目次

略号一覧 3
2.4.1 非臨床試験概要 4
2.4.1.1 薬理試験 4
2.4.1.1.1 効力を裏付ける試験 4
2.4.1.1.2 安全性薬理試験 7
2.4.1.1.3 薬力学的薬物相互作用試験 7
2.4.1.2 薬物動態試験 7
2.4.1.3 毒性試験 8
2.4.2 薬理試験 10
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 10
2.4.2.2 副次的薬理試験 11
2.4.2.3 安全性薬理試験 11
2.4.3 薬物動態試験 12
2.4.3.1 動物種別の全身曝露試験 13
2.4.4 毒性試験 13
2.4.4.1 単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験 13
2.4.4.2 がん原性試験 14
2.4.4.3 生殖発生毒性試験 15
2.4.4.3.1 幼若動物を用いた毒性試験 15
2.4.4.4 局所忍容性試験 15
2.4.4.5 その他の毒性試験 16
2.4.4.5.1 免疫原性試験 16
2.4.4.5.2 免疫毒性試験 16
2.4.4.5.3 組織交差反応性試験 16
2.4.5 総括及び結論 16
2.4.5.1 薬理試験 16
2.4.5.2 薬物動態試験 18
2.4.5.3 毒性試験 18
2.4.5.4 全体的結論 19
2.4.6 参考文献 20

表

表 2.4.1-1　被験物質の呼称 4
表 2.4.1-2　MLN0002 に関する非臨床毒性試験プログラム 9
表 2.4.3-1　ウサギ、サル及びヒトへの MLN0002 静注後の全身曝露量の比較 13

図

図 2.4.1-1　$\alpha_4\beta_7$ インテグリンの腸管指向性機能により提供可能となる、腸管選択的な抗炎症の治療戦略 5

略号一覧

略号	略していない表現	説明
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害作用
AIDS	acquired immune deficiency syndrome	後天性免疫不全症候群
AUC	area under the concentration-versus-time curve	血中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}336hr}$	area under the concentration-versus-time curve from 0 to 336 hours	0 時間から 336 時間までの血中濃度－時間曲線下面積
BQL	Below the quantitation limit	定量限界未満
CD	Crohn's disease	クローン病
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害作用
CL	clearance	クリアランス
C_{max}	maximum concentration	最高血中濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
CSF	cerebral spinal fluid	脳脊髄液
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定（法）
EU	Europe Union	欧州連合
GI	gastrointestinal	消化管
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
IBD	inflammatory bowel disease	炎症性腸疾患
ICH	International Conference on Harmonisation	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IM	intramuscular(ly)	筋肉内
IV	intravenous(ly)	静脈内
JC	John Cunningham	ジョン・カニンハム
JCV	John Cunningham virus	ジョン・カニンハムウイルス（JC ウイルス）
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MAdCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule 1	粘膜アドレシン細胞接着分子-1
MOA	mechanism of action	作用機序
MS	multiple sclerosis	多発性硬化症
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PAHA	primate antihuman antibodies	霊長類（サル）抗ヒト抗体
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PML	progressive multifocal leukoencephalopathy	進行性多巣性白質脳症
RAHA	rabbit antihuman antibodies	ウサギ抗ヒト抗体
SC	subcutaneous(ly)	皮下
$t_{1/2}$	half-life	半減期
TDAR	T cell-dependent antibody response	T 細胞依存性抗体産生
Th	T helper	ヘルパーT
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
UC	ulcerative colitis	潰瘍性大腸炎
ULOQ	upper limit of quantitation	定量上限
US	United States	米国
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1	血管細胞接着分子-1
V_{ss}	volume of distribution at steady-state	定常状態での分布容積

2.4.1 非臨床試験概要

非臨床試験では、MLN0002 の特性及び炎症性腸疾患における薬理作用について評価した。MLN0002 の非臨床試験に関する総合的な評価は、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）が策定したガイダンス M3（R）[1]、S6（R1）[2] [3]、S8 [4]、S1A [5]、S2（R1）[6]、S5（R2）[7]、S7A [8]、及び S7B [9]を適用して実施した。新医薬品の承認申請のための主要な毒性試験及び安全性薬理試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）によって定められたガイドラインを適用して実施した。

非臨床薬理試験では、MLN0002 の作用機序を解明する目的として *in vitro* 及び *in vivo* 試験を行った。さらに、MLN0002 の作用機序から期待される腸管選択的な特性を明らかにするため、MLN0002 よりもインテグリンに対する結合選択性の低い natalizumab を用いて比較検討も行った。

非臨床薬物動態試験では、MLN0002 の薬物動態（PK）、トキシコキネティクス（TK）、薬力学（PD）及び免疫原性を、適切な薬理学的応答を示す New Zealand white ウサギ及びカニクイザルを用いて、単回及び反復投与により評価した。

非臨床毒性試験では、MLN0002 の全身毒性を、New Zealand white ウサギ及びカニクイザルを用いて、単回及び反復投与により評価した。

非臨床試験及び海外臨床試験では、製造工程及び／又は原薬・製剤の剤形等の製造法が異なる 3 つの製剤が使用され、以降、それぞれ製造法 A 製剤、製造法 B 製剤及び製造法 C 製剤として示した（表 2.4.1-1）。国内臨床試験では製造法 C 製剤を使用した。これらはいずれも物質としては MLN0002 として記載する。

なお、製造工程及び剤形の変更に関する詳細情報については、2.3.S.2 及び 2.3.P.2 に記載した。

表 2.4.1-1　被験物質の呼称

本概括評価で使用する被験物質名称	互換的に使用される名称	参考文献
Act-1	ACT-1	Lazarovitz 1984 [12] Schweighoffer 1993 [13]
製造法 A 製剤	LDP-02、MLN02 又は MLN0002	Feagen 2005 [10] Feagen 2008 [11]
製造法 B 製剤	MLN02、MLN0002	Parikh 2012 [14]
製造法 C 製剤	MLN02、MLN0002	Fedyk 2012 [15]

2.4.1.1 薬理試験

2.4.1.1.1 効力を裏付ける試験

薬理試験は、$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンの免疫並びに炎症における役割と機能に関する文献等の既存情報を基に計画した。

免疫システムは、様々な段階に細分化されており、その中の免疫監視は、各リンパ球サブセットの特定組織への優先的遊走を特徴としている。実際、ナイーブリンパ球は、主に二次リンパ器官を介して再循環するが、分化したメモリーT 細胞は、皮膚、中枢神経系（CNS）又は腸管など、抗原に最初に遭遇した組織に優先的に遊走する。すなわち、免疫系が病原体に対しての応答効率を高めるためには、この免疫応答が重要となる[16] [17] [18]。

作用機序の検討により、$\alpha_4\beta_1$インテグリンを発現するメモリーTリンパ球は$\alpha_4\beta_1$インテグリンと血管細胞接着分子-1（VCAM-1）の強固な接着を介することでCNS、骨髄及び皮膚に優先的に遊走するが[16] [17]、$\alpha_4\beta_7$インテグリンを発現するメモリーTリンパ球は、粘膜アドレシン細胞接着分子-1（MAdCAM-1）に強固に接着することで、消化管系に優先的に遊走することが明らかとなっている[16] [17] [18] [19] [20]。

VCAM-1を介したリンパ球遊走機構ではCNSの炎症反応が惹起されることが知られており、病態モデルである自己免疫性脳脊髄炎（EAE）において、$\alpha_4\beta_1$インテグリンに対する抗体又は低分子阻害剤が症状並びにCNSの炎症を改善することが示されている[21] [22] [23] [24] [25] [26]。一方、$\alpha_4\beta_7$インテグリンを阻害するモノクローナル抗体をサルに投与した場合では、上記のようなEAEにおける臨床症状やCNSの炎症の改善は見られないが、慢性大腸炎のサルに投与した場合には、炎症活動が寛解し、速やかに下痢の症状が改善することが報告されている（4.2.1.1-22 報告書番号[redacted] [27]。

種々のインテグリン拮抗薬の作用選択性について模式図に示した（図2.4.1-1）。その中でも、ヒト化モノクローナル抗体であるMLN0002は、$\alpha_4\beta_7$インテグリンに特異的に結合し、$\alpha_4\beta_7$インテグリンと同じサブユニットを有する$\alpha_4\beta_1$及び$\alpha_E\beta_7$のインテグリンとは結合しない（4.2.1.1-3 報告書番号[redacted]）。また、MLN0002は$\alpha_4\beta_7$インテグリンのMAdCAM-1への結合を選択的に阻害するが、VCAM-1への結合は阻害しない（4.2.1.1-3 報告書番号[redacted]及び4.2.1.1-8 報告書番号RPT-01098）。以上の作用機序から、MLN0002は腸管選択的な薬理作用を示すと考えられる。

