block、10 µg/mL) 及び (REGN668 block、10 µg/mL)] でインキュベーションした。カニクイザル及びヒト検体（淡灰色ヒストグラム）での染色特異性を制御する阻害薬として、過剰量の組換え hIL-4 (10 µg/mL) も組み入れた。結合したビオチン化抗体を SA-PE (A~F の黒色ヒストグラム) によって検出した。すべての検体は、アロフィコシアニン (APC) 結合型抗 CD20 抗体 (クローン 2H7、BD Biosciences、20 µL/検体) で共染色した。前方及び側方散乱光でリンパ球をゲーティングした後、CD20 陽性細胞をゲーティングした。全ヒストグラムの x 軸は PE 染色 (IL-4Rα 発現) 強度を示し、y 軸は相対的細胞数を示す。

2.5.5 IL-4 及び IL-13 シグナル伝達に対する作用

[Module 4.2.1.1-2: REGN646-MX-055]

細胞を用いた 2 つのアッセイ、すなわち、STAT6/ルシフェラーゼレポーターをトランスフェクションした HEK293 細胞株を用いたパイオアッセイ、及びカニクイザル全血を用いて 2 型ケモカイン TARC

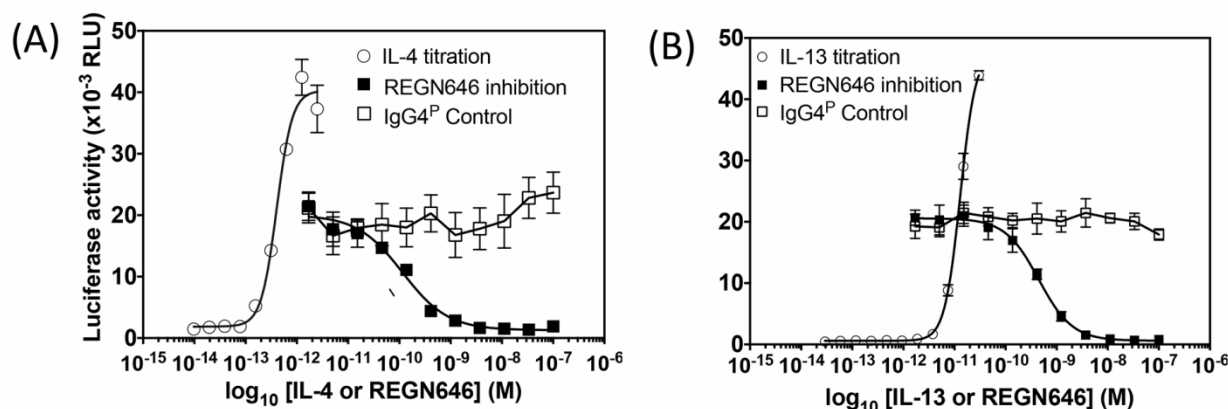
2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

の分泌を測定した初代培養細胞の *in vitro* アッセイにおいて、REGN646 は、IL-4 及び IL-13 依存的シグナル伝達を阻害した。

トランスフェクションしたカニクイザル／ヒトキメラ型 IL-4Rα (Mf: hIL-4Rα) 分子を用いて、MfIL-4 及び MfIL-13 を介したシグナル伝達に対する REGN646 の *in vitro* での阻害作用を測定するバイオアッセイを開発した。MfIL-4 及び MfIL-13 は、いずれもルシフェラーゼ発現を誘導し、それぞれの EC₅₀ は 0.41 pmol/L (図 21A) 及び 13 pmol/L (図 21B) であった。REGN646 は、0.3 pmol/L の MfIL-4 存在下での MfIL-4 を介したルシフェラーゼ発現を阻害し、その IC₅₀ は 116 pmol/L であった。また、REGN646 は、10 pmol/L の MfIL-13 存在下での MfIL-13 を介したルシフェラーゼ活性を阻害し、その IC₅₀ は 447 pmol/L であった。IgG4^P 対照は、0.3 pmol/L の MfIL-4 存在下及び 10 pmol/L の MfIL-13 存在下で活性を示さなかった。

図 21 - REGN646 の MfIL-4Rα 媒介 MfIL-4 及び MfIL-13 誘発 STAT6 シグナル伝達活性化に対する作用



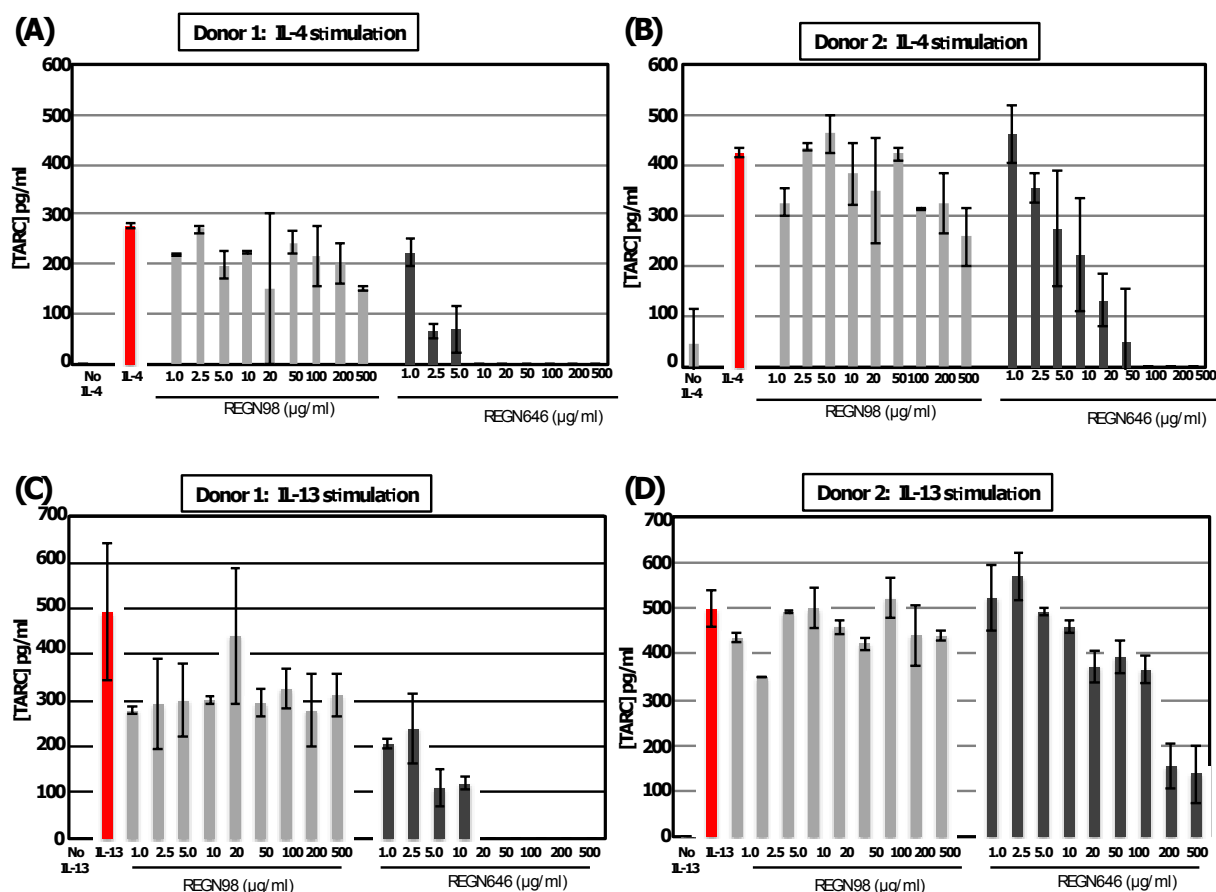
キメラ型 Mf: hIL-4Rα を安定的にトランスフェクションした HEK293/STAT6/Luc (クローン G11) 細胞を、デュピルマブ (100 nmol/L) とブレインキューベーションして内因性 hIL-4Rα シグナル伝達を阻害した。デュピルマブは、細胞表面 MfIL-4Rα に結合しない (図 4)。細胞を漸増濃度の (A) MfIL-4 (9.7 fmol/L ~ 10 pmol/L、白丸) 又は (B) MfIL-13 (29 fmol/L ~ 30 pmol/L、白丸) で処理すると、Mf: hIL-4Rα シグナル伝達によるルシフェラーゼ発現の誘導を示すルミネセンス (RLU) の増加がみられた。MfIL-4 は、ルシフェラーゼ発現を誘導し、その EC₅₀ は 0.41 pmol/L であった (A)。MfIL-13 は同様にルシフェラーゼ発現を誘導し、その EC₅₀ は 13 pmol/L であった (B)。Mf: hIL-4Rα シグナル伝達に対する REGN646 の阻害作用を評価するために、細胞を一定濃度の MfIL-4 又は MfIL-13 存在下で、漸増濃度 (1.7 pmol/L ~ 100 nmol/L) の REGN646 とインキュベーションした。REGN646 (黒四角) は、0.3 pmol/L の MfIL-4 存在下での MfIL-4 を介したルシフェラーゼ発現を阻害し、その IC₅₀ は 116 pmol/L であった (A)。同様に、REGN646 (黒四角) は、10 pmol/L の MfIL-13 存在下での MfIL-13 を介したルシフェラーゼ発現を阻害し、その IC₅₀ は 447 pmol/L であった (B)。REGN646 の阻害作用の特異性を確認するために、並行して、IgG4^P アイソタイプ対照抗体を漸増濃度で細胞とインキュベーションした。IgG4^P 対照抗体 (白四角、A、B) は、同一アッセイ条件下において阻害活性を示さなかった。RLU: 相対発光量。