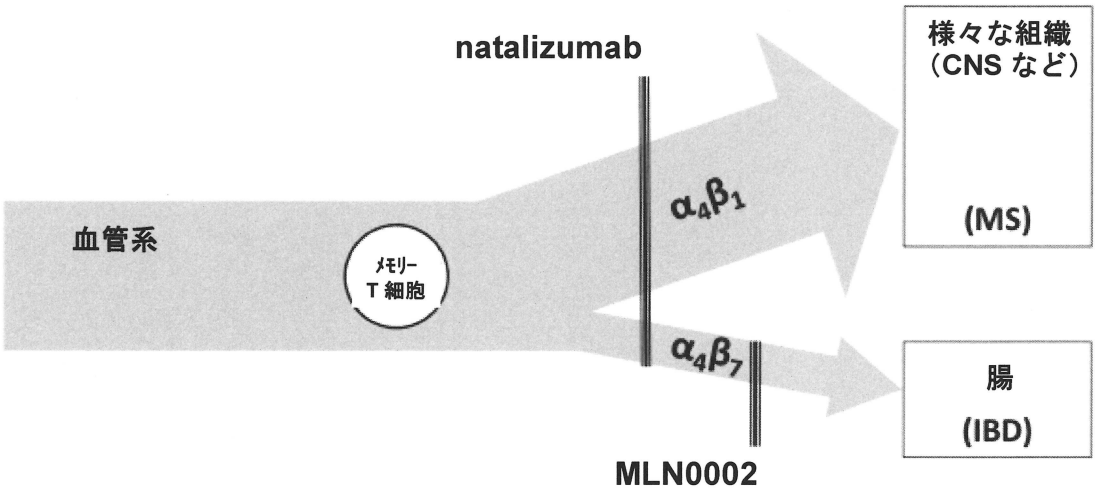


図 2.4.1-1　$\alpha_4\beta_7$インテグリンの腸管指向性機能により提供可能となる、腸管選択的な抗炎症の治療戦略

$\alpha_4\beta_1$インテグリンは多面的で白血球の様々な組織への遊走を媒介し、一方、$\alpha_4\beta_7$インテグリンは、消化管（GI）間質への選択的な遊走を媒介する（腸管指向性がある）。$\alpha_4\beta_7$インテグリンを阻害することによって、UC及びCDに特化した治療戦略が提供可能になる。MLN0002は$\alpha_4\beta_7$インテグリンを介する細胞接着を特異的に拮抗阻害するが、natalizumabは$\alpha_4\beta_1$及び$\alpha_4\beta_7$のインテグリン両方を拮抗阻害する二重拮抗薬である。IBD: Infalammatory Bowel Disease.　MS: Multiple Sclerosis.

MLN0002 とは対照的に、natalizumab は、$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンに結合し、これらのインテグリンと、VCAM-1、MAdCAM-1、フィブロネクチン及びオステオポンチンへの接着を阻害するインテグリン二重拮抗薬である。したがって、natalizumab は、広範な免疫疾患への効果が期待でき、CD 及び多発性硬化症（MS）に対する有効性が認められている。natalizumab は、CD における腸管炎症を緩和し[27]、また、再発性 MS 患者における身体的障害及び臨床症状の悪化を低減する[28]。しかしながら、natalizumab は、脳白質において複数の箇所で損傷がみられ、生命を脅かす脳感染症である進行性多巣性白質脳症（PML）の発症に関連があると考えられている。そのため、臨床における natalizumab の使用は制限されている[29] [30] [31]。PML はジョン・カニンハム・ウイルス（JCV）によって引き起こされる致死性のウイルス性疾患で、発症はまれであるが、後天性免疫不全症候群（AIDS）患者、臓器移植患者、化学療法又は natalizumab などの免疫抑制剤による治療を受けることで適応免疫が不全又は抑制されている患者で発症する可能性が報告されている[32]。

$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリン二重拮抗薬である natalizumab で PML のリスク増加がみられること、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンは腸管免疫の機能に特化していることを考え合わせると、MLN0002 は $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを介する細胞接着を特異的に阻害することにより、CNS の免疫監視機構を損なうことなく消化管の炎症反応を抑制すると考えられ、消化管の炎症を特徴とする UC 又は CD への効果的な治療法となる可能性がある。

以上から、MLN0002 の作用機序を生化学及び細胞レベルで解明することを目的とした *in vitro* 試験を行った（概要表 2.6.3.1）。ヒトの $\alpha_4\beta_1$、$\alpha_4\beta_7$ 又は $\alpha_E\beta_7$ のインテグリンに対する MLN0002 の結合特異性については、これらインテグリンを各々発現する細胞株を用いて評価した。その結果、MLN0002 及び Act-1 がヒト $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに特異的に結合することが実証された。この結合特異性については、競合的な結合試験で検討し、さらにフローサイトメトリー解析により定量化した。また、MLN0002 の種間交差反応性について、マウス、ラット、モルモット、New Zealand white ウサギ、カニクイザル、アカゲザル及びヒトの全血を蛍光標識した MLN0002 及び Act-1 で染色して評価した。加えて、MLN0002 の免疫細胞に対する活性化誘導及び作動的な作用（抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）並びに補体依存性細胞傷害作用（CDC））についても評価した。

$\alpha_4\beta_7$ インテグリンは、MAdCAM-1、VCAM-1 及びフィブロネクチンという 3 種類のリガンドに結合する。前 2 種類のリガンドは、血管内腔の表面に存在し、細胞接着を媒介することができ、白血球の血管外遊出をもたらす。一方、フィブロネクチンは、細胞外マトリックスの構成成分であり、血管内には存在しないため、白血球の血管外遊出には関与しないが、血管外に遊出した白血球に対して結合することも考えられ、この場合には、白血球の活性化、分化もしくは周囲組織を介する遊走に影響を及ぼす可能性がある。MLN0002 が血管外で $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの機能に影響を及ぼすか否かは不明であるが、$\alpha_4\beta_1$ 又は $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンと細胞接着分子 MAdCAM-1、VCAM-1 及びフィブロネクチンとの間の接着相互作用の阻害に対する MLN0002 及び抗 α_4 モノクローナル抗体の選択性とその強度について、$\alpha_4\beta_1$ 又は $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンをそれぞれ特異的に発現する細胞株を用いて評価した。

MLN0002 によって細胞接着が阻害される特定の白血球サブタイプと、MLN0002 によって細胞接着が阻害されない白血球サブタイプを同定するため、ヒト全血を用いて、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンの発現プロファイルについて検討した。ヒト末梢血を MLN0002（抗 $\alpha_4\beta_7$ モノクロー

ナル抗体）及び抗 $\alpha_4\beta_1$ モノクローナル抗体、並びに様々な白血球のサブセット（メモリー及びナイーブ CD4・CD8 T リンパ球、B リンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、好塩基球、抗酸球並びに好中球）を検出マーカーで染色し、フローサイトメトリー解析によって評価した。

通常、Th17 細胞は、UC 及び CD などの多くの自己免疫疾患で炎症を増強するサイトカイン（IL-17A 及び IL-17F）を産生するヘルパーT（Th）リンパ球のサブセットである[33]。そこで、MLN0002 の Th17 細胞への結合能を検討するため、健康成人から採取したヒト末梢血中の Th17 細胞を蛍光標識した MLN0002 及び抗 α_4・抗 β_7 モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

腸管には、腸内細菌及び食物抗原に対する粘膜免疫寛容を媒介する複数の抗炎症機序が存在し、それらがアレルギー性疾患及び慢性炎症の原因となる過剰な免疫応答を防いでいる。そのうちの 1 つが制御性 T（Treg）細胞によるエフェクターT 細胞機能の抑制であり、この抑制機能の低下が、ヒトの炎症性腸疾患（IBD）発症の一因と考えられている[34]。そこで、ヒト Treg 細胞の免疫抑制機能に対する MLN0002 の阻害作用の有無を検討した。

また、MLN0002 の薬理作用は、抗体を除去すると可逆性を示すことが観察されていたため、可逆性の機序について、ヒト全血から精製したメモリーCD4 T リンパ球を用いて *in vitro* で検討した。

上記に加え、複数の *in vivo* モデルを用いて、MLN0002 の薬理作用を検討した。慢性大腸炎を自然発症するワタボウシタマリン（タマリン類のサル）に MLN0002 のマウス相同抗体（Act-1）を投与し、$\alpha_4\beta_7$ インテグリン阻害によってもたらされる抗炎症効果を評価した。また、アカゲザルを用いた EAE モデルにより、MLN0002 が CNS の免疫監視機構に及ぼす潜在的な影響を評価した。さらに、アカゲザルを用いて、皮膚曝露への全身性 T 細胞依存性免疫応答、及び血管内での白血球分画に対する MLN0002 の潜在的影響も評価した。

2.4.1.1.2 安全性薬理試験

適切な薬理学的応答を示すウサギ及びサルを用いた GLP 適用の最長 26 週間の反復投与毒性試験において、MLN0002 の心血管系、消化管系、泌尿器系、呼吸器系及び中枢神経系に及ぼす機能的及び病理的な影響が評価された。また、心血管系への影響については、別途カニクイザルを用いた GLP 適用の安全性薬理試験においても評価された。

2.4.1.1.3 薬力学的薬物相互作用試験

MLN0002 はヒト化モノクローナル抗体であり、薬物代謝に影響を及ぼすサイトカインの産生を調節しないことから、薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.4.1.2 薬物動態試験

MLN0002 の PK、TK 及び PD を、毒性試験で使用された適切な薬理学的応答を示す動物種である New Zealand white ウサギとカニクイザルを用いて実施した（概要表 2.6.5.1 及び 2.6.7.2）。また、ウサギ抗ヒト抗体（RAHA）又は霊長類（サル）抗ヒト抗体（PAHA）が MLN0002 の PK に及ぼす影響も評価した。

PK 及び TK データ（定量下限 [LLOQ]及び定量上限 [ULOQ]、安定性データ、並びに RAHA 及び PAHA 試験における干渉レベルなど）を取得するためにこれらの試験で用いた分析方法については、2.6.4.2 で詳しく述べる。MLN0002 濃度は酵素免疫測定法（ELISA）で測定した。MLN0002 に対する RAHA 又は PAHA は ELISA で測定し、免疫原性について評価した。MLN0002 の PD 作用（未結合 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンレベル及び MLN0002 の結合レベル）はフローサイトメトリー解析で評価した。MLN0002 の薬理学的プロファイルの *in vivo* 評価には、MLN0002 に対して適切な薬理学的応答を示す動物種であるワタボウシタマリン及びアカゲザルを用いた。なお、これらの試験における曝露量及び PD データについては、2.6.2 で考察する。

組織分布又はタンパク結合率及び赤血球移行性を評価する試験は実施しなかった。定常状態での分布容積（V_{ss}）は、カニクイザルを用いて静脈内投与後に測定した。出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に及ぼす影響を検討するため、カニクイザルを用いた GLP 適用試験を実施し、乳仔血清中の MLN0002 濃度を評価した。

ICH ガイドライン S6（R1）[2] [3]では「バイオ医薬品の期待される代謝は、小さなペプチド及び各アミノ酸への分解である。したがって、その代謝経路は一般によく分かっている。一般の医薬品で実施される従来の生体内変化を調べる試験は必要ない。」と記載されていることから、MLN0002 については代謝試験は実施しなかった。

また同ガイドライン[2] [3]では「物質収支を評価するための画一的な試験からはあまり有益な情報は得られない」と記載されていることから、MLN0002 の排泄を評価する試験は、実施しなかった。出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に及ぼす影響を評価するため、カニクイザルを用いた GLP 適用試験において母乳中の MLN0002 濃度を評価した。

2.4.1.3 毒性試験

MLN0002 は非臨床毒性試験において包括的に評価された（概要表 2.6.7.1）。MLN0002 の全身毒性は、MLN0002 に対して適切な薬理学的応答を示すウサギ及びサルを用いた単回及び反復投与毒性試験（ウサギは最長 13 週間、サルは最長 26 週間）においてヒトと同様の投与経路である静脈内投与によって評価した。なお、GLP 適用の反復投与毒性試験では、MLN0002 を 2 週間に 1 回投与した。カニクイザルを用いた 26 週間反復静脈内投与毒性試験では、高用量群において、休薬期間終了まで（すなわち合計 9 ヵ月間）$\alpha_4\beta_7$ インテグリンの結合飽和が観察され、その際の最高濃度（C_{max}）及び薬物濃度－時間曲線下面積（AUC）は、国内臨床試験において潰瘍性大腸炎患者を対象に、300 mg を静脈内点滴投与した際の C_{max} 及び AUC 値よりも、それぞれ約 42 倍及び 31 倍高かった（概要表 2.6.7.3；4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]; 5.3.5.3-3 MLN0002/NDA001）。

遺伝毒性評価は、MLN0002 はヒト化モノクローナル抗体であるため、ICH ガイドライン S6（R1）[2] [3]に従い実施しなかった。

MLN0002 の発がん性を評価する長期反復投与試験は、適切な薬理学的応答を示すげっ歯類が存在しなかったため（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-16 報告書番号 RPT-00709）、ICH ガイドライン S6（R1）[2] [3]に従い実施しなかったが、2.4.4.2 で概要を示す種々の検討において、MLN0002 の発がん性は低いと判断した。

光毒性評価は、MLN0002 はヒト化モノクローナル抗体であるため、ICH ガイドライン S10 [2]に従い実施しなかった。

表 2.4.1-2 に実施した非臨床毒性試験の一覧を示す。なお、GLP 適用試験で使用した製剤は、国内外第 III 相臨床試験で使用した製剤と生化学的、生物物理学的及び免疫化学的特性の点で同等であった（概要表 2.6.7.4）。

表 2.4.1-2　MLN0002 に関する非臨床毒性試験プログラム

試験の種類	動物種	投与期間	被験物質	投与経路	GLP
単回投与毒性試験	カニクイザル	単回投与	製造法 B 製剤	IV	非適用
	カニクイザル	単回投与	製造法 B 及び C 製剤	IV	適用
反復投与毒性試験	New Zealand white ウサギ	3 ヵ月	製造法 B 製剤	IV	適用
	カニクイザル	2 週	製造法 A 製剤	IV	適用
	カニクイザル	2 週	製造法 A 及び B 製剤	IV	非適用
	カニクイザル	3 ヵ月	製造法 A 製剤	IV	適用
	カニクイザル	13 週	製造法 B 製剤	IV	適用
	カニクイザル	26 週	製造法 B 製剤	IV	適用
がん原性試験	ヒト腫瘍組織	N/A	Act-1	*in vitro*	非適用
	ヒト腫瘍細胞株	N/A	Act-1	*in vitro*	非適用
胚・胎児発生に関する試験	New Zealand white ウサギ	単回投与	製造法 B 製剤	IV	非適用
	New Zealand white ウサギ	単回投与	製造法 B 製剤	IV	適用
出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験	カニクイザル	4 ヵ月	製造法 B 製剤	IV	適用
幼若動物毒性試験	カニクイザル	13 週	製造法 C 製剤	IV	適用
局所忍容性試験	New Zealand white ウサギ	単回投与	製造法 C 製剤	SC 及び IM	適用
免疫原性試験 [a]	カニクイザル及び New Zealand white ウサギ	最長 6 ヵ月	製造法 A、B 及び C 製剤	IV	適用及び非適用
免疫毒性試験	カニクイザル	13 週 [b]	製造法 B 製剤	IV	適用
	カニクイザル	3 週	製造法 C 製剤	IV	適用
	アカゲザル	10 日間	Act-1	IV 及び IM	非適用
組織交差反応性試験	マウス、ラット、モルモット、ウサギ、サル及びヒトの組織	N/A	製造法 A 製剤	*in vitro*	非適用
	サル及びヒトの組織	N/A	Act-1、製造法 A 及び B 製剤	*in vitro*	適用

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；IV = 静脈内；SC = 皮下；IM = 筋肉内；N/A = 該当せず；Act-1 = MLN0002 のマウスホモログ前駆体。

a　免疫原性は一般毒性試験の一環として評価した。

b　13 週間反復投与毒性試験の一環として評価した。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$インテグリンと MAdCAM-1 との相互作用を選択的に拮抗阻害し、腸管選択的な抗炎症作用を示すことが確認されており、本抗体は、消化管以外の組織及び器官の免疫監視機構を損なうことはなかった。一方、natalizumab は、複数のインテグリンを阻害することにより腸管だけでなく CNS の免疫監視機能も抑制することから、IBD 治療薬として使用する際は、安全性の面で限界があるとされる。以上のことから MLN0002 は腸管選択的に抗炎症作用を示し、CNS などの消化管以外の組織において免疫機能低下やそれに伴う感染症のリスクを最小限にすることが期待できる。