REGN646 は、アイソタイプ対照抗体 (本アッセイにおいて阻害作用はみられなかった) と比較して、カニクイザル全血の hIL-4 及び hIL-13 を介した TARC 分泌も阻害した (図 22)。また、REGN646 は、阻害作用を示さなかったアイソタイプ対照抗体と比較して、TARC 分泌 (0.5 nmol/L の IL-4 又は 1 nmol/L

2.6.2 薬理試験の概要文
 SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

の IL-13 によって誘導）を用量依存的に阻害した。REGN646 の IL-4 及び IL-13 刺激性 TARC 分泌阻害作用の IC₅₀ 及び IC₉₀ を算出し、表 6 に示す。

図 22 - REGN646 のカニクイザル全血培養における hIL-4 及び hIL-13 刺激性 TARC 分泌に対する作用



カニクイザル全血における IL-4 (A、B) 又は IL-13 (C、D) 刺激性 TARC 分泌阻害作用。血縁関係のないカニクイザル 2 匹から得られた血液（ドナー 1：A、C、ドナー 2：B、D）を無血清 RPMI 培地で 1:1 希釈した。次に、血液を、1 ~500 µg/mL (6.7 nmol/L ~3.3 µmol/L) の濃度範囲の REGN646 又はアイソタイプ対照抗体 (REGN98) と 1 時間プレインキュベーションした後、一定濃度の hIL-4 又は hIL-13 を添加した。その後、全血を hIL-4 (0.5 nmol/L) 又は hIL-13 (1 nmol/L) 存在下で 24 時間培養した。非刺激対照検体 (No IL-4/IL-13) 及び抗体を添加しない刺激対照検体 (赤色棒) も組み入れた。培養期間終了時に上清を回収し、抗ヒト TARC 捕捉ポリクローナル抗体及び抗ヒト TARC ポリクローナル検出 mAb を用いてカニクイザル TARC を検出するために開発した改良 ELISA 法 (R&D Systems、米国ミネソタ州ミネアポリス) を用いて TARC を測定した。

表 6 - REGN646 の TARC 分泌阻害作用の IC₅₀ 及び IC₉₀

REGN646 1~500 µg/mL	IL-4 0.5 nmol/L				IL-13 1 nmol/L			
	ドナー1		ドナー2		ドナー1		ドナー2	
	nmol/L	µg/mL	nmol/L	µg/mL	nmol/L	µg/mL	nmol/L	µg/mL
IC ₅₀	ND	ND	37.8	5.67	50.5	7.57	ND	ND
IC ₉₀	ND	ND	536	80.3	157	23.6	ND	ND

ND：算出不可能な値。

以上のように、REGN646 は、細胞を用いたアッセイにおいて IL-4 及び IL-13 を介したシグナル伝達を阻害した。認められた REGN646 の結合親和性及び活性は、同様のアッセイにおけるデュピルマブの結合親和性及び活性と同程度であった（2.1 項）。

3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。

4 安全性薬理試験

独立したデュピルマブの安全性薬理試験は実施しなかった。しかしながら、カニクイザルを用いた REGN646 の反復投与毒性試験及びマウスを用いた REGN1103 の反復投与毒性試験に安全性薬理エンドポイントを組み入れた。カニクイザルでは、100 mg/kg/週の用量を最長 6 ヶ月間投与し、マウスでは、200 mg/kg/週の用量を最長 7 週間投与した（[Module 2.6.6]項参照）。

4.1 中枢神経系

カニクイザルに REGN646 を投与した反復投与毒性試験及びマウスに REGN1103 を投与した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への影響はみられなかった。これらの試験期間中、動物の瀕死状態又は生死の有無を 1 日 2 回以上観察した。カニクイザルの一般状態検査は、投与期間中に 1 日 1 回以上実施した。また、カニクイザルの試験期間中、詳細な身体検査を週 1 回以上実施した。マウスの一般状態検査は、投与期間中に 1 日 2 回（投与前に 1 回と投与 1～2 時間後に 1 回）実施した。

4.2 心血管系

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験のいずれの試験においても、REGN646 に関連する心拍数、血圧及び心電図（ECG）パラメータの変化は認められなかった。5 週間反復投与毒性試験では、投与開始前、初回及び最終の静脈内持続投与 1～2 時間後並びに 8 週間の回復期間終了時に血圧及び ECG を評価した。ECG の評価には、I、II、III、aVR、aVL 及び aVF 誘導を用いた。13 週間反復投与毒性試験では、投与開始前、投与期間中の 1、22 及び 85 日目の投与約 24 時間後、並びに 13 週間の回復期間終了時に血圧及び ECG を評価した。ECG の評価には、I、II、aVF、CV₄RL 及び CV₄LL 誘導を用いた。6 ヶ月間反復投与毒性試験では、投与開始前、投与期間中の 92 及び 182 日目、並びに 3 ヶ月間の回復期間中に 1 回（269 日目）、心拍数、血圧及び ECG を評価した。ECG の評価には、I、II、III、aVR、aVL 及び aVF 誘導を用いた。

4.3 呼吸系

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、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。評価は、4.1 項に示した一般状態検査と同時に行った。

5 薬力学的薬物相互作用試験

デュピルマブの薬物相互作用試験は実施しなかった。

6 考察及び結論

デュピルマブは、I型及びII型 IL-4/IL-13 受容体の IL-4R α サブユニットに結合して、IL-4 及び IL-13 により誘導されるシグナル伝達を阻害するヒトモノクローナル抗体（IgG4^P）である。IL-4 及び IL-13 は、アレルギー性炎症の誘導期及び作用発現期のいずれにおいても、2型免疫応答の強力なメディエーターであり、それらの機能には重複するものと異なるものがある。両サイトカインは、アトピー性疾患（AD、喘息など）に関連することが示されている。

SPR-Biacore 結合分析では、デュピルマブは hIL-4R α 単量体及び二量体に高親和性で結合することが示された。動物種間結合試験では、デュピルマブのカニクイザル、アカゲザル及びコモンマーモセットの IL-4R α への結合性は弱く、mIL-4R α には結合しないことが示された。デュピルマブはヒトリンパ球表面の天然 IL-4R α に結合したが、カニクイザル、アカゲザル及びコモンマーモセットリンパ球には結合しなかった。このため、マウス抗 IL-4R α 相同抗体（REGN1103）及びカニクイザル抗 IL-4R α 相同抗体（REGN646）を作製し、マウス及びヒト以外の霊長類を用いた毒性試験及び薬物動態試験に供した。

デュピルマブは、SPR-Biacore 結合分析及び初代ヒトリンパ球を用いたフローサイトメトリー試験において、IL-4 の hIL-4R α への結合を直接阻害した。また、2型免疫応答特異的な複数のパラメータ（B細胞の CD23 アップレギュレーション、全血の TARC 分泌など）を指標とした細胞を用いた *in vitro* アッセイにおいて、デュピルマブは、IL-4 及び IL-13 で誘導されるシグナル伝達を阻害した。細胞を用いた ADCC 及び CDC の *in vitro* アッセイにおいて、デュピルマブの 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* 試験結果から、デュピルマブの作用機序は、I型及びII型受容体の IL-4R α サブユニットに結合することによる IL-4 及び IL-13 シグナル伝達の直接阻害であると考えられる。

マウス相同抗体（REGN1103）及びサル相同抗体（REGN646）の結合及び活性を評価する *in vitro* 試験を実施した。REGN1103 及び REGN646 は、それぞれマウス及びカニクイザル由来の IL-4R α に高親和性で結合した。細胞を用いた *in vitro* アッセイにおいて、両相同抗体は、それぞれの種特異的 IL-4R α 受容体サブユニットを介して、IL-4 及び IL-13 で誘導されるシグナル伝達を阻害した。REGN1103 は CDC 活性を誘発しなかった。REGN646 の Fc はデュピルマブの Fc と同一であるため、REGN646 の Fc エフェクター機能活性は評価しなかった。REGN1103 及び REGN646 の結合及び *in vitro* 活性は、同様の試験におけるデュピルマブの結合及び *in vitro* 活性と同程度であったことから、毒性試験及び薬物動態試験においてこれらの相同抗体を使用することの妥当性が裏付けられた。