薬理試験の成績から、MLN0002 は$\alpha_4\beta_7$インテグリンに対して特異的に結合し、natalizumab [36] [37]が結合する$\alpha_4\beta_1$インテグリン、又は etrolizumab（rhuMab beta7）[38]が結合する$\alpha_E\beta_7$インテグリンには結合しない選択性の高い拮抗薬であることが示された（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-1 報告書番号 RPT-01097 Amendment 1、4.2.1.1-2 報告書番号[redacted]及び 4.2.1.1-3 報告書番号[redacted]）。

Act-1、製造法 A 製剤及び製造法 B 製剤のヒト B リンパ球及びメモリーCD4 T リンパ球上の$\alpha_4\beta_7$インテグリンに対する結合親和性は、極めて類似していた（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-21 報告書番号[redacted]）。MLN0002 及び Act-1 の、ウサギ、カニクイザル、アカゲザル及びヒト血液中での$\alpha_4\beta_7$インテグリンへの結合親和性は 0.39 nmol/L 以下の濃度であった（概要表 2.6.3.2;4.2.1.1-16 報告書番号 RPT-00709、4.2.1.1-17 報告書番号 RPT-01101 Amendment 1、4.2.1.1-18 報告書番号 RPT-01052、4.2.1-1-19 報告書番号 RPT-01337 及び 4.2.1.1-20 報告書番号[redacted]）。

MLN0002 は、MAdCAM-1 及び細胞外マトリックスの糖蛋白質であるフィブロネクチンへの結合及び細胞接着を選択的に拮抗阻害することで$\alpha_4\beta_7$インテグリンの機能活性を阻害するが、VCAM-1 への結合に対しては拮抗阻害しなかった（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-8 報告書番号 RPT-01098 及び 4.2.1.1-3 報告書番号[redacted]）。一方、$\alpha_4\beta_7$と$\alpha_4\beta_1$のインテグリンを阻害する natalizumab は、これら 3 つの分子すべてに対する接着を阻害する作用を示すことが報告されている[36] [37]。すなわち、MLN0002 の薬力学的作用は、natalizumab と異なり、$\alpha_4\beta_7$インテグリン/MAdCAM-1 経路及び$\alpha_4\beta_7$インテグリン/フィブロネクチン経路に限定されることが示された。

MLN0002 は作動薬ではないことから、T リンパ球からのサイトカインの放出を誘発することはなかった（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-4 報告書番号 RPT-01140）。また、αTreg 細胞の T リンパ球に対する分裂抑制機能を阻害しなかった（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-14 報告書番号[redacted]及び 4.2.1-1.5 報告書番号 RPT-01954）。さらに、MLN0002 は標的細胞の障害を誘導しないことから（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-6 報告書番号 RPT-01139 及び 4.2.1.1-7 報告書番号 RPT-01138）、MLN0002 が完全に除去されると、細胞上の$\alpha_4\beta_7$インテグリンの機能は速やかに回復した（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-15 報告書番号 RPT-01436）。

慢性大腸炎を自然発症したワタボウシタマリンに、Act-1 を投与したところ、腸管の炎症活動が寛解し、下痢の症状を改善した（概要表 2.6.3.2;4.2.1.1-22 報告書番号[redacted]）。一方、MLN0002 はアカゲザルを用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルにおいて CNS の炎症、及び皮膚に対する免疫応答には影響を及ぼさないことが示された（概要

表 2.6.3.2；4.2.1.1-23 報告書番号 RPT-01673 Amendment 1）[39]。このように、MLN0002 は消化管選択的に薬理作用を示すことから、UC 及び CD に対する治療効果が期待される。

霊長類における MLN0002 の主な薬理作用は、白血球の特定のサブタイプに対する結合に起因する（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-2 報告書番号[redacted]）。すなわち、サル及びヒトの組織を用いて GLP 適用で組織交差反応性試験を実施したところ、MLN0002 の交差反応は、リンパ組織内の白血球、血管腔内の白血球、又は様々な非リンパ系組織にみられる浸潤白血球に限定された（概要表 2.6.7.17；4.2.3.7.7-2 報告書番号[redacted]、4.2.3.7.7-3 報告書番号[redacted]、4.2.3.7.7-4 報告書番号[redacted]及び 4.2.3.7.7-5 報告書番号[redacted]）。これらの成績は、Act-1 モノクローナル抗体を用いて別途実施した試験成績及び既知の $\alpha_4\beta_7$ インテグリン発現パターンと一致しており（4.2.1.1-22）[10] [11]、予期しない交差反応性及び標的以外での反応性は認められなかった。

2.4.2.2 副次的薬理試験

リンパ球は血管系と末梢組織との間を循環しており、リンパ球は血管系から遊出し、末梢組織を監視し、最終的にはリンパ管及び胸管を経由して再び血管系に戻る。したがって、インテグリン拮抗薬を用いて、リンパ球の血管系から末梢組織への遊出を阻害すると、リンパ球が血管系に蓄積される[40]。白血球のサブタイプには、$\alpha_4\beta_1$ 又は $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンのいずれかしか発現せず、両方のインテグリンを発現しないものも存在するため、MLN0002 の薬力学的作用は、$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリン拮抗薬より選択性が高い。また、natalizumab をサルに投与した際に見られた血管系内の白血球数増加は MLN0002 投与では観察されなかった。このことは、MLN0002 の白血球の末梢組織への遊出に及ぼす影響が $\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリン二重拮抗薬である natalizumab のそれに比べてはるかに少ないことを示している。したがって、MLN0002 は、$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリン二重拮抗薬のように広範な免疫監視機構を損なうことはないと考えられる。アカゲザルを用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルにおいて、natalizumab は CNS の免疫監視機構を阻害し、EAE の進行を阻止したが、MLN0002 は CNS の免疫監視機構に影響を及ぼさなかった（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-23 報告書番号 RPT-01673 Amendment 1）。これらの成績は、健康成人を対象とした海外臨床試験において、MLN0002 が脳脊髄液（CSF）中の $CD4^+$ 及び $CD8^+$T リンパ球数、並びに $CD4^+/CD8^+$T 細胞比に影響しないことを示した臨床試験データと整合する（5.3.4.1-1 総括報告書 C13012）[27]。

2.4.2.3 安全性薬理試験

ICH S7A [8]及び S7B [9]に従って、GLP 適用で実施したウサギ及びサルを用いた反復投与毒性試験及びサルを用いた心血管系に関する安全性薬理試験において、MLN0002 は、100 mg/kg の投与量で、消化管系、泌尿器系、呼吸器系、中枢神経系及び心血管系に対して機能的及び病理的な有害作用をもたらさないことが示された（概要文 2.6.6.3；4.2.3.2-5 報告書番号[redacted]、4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]及び 4.2.3.2-1 報告書番号[redacted]；概要表 2.6.3.4；4.2.1.3-1 報告書番号[redacted]）。

2.4.3 薬物動態試験

MLN0002 は、静脈内投与用薬剤として開発されており、主要な臨床試験は静脈内投与で実施されたことから、非臨床試験においても静脈内投与時の MLN0002 の PK を評価した。

MLN0002 の PK 及び TK のプロファイルは、毒性試験で使用された動物種であるウサギとサルを用いて評価された。さらに、毒性試験における曝露-反応関係の考察のための TK についても、ウサギ及びサルの両動物種で検討された。なお、本節で考察する PK 及び TK 試験の一部は、GLP 適用で実施した TK 試験で評価した。

サルにおける MLN0002 の PK パラメータは、クリアランス（CL）（0.180～0.266 mL/hr/kg）及び V_{ss} が低値（80.7～88.3 mL/kg）であり、半減期（$t_{1/2}$）が長い〔336～362 時間（14～15 日）〕というモノクローナル抗体の典型的な特徴がみられた（概要表 2.6.5.16；4.2.2.3-1 報告書番号[redacted]）。

MLN0002 は、ウサギ及びサルにおいて、投与量が 10～100 mg/kg の間では、概ね線形的な PK を示した（概要表 2.6.5.16 及び 2.6.7.3；4.2.2.7-1 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-2 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-6 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-7 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-8 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-15 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-16 報告書番号[redacted]及び 4.2.2.7-17 報告書番号[redacted]）。

妊娠中に MLN0002 の 100 mg/kg を投与したカニクイザルでは、分娩後 28 日間にわたり母乳中に低濃度の MLN0002 が認められた（概要表 2.6.5.7；4.2.2.7-17 報告書番号[redacted]）。妊娠中に MLN0002 を投与したカニクイザルから出生した乳仔では、血清中に低濃度の MLN0002 が認められたが、これは、母乳の経口摂取によるものではなく、主に胎盤通過が原因と考えられた。

MLN0002 はモノクローナル抗体であり、薬物代謝に影響を及ぼすサイトカインの産生に影響を及ぼさないことから、薬物動態的薬物相互作用に関する非臨床試験は実施しなかった。

MLN0002 の免疫原性は、RAHA 及び PAHA を測定し、これらの抗ヒト抗体が動物における MLN0002 曝露に影響を及ぼすか否かを検討することによって評価した（概要表 2.6.5.16 及び 2.6.7.3；4.2.2.7-1 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-2 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-6 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-7 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-8 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-13 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-14 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-15 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-16 報告書番号[redacted]、4.2.2.7-17 報告書番号[redacted]及び 4.2.2.7-18 報告書番号[redacted]）。また、中和作用の有無は、TK 及び PD パラメータに対する影響により判断した。MLN0002 は、他のモノクローナル抗体製剤と同様に、動物において免疫原性を示したが、その力価は高用量において低値であった。RAHA 及び PAHA の発現は、単回及び反復投与毒性試験間で様々であったが、低及び中用量（10 及び 30 mg/kg）の一部の動物において、MLN0002 の血清中濃度の低下は速くなり薬力学的な中和作用を示した。一方で、RAHA／PAHA の中和作用が認められない動物では、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンの持続的な結合飽和が認められた。最高用量（100 mg/kg）では RAHA／PAHA は MLN0002 の PK 又は PD パラメータにほとんど影響を及ぼさなかった。また、無毒性量（NOAEL）である同用量において、ほとんどの動物で投与期間及び休薬期間にわたり、標的である $\alpha_4\beta_7$ イ

ンテグリンの持続的な飽和が維持されたことから、同用量が十分な曝露用量及び薬理作用発現用量であることが確認された。

MLN0002 の製造工程変更に際して、MLN0002 の製造法 B 製剤及び製造法 C 製剤を用いた GLP 適用の単回投与毒性試験を実施した（概要表 2.6.7.3 ; 4.2.2.7-7 報告書番号[redacted]）。本試験では、雌雄のカニクイザル（各群雌雄各 3 匹）に 0、10 及び 30 mg/kg を 30 分間持続静注し、投与開始後から 168 時間にわたり TK、PD 及び PAHA 解析のための試料を採取した。その結果、製造法 B 製剤と製造法 C 製剤は同等の TK、PD 及び PAHA プロファイルを有していることが示された。

サル試験における無毒性量（NOAEL）の 100 mg/kg での曝露量は、国内臨床試験において潰瘍性大腸炎患者を対象に、43 日目に 300 mg を静脈内点滴投与後の C_{max} 及び AUC の平均値のそれぞれ約 42 倍及び 31 倍であった（概要表 2.6.7.3 ; 4.2.2.7-16 報告書番号[redacted]; 5.3.5.3-3 MLN0002/NDA001）。この TK 成績は、毒性試験が十分な曝露量で、かつ、PD 作用が明確に認められた条件において実施されたことを示すものである。

2.4.3.1 動物種別の全身曝露試験

動物種別の MLN0002 に対する相対曝露量の概要を表 2.4.3-1 に示す。

表 2.4.3-1　ウサギ、サル及びヒトへの MLN0002 静注後の全身曝露量の比較

動物種	投与量	投与量との関係	MLN0002 全身（血清）曝露量[a]		
			C_{max}（μg/mL）	AUC（日*μg/mL）	曝露マージン（AUC）
ウサギ	100 mg/kg	NOAEL	9890	51,250[b]	43.6
サル	100 mg/kg	NOAEL	5260	36,500[c]	31.0
ヒト	300 mg[d]	臨床使用量	126.5	1176[c]	N/A

AUC = 薬物濃度-時間曲線下面積 ; C_{max} = 最高濃度 ; N/A = 該当せず ; NOAEL = 無毒性量。

a　C_{max} 及び AUC 値はウサギは 3 ヵ月間反復投与毒性試験（n = 9 ; 4.2.2.7-8 報告書番号[redacted]、補助報告書番号[redacted]）、サルは 26 週間反復投与毒性試験（n = 12; 4.2.2.7-16 報告書番号[redacted]、補助報告書番号[redacted]）のそれぞれ、85 日目及び 169 日目のデータであり、ヒト（患者）については 43 日目に静脈内点滴投与後（n = 6 ; 5.3.5.3-3 MLN0002/NDA001）のデータである。

b　0 時間から 337 時間までの AUC（$AUC_{0\text{-}337hr}$）。

c　0 時間から 336 時間までの AUC（$AUC_{0\text{-}336hr}$）。

d　4 mg/kg にほぼ相当。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験

サルを用いた単回投与毒性試験及びウサギ及びサルを用いた反復投与毒性試験において、MLN0002 は最高用量である 100 mg/kg においても良好な忍容性を示し、毒性所見も認められなかった（概要表 2.6.5.16、2.6.7.5、2.6.7.6、2.6.7.7A、2.6.7.7B、2.6.7.7C、2.6.7.7D 及び 2.6.7.7E ; 4.2.3.1-1 報告書番号[redacted]、4.2.3.1-2 報告書番号[redacted]、4.2.3.2-1 報告書番号[redacted]、4.2.3.2-2 報告書番号[redacted]、4.2.3.2-3 報告書番号[redacted]、4.2.3.2-4 報告書番号[redacted]、4.2.3.2-5 報告書番号[redacted]及び 4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]）。これらの試験で得た MLN0002 への全身曝露量と、国内臨床試験において潰瘍性大腸炎患者を対象に、300 mg の反復投与で得た全身曝露量とを比較した結果の概要を表 2.4.3-1 に示す。

GLP 適用でのウサギの 3 ヵ月反復投与毒性試験並びにカニクイザルの 13 週間及び 26 週間反復投与毒性試験における機能的及び病理学的な検査成績（概要表 2.6.7.7A、2.6.7.7D 及び 2.6.7.7E；4.2.3.2-1 報告書番号[redacted]、4.2.3.2-5 報告書番号[redacted]及び 4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]、並びにカニクイザルを用いた GLP 適用での単回投与による心血管系に関する安全性薬理試験成績（概要表 2.6.3.4；4.2.1.3-1 報告書番号[redacted]）に基づき、MLN0002 は、心血管系、消化管系、泌尿器系、呼吸器系及び中枢神経系に有害な作用を示さないと判断した。ウサギを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験及びカニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験において、MLN0002 の薬理学的作用（腸管への末梢リンパ球の遊走抑制）を示すパイエル板での軽微から軽度のリンパ球減少及び β_7 インテグリン発現白血球の陰窩上皮での減少が認められたが、全身性の免疫抑制を示唆する変化は認められず、これらの成績は MLN0002 が有する $\alpha_4\beta_7$ インテグリン/MAdCAM-1 経路に対する腸管選択的な薬理学的作用と一致していた。また、カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験において、これら変化の回復性が評価され、100 mg/kg において、約 12 週間の休薬期間終了後、パイエル板のリンパ球減少の頻度及び程度は減少した。なお、100 mg/kg 群のすべての動物において、26 週間（6 ヵ月間）の投与（2 週間に 1 回の持続静注）後、約 12 週間の休薬期間を含めた 9 ヵ月間にわたり末梢リンパ球上の $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの飽和が持続した。