初期の *in vivo* 薬効試験として、第1世代のマウス相同抗体である M2M1869N の2型 AD 様皮膚炎症モデルであるハプテン誘発接触過敏症 Balb/c マウスモデルにおける効果を検討した。M2M1869N 投与により、耳介腫脹の抑制傾向が認められた。この抑制傾向は、IL-4R α の阻害が AD を含む2型炎症の有効な治療法であることを示唆した。これ以降の薬効評価は、第2世代のマウス相同抗体 REGN1103 もしくはデュピルマブを用いて実施した。

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

デュピルマブの *in vivo* 有効性は、遺伝子組換えマウスである *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}* マウスを用いて評価した。本マウスにおいて、デュピルマブは2型サイトカイン IL-25 の過剰発現によって誘導される2型免疫応答である杯細胞化生及び血中 IgE 濃度の上昇を抑制した。

また、アレルゲン誘発性2型炎症マウスモデルを用いて、デュピルマブ及びマウス相同抗体 (REGN1103) の *in vivo* 有効性を評価、比較した。デュピルマブの有効性は *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}* マウスを用いて評価し、REGN1103 の有効性は野生型 Balb/c マウスを用いて評価した。本2型炎症モデルにおいて、デュピルマブ及び REGN1103 は、いずれも血中 IgE 濃度及び血中アレルゲン特異的 IgG1 濃度を低下させ、肺好酸球浸潤を抑制し、杯細胞化生を抑制した。本モデルにおける REGN1103 とデュピルマブの 25 mg/kg での有効性は同程度であった。

独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、カニクイザルを用いて 100 mg/kg/週までの用量で最長6ヵ月実施した反復皮下投与毒性試験において、REGN646 に関連する血圧及び ECG に対する作用はみられず、心血管系、呼吸系及び中心神経系に対する機能的及び器質的障害も認められなかった。

総括すると、デュピルマブは *in vitro* で IL-4Rα に結合し、I 型及び II 型受容体を介して IL-4 及び IL-13 により誘導されるシグナル伝達を効果的に阻害した。

参 考 文 献

1. Hay RJ, Johns NE, Williams HC, Bolliger IW, Dellavalle RP, Margolis DJ, et al. The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions. *J Invest Dermatol*. 2014; 134(6):1527-34.
2. Landis ET, Davis SA, Taheri A, Feldman SR. Top dermatologic diagnoses by age. *Dermatol Online J*. 2014; 20(4):22368.
3. DaVeiga SP. Epidemiology of atopic dermatitis: a review. *Allergy Asthma Proc*. 2012;33(3):227-34.
4. Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, Feldman SR, Hanifin JM, Simpson EL, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(2):338-51.
5. Guttman-Yassky E, Nogales KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis—part I: clinical and pathologic concepts. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 127(5):1110-8.
6. Siegfried EC, Herbert AA. Diagnosis of atopic dermatitis: mimics, overlaps, and complications. *J Clin Med*. 2015; 4(5):884-917.
7. Ring J, Alomar A, Bieber T, Deleuran M, Fink-Wagner A, Gelmetti C, et al. Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012; 26(8):1045-60.
8. Ring J, Alomar A, Bieber T, Deleuran M, Fink-Wagner A, Gelmetti C, et al. Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) part II. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012; 26(9):1176-93.
9. Lubbe J, Friedlander SF, Cribier B, Morren MA, Garcia-Diez A, Gelmetti C, et al. Safety, efficacy, and dosage of 1% pimecrolimus cream for the treatment of atopic dermatitis in daily practice. *Am J Dermatol*. 2006; 7(2):121-31.
10. Frankel HC, Qureshi AA. Comparative effectiveness of topical calcineurin inhibitors in adult patients with atopic dermatitis. *Am J Clin Dermatol*. 2012;13(2):113-23.
11. Arkwright PD, Motala C, Subramanian H, Spergel J, Schneider LC, Wollenberg A. Atopic dermatitis working group of the allergic skin diseases committee of the AAAAI. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2013;1(2):142-51.
12. Darsow U, Wollenberg A, Simon D, Taieb A, Werfel T, Oranje A, et al. Difficult to control atopic dermatitis. *World Allergy Organ J*. 2013;6(1):6.
13. Zuberbier T, Orlow SJ, Paller AS, Taieb A, Allen R, Hernanz-Hermosa JM, et al. Patient perspectives on the management of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118(1):226-32.
14. Schiffner R, Schiffner-Rohe J, Landthaler M, Stolz W. Treatment of atopic dermatitis and impact on quality of life: a review with emphasis on topical non-corticosteroids. *Pharmacoeconomics*. 2003; 21(3): 159-79.

15. Ellison JA, Patel L, Ray DW, David TJ, Clayton PE. Hypothalamic-pituitary-adrenal function and glucocorticoid sensitivity in atopic dermatitis. *Pediatrics*. 2000;105(4 Pt 1):794-9.
16. Gandhi NA, Bennett BL, Graham NM, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD. Targeting Key Proximal Drivers of Type 2 Inflammation in Disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(1):35-50.
17. Howell MD, Parker ML, Mustelin T, Ranade K. Past, present, and future for biologic intervention in atopic dermatitis. *Allergy*. 2015; 70(8):887-96.
18. Hamilton JD, Suarez-Farinas M, Dhingra N, Cardinale I, Li X, Kostic A, et al. Dupilumab improves the molecular signature in skin of patients with moderate-to-severe atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 134(6):1293-300.
19. Rothman P, Lutzker S, Cook W, Coffman R, Alt FW. Mitogen plus interleukin 4 induction of C epsilon transcripts in B lymphoid cells. *J Exp Med*. 1988; 168(6): 2385-9.
20. Lebman DA, Coffmann RL. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J Exp Med*. 1988; 168(3):853-62.
21. Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*. 1991; 254(5032): 707-10.
22. Moon HB, Severinson E, Heusser C, Johansson SG, Möller G, Persson U. Regulation of IgG1 and IgE Synthesis by Interleukin 4 in Mouse B Cells. *Scand J Immunol*. 1989; 30(3):355-61.
23. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(8):3730-4.
24. Gauchat JF, Lebman DA, Coffman RL, Gascan H, de Vries JE. Structure and expression of germline ϵ transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch IgE production. *J Exp Med*. 1990; 172(2): 463-73.
25. Gascan H, Gauchat JF, Roncarolo MG, Yssel H, Spits H, de Vries JE. Human B cell clones can be induced to proliferate and switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4⁺ T cell clones. *J Exp Med*. 1991; 173(3): 747-50.
26. Mochizuki M, Bartels J, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM. IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. *J Immunol*. 1998; 160(1):60-8.
27. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119(6): 1303-10.
28. Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, De Benedetto A, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120(1):150-5.
29. Kim BE, Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol*. 2008; 126(3):332-7.

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

30. Haas H, Falcone FH, Holland MJ, Schramm G, Haisch K, Gibbs BF, et al. Early interleukin-4: its role in the switch towards a Th2 response and IgE-mediated allergy. *Int Arch Allerg Immunol*. 1999; 119(2): 86-94.
31. Kuwabara N, Kondo N, Fukutomi O, Agata H, Orii T. Relationship between interferon-gamma, interleukin-4 and IgE production of lymphocytes from hen's egg sensitive patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1995; 5(4):198-204.
32. Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the FcεRI, CD40L, IL-4, and IL-13 and can induce IgE Synthesis in B cells. *J Clin Invest*. 1997; 99(7):1492-9.
33. Gascan H, Gauchat JF, de Waal Malefyt R, Schneider P, Yssel H, de Vries JE. Regulation of human IgE synthesis. *Clin Exp Allergy*. 1991; 21(Suppl 1):162-6.
34. Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol*. 2010;22(2):125-37.
35. Oh MH, Oh SY, Yu J, Myers AC, Leonard WJ, Liu YJ, et al. IL-13 induces skin fibrosis in atopic dermatitis by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol*. 2011; 186(12):7232-42.
36. Laoukili J, Perret E, Willems T, Minty A, Parthoens E, Houcine O, et al. IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *J Clin Invest*. 2001; 108(12):1817-24.
37. Corren J. Role of interleukin-13 in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013;13(5):415-20.
38. Ford D, Sheehan C, Girasole C, Priester R, Kouttab N, Tigges J, et al. The human B cell response to IL-13 is dependent on cellular phenotype as well as mode of activation. *J Immunol*. 1999;163(6):3185-93.
39. Hajoui O, Zheng H, Guay J, Letuve S, Fawaz LM, Mazer BD. Regulation of IL-13 receptor alpha 1 expression and signaling on human tonsillar B-lymphocyte subsets. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120(6): 1425-32.
40. Junttila IS, Mizukami K, Dickensheets H, Meier-Schellersheim M, Yamane H, Donnelly RP, Paul WE. Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4Rα, IL-13Rα1, and γc regulates relative cytokine sensitivity. *J Exp Med*. 2008; 205(11): 2595-608.
41. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*. 1993; 362(6417): 245-8.
42. McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE, Anderson S, Fallon P, Zurawski G, et al. Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity*. 1998; 9(3): 423-32.
43. McKenzie GJ, Fallon PG, Emson CL, Grencis RK, McKenzie AN. Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. *J Exp Med*. 1999; 189(10): 1565-72.
44. Fish SC, Donaldson DD, Goldman SJ, Williams CM, Kasaian MT. IgE generation and mast cell effector function in mice deficient in IL-4 and IL-13. *J Immunol*. 2005;174(12):7716-24.
45. Noben-Trauth N, Shultz LD, Brombacher F, Urban JF Jr, Gu H, Paul WE. An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(20): 10838-43.