以上のように、MLN0002 は、ウサギ及びサルの両動物種で最高用量である 100 mg/kg においても良好な忍容性を示し、毒性は認められなかった。

2.4.4.2 がん原性試験

MLN0002 はげっ歯類に対して適切な薬理学的応答を示さないため（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-16 報告書番号 RPT-00709）、従来のがん原性リスク評価試験（げっ歯類を用いたバイオアッセイ）を適用することはできない。しかしながら、以下に示す成績から、MLN0002 が発がん性を有する可能性は低いと考えた。

a.) $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの発現はヒト成熟白血球及びリンパ腫細胞株に限定して発現し、ヒト固形腫瘍（結腸粘膜由来の悪性腫瘍）細胞上には認められないこと（概要表 2.6.7.17；4.2.3.4.3-1 報告書番号[redacted]）

b.) Act-1 は、*in vitro* 条件において、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現したヒトリンパ腫細胞株の細胞増殖及び細胞死に影響を及ぼさなかったこと（概要表 2.6.7.17；4.2.3.4.3-2 報告書番号[redacted]）。

c.) MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現するヒト白血球のサイトカイン産生、活性化、細胞増殖及び細胞死など、腫瘍形成に関連する他の因子に影響を及ぼさなかったこと（2.6.2.2.2.2；4.2.1.1-4 報告書番号 RPT-01140 及び 4.2.1.1-5 報告書番号 RPT-01954）。

d.) 反復投与毒性試験において、過形成などの前がん病変の有無について評価した結果、New Zealand white ウサギを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験でリンパ組織の過形成が認められたものの、これはヒト化モノクローナル抗体をヒト以外の動物種に注入することで生じる免疫原性（抗原刺激）に起因する変化と考えられ、その他、カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験を含め、GLP 適用で実施した毒性試験のいずれにおいても、細胞増殖及び細胞死並びに全身性の免疫抑制を示唆する変化は認められ

なかったこと（概要表 2.6.7.7A、2.6.7.7D、及び 2.6.7.7E；4.2.3.2-1 報告書番号[redacted]、4.2.3.2-5 報告書番号[redacted]及び 4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]）。

2.4.4.3 生殖発生毒性試験

MLN0002 は、最高用量である 100 mg/kg においても、New Zealand white ウサギの胚・胎児発生、並びにカニクイザルの出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に影響を及ぼさなかった。

なお、MLN0002 の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。これは、マウス及びラットでは MLN0002 による薬理活性が認められなかったこと、New Zealand white ウサギ及びカニクイザルを用いた GLP 適用での反復投与毒性試験において生殖器系組織に病理組織学的所見が認められなかったこと、並びに β_7 インテグリンホモ接合体性ヌル（$Itgb7^{-/-}$）マウス（$\alpha_4\beta_7$ インテグリン及び $\alpha_E\beta_7$ インテグリン機能が欠損しているマウス）の受胎能は正常であることを根拠としている。

MLN0002 は、最高用量である 100 mg/kg で、New Zealand white ウサギの胚・胎児発生に影響を及ぼさなかった（概要表 2.6.7.11 及び 2.6.7.13；4.2.3.5.2-1 報告書番号[redacted]及び 4.2.3.5.2-2 報告書番号[redacted]）。

また、MLN0002 は、最高用量である 100 mg/kg で、カニクイザルの出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に影響を及ぼさなかった（概要表 2.6.7.14；4.2.3.5.3-1 報告書番号[redacted]）。同投与量において、投与期間中 MLN0002 が持続して曝露されたことが示された。また、母動物における PD 成績では、妊娠後 277 日目まで、MLN0002 が $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに結合した細胞の割合が高値を、非結合細胞の割合が低値をそれぞれ示したことで、試験期間中、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンの飽和が持続したことが示された。100 mg/kg 投与母動物から出生した乳仔の平均血清中濃度は、分娩後 28 日目で 30.3 μg/mL、分娩後 120 日目で 0.0184 μg/mL であり、分娩後 181 日目では定量限界未満（BQL）であった。分娩後 28 日目に、当該乳仔すべてにおいて $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの結合飽和が認められ、同飽和は、分娩後 120 日目には当該乳仔 9 匹中 3 匹で認められたが、分娩後 181 日目にはすべての乳仔において消失していた。

2.4.4.3.1 幼若動物を用いた毒性試験

MLN0002 は、幼若カニクイザル（試験開始時に 11～15 ヵ月齢）を用いた 13 週間反復投与毒性試験において、最大 100 mg/kg の投与量まで良好な忍容性を示し、毒性は認められなかった（概要表 2.6.7.15；4.2.3.5.4-1 報告書番号[redacted]）。

2.4.4.4 局所忍容性試験

MLN0002 の持続静注は、局所刺激性を惹起しなかった（概要表 2.6.7.7A、2.6.7.7D 及び 2.6.7.7E；4.2.3.2-1 報告書番号[redacted]、4.2.3.2-5 報告書番号[redacted]及び 4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]）。また、New Zealand white ウサギに対して MLN0002 を皮下投与及び筋肉内投与したが、臨床的に意味のある刺激性は認められなかった（概要表 2.6.7.16；4.2.3.6-1 報告書番号[redacted]）。

2.4.4.5 その他の毒性試験

2.4.4.5.1 免疫原性試験

毒性試験の一環として、MLN0002 の TK 及び PD に加えて（2.6.4.8）、ウサギの RAHA 又はサルの PAHA の発現を測定した。また、TK 及び PD パラメータに対する影響により、その中和作用の有無を評価した。RAHA／PAHA の発現は、概して投与量に反比例し、低及び中用量（10 及び 30 mg/kg）の一部の動物で、MLN0002 の TK 及び PD パラメータに対する中和作用がみられたが、中和作用がみられなかった動物では、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンの持続的な飽和が維持された。また、高用量（100 mg/kg）では、RAHA／PAHA は MLN0002 の TK 及び PD パラメータにほとんど影響を及ぼさなかった。無毒性量（NOAEL）である同用量において、反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験におけるほとんどの動物において、投与期間及び休薬期間にわたり標的である $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの持続的な飽和が維持された。

2.4.4.5.2 免疫毒性試験

サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験及び同様にサルを用いて別途実施した免疫毒性試験において、感染の臨床徴候並びに T 細胞依存性抗体産生（TDAR）及び NK 細胞活性を検討したところ、MLN0002 は、全身性の適応免疫応答及び自然免疫応答に影響を及ぼさなかった（概要表 2.6.7.7D 及び 2.6.7.17 ; 4.2.3.7.2-1 報告書番号[redacted]及び 4.2.3.7.2-2 報告書番号[redacted]）。これらのデータは、健康成人において MLN0002 への曝露により筋肉内接種 B 型肝炎ワクチンに対するセロコンバージョン率に影響が認めらなかったことと一致するものである（5.3.4.1-2 総括報告書 C13013）。

2.4.4.5.3 組織交差反応性試験

非臨床毒性試験では、New Zealand white ウサギ及びカニクイザルを用いたが、MLN0002 は、ウサギ、サル、ヒトの $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対して同等の結合親和性を示し、かつ、サルはヒトと同等の組織交差反応性を示した（2.6.2）。また、これら組織交差反応性パターンは、既知の $\alpha_4\beta_7$ インテグリン発現パターンと一致していた。

2.4.5 総括及び結論

ICH ガイドライン M3 (R) [1]、S6（R1）[2] [3]、S8 [4]、S1A [5]、S2 (R1) [6]、S5 (R2) [7]、S7A [8]及び S7B [9]に準拠して実施された非臨床試験において、MLN0002 の薬理特性、薬物動態特性及び毒性特性が評価された。

2.4.5.1 薬理試験

MLN0002 は、ヒトリンパ球 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに特異的に結合するヒト化免疫グロブリン G1（IgG1）モノクローナル抗体であり、$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_E\beta_7$ のインテグリンには結合しない。

MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する結合特異性があるという点で、他のインテグリン拮抗薬（$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンに結合する natalizumab [36] [37]、並びに $\alpha_E\beta_7$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンに結合する etrolizumab [38]など）とは異なる。また、MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンに結合するが、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンの VCAM-1 への接着を阻害することなく、MAdCAM-1 及びフィブロネクチンへの接着を選択的に阻害する。このように、MLN0002 は、

$\alpha_4\beta_7$インテグリンに対して選択的拮抗阻害作用があるので、他のインテグリン拮抗薬であるnatalizumab及びetrolizumabとは異なり、MLN0002による阻害は、$\alpha_4\beta_7$インテグリン/MAdCAM-1経路及び$\alpha_4\beta_7$インテグリン/フィブロネクチン経路に限定される。

MLN0002は作動薬ではないので、免疫細胞からのサイトカインの放出は惹起しない。また、Treg細胞のTリンパ球に対する分裂抑制機能を阻害しない。さらにMLN0002は、Fcγ受容体を活性化させないので、標的細胞の障害を誘導しない。実際、MLN0002を除去すると、$\alpha_4\beta_7$インテグリン機能は比較的急速に再構築され、細胞の$\alpha_4\beta_7$インテグリン機能は、MLN0002が完全に除去されると24時間以内に曝露前の約50%に回復し、4日後にはほぼ完全に回復した（概要表2.6.3.2；4.2.1.1-15報告書番号RPT-01436）。