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

46. Barner M, Mohrs M, Brombacher F, Kopf M. Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. *Curr Biol*. 1998;8(11):669-72.
47. Munitz A, Brandt EB, Mingler M, Finkelman FD, Rothenberg ME. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor $\alpha 1$ and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(20): 7240-5.
48. Ramalingam TR, Pesce JT, Sheikh F, Cheever AW, Mentink-Kane MM, Stevens S, et al. Unique functions of the type II interleukin 4 receptor identified in mice lacking the interleukin 13 receptor $\alpha 1$ chain. *Nat Immunol*. 2008; 9(1): 25-33.
49. Macdonald LE, Karow M, Stevens S, Auerbach W, Poueymirou WT, Yasenchak J, et al. Precise and in situ genetic humanization of 6Mb of mouse immunoglobulin genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(14):5147-52.
50. 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(14):5153-8.
51. Lee GR, Flavell RA. Transgenic mice which overproduce Th2 cytokines develop spontaneous atopic dermatitis and asthma. *Int Immunol*. 2004; 16(8): 1155-60.
52. Siegel JP, Mostowski HS. A bioassay for the measurement of human interleukin-4. *J Immunol Methods*. 1990; 132(2): 287-95.
53. Defrance T, Aubry JP, Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N, et al. Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J Exp Med*. 1987;165(6):1459-67.
54. Ogata H, Ford D, Kouttab N, King TC, Vita N, Minty A. et al. Regulation of interleukin-13 receptor constituents on mature human B lymphocytes. *J Biol Chem*. 1998; 273(16): 9864-71.
55. Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, Larsen CG. A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J Invest Dermatol*. 2000; 115(4):640-6.
56. Goebeler M, Trautmann A, Voss A, Bröcker EV, Toksoy A, Gillitzer R. Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Am J Pathol*. 2001;158(2):431-40.
57. Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, et al. Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107(3):535-41.
58. Terada N, Nomura T, Kim WJ, Otsuka Y, Takahashi R, Kishi H, et al. Expression of C-C chemokine TARC in human nasal mucosa and its regulation by cytokines. *Clin Exp Allergy*. 2001; 31(12):1923-31.
59. Berin MC. The role of TARC in the pathogenesis of allergic asthma. *Drug News Perspect*. 2002;15(1):10-16.

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

60. Leung TF, Wong CK, Chan IH, Ip WK, Lam CW, Wong GW. Plasma concentration of thymus and activation-regulated chemokine is elevated in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110(3):404-9.
61. Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, Yamamoto K, Ishii A, Yoshie O, et al. Increased levels of a Th2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics. *Allergy.* 2002; 57:173-7.
62. Syed F, Huang CC, Li K, Liu V, Shang T, Amegadzie BY, et al. Identification of interleukin-13 related biomarkers using peripheral blood mononuclear cells. *Biomarkers.* 2007; 12(4): 414-23.
63. 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.
64. Warncke M, Calzascia T, Coulot M, Balke N, Touil R, Kolbinger F, et al. Different adaptations of IgG effector function in human and nonhuman primates and implications for therapeutic antibody treatment. *J Immunol.* 2012;188(9):4405-11.
65. Vidarsson G, Dekkers, G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014; 5:520.
66. 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(2): 163-71.
67. 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(1):55-63.
68. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol.* 2002; 169(1): 443-53.
69. Grünig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science.* 1998; 282(5397):2261-3.
70. Johnson JR, Wiley, RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, et al. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169(3):378-85.
71. Calderón MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, De Blay F, Hernandez Fernandez de Rojas D, Virchow JC, et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(1):38-48.
72. 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(6):652-59.

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

73. Or R, Renz H, Terada N, Gelfand EW. IL-4 and IL-2 promote human T-cell proliferation through symmetrical but independent pathways. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992; 64(3):210-7.
74. Izuhara K, Harada N. Interleukin-4 (IL-4) Induces Protein Tyrosine Phosphorylation of the IL-4 Receptor and Association of Phosphatidylinositol 3-Kinase to the IL-4 Receptor in a Mouse T Cell Line, HT-2. *J Biol Chem.* 1993; 268(18):13097-102.
75. Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE, Aversa G. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol.* 1993;5(6): 657-63.
76. Stein R, Qu Z, Chen S, Rosario A, Shi V, Hayes M, et al. Characterization of a new humanized anti-CD20 monoclonal antibody, IMMU-106, and its use in combination with the humanized anti-CD22 antibody epratuzumab, for the therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(8):2868-78.
77. Takeshita K, Yamasaki T, Akira S, Gantner F, Bacon KB. Essential role of MHC II-independent CD4+ T cells, IL-4 and STAT6 in contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate in the mouse. *Int Immunol* 2004;16(5):685-95.
78. Dearman RJ, Kimber I. Role of CD4+ T helper 2-type cells in cutaneous inflammatory responses induced by fluorescein isothiocyanate. *Immunology* 2000;101(4):442-51.
79. Dearman RJ, Cumberbatch M, Hilton J, Fielding I, Basketter DA, Kimber I. A re-appraisal of the skin-sensitizing activity of 2,4-dinitrothiocyanobenzene. *Food Chem Toxicol* 1997; 35(2): 261-269.
80. Hayashi M, Higashi K, Kato H, Kaneko H. Assessment of preferential Th1 or Th2 induction by low-molecular-weight compounds using a reverse transcription-polymerase chain reaction method: comparison of two mouse strains, C57BL/6 and BALB/c. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;177(1):38-45.
81. Imai Y, Kondo A, Iizuka H, Maruyama T, Kurohane K. Effects of phthalate esters on the sensitization phase of contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(11): 1462-8.
82. Larson RP, Zimmerli SC, Comeau MR, Itano A, Omori M, Iseki M. et al. Dibutyl phthalate-induced thymic stromal lymphopoietin is required for Th2 contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 2010; 184: 2974–84.
83. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002; 3(7):673–80.

サノフィ株式会社

デュピルマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 – 非臨床概要

2.6.3 薬理試験概要表

Total number of pages: 24

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	12
3 副次的薬理試験.....	22
4 安全性薬理試験.....	23
5 薬力学的薬物相互作用試験	24

表 目 次

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program	4
表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - in vitro Binding Affinity (SPR-Biacore)	12
表 2.6.3.2.2 - Primary pharmacodynamics - in vitro	14
表 2.6.3.2.3 - Primary pharmacodynamics - in vivo	18

1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program

Overview		Test Article: dupilumab		
Type of Study	Test System	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics				
Determination of the kinetic binding parameters for the interaction of dupilumab with recombinant human, cynomolgus monkey, rhesus monkey, common marmoset and mouse IL-4Rα under neutral conditions (non-GLP).	Using Surface Plasmon Resonance (SPR)-Biacore, dupilumab was captured on the chip surface by an immobilized anti-human Fcγ antibody; monomeric and dimeric IL-4Rα proteins (with C-terminal MycMycHis or mouse Fc tags) were injected over the captured dupilumab surface. Study conducted at pH 7.4.	██████████	REGN668-MX-██████024	[4.2.1.1-1]
Determination of the ability of dupilumab to act as an antagonist of IL-4 binding to hIL-4Rα (non-GLP).	Using SPR-Biacore, monomeric human IL-4Rα ectodomain protein (hIL-4Rα.mmH) was captured the chip surface via the C-terminal MycMycHis-tag and pre-bound to saturation levels with dupilumab or a non-binding control antibody. Subsequently, a mixture of hIL-4 with dupilumab or control antibody was injected over the captured hIL-4Rα surfaces pre-bound with the corresponding antibody. Study conducted at pH 7.4.	██████████	REGN646-MX-██████055	[4.2.1.1-2]
Determination of the ability of dupilumab to bind IL-4Rα expressed on the surface of human PBMCs (non-GLP).	Using a biotinylated version of dupilumab, <i>in vitro</i> binding of dupilumab to human PBMCs was determined by flow cytometry.	██████████	REGN668-MX-██████025	[4.2.1.1-3]

GLP=good laboratory practice, IL-4=interleukin-4, IL-4Rα=interleukin-4 receptor alpha subunit, PBMCs=peripheral blood mononuclear cells, SPR=surface plasmon resonance,

2.6.3 薬理試験概要表

SAR231893 - デュピルマブ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview- study program (continued)

Overview		Test Article: dupilumab		
Type of Study	Test System	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics				
Determination of the ability of dupilumab to bind IL-4Rα expressed on the surface of monkey lymphocytes (non-GLP).	Using a biotinylated version of dupilumab, <i>in vitro</i> binding of dupilumab to lymphocytes from cynomolgus monkey, rhesus monkey, and common marmoset whole blood was determined by flow cytometry.	██████████	REGN646-MX-████055	[4.2.1.1-2]
Determination of dupilumab inhibition of IL-4-mediated upregulation of CD23 expression in Ramos Burkitt's lymphoma cells (non-GLP).	CD23 expression was measured in Ramos B cells after stimulation with hIL-4 to assess the ability of dupilumab to inhibit IL-4-mediated signaling through the Type I receptor.	██████████	REGN668-MX-████025	[4.2.1.1-3]
Determination of dupilumab inhibition of IL-4-mediated upregulation of CD23 expression in human PBMCs (non-GLP).	CD23 expression was measured in human PBMCs after stimulation with hIL-4 to assess the ability of dupilumab to inhibit IL-4-mediated signaling through the Type I or Type II receptor.	██████████	REGN668-MX-████025	[4.2.1.1-3]
Determination of dupilumab inhibition of IL-4- and IL-13-mediated thymus and activation-regulated chemokine (TARC) secretion (non-GLP).	TARC secretion was measured in whole blood from two donors after stimulation with hIL-4 or hIL-13 to determine the ability of dupilumab to inhibit IL-4 and IL-13 signaling through the Type I and Type II receptors.	██████████	REGN668-MX-████025	[4.2.1.1-3]
Evaluation of effector function activity via the dupilumab Fc domain (ADCC and CDC) (non-GLP).	In vitro cell-based assays were developed for measurement of ADCC and CDC. CHO-K1, HEK293, and Ramos cells were chosen as target cells. Engineered CHO-K1 and HEK293 cell lines generated to overexpress human IL-4Rα were also included in the assays. Levels of endogenous or recombinant IL-4Rα expression were determined by fluorescence-based flow cytometry. Daudi lymphoma cells, treated with rituximab, were used as a positive control.	██████████	REGN668-MX-████023	[4.2.1.1-4]

ADCC=antibody-dependent cellular cytotoxicity, CDC=complement-dependent cytotoxicity, CHO-K1 cells= a Chinese hamster ovary cell line, GLP=good laboratory practice, HEK293cells= a human embryonic kidney cell line, IL-4=interleukin-4, IL-4Rα=interleukin-4 receptor alpha subunit, IL-13= interleukin 13, PBMCs=peripheral blood mononuclear cells, Ramos cells= a human Burkitt's lymphoma cell line

2.6.3 薬理試験概要表

SAR231893 - デュピルマブ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview- study program (continued)

Overview		Test Article: dupilumab		
Type of Study	Test System	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics				
Generation and validation of <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> Mice	Genetically modified mice in which both IL-4 and the ectodomain of IL-4Rα were replaced with their corresponding human sequences (<i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i>) were generated using VelociGene® technology. The <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> mice were bred to a genetic background of 75% C57BL/6NTac 25% 129S6/SvEvTac. This strategy resulted in a chimeric receptor that preserves the intracellular domain of the mouse receptor, while maintaining the extracellular domain as the human sequence, so that the receptor can be activated by hIL-4 and activity blocked by dupilumab. To evaluate the functional effects of humanizing IL-4Rα and IL-4 in a disease-relevant physiological allergy model, WT, <i>Il4ra^{hu/hu}</i> mice or <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> mice were intranasally administered either 50µg house dust mite (HDM) extract diluted in 20µL of saline, or 20µL of saline for 5 days per week for 3 weeks. At the end of the treatment mice were sacrificed and their lungs, spleen and serum were collected. Lungs were used for histologic, cytokine, gene expression and pulmonary cell infiltrate analyses, spleens were used to validate the expression pattern of human versus mouse IL-4Rα in the <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> mice, and serum was used to determine circulating IgE and HDM-specific IgG1 levels in the mice.	[REDACTED]	REGN668-MX-[REDACTED]051	[4.2.1.1-5]

HDM= house dust mite, IL-4=interleukin-4, IL-4Rα=interleukin-4 receptor alpha subunit

2.6.3 薬理試験概要表

SAR231893 - デュピルマブ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview- study program (continued)

Overview		Test Article: dupilumab		
Type of Study	Test System	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics				
A Mouse Model of Type 2-driven Inflammation to Assess the Pharmacodynamic Effect of Dupilumab	<i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> mice weighed individually, anesthetized with isoflurane, and injected 7µg of a freshly prepared IL-25 expression vector suspension through the lateral tail vein. HDD injected mice were randomized and started the first treatment regime on the same day, after the HDD injections, (day 0) and every other day thereafter for a total of 4 treatments (on days 0, 2, 4, and 7). On day 9, mice were sacrificed to collect whole blood from each mouse by cardiac puncture. Following cardiac puncture, the lung tissues were harvested and fixed in 10% formalin overnight. The next day the lung tissues were transferred to 70% ETOH and shipped to Histoserv, Inc (Germantown, MD) for paraffin embedding, sectioning, and periodic acid Schiff (PAS) staining.		REGN668-MX-025	[4.2.1.1-3]
Efficacy of dupilumab in a four-week mouse model of allergen-induced lung inflammation (non-GLP).	House dust mite (HDM) extract was administered intranasally to <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> mice thrice weekly for four consecutive weeks. HDM-exposed mice were administered 25mg/kg dupilumab or an isotype control twice weekly for the duration of the study. On day 30 of the study, all mice were sacrificed and blood was collected via cardiac puncture for determination of serum levels of total IgE, HDM-specific IgG1, and therapeutic antibodies. In addition, lungs were harvested for analysis of pulmonary eosinophil populations by flow cytometry and goblet cell metaplasia using histological methods.		REGN668-MX-052	[4.2.1.1-6]

GLP=good laboratory practice, HDM= house dust mite, IL-4=interleukin-4, IL-4Rα=interleukin-4 receptor alpha subunit

2.6.3 薬理試験概要表

SAR231893 - デュピルマブ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview- study program (continued)

Overview		Test Article: M2M1869N		
Type of Study	Test System	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics				
Determination of the kinetic binding parameters for the interaction of M2M1869N with recombinant soluble monomeric and dimeric mouse IL-4Rα (non-GLP).	Using SPR-Biacore, REGN1103 was captured on the chip surface by an immobilized polyclonal anti-mouse Fc antibody; monomeric monomeric and dimeric mouse IL-4Rα proteins (with C-terminal MycMycHis or mouse Fc tags) were injected over the captured M2M1869N surface. Study conducted at pH 7.4.	■■■■■, ■■■■	REGN668-MX-■■■■003	[4.2.1.1-7] [4.2.1.1-7a]
Efficacy of M2M1869N in a hapten-induced contact hypersensitivity model (non-GLP).	BALB/c mice were untreated (unsensitized control) or were subcutaneously injected with PBS, isotype control antibody, or M2M1869N 30 minutes prior to sensitization on day 0. The wax-stripped chest skin of mice was treated on days 0 and 1 with 0.5% FITC in a 1:1 mixture of dibutyl phthalate and acetone. On day 6, mice were again subcutaneously injected with PBS, isotype control antibody, or M2M1869N, and were then challenged with 0.5% FITC on both sides of the left ear. Ear thickness was measured at 0 hours to establish baseline thickness, at 6 hours post-FITC challenge, and at 24 hours post-FITC challenge.	■■■■■, ■■■■	REGN668-MX-■■■■003	[4.2.1.1-7] [4.2.1.1-7a]

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview- study program (continued)