MLN0002の主な標的は、$\alpha_4\beta_7$インテグリンを高発現する白血球のサブタイプである。また、これらの細胞は、腸管炎症の重要なメディエーターであり、薬効試験として、大腸炎を発症したサルにAct-1モノクローナル抗体を投与した場合、慢性大腸炎が寛解した。（概要表2.6.3.2；4.2.1.1-22 報告書番号[redacted]

白血球のサブタイプには、$\alpha_4\beta_1$又は$\alpha_4\beta_7$のインテグリンのいずれかしか発現しないものも存在することから、MLN0002のPD作用は、natalizumabなどの、$\alpha_4\beta_1$及び$\alpha_4\beta_7$のインテグリン二重拮抗薬よりも選択的である。サルにおける細静脈外への白血球遊出の阻害により、結果的に血管系内の白血球が増加する作用が、MLN0002投与よりnatalizumab投与で明らかに高い実験結果は、MLN0002がnatalizumabに比べが白血球に及ぼす影響がはるかに少ないことを示している。免疫監視機構には、白血球の静脈から組織への漏出が必要である。すなわち、これらのデータからMLN0002が、$\alpha_4\beta_1$と$\alpha_4\beta_7$のインテグリン二重拮抗薬であるnatalizumabに比べ免疫監視機構を広範囲に損ねることはないと推察できる。CNSにおける免疫監視機能に対するMLN0002の影響がnatalizumabより限定されているという仮説をサルEAEモデルを用いて実証した。すなわち、MLN0002は、同モデルにおいて、CNSの免疫監視機構には何ら作用しなかったが、natalizumabは、CNSの免疫監視機能を阻害した結果、EAEモデルにおける脊髄炎の発症を抑制した（概要表2.6.3.2; 4.2.1.1-23 報告書番号[redacted]。MLN0002が、サルのCNSにおける免疫監視機能にほとんど影響しない結果は、健康成人を対象としたMLN0002の海外臨床試験において、MLN0002投与が脳脊髄液（CSF）中の$CD4^+$及び$CD8^+$Tリンパ球数、並びに$CD4^+/CD8^+$比に影響を及ぼさなかったという結果と一致していた（5.3.4.1-1 総括報告書C13012）。

MLN0002の薬理学的作用が消化管選択的な作用を示す追加データとして、全身の免疫監視機構に影響しないこと、すなわち、皮下免疫抗原に対する全身性のB細胞及びT細胞による免疫応答の誘導を損ねることはなく、皮膚、リンパ管及び二次リンパ器官の免疫監視機構も安定していたことが示された（2.6.2.2.3.2）。この結果は、MLN0002が抗原に対する全身性T細胞依存性抗体産生に影響を及ぼさないことを示したGLP適用での毒性試験結果（2.6.6.3.5及び2.6.6.9.2.1）と一致していた。また、健康成人を対象とした海外臨床試験では、MLN0002は筋注B型肝炎ワクチンに対するセロコンバージョン率に影響を及ぼさない一方、プラセボと比較して経口コレラワクチンに対する免疫応答が減弱していることが示された（5.3.4.1-2 総括報告書C13013）。さらに、適切な薬理学的応答を示す動物種を用いたGLP適用での安全性薬理試験及び毒性試験において、MLN0002は、消化管系、泌尿器系、呼吸器系、心血管系及び中枢神経系への影響を誘発しなかった（2.6.6.3；4.2.3.2-5 報告書番号[redacted]

[redacted] 4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]及び 4.2.3.2-1 報告書番号[redacted]。以上の結果から、MLN0002 が胃腸組織以外の免疫監視機構を損ねることのない腸管選択的な薬理学的プロファイルをもつことが示された（4.2.1.2-1 報告書番号[redacted]）。

UC 及び CD の現行の生物学的製剤による治療に関連して発生する感染症は、$\alpha_4\beta_1$ と $\alpha_4\beta_7$ のインテグリン二重阻害や腫瘍組織壊死因子 α（TNF-α）阻害などによる全身性免疫抑制に起因する。一方、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンは、消化管指向性免疫調節の標的であることから、その拮抗作用を有する MLN0002 は、CNS などの消化管以外の組織での免疫低下及び感染性合併症を最小限にすることができると考えられる。以上のことから、MLN0002 は消化管選択的な免疫調節作用を示すことで、UC 又は CD の治療において、既存の薬剤よりも優れたリスクベネフィットプロファイルを有する薬剤になると期待される。

2.4.5.2 薬物動態試験

MLN0002 の PK、TK、PD 及び免疫原性について、New Zealand white ウサギ及びカニクイザル（いずれも MLN0002 の毒性試験に使用された適切な薬理学的応答を示す動物種）を用いて *in vivo* で評価した。MLN0002 は、他のモノクローナル抗体製剤と同様に、CL が低値であり、V_{ss} も低値であった。

MLN0002 の $t_{1/2}$ は、他のモノクローナル抗体製剤で報告された範囲内であった。MLN0002 は、検討した投与量の範囲内では、概ね線型的な PK を示した。$\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する結合飽和は、投与直後に現れ、飽和が維持された期間は、投与量に依存した。

MLN0002 の免疫原性は、RAHA 及び PAHA を測定することで評価した。RAHA 及び PAHA の発現は、単回及び反復投与毒性試験間により様々であった。低及び中用量（10 及び 30 mg/kg）の一部の動物では、RAHA／PAHA は、MLN0002 の PK 及び PD パラメータに対して中和作用を示したが、RAHA／PAHA が中和作用を示さない動物では、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンの持続的な結合飽和が認められた。最高用量（100 mg/kg）では、RAHA／PAHA は MLN0002 の PK 又は PD パラメータにほとんど影響を及ぼさなかった。NOAEL である同用量において、反復投与毒性試験で用いたほとんどの動物で、投与期間及び休薬期間にわたり標的である $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの持続的な飽和が維持された。

以上のように、ウサギ及びサルを用いて、MLN0002 の PK、TK 及び PD プロファイルを評価した結果、MLN0002 は、一般的なモノクローナル抗体製剤と類似した PK プロファイルを示し、検討した動物種において MLN0002 は $\alpha_4\beta_7$ インテグリンへの阻害作用を示した。

なお、MLN0002 の開発過程で、MLN0002 の製造工程を製造法 A、製造法 B 及び製造法 C へと変更したが、非臨床試験において、これら 3 つの製剤はサルにおいて同等の PK パラメータを有することが示された。

2.4.5.3 毒性試験

GLP 適用で実施された非臨床毒性試験成績から、ヒトの安全性に関して懸念される知見は認められず、UC 及び CD 患者に対して MLN0002 の投与は許容されうると考えられた。

薬理学的に適切な応答を示す動物種であるカニクイザル及び New Zealand white ウサギを用いて、MLN0002 の安全性が評価された。MLN0002 は、単回及び反復投与毒性試験におい

て、試験した最大曝露量において良好な忍容性を示し、毒性所見も認められなかった（概要表 2.6.7.3；4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]。GLP 適用での 13 週間及び 26 週間反復投与毒性試験における機能的及び病理学的な検査成績、並びにカニクイザルを用いた GLP 適用での単回投与による心血管系に関する安全性薬理試験成績から、MLN0002 は、心血管系、消化管系、泌尿器系、呼吸器系及び中枢神経系に有害な作用を示さないと判断された。消化管粘膜で β_7 インテグリンを発現している白血球の減少が認められたが、これは MLN0002 の主要な薬理学的作用（$\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現している白血球の腸管への遊走を抑制）を示す変化と考えられた。これらのデータは、大腸炎自然発症ワタボウシタマリンの腸管における抗炎症性作用を示した主要な薬理試験成績と一致し（2.6.2.2: 4.2.1.1-22）、霊長類において、$\alpha_4\beta_7$ インテグリン受容体への結合は腸管選択的な抗炎症性作用をもたらすことを示している。

MLN0002 の投与により最長で 9 ヵ月間 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを飽和させたサルにおいても顕性又は不顕性感染率は高値を示さなかったが、これらの成績は、MLN0002 が、T 細胞依存性抗体産生（TDAR）の一次応答及び二次応答など、全身性の自然免疫応答及び適応免疫応答に影響を及ぼさなかった成績と一致し、MLN0002 による $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの阻害が、全身性の免疫応答に影響を及ぼさないこと、すなわち、MLN0002 の腸管選択的な $\alpha_4\beta_7$ インテグリン/MAdCAM-1 経路阻害作用を示すものである。