Overview		Test Article: REGN1103		
Type of Study	Test System	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics				
Determination of the kinetic binding parameters for the interaction of REGN1103 with recombinant soluble monomeric mouse IL-4Ra (non-GLP).	Using SPR-Biacore, REGN1103 was captured on the chip surface by an immobilized polyclonal anti-mouse Fc antibody; monomeric mouse IL-4Ra (with C-terminal MycMycHis) was injected over the captured REGN1103 surface. Study conducted at pH 7.4.	██████████	REGN1103-MX-██████████049	[4.2.1.1-8]
Determination of REGN1103 inhibition of mIL-4-mediated T cell proliferation (non-GLP).	Mouse HT-2 cell proliferation was measured after stimulation with mIL-4 to assess the ability of REGN1103 to inhibit IL-4-mediated signaling through the Type I receptor.	██████████	REGN1103-MX-██████████049	[4.2.1.1-8]
Determination of REGN1103 inhibition of mIL-13-mediated B cell proliferation (non-GLP).	Mouse B9 cell proliferation was measured after stimulation with mIL-4 to assess the ability of REGN1103 to inhibit IL-13-mediated signaling through the Type II receptor.	██████████	REGN1103-MX-██████████049	[4.2.1.1-8]
Evaluation of complement dependent cytotoxicity via the REGN1103 Fc domain (non-GLP).	An in vitro cell-based assay was developed for measurement of CDC. HT-2 cells were chosen as target cells. RL cells, a human non-Hodgkin's lymphoma B cell line, treated with a mouse anti-CD20 antibody, were used as a positive control.	██████████	REGN1103-MX-██████████049	[4.2.1.1-8]
Efficacy of REGN1103 in a four-week mouse model of allergen-induced lung inflammation (non-GLP).	HDM extract was administered intranasally to wild type Balb/c mice thrice weekly for four consecutive weeks. HDM-exposed mice were administered 25mg/kg REGN1103 or an isotype control twice weekly for the duration of the study. On day 30 of the study, all mice were sacrificed and blood was collected via cardiac puncture for determination of serum levels of total IgE, HDM-specific IgG1, and therapeutic antibodies. In addition, lungs were harvested for analysis of pulmonary eosinophil populations by flow cytometry and goblet cell metaplasia using histological methods.	██████████	REGN1103-MX-██████████050	[4.2.1.1-9]

CDC=complement-dependent cytotoxicity, GLP=good laboratory practice, HDM= house dust mite, IL-4=interleukin-4, IL-4Ra=interleukin-4 receptor alpha subunit, IL-13= interleukin 13, SPR=surface plasmon resonance

2.6.3 薬理試験概要表

SAR231893 - デュピルマブ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview- study program (continued)

Overview		Test Article: REGN646		
Type of Study	Test System	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics				
Determination of the kinetic binding parameters for the interaction of REGN646 with recombinant cynomolgus monkey IL-4Rα under neutral conditions (non-GLP).	Using SPR-Biacore, REGN646 was captured on the chip surface by an immobilized anti-human Fcγ antibody; monomeric and dimeric cynomolgus monkey IL-4Rα proteins (with C-terminal MycMycHis or mouse Fc tags) were injected over the captured REGN646 surface. Study conducted at pH 7.4.	██████████	REGN646-MX-██████████055	[4.2.1.1-2]
Determination of the ability of REGN646 to act as an antagonist of IL-4 binding to MfIL-4Rα (non-GLP).	Using SPR-Biacore, monkey IL-4Rα ectodomain protein (MfIL-4Rα.mmH) was captured on a sensor chip surface via the MycMycHis tag; REGN646 or a non-binding control antibody was then captured. Subsequently, a mixture of human or monkey IL-4 with REGN646 or non-binding control was injected over the captured MfIL-4Rα.mmH surfaces pre-bound with the corresponding antibody. Study conducted at pH 7.4.	██████████	REGN646-MX-██████████055	[4.2.1.1-2]
Determination of the ability of REGN646 to bind IL-4Rα expressed on the surface of cynomolgus monkey and human lymphocytes (non-GLP).	Using a biotinylated version of REGN646, <i>in vitro</i> binding of REGN646 to lymphocytes from cynomolgus monkey and human whole blood was determined by fluorescent flow cytometry.	██████████	REGN646-MX-██████████055	[4.2.1.1-2]
Determination of REGN646 inhibition of IL-4- and IL-13-mediated activation of STAT6 signaling (non-GLP).	Luciferase activity of a human embryonic kidney STAT6/luciferase reporter cell line was measured after stimulation with MfIL-4 and MfIL-13 to assess REGN646 blockade of IL-4- and IL-13-mediated activation of STAT6 signaling through the Type I and Type II receptors.	██████████	REGN646-MX-██████████055	[4.2.1.1-2]
Determination of REGN646 inhibition of hIL-4- and hIL-13-mediated thymus and activation-regulated chemokine (TARC) secretion (non-GLP).	TARC secretion was measured in cynomolgus monkey whole blood from two donors after stimulation with hIL-4 or hIL-13 to determine the ability of dupilumab to inhibit IL-4- and IL-13-mediated signaling through the Type I and Type II receptors.	██████████	REGN646-MX-██████████055	[4.2.1.1-2]

GLP=good laboratory practice, IL-4=interleukin-4, IL-4Rα=interleukin-4 receptor alpha subunit, IL-13= interleukin 13, SPR=surface plasmon resonance, STAT=signal transduction and activator of transcription

2.6.3 薬理試験概要表
SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview- study program (continued)

Overview	Test Article: dupilumab
Type of Study	
Secondary Pharmacodynamics - No studies conducted	
Safety Pharmacology	
Safety pharmacology endpoints were integrated into the GLP-compliant toxicology studies conducted in cynomolgus monkeys (see [Module 2.6.6.3.2]).	
Pharmacodynamic Drug Interactions - No studies conducted	

GLP=good laboratory practice

2 効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - in vitro Binding Affinity (SPR-Biacore)

Binding Affinity Studies			Test Article: dupilumab			
Summary of Kinetic Binding Parameters for the Interaction of Dupilumab with IL-4Ra Proteins at pH 7.4, 25°C (dupilumab captured by anti-human Fc sensor surface)			Study Number REGN668-MX-024 [4.2.1.1-1]			
IL-4Ra Species	Monomer/Dimer ^{a)}	pH	<i>k</i> _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	<i>k</i> _d (s ⁻¹)	<i>K</i> _D (nM)	<i>t</i> _{1/2}
Human	Monomer	7.4	5.56x10 ⁵	1.84x10 ⁻⁵	3.31x10 ⁻¹¹	10.5 h
Human	Dimer		4.74x10 ⁵	5.65x10 ⁻⁶	1.19 x10 ⁻¹¹	31.1 h
Cynomolgus Monkey (Mf)	Monomer		NA ^{b)}	NA ^{b)}	8.32 x10 ⁻⁷	NA ^{b)}
Cynomolgus Monkey (Mf)	Dimer		8.88x10 ⁵	4.70x10 ⁻³	5.30 x10 ⁻⁹	2.5 min
Rhesus Monkey(Mm)	Monomer		NA ^{b)}	NA ^{b)}	5.76 x10 ⁻⁷	NA ^{b)}
Common Marmoset (Cj)	Monomer		NA ^{b)}	NA ^{b)}	1.19 x10 ⁻⁶	NA ^{b)}
Murine	Monomer		NB ^{c)}	NB ^{c)}	NB ^{c)}	NB ^{c)}
Binding Affinity Studies			Test Article: M2M1869N			
Summary of Kinetic Binding Parameters for the Interaction of M2M1869N with mIL-4Ra at pH 7.4, 25°C (M2M1869N captured by anti-mouse Fc sensor surface)			Study Number REGN668-MX-003 [4.2.1.1-7] [4.2.1.1-7a]			
Ligand	<i>k</i> _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	<i>k</i> _d (s ⁻¹)	<i>K</i> _D (pM)	<i>t</i> _{1/2} (min)		
mIL-4Ra-mmH	3.04x10 ⁵	1.96x10 ⁻⁴	640	59		
Binding Affinity Studies			Test Article: REGN1103			
Summary of Kinetic Binding Parameters for the Interaction of REGN1103 with mIL-4Ra at pH 7.4, 25°C (REGN1103 captured by anti-mouse Fc sensor surface)			Study Number REGN1103-MX-049 [4.2.1.1-8]			
Ligand	<i>k</i> _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	<i>k</i> _d (s ⁻¹)	<i>K</i> _D (pM)	<i>t</i> _{1/2} (min)		
mIL-4Ra-mmH	3.84x10 ⁵	3.33x10 ⁻⁵	86.7	347		

k_a =association rate constant; k_d = dissociation rate constant; K_D =equilibrium dissociation constant; h = hour; min = minute; $t_{1/2}$ = half-life.

^{a)}Monomeric constructs correspond to the IL-4Rα ectodomain with a MycMycHis tag. Dimeric constructs correspond to two IL-4Rα ectodomains fused via a mouse IgG2a Fc.

^{b)}Data not available. K_D values of this interaction were determined using a Biacore steady-state binding method from which the kinetic binding parameters, k_a , k_d , and $t_{1/2}$ cannot be measured accurately

^{c)}No observable binding interaction at highest ligand concentration tested (800nM).

2.6.3 薬理試験概要表

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - in vitro Binding Affinity (SPR-Biacore)(continued)

Binding Affinity Studies			Test Article: REGN646	
Summary of Kinetic Binding Parameters for the Interaction of REGN646 with MfIL-4R α Proteins at pH 7.4, 25°C (REGN646 captured by anti-human Fc sensor surface)			Study Number REGN646-MX-055 [4.2.1.1-2]	
Monomer/Dimer ^{a)}	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)	$t_{1/2}$ (min)
Monomer	4.4x10 ⁵	1.1x10 ⁻³	2.5	11
Dimer	5.9x10 ⁵	1.8x10 ⁻³	0.031	640

k_a =association rate constant; k_d = dissociation rate constant; K_D =equilibrium dissociation constant; h = hour; min = minute; $t_{1/2}$ = half-life.

表 2.6.3.2.2 - Primary pharmacodynamics - in vitro

In Vitro Studies		Test Article: dupilumab
Dupilumab functions as an antagonist of IL-4 binding to IL-4Rα		Study Number REGN646-MX-055 [4.2.1.1-2]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
Binding of hIL-4 to monomeric human IL-4Rα ectodomain protein (hIL-4Rα.mmH) captured on a sensor chip surface. Binding was measured in the presence of dupilumab or a non-binding control.	No relevant binding of hIL-4 (25nM) is observed in the presence of dupilumab (333nM), demonstrating the complete blockade of binding of these ligands to the receptor.	
Dupilumab binds native cell surface IL-4Rα on human lymphocytes		Study Number REGN668-MX-025 [4.2.1.1-3]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
The binding of dupilumab to IL-4Rα endogenously expressed on the cell surface of human lymphocytes measured using biotinylated dupilumab.	Dupilumab binds native cell surface IL-4Rα on human lymphocytes. Binding of biotinylated dupilumab (1μg/mL) is blocked by pre-incubation of the cells with excess IL-4 (10μg/mL) or unlabeled dupilumab (10μg/mL), demonstrating that the binding is specific for IL-4Rα.	
Dupilumab does not bind native cell surface IL-4Rα on non-human primate lymphocytes		Study Number REGN646-MX-055 [4.2.1.1-2]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
The binding of dupilumab to IL-4Rα endogenously expressed on the cell surface of cynomolgus monkey, rhesus monkey, and common marmoset lymphocytes measured using biotinylated dupilumab.	Dupilumab (1μg/mL) does not bind cynomolgus lymphocytes, rhesus monkey lymphocytes or common marmoset lymphocytes	
Dupilumab blocks IL-4 and IL-13-mediated STAT6 signaling in HEK293 cell		Study Number REGN668-MX-025 [4.2.1.1-3]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
Luciferase activity in HEK293 cells transfected with a STAT6/luciferase reporter and stimulated with either hIL-4 or hIL-13.	Human IL-4 (34fM-2nM) activates STAT6 signaling in HEK293 cells transfected with a STAT6/luciferase reporter with an EC ₅₀ of 11pM. Human IL-13 (84fM-5nM) activates signaling with an EC ₅₀ of 34pM. Dupilumab (0.051pM to 3nM) blocks hIL-4- (10pM) mediated signaling with an IC ₅₀ value of 20pM. Dupilumab (0.51pM to 30nM) blocks hIL-13- (40pM) mediated signaling with an IC ₅₀ value of 12pM.	
Dupilumab blocks IL-4-mediated upregulation of CD23 in Ramos Burkitt's Lymphoma cells		Study Number REGN668-MX-025 [4.2.1.1-3]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
Upregulation of CD23 expression in Ramos B cells stimulated with hIL-4. IL-4 signaling mediated by the Type I receptor.	Dupilumab (12.5-200nM) inhibits hIL-4- (1nM) induced up-regulation of CD23 in a dose-dependent manner, with minimal inhibition evident at the lowest dose tested.	

表 2.6.3.2.2 - Primary pharmacodynamics - in vitro(continued)

In Vitro Studies		Test Article: dupilumab
Dupilumab blocks IL-4-mediated upregulation of CD23 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)		Study Number REGN668-MX-025 [4.2.1.1-3]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
Upregulation of CD23 expression in PBMCs from three donors stimulated with hIL-4. IL-4 signaling mediated by the Type I or Type II receptor.	Dupilumab (0.13pM to 1.3µM) inhibits hIL-4- (0.14nM) induced up-regulation of CD23 in a dose-dependent manner. The IC ₅₀ values for the three donors tested were: 34pM (donor 1), 156pM (donor 2), and 157pM (donor 3), respectively.	
Dupilumab blocks IL-4 and IL-13-mediated TARC secretion		Study Number REGN668-MX-025 [4.2.1.1-3]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
Secretion of TARC by PBMCs after stimulation with hIL-4 or hIL-13	Dupilumab (0.07nM-1.7µM) inhibits hIL-4- (0.5nM) and hIL-13- (1.0nM) mediated TARC secretion. The calculated IC ₅₀ value for dupilumab-mediated inhibition of IL-4-stimulated TARC release was 0.53nM (0.08 µg/mL) for donor 1 and 0.24nM (0.04 µg/mL) for donor 2. The calculated IC ₉₀ value for dupilumab-mediated inhibition of IL-4-stimulated TARC release was 1.07nM (0.16µg/mL) for donor 1 and 2.82nM (0.43 µg/mL) for donor 2. The calculated IC ₅₀ value for dupilumab-mediated inhibition of IL-13-stimulated TARC release was 0.27nM (0.04 µg/mL) for donor 1 and 0.26nM (0.04 µg/mL) for donor 2. The calculated IC ₉₀ value for dupilumab-mediated inhibition of IL-13-stimulated TARC release was 0.58nM (0.88 µg/mL) for donor 1 and 0.67nM (0.1 µg/mL) for donor 2.	
Evaluation of effector function activity via the dupilumab Fc domain (ADCC and CDC)		Study Number REGN668-MX-023[4.2.1.1-4]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
PBMC-induced ADCC and serum complement-induced CDC measured by readout from luminogenic peptide that is cleaved by intracellular protease released on cell death.	Dupilumab (3.3pM to 200nM) does not induce ADCC in CHO-K1, HEK-293, and Ramos cells that express endogenous or recombinant human IL-4Rα. Furthermore, dupilumab (3.2pM-188nM) does not induce CDC in CHO-K1, HEK-293, and Ramos cells that express endogenous or recombinant human IL-4Rα.	

表 2.6.3.2.2 - Primary pharmacodynamics - in vitro(continued)

In Vitro Studies		Test Article: REGN1103
REGN1103 Blocks mIL-4 Induced T Cell Proliferation		Study Number REGN1103-MX-049 [4.2.1.1-8]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
Proliferation of a mouse T cell line, HT-2, induced by stimulation with 1nM mIL-4. IL-4 signaling mediated by the Type I receptor.	Mouse IL-4 (0.02-20nM) stimulates HT-2 cell growth with an EC ₅₀ value of 0.5nM. REGN1103 (0.05nM-50nM) inhibits mIL-4- (1nM) induced HT-2 cell proliferation with an IC ₅₀ value of 1.9nM (IC ₉₀ = 5.9nM).	
REGN1103 blocks mIL-13 stimulated growth of B cells		Study Number REGN1103-MX-049 [4.2.1.1-8]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
Growth of a mouse B cell line, B9, induced by stimulation with 0.1 nM mIL-13. IL-13 signaling mediated by the Type II receptor.	Mouse IL-13 (0.3pM-20nM) stimulates B9 cell growth with an EC ₅₀ value of 156pM. REGN1103 (0.02pM-1nM) inhibited mIL-13- (100pM) mediated stimulation of B9 cell proliferation with an IC ₅₀ value of 11pM (IC ₉₀ = 110pM).	
REGN1103 does not mediate complement dependent cytotoxicity		Study Number REGN1103-MX-049 [4.2.1.1-8]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
Mouse serum complement-induced CDC measured by readout from luminogenic peptide that is cleaved by intracellular protease released on cell death.	REGN1103 (8.5pM-500nM) does not mediate CDC on IL-4Rα-expressing HT-2 cells.	