MLN0002 は、New Zealand white ウサギの胚・胎児発生、カニクイザルの出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に影響を及ぼさず、幼若カニクイザルを用いた反復投与毒性試験においても毒性所見は認められなかった。また、MLN0002 は *in vitro* で $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現するヒト血液腫瘍細胞の細胞増殖及び細胞死に影響を及ぼさなかったこと、反復投与毒性試験において、細胞増殖及び細胞死に影響を及ぼさなかったこと、全身性の免疫抑制を示唆する変化は認められなかったことから、発がん性を有する可能性は低いと考えられ、さらに、MLN0002 持続静注による局所刺激性も認められなかった。

以上のように、安全性薬理試験、反復投与毒性試験、がん原性に関する検討試験、生殖発生毒性試験及び幼若動物毒性試験において、ヒトの安全性に関して懸念される知見は認められなかった。

2.4.5.4 全体的結論

MLN0002 の作用機序及び薬理学的プロファイルについて、*in vitro* 及び *in vivo* で特性を評価した。これらの作用機序の解明により、MLN0002 は腸管指向性の $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに特異的に結合する選択性の高い拮抗薬であり、MAdCAM-1 への細胞接着を阻害し、消化管に選択的な免疫調節作用をもたらすことが示された。この薬理学的プロファイルは、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンだけでなく $\alpha_4\beta_1$ インテグリンも阻害し、広範な免疫調節作用をもたらす natalizumab の薬理学的プロファイルとは異なる。ウサギ及びサルにおいて、MLN0002 の PK、TK 及び PD プロファイルは十分に評価され、MLN0002 は、多くのモノクローナル抗体製剤と類似した PK を示し、$t_{1/2}$ が長く、CL が低値、及び V_{ss} が低値であった。MLN0002 は、試験した動物種において薬理活性を示した。安全性薬理試験、反復投与毒性試験、がん原性に関する検討試験、生殖発生毒性試験及び幼若動物毒性試験に基づいた非臨床毒性試験においてヒトの安全性に関して懸念されるような特記すべき知見はみられなかった。

全身曝露量（AUC）における十分な安全域と MLN0002 の有効性を考慮すると、MLN0002 の非臨床成績は、UC 又は CD 患者への MLN0002 の使用を支持するものである。

2.4.6 参考文献

[1] Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3(R2). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2009.

[2] Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1997.

[3] Addendum to ICH S6: preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6(R1). International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2009. Draft consensus guideline.

[4] Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals S8. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

[5] Guideline on the need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals S1A. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1995.

[6] Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2011.

[7] Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5(R2). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

[8] Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals S7A. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2000.

[9] The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals S7B. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

[10] Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, Fedorak RN, Pare P, McDonald JW, et al. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. N Engl J Med. 2005;352(24):2499-507.

[11] Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, Fedorak RN, Pare P, McDonald JW, et al. Treatment of active Crohn's disease with MLN0002, a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. Clin Gastroenterol Hepatol. 2008;6(12):1370-7.

[12] Lazarovits AI, Moscicki RA, Kurnick JT, Camerini D, Bhan AK, Baird LG, et al. Lymphocyte activation antigens. I. A monoclonal antibody, anti-Act I, defines a new late lymphocyte activation antigen. J Immunol. 1984;133(4):1857-62.

[13] Schweighoffer T, Tanaka Y, Tidswell M, Erle DJ, Horgan KJ, Luce GE, et al. Selective expression of integrin alpha 4 beta 7 on a subset of human CD4+ memory T cells with hallmarks of gut-trophism. J Immunol. 1993;151(2):717-29.

[14] Parikh A, Leach T, Wyant T, Scholz C, Sankoh S, Mould DR, et al. Vedolizumab for the treatment of active ulcerative colitis: A randomized controlled phase 2 dose-ranging study. Inflamm Bowel Dis. 2012;18(8):1470-9.

[15] Fedyk ER, Yang L-L, Wyant T, Kadambi V. Vedolizumab does not affect the suppressive activity of gut-homing T regulatory cells. Inflamm Bowel Dis. 2012;18(S1):S86-7.

[16] von Andrian U H, Engelhardt B. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. N Engl J Med. 2003;348(1):68-72.

[17] Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. Trends Immunol. 2005;26(9):485-95.

[18] Sheridan BS, Lefrançois L. Regional and mucosal memory T cells. Nat Immunol. 2011;12(6):485-91.

[19] Erle DJ, Briskin MJ, Butcher EC, Garcia-Pardo A, Lazarovits AI, Tidswell M. Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin alpha 4 beta 7, on human leukocytes. J Immunol. 1994;153(2):517-28.

[20] Rott LS, Briskin MJ, Andrew DP, Berg EL, Butcher EC. A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with beta 7 integrins and memory differentiation. J. Immunol. 1996;156(10):3727-36.

[21] Engelhardt B, Laschinger M, Schulz M, Samulowitz U, Vestweber D, Hoch G. The development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse requires alpha4-integrin but not alpha4beta7-integrin. J Clin Invest. 1998;102(12):2096-105.

[22] Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA Jr. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. J Exp Med. 1993;177(1): 57-68.

[23] Kent SJ, Karlik SJ, Cannon C, Hines DK, Yednock TA, Fritz LC, et al. A monoclonal antibody to alpha 4 integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis. J Neuroimmunol. 1995;58(1):1-10.

[24] Keszthelyi E, Karlik S, Hyduk S, Rice GP, Gordon G, Yednock T, Horner H. Evidence for a prolonged role of alpha 4 integrin throughout active experimental allergic encephalomyelitis. Neurology. 1996;47(4):1053-9.

[25] Piraino PS, Yednock TA, Freedman SB, Messersmith EK, Pleiss MA, Karlik SJ. Suppression of acute experimental allergic encephalomyelitis with a small molecule inhibitor of alpha4 integrin. Mult. Scler. 2005;11(6):683-90.

[26] Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. Nature. 1992;356(6364):63-6.

[27] Sandborn WJ, Colombel JF, Enns R, Feagan BG, Hanauer SB, Lawrance IC, et al. Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease. N Engl J Med. 2005;353(18):1912-25.

[28] Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med. 2006;354(9):899-910.

[29] Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. Annu Rev Med. 2010;61:35-47.

[30] Berger JR. Natalizumab and progressive multifocal leucoencephalopathy. Ann Rheum Dis. 2006;65 Suppl 3:iii48-53.

[31] Tan CS, Koralnik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. Lancet Neurol. 2010;9(4):425-37.

[32] Schmedt N, Andersohn F, Garbe E. Signals of progressive multifocal leukoencephalopathy for immunosuppressants: a disproportionality analysis of spontaneous reports within the US Adverse Event Reporting System (AERS). Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2012;21(11):1216-20

[33] Hundorfean G, Neurath MF, Mudter J. Functional relevance of T helper 17 (Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2012;18(1):180-6.

[34] Izcue A, Coombles JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. Annu Rev Immunol. 2009;27:313-38.

[35] Photosafety evaluation of pharmaceuticals S10. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2014.

[36] Tysabri (natalizumab) injection, for intravenous use [package insert]. Cambridge (MA, USA): Biogen Idec Inc; 2016.

[37] Tysabri 300 mg concentrate for solution for infusion [summary of product characteristics]. Maidenhead (Berkshire, United Kingdom): Biogen Idec Ltd; 2016.

[38] Stefanich EG, Danilenko DM, Wang H, O'Byrne S, Erickson R, Gelzleichter T, et al. A humanized monoclonal antibody targeting the β_7 integrin selectively blocks intestinal homing of T lymphocytes. Br J Pharmacol. 2011;162(8):1855-70.

[39] Haanstra KG, Hofman S, 't Hart B, Blezer E, Yang L, Wyant T, et al. Antagonizing the alpha4beta1 integrin but not alpha4beta7 inhibits leukocytic infiltration of the CNS in rhesus monkey EAE. J Immunol. 2013;190(5):1961-73.

[40] Wehner NG, Gasper C, Shopp G, Nelson J, Draper K, Parker S, et al. Immunotoxicity profile of natalizumab. J Immunotoxicol. 2009;6:115-29.

[41] Wagner N, Löhler J, Kunkel EJ, Ley K, Leung E, Krissansen G, et al. Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. Nature. 1996;382(6589):366-70.