表 2.6.3.2.2 - Primary pharmacodynamics - in vitro(continued)

In Vitro Studies		Test Article: REGN646
REGN646 functions as an antagonist of IL-4 binding to MfIL-4Rα		Study Number REGN646-MX-055[4.2.1.1-2]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
Binding of hIL-4 and MfIL-4 to monomeric monkey IL-4Rα ectodomain protein (IL-4Rα.mmH) captured on a sensor chip surface. Binding was measured in the presence of REGN646 or a non-binding control.	No relevant binding of 25nM of either MfIL-4 or hIL-4 is observed in the presence of REGN646 (333nM), demonstrating the complete blockade of binding of these ligands to the monkey receptor.	
REGN646 binds native cell surface IL-4Rα on cynomolgus monkey, but not human lymphocytes		Study Number REGN646-MX-055[4.2.1.1-2]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
The binding of REGN646 to IL-4Rα endogenously expressed on the cell surface of cynomolgus monkey peripheral blood lymphocytes measured using biotinylated REGN646.	REGN646 binds endogenous MfIL-4Rα on the surface of cynomolgus monkey peripheral blood lymphocytes. Binding of biotinylated REGN646 (1μg/mL) could be blocked by pre-incubation of the cells with excess hIL-4 (10μg/mL) or unlabeled REGN646 (10μg/mL), demonstrating that the binding was specific for MfIL-4Rα.	
REGN646 Specifically Blocks MfIL-4 and MfIL-13-Mediated Activation of STAT6 Signaling through the MfIL-4Rα Receptor		Study Number REGN646-MX-055[4.2.1.1-2]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
Luciferase activity in HEK293 cells transfected with a STAT6/luciferase reporter and stimulated with 0.3pM MfIL-4- or 10pM MfIL-13	MfIL-4 (9.7fM-10pM) activates STAT6 signaling in HEK293 cells transfected with a STAT6/luciferase reporter with an EC ₅₀ of 0.41pM. MfIL-13 (29fM-30pM) activates signaling with an EC ₅₀ of 13pM. REGN646 (1.7pM to 100nM) blocks MfIL-4- (0.3pM) and MfIL-13- (10pM) mediated signaling with IC ₅₀ values of 116pM and 447pM, respectively.	
REGN646 blocks IL-4 and IL-13-mediated TARC secretion		Study Number REGN646-MX-055[4.2.1.1-2]
Parameter Measured	Noteworthy Findings	
Secretion of thymus and activation-regulated chemokine (TARC) by cynomolgus monkey whole blood after stimulation with hIL-4 or hIL-13	REGN646 (6.7nM-3.3μM) inhibits hIL-4- (0.5nM) and hIL-13- (1nM) mediated TARC secretion in cynomolgus monkey whole blood. The calculated IC ₅₀ value for REGN646-mediated inhibition of IL-4-stimulated TARC release was 5.67μg/mL (37.8nM) for donor 2, while the respective IC ₅₀ value for donor 1 was indeterminable. The calculated IC ₉₀ value for REGN646-mediated inhibition of IL-4-stimulated TARC release was 80.3μg/mL (536nM) for donor 2, while the respective IC ₉₀ value for donor 1 was indeterminable. The calculated IC ₅₀ value for REGN646-mediated inhibition of IL-13-stimulated TARC release was 7.57μg/mL (50.5nM) for donor 1, while the respective IC ₅₀ value for donor 2 was indeterminable. The calculated IC ₉₀ value for REGN646-mediated inhibition of IL-13-stimulated TARC release was 23.6μg/mL (157nM) for donor 1, while the respective IC ₉₀ value for donor 2 was indeterminable.	

表 2.6.3.2.3 - Primary pharmacodynamics - in vivo

In Vivo Studies				Test Article: dupilumab
Generation and Validation of <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> Mice				Study Number REGN668-MX-051[4.2.1.1-5]
Species/Strain/ Gender/Animals per group	Method of Dupilumab Administration	Dose of Test Article	Parameters Measured	Noteworthy Findings
Wild type or <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> Female 5-10 / group	N/A	N/A	Expression of IL-4 and IL-4Rα Serum IgE Serum HDM-specific IgG1 Pulmonary eosinophil infiltration Goblet cell metaplasia	Wild type mice expressed murine IL-4 and IL-4Rα, whereas <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> mice exclusively expressed human IL-4 and IL-4Rα. After HDM exposure, both wild type and <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> mice exhibited comparable levels of serum IgE and HDM-specific IgG1, total pulmonary eosinophils, pulmonary infiltration by activated eosinophils, and goblet cell metaplasia. All the features of the allergic response examined in the <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> mice were indistinguishable from the wild type control.
A Mouse Model of Type 2-driven Inflammation to Assess the Pharmacodynamic Effect of Dupilumab				Study Number REGN668-MX-025[4.2.1.1-3]
<i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> Female 5-7 / group	Subcutaneous	5, 25, or 50mg/kg	Goblet cell metaplasia Serum IgE	Induction of IL-4 and IL-13 by a supra-physiological IL-25 stimulus increases goblet cell metaplasia and total circulating IgE levels. Administration of dupilumab significantly inhibits both goblet cell metaplasia and circulating IgE levels. By comparison, administration of an isotype control antibody did not have an effect on goblet cell metaplasia or IgE levels.

表 2.6.3.2.3 - Primary pharmacodynamics - in vivo(continued)

In Vivo Studies				Test Article: dupilumab
Species/Strain/ Gender/Animals per group	Method of Dupilumab Administration	Dose of Test Article	Parameters Measured	Noteworthy Findings
Dupilumab Reduces the Type 2 Immune Response in a Four-Week Mouse Model of Allergen-Induced Lung Inflammation				Study Number REGN668-MX-052[4.2.1.1-6]
Mice <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> Female 5-10/ group	Subcutaneous	25mg/kg	Serum IgE Serum HDM-specific IgG1 Pulmonary eosinophil infiltration Goblet cell metaplasia	HDM-exposed <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> mice treated with dupilumab twice weekly have significantly lower levels of circulating IgE and HDM-specific IgG1 compared to untreated HDM-exposed mice and to HDM-exposed mice administered an isotype control. HDM-exposed <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> treated with dupilumab twice weekly show a trend towards a reduced frequency of total eosinophils in the lungs and have significantly less infiltration with activated eosinophils compared to untreated HDM-exposed mice and to HDM-exposed mice administered an isotype control. HDM-exposed mice treated with dupilumab twice weekly also have significantly less goblet cell metaplasia compared to untreated HDM-exposed mice and to HDM-exposed mice administered an isotype control. Efficacy was observed for all endpoints evaluated at a dose of 25mg/kg twice weekly, corresponding to an average terminal dupilumab serum level of 377.5µg/mL as determined by ELISA for anti-hIgG antibodies.

表 2.6.3.2.3 - Primary pharmacodynamics - in vivo(continued)

In Vivo Studies				Test Article: M2M1869N
Species/Strain/ Gender/Animals per group	Method of Dupilumab Administration	Dose of Test Article	Parameters Measured	Noteworthy Findings
Efficacy of M2M1869N in a mouse model of Hapten-induced Contact Hypersensitivity				Study Number REGN668-MX-003 [4.2.1.1-7] [4.2.1.1-7a]
Mice Balb/c Female 5/ group	Subcutaneous	20mg/kg	Ear thickness	In mice sensitized with FITC/DBP solution, marked ear edema of the left (FITC-challenged) ear was observed compared to the unsensitized control group at 6 and 24 hours post challenge. The ear swelling was more pronounced at 24 hours than at 6 hours. Treatment with anti-mouse IL-4R α antibody, M2M1869N, showed a trend towards reduced ear swelling compared to the isotype control at 24h post challenge

表 2.6.3.2.3 - Primary pharmacodynamics - in vivo(continued)

In Vivo Studies				Test Article: REGN1103
Species/Strain/ Gender/Animals per group	Method of Dupilumab Administration	Dose of Test Article	Parameters Measured	Noteworthy Findings
Efficacy of REGN1103 in a Four-Week Mouse Model of Allergen-Induced Lung Inflammation				Study Number REGN1103-MX-050 [4.2.1.1-9]
Mice Balb/c Female 5-10/ group	Subcutaneous	25mg/kg	Serum IgE Serum HDM-specific IgG1 Pulmonary eosinophil infiltration Goblet cell metaplasia	HDM-exposed wild type Balb/c mice treated with REGN1103 have significantly lower levels of circulating IgE and HDM-specific IgG1 compared to untreated HDM-exposed mice and to HDM-exposed mice administered an isotype control. HDM-exposed mice treated with REGN1103 have a significantly lower frequency of total eosinophils as well as activated eosinophils in the lungs compared to untreated HDM-exposed mice and to HDM-exposed mice administered a control antibody. HDM-exposed mice treated with REGN1103 also have significantly less goblet cell metaplasia than mice administered a control antibody. Efficacy was observed for all endpoints evaluated at a dose of 25mg/kg twice weekly, corresponding to an average terminal REGN1103 serum level of 387.07µg/mL as determined by ELISA for anti-mouse IL-4Rα antibodies.

2.6.3 薬理試験概要表
SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

3 副次的薬理試験

該当なし

4 安全性薬理試験

安全性薬理の評価項目は、カニクイザルの GLP 毒性試験において評価した([Module 2.6.6.3.2]). REGN646 は、100 mg/kg までの 1 週間 1 回、5 週間 静脈内もしくは皮下投与、6 ヶ月間皮下投与においても、心血管系、中枢神経系、呼吸系に対して影響は示さなかった。

2.6.3 薬理試験概要表
SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし