目次

略号一覧 2
2.6.1 緒言 3
2.6.1.1 製剤の組成 3
2.6.1.2 用法・用量 4
2.6.1.3 薬理学的分類 — 選択的免疫抑制薬 4
2.6.1.4 効能・効果 4

表

表 2.6.1-1　MLN0002 に関する一般情報 3

略号一覧

略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
CDR	complementarity-determining region	相補性決定領域
CAS	Chemical Abstracts Service	Chemical Abstracts Service
GI	gastrointestinal	消化管
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
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

2.6.1 緒言

MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンに特異的に結合し、粘膜アドレシン細胞接着分子-1（MAdCAM-1）を阻害し、リンパ球の消化管（GI）への遊走をブロックするヒト化モノクローナル抗体（mAb）である（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]）。本剤は、2 本のジスルフィド架橋によって結合されたκ鎖サブクラスからなる 2 本の軽鎖及び 2 本の重鎖で構成され、免疫グロブリン（Ig）G1 アイソタイプの抗体を形成する。

MLN0002 は、マウス Act-1 モノクローナル抗体（mAb）の相補性決定領域（CDR）をヒト IgG1 の重鎖及びκ軽鎖に置き換えることによって作製される。したがって、MLN0002 及び Act-1 は、重鎖及び軽鎖の両方の様々な領域において同じ抗原認識モチーフ（又は CDR）を有している。

MLN0002 に関する命名法、Chemical Abstracts Service（CAS）登録番号、分子式及び分子量などの概要を表 2.6.1-1 に示す。

表 2.6.1-1　MLN0002 に関する一般情報

JAN	日本名：ベドリズマブ（遺伝子組換え） 英名：Vedolizumab (Genetical Recombination)
INN	vedolizumab
化学名	ベドリズマブは，遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体であり，マウス抗ヒト α4β7 インテグリン抗体の相補性決定部，並びにヒト IgGl のフレームワーク及び定常部からなり，H 鎖の 239 及び 241 番目のアミノ酸残基が Ala に置換されている．ベドリズマブは，チャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される．ベドリズマブは，451 個のアミノ酸残基からなる H 鎖（γ1 鎖）2 本及び 219 個のアミノ酸残基からなる L 鎖（κ 鎖）2 本で構成される糖タンパク質（分子量：約 150,000）である． Vedolizumab is a recombinant humanized monoclonal antibody composed of complementarity-determining regions derived from mouse anti-human α4β7 integrin monoclonal antibody and framework regions and constant regions derived from human IgG1, whose amino acid residues at positions 239 and 241 in the H-chains are substituted by Ala. Vedolizumab is produced in Chinese hamster ovary cells. Vedolizumab is a glycoprotein (molecular weight: ca. 150,000) composed of 2 H-chains (γ1-chains) consisting of 451 amino acid residues each and 2 L-chains (κ-chains) consisting of 219 amino acid residues each.
CAS 登録番号	*943609-66-3*
分子式	$C_{6528}H_{10080}N_{1732}O_{2042}S_{42}$
分子量	146,842.99（タンパク質部分、4 本鎖） H 鎖: 49,519.14　L 鎖: 23,902.35

CAS = Chemical Abstracts Service ; INN = 国際一般名

2.6.1.1 製剤の組成

本剤は凍結乾燥製剤であり、注射用水を用いて再調製するとき、60 mg/mL ベドリズマブ、50 mmol/L ヒスチジン（L-ヒスチジン 4.59 mg/mL 及び L-ヒスチジン塩酸塩水和物 4.28 mg/mL として）、125 mmol/L L-アルギニン塩酸塩、100 mg/mL 精製白糖及び 0.6 mg/mL ポリソルベート 80 を含有する。

本製剤に関する詳細な組成については、2.3.P.1 に記載した。

2.6.1.2 用法・用量

本剤の用法・用量（案）を以下に示す。

通常、成人にはベドリズマブ（遺伝子組換え）として1回300 mgを点滴静注する。初回投与後、2週、6週に投与し、以降8週間隔で点滴静注する。

2.6.1.3 薬理学的分類 — 選択的免疫抑制薬

本剤は、ヒトリンパ球の$\alpha_4\beta_7$インテグリンを標的とするヒト化IgG1モノクローナル抗体である。

2.6.1.4 効能・効果

本剤の効能・効果（案）を以下に示す。

中等症から重症の潰瘍性大腸炎の治療及び維持療法（既存治療で効果不十分な場合に限る）

目次

略号一覧 3
2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.2.1 免疫及び炎症におけるインテグリンの役割 7
2.6.2.2.2 *in vitro* PD 試験 9
2.6.2.2.3 *in vivo* PD 試験 18
2.6.2.3 副次的薬理試験 28
2.6.2.4 安全性薬理試験 30
2.6.2.4.1 カニクイザルを用いた MLN0002 投与による心血管系への影響を検討する安全性薬理試験 30
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 30
2.6.2.6 考察及び結論 31
2.6.2.7 参考文献 32

表

表 2.6.2.1-1　薬理試験で用いた被験物質 6
表 2.6.2.2-1　MLN0002 の *in vitro* 特性 9
表 2.6.2.2-2　$\alpha_4\beta_7$ 及び $\alpha_4\beta_1$ のインテグリン発現細胞のリガンドである MAdCAM-1 VCAM-1 及びフィブロネクチンへの結合に対する MLN0002 の拮抗阻害 13
表 2.6.2.2-3　白血球サブタイプ別 $\alpha_4\beta_1$ インテグリン及び $\alpha_4\beta_7$ インテグリン発現率 15
表 2.6.2.2-4　リンパ球サブタイプ別 $\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリン発現率 15
表 2.6.2.2-5　ヘルパーT リンパ球及び細胞傷害性 T リンパ球亜集団での $\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリン発現率 15
表 2.6.2.2-6 ウサギ、サル及びヒトの $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する MLN0002 の結合親和性 18
表 2.6.2.2-7　MLN0002 の *in vivo* 特性 19
表 2.6.2.2-8　投与前レベルに対する炎症性細胞密度の減少率（%） 21
表 2.6.2.2-9　アカゲザルの実験的自己免疫性脳脊髄炎における中枢神経系の免疫監視機構に対する MLN0002 の影響の概要 28

図

図 2.6.2.2-1　リンパ球インテグリンが血管細胞接着分子に結合することに起因する免疫監視及び組織の炎症 7
図 2.6.2.2-2　$\alpha_4\beta_7$ インテグリンの腸管指向性機能による腸管選択的な抗炎症治療 8

図 2.6.2.2-3　$\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する排他的な拮抗阻害による腸管選択的な抗炎症作用 9
図 2.6.2.2-4　$\alpha_4\beta_7$ インテグリンに結合した Act-1 の構造モデル 10
図 2.6.2.2-5　MLN0002 の $\alpha_4\beta_7$ インテグリンへの結合特異性 11
図 2.6.2.2-6　Act-1 投与による慢性大腸炎ワタボウシタマリンの便状態の改善 20
図 2.6.2.2-7　Act-1 を投与したワタボウシタマリンにおける胃腸粘膜の肉眼的変化 20
図 2.6.2.2-8　Act-1 投与による慢性大腸炎ワタボウシタマリンの胃腸における炎症性浸潤軽減 21
図 2.6.2.2-9　アカゲザルにおける natalizumab 及び MLN0002 の PK、免疫原性及び PD 23
図 2.6.2.2-10　*in vivo* での natalizumab 又は MLN0002 への曝露がミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白に対する免疫応答に与える影響 24
図 2.6.2.2-11　MLN0002 の大脳白質病変の形成への影響作用 25
図 2.6.2.2-12　MLN0002 の脳炎症及び脱髄への影響 26
図 2.6.2.2-13　MLN0002 のサル脳脊髄液中の白血球レベルへの影響 27
図 2.6.2.3-1　MLN0002 の選択的な副次的薬力学的作用 29

略号一覧

略号	略していない表現	説明
BALT	bronchus-associated lymphoid tissue	気管支関連リンパ組織
CD	Crohn's disease	クローン病
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害作用
CDR	complementarity-determining region	相補性決定領域
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
CV	cardiovascular	心血管系
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
EC_{50}	concentration of labeled antibody that yielded 50% of maximal staining	最大染色の 50%を生じさせた標識抗体濃度
ECG	electrocardiogram	心電図
GALT	gut-associated lymphoid tissue	腸管関連リンパ組織
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
IC_{50}	concentration producing 50% inhibition	50%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonisation	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IFN	interferon	インターフェロン
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IL	interleukin	インターロイキン
IPEX	immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked	X 連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸症候群
IV	intravenous（ly）	静脈内
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
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
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein	ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白
MRI	magnetic resonance imaging	磁気共鳴撮像
MS	multiple sclerosis	多発性硬化症
MTR	magnetization transfer ratio	磁化移動率
NK	natural killer	ナチュラルキラー（細胞）
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PAHA	primate antihuman antibodies	霊長類（サル）抗ヒト抗体
PALS	periarteriolar lymphoid sheaths	動脈周囲リンパ鞘
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核球
PD	pharmacodynamic（s）	薬力学
PHA	phytohemagglutinin	植物性血球凝集素
PK	pharmacokinetic（s）	薬物動態
PML	progressive multifocal leukoencephalopathy	進行性多巣性白質脳症
SC	subcutaneous（ly）	皮下
Th	T helper	ヘルパーT（細胞）
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
Treg	regulatory T cells	制御性 T 細胞
UC	ulcerative colitis	潰瘍性大腸炎
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1	血管細胞接着分子-1

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

MLN0002 は、κ 鎖サブクラスからなる 2 本の軽鎖及び 2 本の免疫グロブリン（Ig）G1 重鎖で構成された、新しいタイプの遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体（mAb）である。MLN0002 は、ヒトリンパ球の $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに特異的に結合する。$\alpha_4\beta_7$ インテグリンは、血管細胞接着分子である MAdCAM-1（粘膜アドレシン細胞接着分子-1）に結合することにより、腸管関連リンパ組織（GALT）及び粘膜固有層へのリンパ球の遊走を手助けする腸管の免疫及び炎症における重要なメディエーターである[1] [2] [3] [4]。腸管選択的な抗炎症作用を特徴とする MLN0002 は、潰瘍性大腸炎（UC）及びクローン病（CD）に対する治療薬として欧米で承認されている。

MLN0002 の薬理学的プロファイルの特性について、*in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。*in vitro* 試験では、単離したヒト及びサルの組織、細胞並びに細胞株を用いて、$\alpha_4\beta_7$ インテグリン機能の結合特異性及び選択的拮抗性について評価した。一方、*in vivo* 試験では、慢性大腸炎を発症するワタボウシタマリン及び実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を発症するアカゲザルを用いて、薬力学的（PD）作用について評価した。なお、MLN0002 に対して実施した個々の薬理試験の概要は概要表 2.6.3.1 に収載した。

薬理学的な評価により、MLN0002 は腸管指向性 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対して特異的に結合する選択性の高い拮抗薬であること、すなわち、natalizumab[5] [6]とは異なり $\alpha_4\beta_1$ インテグリンに結合しないこと、また etrolizumab（rhuMab beta7）[7]とは異なり $\alpha_E\beta_7$ インテグリンに結合しないことが実証されている（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]）。MLN0002 は、MAdCAM-1 及び細胞外マトリックス糖蛋白であるフィブロネクチンへの結合及び接着を選択的に拮抗することによって $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの機能を阻害するが、血管細胞接着分子-1（VCAM-1）に対する結合には拮抗しない。このように、拮抗作用が選択的であることから、MLN0002 の PD 作用は、他の $\alpha_4\beta_7$ インテグリン拮抗薬と異なり、$\alpha_4\beta_7$ 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と考えられる。

一方、MLN0002 は $\alpha_4\beta_7$ インテグリン拮抗薬であって作動薬ではないため、免疫細胞からのサイトカインの放出を惹起せず、また $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現する制御性 T 細胞（Treg 細胞）によるサイトカインの産生も阻害しない。さらに、MLN0002 は標的細胞を障害しないため、MLN0002 を除去すると、$\alpha_4\beta_7$ インテグリン機能は急速に再構築される。

MLN0002 の PD 作用は、消化管に対して選択的である。すなわち、MLN0002 のマウス相同抗体である Act-1 を慢性の潰瘍性大腸炎を発症している動物に投与したところ、腸管炎症が寛解し、下痢症状が改善した（4.2.1.1-22 報告書番号 Hesterberg 1996）。一方、MLN0002 は、アカゲザル EAE モデルにおいて中枢神経系（CNS）の炎症又は皮膚曝露に対する免疫応答のいずれにも影響を及ぼさないことも実証された（4.2.1.1-23 報告書番号 RPT-01673 Amendment 1）。以上のことから、MLN0002 を UC 及び CD の治療薬として開発した背景は、この腸管選択的抗炎症作用機序に基づいている。

霊長類における MLN0002 の主な標的は、白血球の特定のサブタイプである。サル及びヒトの組織を用いた医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）に適用した組織交差反応性試験では、MLN0002 の結合は、リンパ組織中の白血球、血管腔内の白血球、又は様々

な非リンパ系組織において認められた浸潤白血球に限定されていた。これらの結果は、Act-1を用いて別途実施した試験成績及び霊長類における既知の$\alpha_4\beta_7$インテグリン発現パターンと一致していた（4.2.1.1-22 報告書番号 Hesterberg 1996）[8] [9]。なお、予期しなかった交差反応性及び標的以外での反応性はみられなかった。*in vitro* において、MLN0002 及び Act-1 は、ウサギ、カニクイザル、アカゲザル及びヒトの血液において、1 nmol/L 未満の濃度で$\alpha_4\beta_7$インテグリンに結合した。

GLP 適用で実施した反復投与毒性試験及び心血管系に対する安全性薬理試験において、MLN0002 は、100 mg/kg の用量において、消化器系、泌尿器系、呼吸器系、CNS 及び心血管系に機能的及び病理的な有害作用は引き起こさなかった。同用量における最高濃度（C_{max}）の平均値（2.6.6.3 ; 4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]は、ヒトに 300 mg を静脈内点滴投与した際の C_{max} の幾何平均値の約 42 倍に相当する（5.3.5.3-3 MLN0002/NDA001）。さらに、MLN0002 は、多発性硬化症（MS）の霊長類モデルであるアカゲザル EAE において CNS の免疫監視機構を損なわなかった（2.6.2.2.3.2）。

非臨床試験及び臨床試験では、MLN0002 の製造工程及び／又は原薬・製剤の剤形が異なる 3 つの製造法による MLN0002 を使用した。これらをそれぞれ MLN0002（製造法 A）、MLN0002（製造法 B）及び MLN0002（製造法 C）と呼称する（表 2.6.2.1-1）。なお、すべての物質を開発コードである MLN0002 と総称する。

製造法 A（MLN0002）は、NS0 細胞株を用いて製造した。MLN0002 の臨床的有効性は、NS0 由来製剤（製造法 A）を用いて実施した第 II 相臨床試験で評価された。製造効率を改善するため、CHO 細胞を用いた製造法（製造法 B）を開発して、MLN0002 を製造した。CHO 細胞由来原薬（製造法 B）の場合、軽鎖の定常領域におけるマウス由来の 2 個のアミノ酸をヒトκ鎖の共通領域配列と一致する 2 個のアミノ酸と置換した。抗体の結合領域に変更はないことから、CHO 細胞産生（製造法 B）抗体の生物学的機能は、NS0 細胞産生（製造法 A）抗体のものと同等となることが予測された。なお、製造工程及び剤形の変更に関する情報は、2.3.S.2 及び 2.3.P.2 に記載した。

マウス抗体である Act-1 は MLN0002 の先行相同体であり、MLN0002 及び Act-1 は、重鎖及び軽鎖の両方の様々な領域において共通の抗原認識モチーフ（又は相補性決定領域（CDR））を有している。Act-1、NS0 及び CHO に由来する MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$インテグリンに対して、同程度の結合特異性、親和性及び選択的な拮抗性を示した。

結論として MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$インテグリンの MAdCAM-1 との相互作用に選択的に拮抗し、腸管選択的な抗炎症作用をもたらすことが確認され、この作用機序に基づき、本剤を UC 及び CD 治療薬として開発した。

表 2.6.2.1-1　薬理試験で用いた被験物質

試験の種類	被験物質	GLP	報告書番号	添付資料番号
in vitro 薬力学試験				
結合特異性	MLN0002（製造法 B）	非適用	RPT-01097 Amendment 1	4.2.1.1-1
$\alpha_4\beta_7$インテグリンの発現パターン	Act-1 及び MLN0002（製造法 B）	非適用	[redacted]	4.2.1.1-2 4.2.1.1-3
T リンパ球活性化及びサイトカイン産生	MLN0002（製造法 B）	非適用	RPT-01140	4.2.1.1-4
T リンパ球増殖	MLN0002（製造法 C）	非適用	RPT-01954	4.2.1.1-5
CDC	MLN0002（製造法 B）	非適用	RPT-01139	4.2.1.1-6
ADCC	Act-1 及び MLN0002（製造法 B）	非適用	RPT-01138	4.2.1.1-7
$\alpha_4\beta_7$インテグリン - リガンド間相互作用に対する拮抗選択性	MLN0002（製造法 B）	非適用	RPT-01098	4.2.1.1-8
組織交差反応性（アッセイ条件の最適化）	MLN0002（製造法 A）	非適用	[redacted]	4.2.1.1-9
組織交差反応性（サル）	MLN0002（製造法 B）	適用	[redacted]	4.2.1.1-10
組織交差反応性（ヒト）	Act-1	非適用	[redacted]	4.2.1.1-11
	MLN0002（製造法 A）	適用	[redacted]	4.2.1.1-12
	MLN0002（製造法 B）	適用	[redacted]	4.2.1.1-13
Th17 細胞及び Treg 細胞への結合	Act-1 及び MLN0002（製造法 B）	非適用	[redacted]	4.2.1.1-14
Treg 細胞の活性に対する影響	MLN0002（製造法 C）	非適用	RPT-01954	4.2.1.1-5
in vitro での $\alpha_4\beta_7$インテグリン機能の回復性	MLN0002（製造法 B）	非適用	RPT-01436	4.2.1.1-15
異種由来白血球に対する親和性	Act-1 及び MLN0002（製造法 A）	非適用	RPT-00709	4.2.1.1-16
	MLN0002（製造法 B）	非適用	RPT-01101 Amendent 1	4.2.1.1.17
	MLN0002（製造法 B）	非適用	RPT-01052	4.2.1.1-18
	MLN0002（製造法 B）	非適用	RPT-01337	4.2.1.1-19
	MLN0002（製造法 A）	非適用	[redacted]	4.2.1.1-20
	Act-1、MLN0002（製造法 A）及び MLN0002（製造法 B）	非適用	[redacted]	4.2.1.1-21
in vivo 薬力学試験				
慢性大腸炎の非臨床モデルにおける有効性	Act-1	非適用	Hesterberg 1996	4.2.1.1-22
EAE の非臨床モデルにおける CNS に対する影響	MLN0002（製造法 B）	非適用	RPT-01673 Amendment 1 Haanstra 2013[10]	4.2.1.1-23
安全性薬理試験				
心血管系への影響を検討する安全性薬理試験	MLN0002（製造法 B）	適用	[redacted]	4.2.1.3-1

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

作用機序の解明、分子標的治療薬としての MLN0002 の選択性及び結合特異性の実証、並びに $\alpha_4\beta_7$インテグリン機能の阻害を評価する目的として、MLN0002 の効力を裏付ける試験を複数実施した。本項では、MLN0002 の作用機序を他の $\alpha_4\beta_7$インテグリン拮抗薬と比較した成績について述べる（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-3 報告書番号[redacted]。

2.6.2.2.1 免疫及び炎症におけるインテグリンの役割

免疫においては、侵襲性の病原体が存在するかどうか監視する役割を白血球が担っている。病原体を監視するためには、特に白血球のサブセットであるリンパ球が局所に遊走することが重要である。ナイーブリンパ球は、主に全身を再循環するが、分化したメモリーT 細胞は、皮膚、CNS 又は消化管などの抗原に遭遇した組織や、再度遭遇する可能性が高い組織に対して優先的に遊走する。このメモリーT リンパ球の組織指向性遊走は、一方で自己免疫疾患の病原性炎症の制御を担っている[4] [11] [12] [13]。

リンパ球の組織指向性遊走における重要な事象としては、リンパ球の後毛細血管細静脈から周囲組織へと遊出することである。これは、多くの連続したステップが関与する複雑な細胞カスケードの結果として起こっている。第 1 ステップは、リンパ球の血管内腔に対して弱くかつ一時的な接着であり、これによって血管内腔に沿ったリンパ球の最初のテザリング、キャプチャー及びローリングがみられる。次のステップでは、追加の刺激によりリンパ球が活性化され、血管内腔に対する接着強度が増加し、強固な接着及びアレストがもたらされる。これらの重要なステップは、リンパ球表面に発現したインテグリンが血管内腔に発現した細胞接着分子に結合することによって引き起こされる。次に、強固なアレストによって、リンパ球の血管壁の通過遊出が可能になり、これらのリンパ球は、粘膜固有層を通り抜け、細胞外マトリックス成分及び間質細胞への接着を経由して、炎症性刺激源へ向かって遊走することが可能となる（図 2.6.2.2-1）[11] [12] [13]。

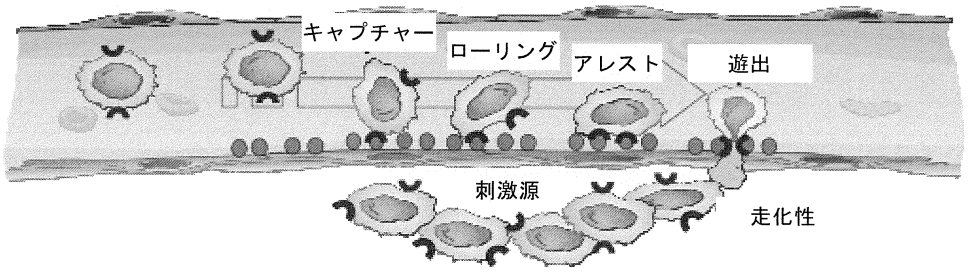


図 2.6.2.2-1　リンパ球インテグリンが血管細胞接着分子に結合することに起因する免疫監視及び組織の炎症

リンパ球インテグリン（青い半円）が血管細胞接着分子（赤い円）へ結合することにより、白血球を血管内皮内腔にキャプチャーする。これらの白血球は、せん断力により静脈還流方向へローリングする。インテグリンが活性化すると、白血球の強固な接着、血管内腔を通過する遊出、及び粘膜下層細胞外マトリックスから刺激源までの走化性が惹起される。

一般的に、血管内腔で発現した細胞接着分子へのリンパ球の強固な接着に関与し、また白血球が血管壁を通り抜けて周囲組織へ遊出することを容易にするインテグリンは、リンパ球の組織遊走の一連の事象において不可欠な因子である。

2.6.2.2.1.1 インテグリンは独特な機能を媒介する

インテグリンは、α 鎖と β 鎖という 2 つのサブユニットで構成されたヘテロ二量体で、これまで 24 種類のサブタイプが同定されている。このようにヘテロ二量体が多種に及ぶことが、

様々なインテグリンが細胞生理学上の独特な機能的役割を果たしていることと関連している[4] [14]。$\alpha_4\beta_7$インテグリンは、メモリーTリンパ球の特定のサブタイプに発現している[15] [16]。この$\alpha_4\beta_7$インテグリンは、血管内腔表面のMAdCAM-1に結合することによって、消化管への$\alpha_4\beta_7$インテグリン発現細胞の遊走を特異的に引き起こすが[4] [11]、関連組織へ遊出するには、血管に$\alpha_4\beta_7$インテグリン及びMAdCAM-1が存在するだけでは不十分であり、他の因子の存在が必要である。これは、MAdCAM-1がマウスの血液脳関門の細静脈内腔表面に異所発現した場合、ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白（MOG）で誘導したEAE発症中であっても、脳中への免疫細胞の游出の増加はみられなかったことからも示唆されている[17]。したがって、組織における潜在的な影響を正確に予測するには、発現プロファイルの情報だけでは十分とはいえない。$\alpha_4\beta_7$インテグリン及びMAdCAM-1の生理学的役割を説明するには、つまり、前述のマウスEAE、並びに後述のサル大腸炎及びEAEなどにおいてそれらの機能をブロックする作用機序の解明が必要である[4] [11]。

$\alpha_4\beta_7$インテグリンが腸管指向性機能を有することとは対照的に、$\alpha_4\beta_1$インテグリンは複数の組織指向性機能を有する。その中でも$\alpha_4\beta_7$インテグリンを発現するサブタイプとは異なるメモリーTリンパ球で発現し[15] [16]、CNS及び皮膚の血管内腔表面でVCAM-1に結合することによって、CNS及び皮膚のそれぞれの組織へ遊走する（図2.6.2.2-2）[4] [11] [12] [18]。このように、病原性Tリンパ球の組織指向性遊走により、組織選択的に炎症を治療することが可能である。

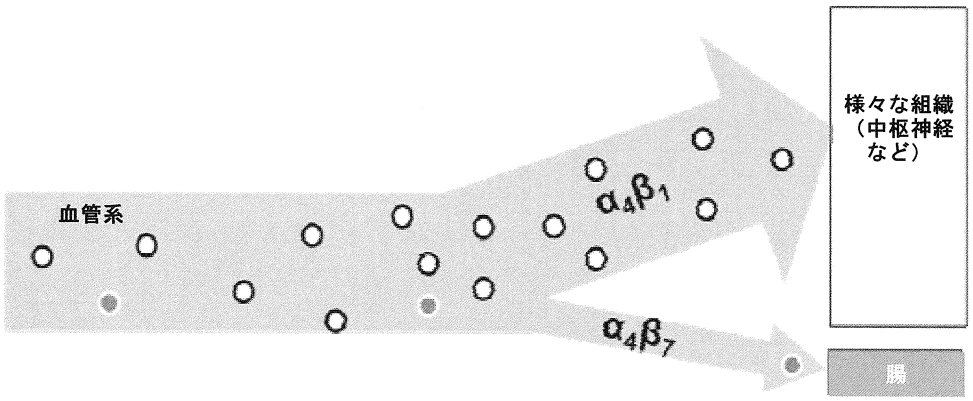


図2.6.2.2-2　$\alpha_4\beta_7$インテグリンの腸管指向性機能による腸管選択的な抗炎症治療

$\alpha_4\beta_1$インテグリンは、様々な組織へ白血球の遊走を媒介するが（多面的指向性）、$\alpha_4\beta_7$インテグリンは、消化管の間質への選択的な遊走を媒介する（腸管指向性）。$\alpha_4\beta_7$インテグリンを阻害することで、UC及びCDに対して特化された最適な治療戦略が提供可能となる。

血管細胞接着分子へのインテグリン結合に拮抗する薬剤は、一般的には、リンパ球の血管内皮内腔への強固な接着を妨害し、その結果として、炎症性刺激に反応したリンパ球の周囲組織への浸潤を阻止する。その中でも$\alpha_4\beta_7$インテグリンに特異的に結合する拮抗薬は、上述の病原性Tリンパ球の組織指向性遊走により、他の器官の免疫監視機構を阻害しないため、患者の全身性の感染症への罹患リスクを高めずに、UC及びCDに関連する炎症を改善する

（図 2.6.2.2-3）と考えられる。以上のことから、$\alpha_4\beta_7$インテグリン特異的拮抗薬である MLN0002 を UC 及び CD に対する治療薬として開発した。

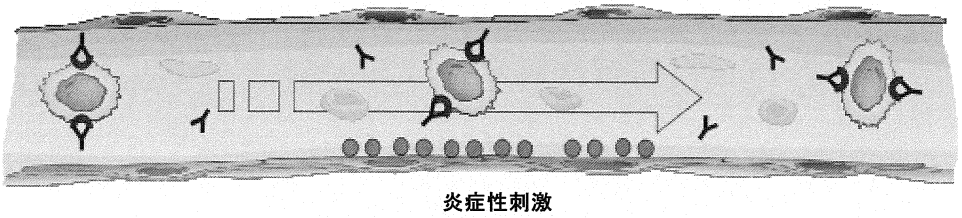


図 2.6.2.2-3　$\alpha_4\beta_7$インテグリンに対する排他的な拮抗阻害による腸管選択的な抗炎症作用

拮抗薬（黒の抗体）で粘膜アドレッシン細胞接着分子 1（MAdCAM-1）（赤い円）への $\alpha_4\beta_7$インテグリン（青い半円）の結合をブロックすると、白血球のキャプチャー及びそれに続く血管内腔を通り抜ける遊出が阻止されるため腸の炎症が低減される。

2.6.2.2.2 *in vitro* PD 試験

2.6.2.2.2.1 ヒト化抗体 MLN0002 の結合特性

：添付資料番号 4.2.1.1-1（評価）、-2（参考）、-3（参考）、-4（参考）、-5（参考）、-6（参考）、-7（参考）、-8（参考）

MLN0002 は、κ 鎖サブクラスからなる 2 本の軽鎖及び 2 本の免疫グロブリン（Ig）G1 重鎖で構成された新しいタイプの遺伝子組換えヒト化 mAb である。MLN0002 は、MLN0002 のマウス相同抗体である Act-1 の相補性決定領域（CDR）をヒト IgG1 の重鎖及び κ 軽鎖に移植することによって作製される。MLN0002 及び Act-1 は、重鎖及び軽鎖の両方の様々な領域で共通の抗原認識モチーフ（又は CDR）を有している。両抗体は、ヒトリンパ球の $\alpha_4\beta_7$インテグリンに結合し、$\alpha_4\beta_1$インテグリン又は $\alpha_E\beta_7$インテグリンには結合しない $\alpha_4\beta_7$インテグリン選択的拮抗薬である（4.2.1.1-3 報告書番号[redacted] [15]。MLN0002 の *in vitro* 特性の概要を表 2.6.2.2-1 に示す。

表 2.6.2.2-1　MLN0002 の *in vitro* 特性

アイソタイプ	ヒト IgG1（重鎖 FcR 結合領域を変異させてある）
結合部位	β_7鎖（α_4鎖でヘテロ二量体化されたとき）[19]
インテグリン特異性	$\alpha_4\beta_7$インテグリン（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]
細胞活性化	惹起せず（4.2.1.1-4 報告書番号 RPT-01140）
サイトカイン放出	惹起せず（4.2.1.1-4 報告書番号 RPT-01140）
T 細胞増殖	作用せず（4.2.1.1-5 報告書番号 RPT-01954）
CDC	細胞傷害性なし（4.2.1.1-6 報告書番号 RPT-01139）
ADCC	細胞傷害性なし（4.2.1.1-7 報告書番号 RPT-01138）
拮抗性	選択的、すなわち、MAdCAM-1 及びフィブロネクチンへの接着は阻害するが、VCAM-1 への接着は阻害しない（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]
組織結合プロファイル	結合は白血球の亜集団に制限され、好中球又は単球には結合しない（4.2.1.1-2 報告書番号[redacted]及び 4.2.1.1-3 報告書番号[redacted]

ADCC = 抗体依存性細胞傷害作用；CDC = 補体依存性細胞傷害作用；Ig = 免疫グロブリン；MAdCAM-1 = 粘膜アドレッシン細胞接着分子-1；VCAM-1 = 血管細胞接着分子-1。

近年、ヒト $\alpha_4\beta_7$ の頭部フラグメントに結合した Act-1 Fab の構造が 3.1-Å 分解能での X 線解析で解明された[19]。この研究によって、α_4 鎖に結合し、$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンを阻害する非選択的 α_4 拮抗薬である natalizumab 及び RO0505376 などのインテグリン拮抗薬とは対照的に、Act-1 は、β_7 鎖に結合し、α_4 鎖には接触しないことが明らかにされた（図 2.6.2.2-4）[19]。MLN0002/$\alpha_4\beta_7$ 複合体の高分解能結晶が析出されなかったことから、MLN0002 については Act-1 と同様のデータは取得できなかった。

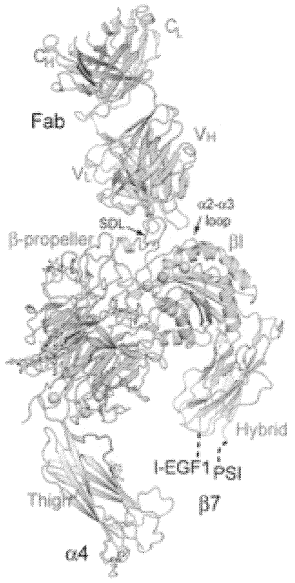


図 2.6.2.2-4　$\alpha_4\beta_7$ インテグリンに結合した Act-1 の構造モデル

出典：Yu et al, 2012.[19]

結合した Act-1 Fab と共結晶化し、3.15 Å 分解能で X 線回折して得た $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの頭部フラグメント構造。Act-1 は、α_4 β-propeller ドメインとの界面で MIDAS 付近の β_7 βI ドメインから突き出る、特異性決定ループ（SDL）として知られる拡張ジスルフィド結合ループを認識する。Fab は、β_7 サブユニットとだけ接触し、溶媒露出総面積は 1300 Å^2。β_7 の当該面積の大部分は SDL が占め（88%）、残りは βI ドメイン α2-α3 ループの Ser-231 に集まる。結晶構造（crystal structure）には、α_4 thigh ドメインがある；β_7 PSI 及び I-EGF1 ドメインは、結晶化構造（crystallization construct）及び結晶（crystals）に存在する。銀色及びオレンジ色の球は、それぞれ Ca^{2+} 及び Mg^{2+} イオンを示す。ジスルフィド結合はオレンジ色で示し、ホワイトカーボン付きのグリカンはバーで示した。

$\alpha_4\beta_1$、$\alpha_4\beta_7$ 又は $\alpha_E\beta_7$ のインテグリンのうち、いずれか 1 つしか発現しない細胞株を用いて、α_4 鎖、α_E 鎖、β_1 鎖及び β_7 鎖で構成されるインテグリンヘテロ二量体発現細胞に対する MLN0002 の結合特異性を調べた（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-1 報告書番号 RPT-01097 Amendment 1 及び 4.2.1.1-3 報告書番号[redacted]）。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。さらに、結合特異性について、無刺激の細胞を用いたフローサイトメトリー解析により評価し以下のことが明らかとなった。すなわち、MLN0002 は、α_4 鎖及び β_7 鎖（図 2.6.2.2-5B）を発現するが、β_1 鎖又は α_E 鎖は発現しない RPMI8866 細胞に対して結合し（図 2.6.2.2-5A）、相同体である Act-1 を添加してインキュベーションした場合、MLN0002 の細胞との結合が Act-1 と競合した。また、α_4 鎖及び β_1 鎖（図 2.6.2.2-5D）を発現するが β_7 鎖を発現しない RAMOS 細胞（図 2.6.2.2-5C）並びにヒト α_E 鎖及び β_7 鎖（図 2.6.2.2-5E 及び図 2.6.2.2-5F）を発現するがヒト α_4 鎖を発現しない L1.2

トランスフェクタント細胞（図 2.6.2.2-5E）とも結合しなかった。以上の成績からヒト全血白血球を用いた試験において、MLN0002 の $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する結合特異性が、$\alpha_4\beta_1$ 又は $\alpha_E\beta_7$ のインテグリンに対する結合との対比の観点から実証された。ヒト全血白血球では、上述の結合プロファイルが濃度 400 μg/mL（試験した最高濃度）まで維持された。なお、同濃度は、43 日目に 300 mg での 30 分間の単回持続静注後にヒトで観察される C_{max} の幾何平均値（124.3 μg/mL）を上回る濃度に相当する（5.3.5.3-3 MLN0002/NDA001）（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-2 報告書番号[redacted]及び 4.2.1.1-3 報告書番号[redacted]）。

したがって、MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンに特異的に結合し、$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_E\beta_7$ のインテグリンに対しては結合しない。この選択的な結合プロファイルが、*in vivo* での MLN0002 の腸管選択的抗炎症プロファイルを示す主な要因である。

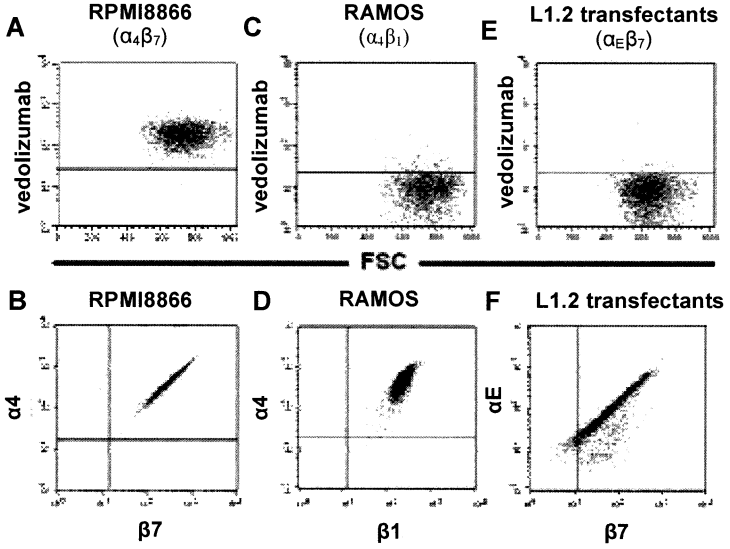


図 2.6.2.2-5　MLN0002 の $\alpha_4\beta_7$ インテグリンへの結合特異性

出典：報告書番号 RPT-01097 Amendment 1 及び[redacted]
$\alpha_4\beta_7$（B）しか発現しない RPMI8866 細胞（A）、$\alpha_4\beta_1$（D）しか発現しない RAMOS 細胞（C）、及び $\alpha_E\beta_7$（F）しか発現しない L1.2 細胞トランスフェクタント（E）に対する MLN0002 の結合プロファイルを示すフローサイトメトリー分析。フローサイトメトリープロットは、独立して実施した少なくとも 3 つの実験に基づく。

2.6.2.2.2.2 MLN0002 は作動薬作用を示さない

：添付資料番号 4.2.1.1-4（参考）、-5（参考）

MLN0002 のヒト全血への結合は、T リンパ球活性化マーカーである CD69 及び CD25 の発現に影響を及ぼさなかったが（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-4 報告書番号 RPT-01140）、陽性対照刺激因子であるリポ多糖（LPS）及び植物性血球凝集素（PHA）は T リンパ球表面の CD69 及び CD25 の発現を増加させた。

MLN0002 のヒト全血中の白血球への結合は、インターフェロン（IFN）γ、腫瘍壊死因子（TNF）α、インターロイキン（IL）-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-12（P70）、IL-17、IL-12（P40）及び IL-23 蛋白などのサイトカイン産生を惹起しなかった。

in vitro で抗 CD3／抗 CD28 ビーズ又は PHA を用いて刺激したところ、対照溶媒又はアイソタイプ対照抗体と比べ、MLN0002（抗 $\alpha_4\beta_7$ インテグリン抗体）、natalizumab（抗 α_4 インテ

グリン抗体）及びFIB504（抗β_7インテグリン抗体）は、ヒト末梢血T細胞の増殖に対して影響を示さなかった（概要表2.6.3.2；4.2.1.1-5報告書番号RPT-01954）。これらの成績は、MLN0002の*in vivo*作用が標的細胞の活性化及び増殖に関与しないことを示唆している。

2.6.2.2.2.3 MLN0002はFc媒介作用を惹起しない

：添付資料番号4.2.1.1-6（参考）、-7（参考）

補体依存性細胞傷害作用（CDC）は、抗CD3 mAb OKT3（muromonab-CD3）などの治療用mAbにみられる*in vivo*で補体結合部位である抗体のFc領域によって引き起こされる典型的な細胞傷害作用機序である[20]。そこで、MLN0002ではFcの補体結合部位を排除するため、重鎖の結合領域において、2個のアミノ酸変異（Leu239とGly241をAlaと置換）を含むように遺伝子操作を行っている。ヒト末梢血単核球（PBMC）を用いて、MLN0002の潜在的なCDCとOKT3のCDCを*in vitro*で比較した（概要表2.6.3.2;4.2.1.1-6報告書番号RPT-01139）。MLN0002又はIgG1アイソタイプ対照の存在下で、MLN0002のヒト全血細胞への飽和結合を達成するために必要な濃度よりも約20倍高い濃度10 μg/mLであっても、細胞傷害は観察されなかった。一方、OKT3では、PBMCにおける用量依存的にCDCを誘導した。これらの成績は、*in vivo*では、MLN0002がCDCの誘導に関与しないことを示唆している。

また、抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）についても、抗CD20 mAbであるrituximab[21]などの治療用mAbにみられる抗体のFc領域が関与するもう1つの典型的な細胞傷害作用機序である。上述のように、MLN0002はFc受容体へ結合しないようにFc領域に遺伝子操作（Leu239とGly241をAlaと置換）を施しているが、MLN0002の潜在的なADCCの有無を検証した。高レベルの$\alpha_4\beta_7$インテグリン（図2.6.2.2-5）及びCD20を発現するRPMI8866細胞を用いて、*in vitro*でのMLN0002とrituximabのADCCを比較した（概要表2.6.3.2；4.2.1.1-7報告書番号RPT-01138）。MLN0002又はIgG1アイソタイプ対照の存在下で、MLN0002のRPMI8866への飽和結合を達成するために必要な濃度よりも約100倍高い濃度10 μg/mLにおいても、ADCCは観察されなかった。一方、rituximabは、RPMI8866細胞において、用量依存的にADCCを誘導した。これらの成績は、*in vivo*では、MLN0002がADCCの誘導に関与しないことを示唆している。

2.6.2.2.2.4 MLN0002は$\alpha_4\beta_7$インテグリンのMAdCAM-1に対する結合を拮抗阻害するがVCAM-1に対する結合は拮抗阻害しない

：添付資料番号4.2.1.1-8（参考）

$\alpha_4\beta_7$インテグリンは、3種類のリガンド、すなわち、MAdCAM-1、VCAM-1及びフィブロネクチンと結合する。最初の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。$\alpha_4\beta_7$インテグリンは、白血球が血管外に遊出した後にフィブロネクチンに結合することがあり、この結合は、白血球の活性化、分化及び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$\alpha_4\beta_7$インテグリンの作用に影響を及ぼすか否かは不明である。そこで、$\alpha_4\beta_1$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 mAbの選択性及びその強度（potency）について評価した（概要

表 2.6.3.2;4.2.1.1-8 報告書番号 RPT-01098)。$\alpha_4\beta_1$ インテグリンのみを発現する細胞株(RAMOS)又は $\alpha_4\beta_7$ インテグリンのみを発現する細胞株（RPMI8866）を用いて低親和性（Mn^{+2} 添加なし）又は高親和性（1 mM Mn^{+2} 添加）を促すインテグリン活性化の下で、それぞれプレートに固相化したヒト MAdCAM-1、VCAM-1 及びフィブロネクチンに対する MLN0002 の拮抗作用を評価した。その結果、MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンと MAdCAM-1 又はフィブロネクチンとの結合を拮抗阻害したが、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンと VCAM-1 との結合は拮抗阻害しなかった（表 2.6.2.2-2：4.2.1.1-8 報告書番号 RPT-01098）。対照的に、抗 α_4 mAb は、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンと、MAdCAM-1、VCAM-1 及びフィブロネクチンとの相互作用をすべて拮抗阻害した。一方、MLN0002 は、400 μg/mL の濃度で、$\alpha_4\beta_1$ インテグリンと VCAM-1 又はフィブロネクチンとの結合を阻害しなかった。同濃度は、43 日目に 300 mg での 30 分間単回持続静注後のヒトでの C_{max} の幾何平均値(124.3μg/mL)を上回る濃度に相当する(5.3.5.3-3 MLN0002/NDA001)。

表 2.6.2.2-2　$\alpha_4\beta_7$ 及び $\alpha_4\beta_1$ のインテグリン発現細胞のリガンドである MAdCAM-1 VCAM-1 及びフィブロネクチンへの結合に対する MLN0002 の拮抗阻害

	IC_{50} (μg/mL)					
Mn^{+2} (mM)	$\alpha_4\beta_7$			$\alpha_4\beta_1$		
	MAdCAM-1	VCAM-1	フィブロネクチン	MAdCAM-1	VCAM-1	フィブロネクチン
0	0.023 ± 0.012	> 400	N/A[a]	N/A[b]	> 400	N/A[a]
1	0.058 ± 0.024	> 400	0.020 ± 0.012	N/A[b]	> 400	> 400

出典：報告書番号 RPT-01098

IC_{50} = 50%阻害濃度；MAdCAM-1 = 粘膜アドレシン細胞接着分子-1；N/A = 該当せず；VCAM-1 = 血管細胞接着分子-1。

注記：低親和性（Mn^{+2} 添加なし）又は高親和性（1 mM Mn^{+2} 添加）インテグリン活性化の下で、プレートに固相化したヒト MAdCAM-1、VCAM-1 又はフィブロネクチンに接着する能力の観点で、$\alpha_4\beta_1$ インテグリンしか発現しない細胞株（RAMOS 細胞）又は $\alpha_4\beta_7$ インテグリンしか発現しない細胞株（RPMI8866 細胞）を評価した。次に、接着相互作用を阻害する能力について、MLN0002 を評価した。

a　フィブロネクチンへの結合には、Mn^{+2} が必要であった。

b　$\alpha_4\beta_1$ インテグリンを発現する RAMOS 細胞は、Mn^{+2} 活性化の下でも、MAdCAM-1 に結合しなかった。

これらのデータは、Act-1 を用いて別途実施された試験によっても裏付けられている。Act-1 は、$\alpha_4\beta_7$ インテグリン発現細胞のヒト MAdCAM-1 への接着を阻害した[22]。Act-1 は、$\alpha_4\beta_7$ インテグリン発現細胞のフィブロネクチンへの接着も阻害したが、VCAM-1 への接着は阻害しなかった[15]。

以上のことから、*in vitro* において、MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンと血管内皮細胞面のリガンドである MAdCAM-1 又は細胞外マトリックス成分のフィブロネクチンとの間の細胞接着を 0.39 nmol/L 以下の濃度で阻害するが、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンと血管内皮細胞表面のリガンド VCAM-1 との間の相互作用及び $\alpha_4\beta_1$ インテグリンと VCAM-1 若しくはフィブロネクチンとの間の相互作用による細胞接着は阻害しないことを示唆している。

2.6.2.2.2.5 MLN0002 が標的とするヒト組織及び細胞

：添付資料番号 4.2.1.1-9（参考）、-10（評価）、-11（評価）、-12（評価）、-13（評価）

GLP 適用での Act-1 及び MLN0002 の組織交差反応性試験を実施するにあたり、最適条件を決定するための検討を GLP 非適用で実施した(概要表 2.6.3.1;4.2.1.1-9 報告書番号[redacted]。

GLP 適用でのサルを用いた組織交差反応性試験では、35 部位の正常カニクイザル組織の凍結切片（入手可能な場合は 1 組織当たり 2 ドナー）を用いて、MLN0002（製造法 B）（ロット番号 0002-807-G0）(2 及び 20 μg/mL) の結合パターンを確認した (概要表 2.6.3.2 ; 4.2.1.1-10 報告書番号[redacted] 。これらサル組織で観察された MLN0002 の染色パターンは、後述のヒト組織で観察されたものと類似し、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンの発現パターンとも一致した。すなわち、血液中のリンパ球、結腸（粘膜固有層及び粘膜下リンパ小節）、小腸（上皮内、粘膜固有層及び粘膜下リンパ小節）、胃（粘膜固有層）、心臓（心筋間質）、肺（気管支／細気管支近傍の気管支関連リンパ組織（BALT））、リンパ節、唾液腺（間質の浸潤細胞巣）、脾臓（動脈周囲リンパ鞘（PALS））、胸腺（髄質で顕著）、扁桃（主に濾胞間領域及び粘膜下組織）、並びに膀胱 (主に固有層-粘膜下層内の浸潤細胞巣) 内のリンパ球に結合した MLN0002 に対する染色性が認められた。これらの結果は、サルの染色パターンがヒトと類似していることを示しており、ヒトでの MLN0002 に対する影響を評価する上でサルが生理学的に適切な種であること示すものである。

GLP 適用でのヒト組織を用いた組織交差反応性試験では、3 名の各ドナー由来の 37 部位の正常ヒト組織の凍結切片を用いて、Act-1（ロット番号 5.1）（5 及び 20 μg/mL）、MLN0002（製造法 A）（ロット番号 8.2.1）（5 及び 20 μg/mL）、並びに MLN0002（製造法 B）（ロット番号 0002-807-G0）（2 及び 20 μg/mL）の結合パターンを検討した（概要表 2.6.3.2 ; 4.2.1.1-11 報告書番号[redacted]、4.2.1.1-12 報告書番号[redacted]及び 4.2.1.1-13 報告書番号[redacted]。各抗体のヒト組織に対する結合パターンは類似し、リンパ組織中のリンパ球、血管腔内のリンパ球、又は様々な非リンパ系組織において認められた浸潤リンパ球に限定されていた。すなわち、リンパ節の T 細胞領域（傍皮質／マントル帯）、扁桃（濾胞間領域／マントル帯）、脾臓（PALS）、リンパ節又は腸管関連リンパ組織（GALT）におけるリンパ小節、胸腺髄質及び骨髄のリンパ球 ; 脳（大脳、Act-1 のみ）、肝臓、肺（MLN0002（製造法 A）のみ）及びリンパ節の血管内腔のリンパ球、並びに肝臓の静脈周囲、前立腺及び甲状腺内の浸潤リンパ球に染色性が認められた。

これらの成績は、別途実施された Act-1 結合 $\alpha_4\beta_7$ インテグリン発現リンパ球の分布に関する検討によって裏付けられ[23]、既知の $\alpha_4\beta_7$ インテグリン発現パターンとも一致していた[1] [15] [23] [24] [25] [26]。予期しなかった交差反応性又は標的以外での反応性は認められなかった。結論として、これらの結果により、MLN0002 の主な薬理学的標的は白血球のサブタイプであることが実証された。

2.6.2.2.2.6 MLN0002 が結合するヒト白血球

：添付資料番号 4.2.1.1-2（参考）

特定の白血球に対する MLN0002 の作用の有無を検討するため、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を調べた。すなわち、ヒト全血を MLN0002（すなわち、抗 $\alpha_4\beta_7$ mAb）及び抗 α_4 ・抗 β_1 mAb、並びに様々な白血球のサブタイプ（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て、フローサイトメトリー解析により評価した。その結果、ヒト全血では、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンの発現パターンは、$\alpha_4\beta_1$ インテグリンの発現パターンよりもさらに限定されていることが判明した（概要表 2.6.3.2 ; 4.2.1.1-2 報告書番号

[redacted]。特に、単球及びリンパ球においては、$\alpha_4\beta_7$インテグリン発現率は$\alpha_4\beta_1$インテグリン発現率に比して15.5%及び60.2%の発現率であった。（表2.6.2.2-3）。

表2.6.2.2-3　白血球サブタイプ別$\alpha_4\beta_1$インテグリン及び$\alpha_4\beta_7$インテグリン発現率

細胞タイプ	細胞表面での指定インテグリン発現率	
	$\alpha_4\beta_1$	$\alpha_4\beta_7$
好中球	4.6%	3.0%
好酸球	100.0%	89.0%
単球	99.5%	15.5%
リンパ球	92.9%	60.2%

出典：報告書番号[redacted]

さらに、ヒト全血内において$\alpha_4\beta_1$インテグリンを発現するが$\alpha_4\beta_7$インテグリンを発現しないリンパ球の大きなサブタイプがあることが判明した（表2.6.2.2-4）。

表2.6.2.2-4　リンパ球サブタイプ別$\alpha_4\beta_1$及び$\alpha_4\beta_7$のインテグリン発現率

細胞タイプ	$\alpha_4\beta_1$インテグリン発現率	$\alpha_4\beta_1^+$集団での$\alpha_4\beta_7$インテグリン発現率
ナチュラルキラー細胞	99.6%	64.1%
Bリンパ球	100.0%	88.2%
ヘルパーTリンパ球	89.8%	56.2%
ナイーブヘルパーTリンパ球	90.9%	72.3%
メモリーヘルパーTリンパ球（$CD4^+$）	79.1%	35.9%
細胞傷害性Tリンパ球（$CD8^+$）	98.7%	64.0 %

出典：報告書番号[redacted]

特にメモリーT細胞においては、$\alpha_4\beta_1$及び$\alpha_4\beta_7$のインテグリンは、相補的に発現していた。すなわち、ヒトメモリーヘルパーTリンパ球及び細胞傷害性Tリンパ球サブタイプでは、β_1インテグリンの発現が高い細胞で$\alpha_4\beta_7$インテグリンの発現率が低下しており、これらのサブタイプにおける$\alpha_4\beta_7$インテグリンの発現パターンは、β_1インテグリン発現レベルが高ければ低下する反比例の関係を示した（表2.6.2.2-5）。

表2.6.2.2-5　ヘルパーTリンパ球及び細胞傷害性Tリンパ球亜集団での$\alpha_4\beta_1$及び$\alpha_4\beta_7$のインテグリン発現率

$\alpha_4\beta_1$プロファイル	$CD4^+$ $\alpha_4\beta_1^+$亜集団での$\alpha_4\beta_7$インテグリン発現率	$CD8^+$ $\alpha_4\beta_1^+$亜集団での$\alpha_4\beta_7$インテグリン発現率
$\alpha_4^{high}\beta_1^{high}$	21.2%	35.4%
$\alpha_4^{high}\beta_1^{low}$	96.3%	82.1%
$\alpha_4^{low}\beta_1^{high}$	5.3%	25.6%
$\alpha_4^{low}\beta_1^{low}$	69.9%	80.1%

出典：報告書番号[redacted]

特に、高レベルの$\alpha_4\beta_1$（$\alpha_4\beta_1^{high}$）インテグリンを発現するメモリーT細胞のサブタイプ（α_4^+メモリー$CD4^+$ Tリンパ球全体の約70%を占める）の大半は、MLN0002との結合に対して陰性であった。反対に、低レベルのβ_1（$\alpha_4\beta_1^{low}$）インテグリンを発現するメモリー$CD4^+$ Tリンパ球のサブタイプ（α_4^+ メモリー$CD4^+$ Tリンパ球全体の約30%を占める）は、MLN0002に結合し、その大部分が$\alpha_4\beta_7^{high}$ Tリンパ球で構成されていた。メモリー$CD8^+$ Tリンパ球に関

しても、類似した相関がみられた。$\alpha_4\beta_1^{low}$ 表現型を有するメモリーCD8$^+$ T リンパ球のサブタイプ（メモリーCD8$^+$ リンパ球全体の約 25%を占める）では $\alpha_4\beta_7^{high}$ 細胞が豊富に存在した。すべてのメモリーCD8$^+$ T リンパ球は $\alpha_4\beta_1$ インテグリンを発現したが、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現したのは全体の約 30%～40%であった。

これらの結果は、*in vivo* において、$\alpha_4\beta_1$ 又は $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンのいずれか一方しか発現しないヒト白血球のサブタイプが存在することを示しており、$\alpha_4\beta_7$ インテグリン特異的拮抗薬である MLN0002 は、$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンに対して結合性を示す natalizumab の標的とする白血球の集団よりも小さいことを表している[5] [6]。このように標的とする細胞の範囲が狭いことが、MLN0002 の腸管選択的な薬理学的プロファイルを示す要因であると考えられる。

2.6.2.2.7 MLN0002 は *in vitro* でヒト末梢血で高レベルの $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現する Th17 細胞サブタイプに結合する

：添付資料番号 4.2.1.1-14（参考）

通常の Th17 細胞は、ヘルパーT（Th）リンパ球のサブタイプを構成し、UC 及び CD などの多くの自己免疫疾患における炎症を増幅させるサイトカイン（IL-17A 及び IL-17F）を産生する[27]。IL-17A 及び IL-17F は、UC 又は CD 患者の炎症粘膜では豊富に存在することから、慢性炎症の実験モデルにおいて抗 IL-17 をターゲットとした治療薬を投与することで、疾患改善効果をもたらすことが可能になる。これは、UC 又は CD 患者での潜在的な有用性を示唆している[27]。

$\alpha_4\beta_7$ インテグリンによって血管から胃腸粘膜下層へ Th17 細胞が遊出される可能性があることから、MLN0002 が Th17 細胞に結合する作用について検討するため、健康成人の末梢血内の Th17 細胞を、蛍光標識した MLN0002 並びに抗 α_4・抗 β_7 mAb で染色し、フローサイトメトリー解析により評価した（概要表 2.6.3.2 ; 4.2.1.1-14 報告書番号[redacted]）。その結果、MLN0002 は末梢血におけるメモリーTh17 細胞集団全体の約 27%に結合した。以上のことから、MLN0002 は、ヒトの腸管において炎症を増幅させる Th17 細胞の炎症促進作用を阻害する可能性があることを示唆している。

2.6.2.2.8 MLN0002 は *in vitro* でヒト末梢血中の Treg 細胞の免疫抑制作用を阻害しない

：添付資料番号 4.2.1.1-5（参考）、-14（参考）

腸には、環境及び食物抗原に対する粘膜免疫寛容を誘導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を引き起こす免疫応答の悪化を防いでいる。そのうちの 1 つが Treg 細胞によるエフェクターT 細胞機能の抑制機構であり、エフェクター及び Treg 細胞を免疫不全マウスへ移植したところ、粘膜の免疫恒常性を維持したことからも、これらが重要な役割を果たしていることは明らかである[28]。そこで、Treg 細胞の機能不全が、ヒト炎症性腸疾患（IBD）発症の寄与因子になる可能性が考えられる。実際、Treg 細胞の欠乏は、転写活性化因子 FoxP3 の機能不全に関連すると考えられるが、侵襲性自己免疫疾患及び腸疾患に至る稀な劣性疾患である X 連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸（IPEX）症候群の主要な特徴として上げられている。しかし Treg が欠損している IPEX 症候群と腸内の炎症疾患との間には、明らかな病態の違いがみられる。その違いは、慢性化した腸管炎症が観

察されるIBD患者の粘膜においては、Treg細胞がむしろ増加しているからである[28]。そこで、ヒトTreg細胞のエフェクターター細胞抑制作用に対するMLN0002の影響を検討した。健康成人のPBMCを用いて、蛍光標識したMLN0002及び抗α_4・抗β_7 mAbで染色し、フローサイトメトリー解析により評価した（概要表2.6.3.2；4.2.1.1-14報告書番号[redacted]）。その結果、MLN0002は末梢血に存在しているTreg細胞に対して全体の約9%に結合した。また、3種類の$\alpha_4\beta_7$インテグリン拮抗薬（MLN0002、natalizumab及び抗β_7インテグリンmAb FIB504）のTreg細胞集団の抑制作用に対する影響についても同様に検討した（概要表2.6.3.2；4.2.1.1-5報告書番号RPT-01954）。対照溶媒又はアイソタイプ対照抗体と比べ、MLN0002、natalizumab及びFIB504は、精製度の高いヒト$\alpha_4\beta_7^+$ $CD4^+$ $CD25^+$ $CD127^{low}$ $FoxP3^+$ Treg細胞のエフェクターT細胞に対する分裂抑制作用に対して影響を及ぼさなかった。これらのデータは、MLN0002がヒトTregの細胞活性に影響を及ぼさないことを示唆している。

2.6.2.2.2.9 *in vitro* でのヒトメモリーCD4 Tリンパ球における$\alpha_4\beta_7$インテグリン機能の回復性

：添付資料番号4.2.1.1-15（参考）

MLN0002を除去すると、その薬力学的作用に回復性があることが非臨床試験において観察された（2.6.6.3；4.2.3.2-5報告書番号[redacted]及び4.2.3.2-6報告書番号[redacted]）。回復性の機序について、ヒト全血から精製したメモリーCD4 Tリンパ球を用いて検討した（概要表2.6.3.2；4.2.1.1-15報告書番号RPT-01436）。フローサイトメトリー解析により評価したところ、MLN0002が結合すると、MLN0002/$\alpha_4\beta_7$複合体は完全に内在化され、$\alpha_4\beta_7$インテグリンの細胞外発現は完全に阻害された。この内在化は4時間以内に始まり、24時間経過するまで継続した。実験系からMLN0002を除去すると、$\alpha_4\beta_7$インテグリンが24時間以内に細胞表面に再び発現し（$\alpha_4\beta_7$インテグリン陽性細胞の50%～58%）、4日以内に、ほぼ曝露前レベルに完全に再構築された状態となった（90%）。再構築された$\alpha_4\beta_7$インテグリンは、MAdCAM-1と結合する機能を有していた。これらのデータは、MLN0002によって阻害された細胞の薬理学的活性は、MLN0002の除去後24時間以内には部分的に回復し、4日以内でほぼ完全に回復することを示唆している。

2.6.2.2.2.10 MLN0002は、ウサギ、サル及びヒト由来の全血白血球に対しては同程度の結合親和性を示すが、マウス、ラット又はモルモット由来の全血白血球に対しては結合親和性は示さない

：添付資料番号4.2.1.1-16（評価）、-17（評価）、-18（評価）、-19（参考）、-20（参考）、-21（参考）

MLN0002及びAct-1で染色したマウス、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用いて、MLN0002の種間の交差反応性を評価した。MLN0002及びAct-1の$\alpha_4\beta_7$インテグリンに対する結合は、飽和及び競合的な結合試験として、フローサイトメトリー解析によって定量した（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及び4.2.1.1-19報告書番号RPT-01337）。これらの試験成績から、MLN0002が、ウサギ、カニクイザル、アカゲザル及びヒト全血中の$\alpha_4\beta_7$インテグリンに対して同程度のナノモル以下

の濃度で結合することを示した（表 2.6.2.2-6）。MLN0002 及び Act-1 は、いずれも、マウス、ラット又はモルモット全血中に発現した $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに結合しなかった（4.2.1.1-16 報告書番号 RPT-00709）。これらの試験成績から、ウサギ並びにアカゲザル及びカニクイザルが、MLN0002 に対して薬理学的に反応性が高い動物種であることが判明した。

表 2.6.2.2-6 ウサギ、サル及びヒトの $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する MLN0002 の結合親和性

動物種	報告書番号	B リンパ球				メモリーCD4 T リンパ球			
		EC_{50}		IC_{50}		EC_{50}		IC_{50}	
		μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM
New Zealand white ウサギ	RPT-01101 Amendment 1	0.03	0.21	0.04	0.26	0.02	0.13	0.06	0.42
アカゲザル	RPT-01337	ND	ND	ND	ND	0.03	0.19	0.01	0.08
カニクイザル	RPT-01052	0.06	0.37	0.06	0.39	0.06	0.39	0.06	0.37
	RPT-01337	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	0.09
ヒト	RPT-01052	0.06	0.4	0.06	0.4	0.05	0.33	0.06	0.37
	RPT-01101 Amendment 1	0.06	0.41	0.05	0.34	0.05	0.31	0.07	0.47
	RPT-01337	ND	ND	ND	ND	0.02	0.14	0.01	0.06

EC_{50} = 最大染色の 50%を生じさせた標識抗体濃度；IC_{50} = EC_{50} で使用された標識抗体の結合を 50%阻害する抗体濃度；ND = 実施せず

初期の試験では、MLN0002（製造法 A）がヒト及びカニクイザルの T 細胞表面の $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対して同程度の結合親和性を有することが示された（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-20 報告書番号[redacted]）。ヒト B リンパ球及びメモリーCD4 T リンパ球表面の $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する Act-1、MLN0002（製造法 A）及び MLN0002（製造法 B）の結合親和性は、極めて類似していることが示された（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-21 報告書番号[redacted]）。

2.6.2.2.3 *in vivo* PD 試験

MLN0002 は、*in vivo* において腸管選択的な抗炎症性薬理作用を示した（表 2.6.2.2-7）。すなわち、主に $\alpha_4\beta_7$ インテグリンによって引き起こされるサル大腸炎モデルにおいて、Act-1 モノクローナル抗体の有効性が観察された。さらに、これらのデータは、UC 及び CD 患者において MLN0002 を用いた場合の臨床的有効性と、CD 患者において natalizumab を用いた場合の臨床的有効性を示すデータと類似していた[8] [9] [29]。一方、MLN0002 は、CNS の免疫監視機構に影響を及ぼさないことから、EAE には作用しなかった。また、皮膚曝露に対する全身性 T 細胞依存性抗体産生（TDAR）の一次応答の阻害並びに骨髄に対する影響はみられなかった。臨床試験においても類似した成績が観察され、MLN0002 は、血管内の $CD34^+$ 造血前駆細胞のレベルを上昇させなかった（5.3.3.1-1 総括報告書 C13009）。MLN0002 は、血管内の白血球の比較的小さな集団（主に白血球集団全体の約 1%を構成する $\alpha_4\beta_7^{high}$ 腸管ホーミングメモリーT 細胞集団）の増加を誘導する[30]。したがって、腸管ホーミング T 細胞集団が 3～4 倍増加しても、当該細胞集団は白血球の小さなサブタイプに過ぎず、白血球総数に影響を与えるものではない。ゆえに、MLN0002 によって影響を受ける白血球の範囲が限定されることが、*in vivo* における腸管選択的な薬力学的作用を示す主な要因と考えている。

表 2.6.2.2-7　MLN0002 の *in vivo* 特性

ワタボウシタマリンの自然発症大腸炎	大腸炎の緩和 [a]
アカゲザルの EAE	影響は検出されず
サルの全身性 T 細胞依存性免疫応答	影響は検出されず
サルの血管中白血球区画	白血球全体の中の限定された亜集団（約 1%）

出典：4.2.1.1-22 Hesterberg 1996 並びに 4.2.1.1-23 報告書番号 RPT-01673 Amendment 1 及び 4.2.3.7.2-2 報告書番号[redacted]
EAE = 実験的自己免疫性脳脊髄炎
a　試験では、MLN0002 の先行相同体である Act-1 マウス mAb を用いた。

2.6.2.2.3.1 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを阻害すると、大腸炎を自然発症したサルの消化管で抗炎症作用を惹起する

：添付資料番号 4.2.1.1-22（参考）

炎症性腸疾患（IBD）の動物モデルにおける $\alpha_4\beta_7$ インテグリン阻害の潜在的な有効性を評価するため、慢性大腸炎を自然発症するワタボウシタマリン（*Saguinus oedipus*）における MLN0002 の先行相同体であるマウス抗体の Act-1 の作用を調べた（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-22 報告書番号 Hesterberg 1996）。大腸炎を自然発症したワタボウシタマリンには、ヒトにおける潰瘍性大腸炎において認められるものと類似した病理所見及び症状が認められる。試験のために選択した 8 匹のサルは、試験組入れ前の粘膜生検、身体的外見及び持続性下痢に基づく評価により、自然発症した慢性大腸炎を確認した。4 匹のサルに、Act-1 又は非特異性マウス IgG1 抗体のいずれかを投与した（2.0 mg/kg を 8 日間連続；初回のみ静脈内投与で、2 回目以降は筋肉内（IM）投与）。Act-1 投与群では、3 日目までにすべてのサルで下痢の寛解がもたらされ、試験終了日（20 日目）まで、すなわち、Act-1 の最終投与から 12 日間作用が持続した（図 2.6.2.2-6）。5 日目の大腸粘膜生検により、Act-1 が大腸の粘膜固有層内の $\alpha_4\beta_7$ インテグリン陽性リンパ球に局在することが明らかになった（図 2.6.2.2-7B）。投与前の粘膜生検と比較すると、Act-1 は、炎症活性（腸粘膜固有層の白血球浸潤）を低減させ（図 2.6.2.2-8）、5 日目までに認められた病理的な退行性変化と関連していた（図 2.6.2.2-7A 及び図 2.6.2.2-7B）。さらに、免疫組織学的に調製した生検組織を形態計測解析した結果、5～20 日目において、粘膜中における $\alpha_4\beta_7$ インテグリン陽性リンパ球並びに $\alpha_4\beta_7$ インテグリン陰性好中球及びマクロファージの密度が明らかに低下した（表 2.6.2.2-8）。一方、対照動物ではいずれにおいても、症状又は免疫組織学的な改善はみられなかった。すなわち、$\alpha_4\beta_7$ インテグリン阻害は IBD の霊長類モデルにおいて有効であることを示している。

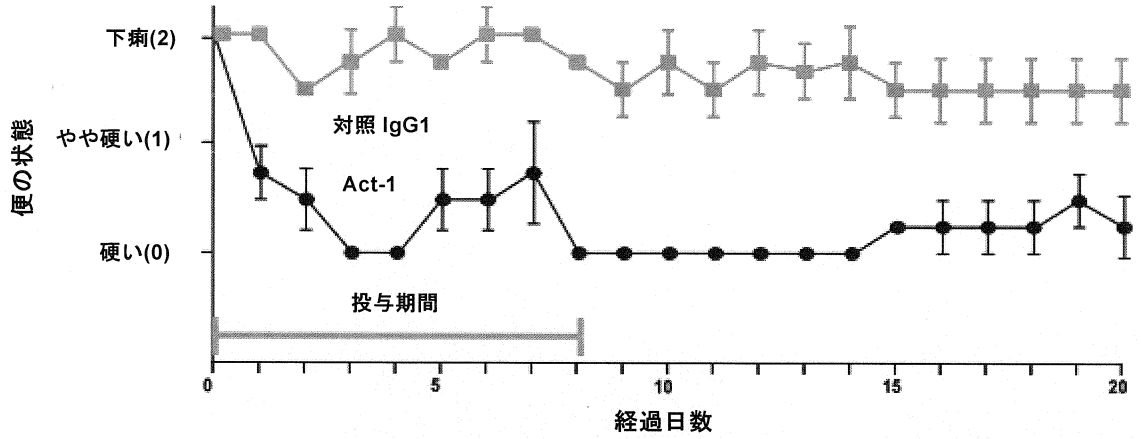


図 2.6.2.2-6　Act-1 投与による慢性大腸炎ワタボウシタマリンの便状態の改善

出典：Hesterberg 1996
慢性大腸炎発症ワタボウシタマリンにおける Act-1（●）、又は非特異性 mAb（■）の便の状態に対する治療効果。サルに、0～8 日にかけて毎日 mAb を投与した。便の状態の改善は、Act-1 mAb を用いた免疫療法中及び免疫療法後に認められたが、非特異性 mAb を投与した対照群で認められなかった。治療群内の動物から得た便の状態のスコアは、平均値 ± 1 SEM（平均値の標準誤差）で表記。

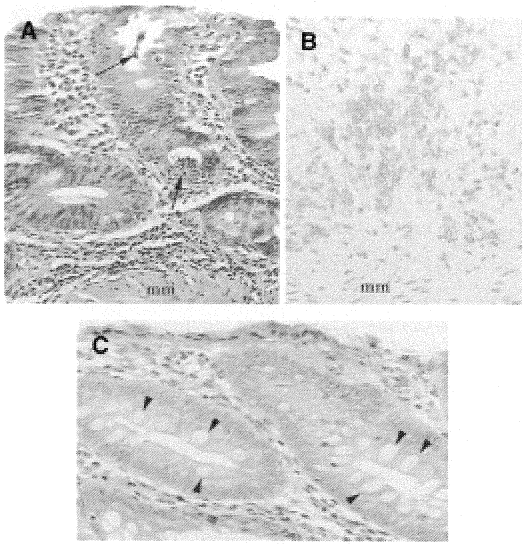


図 2.6.2.2-7　Act-1 を投与したワタボウシタマリンにおける胃腸粘膜の肉眼的変化

出典：Hesterberg 1996
（A）投与前：内皮コンパートメント及び陰窩内腔（矢印）内での膿性滲出液、並びに完全分化杯細胞の欠失を特徴とする内皮未成熟がみられる。粘膜固有層は、単核細胞の膿性炎症性浸潤によって拡張されている（Monkey Sgo 326-84; mm, 粘膜筋板）（観察倍率 540 倍）。（B）Act-1 投与後：免疫組織化学法を用いることで、Act-1 が粘膜固有層内の単核細胞の膜に局在していることが判明（Sgo 17-85; mm, 粘膜筋板）（観察倍率 700 倍）。（C）炎症浸潤の好中球コンポーネントは消散し、完全に分化した杯細胞（矢印）が観察され、粘膜固有層にはもはや単核細胞及び／又は好中球による拡張はみられない（Sgo 326-84; 観察倍率 650 倍）。

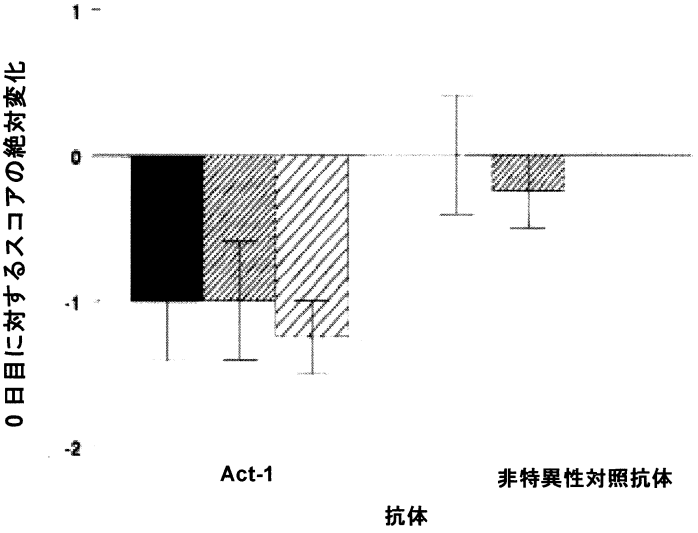


図 2.6.2.2-8　Act-1 投与による慢性大腸炎ワタボウシタマリンの胃腸における炎症性浸潤軽減

出典：Hesterberg 1996.
Act-1 又は非特異性対照抗体を投与した慢性大腸炎のワタボウシタマリンにおける Act-1 免疫療法の大腸炎症活性に対する治療効果の解析。各バーは、炎症性活性スコアにおける絶対変化の（投与群内）平均値 ± 1 SEM（平均値の標準誤差）を示す。当該値は、各動物に対して、5 日目（黒色のバー）、10 日目（薄い斜線のバー）及び 20 日目（濃い斜線のバー）でのスコアを 0 日目のスコアと比較することで計算した。20 日目、非特異性対照抗体群に対する炎症性スコアには変化がなかった。Act-1 群のすべてのタイムポイントでの炎症性活性の平均生スコアは、0 日目の同じ動物のスコアよりも統計学的に有意に低かった（5 日目及び 10 日目、$p < 0.05$；20 日目、$p < 0.01$）。

表 2.6.2.2-8　投与前レベルに対する炎症性細胞密度の減少率（%）

経過日数	β_7^+細胞	T 細胞	B 細胞	好中球	単球／マクロファージ
5	30.1	49.6[a]	46.9[a]	17	29.7[a]
10	31.6[a]	24.1[a]	17.9	42.5[a]	41.5[a]
20	40.2[a]	3.6	38.7[a]	38.9[a]	41.5[a]

出典：Hesterberg 1996
a: $p < 0.05$.

ワタボウシタマリンへの Act-1 投与は、総じて ≥ 10 μg/mL の血清中濃度をもたらし、2～10 日目（当該パラメータに対する最終評価日）までリンパ球の $\alpha_4\beta_7$ インテグリンサブユニットを飽和させた。以上のことは、病理所見及び症状の改善は $\alpha_4\beta_7$ インテグリン阻害に起因することを実証している。

2.6.2.2.3.2 MLN0002 は、EAE を発症させたアカゲザルの中枢神経系の免疫監視機構及び炎症に影響を及ぼさない

：添付資料番号 4.2.1.1-3（参考）、-23（参考）

CNS の免疫監視機構は、脳を感染症から防護し、恒常性を維持する機構である一方で、EAE 及び MS などの自己免疫疾患に至る病原性炎症を惹起する場合もある。リンパ球が後毛細血管細静脈を通り抜けることにより脈絡叢の軟膜及び脳室腔の脳脊髄液（CSF）への遊出は、$\alpha_4\beta_1$ インテグリンの VCAM-1 への結合によって引き起こされる[11] [12] [18] [31]。$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンに対する二重拮抗薬である natalizumab は、$\alpha_4\beta_1$ インテグリンに対する拮抗作用により脳実質への白血球遊走を低減し、プラーク形成を抑制することにより、ラット及び

モルモットにおけるEAEの病態の進行を阻止する報告がみられる[5] [6] [32] [33]。さらに、同じ作用機序によって、MS患者における臨床症状の悪化頻度に対しても低減する有効性を示している[5] [6]。そこで、他のインテグリン拮抗薬とMLN0002との比較の観点から、MLN0002による$\alpha_4\beta_7$インテグリンに対する特異的阻害がEAEの非臨床モデルにおけるCNSの免疫監視機構及び炎症に影響を及ぼすか否かについて評価した（概要表2.6.3.2；4.2.1.1-23報告書番号RPT-01673 Amendment 1）[10]。このモデルでは、外因性MOGの皮下（SC）投与によってTリンパ球を初回免疫することによって、自己免疫応答が誘導される[34]。これらの初回免疫によって誘導された病原性メモリーTリンパ球は、続いてMOGが存在するかどうか他の器官及び組織を監視し、大脳皮質のオリゴデンドロサイトによる内因性MOG発現に遭遇すると、これらの細胞を破壊し脱髄性病変を引き起こす病原性炎症反応が誘導される[33] [34] [35] [36]。

アカゲザルは陽性対照natalizumab及び被験物質MLN0002の両方が薬理学的に反応し、またEAEモデルが確立されている唯一の動物種であるため、本実験に使用した（概要表2.6.3.2；4.2.1.1.19報告書番号RPT-01337）[34]。MLN0002は、アカゲザル及びヒトのメモリーTリンパ球と同程度の親和性で結合する（それぞれに対し、最大染色の50%を生じさせた標識抗体濃度 [EC_{50}] は27.6及び21.3 ng/mL、50%阻害濃度 [IC_{50}]は12.2及び8.4 ng/mLであった）。一方、natalizumabも、アカゲザル及びヒトのメモリーTリンパ球と同程度の親和性で結合する（それぞれに対し、EC_{50}は18.6及び11.4 ng/mL、IC_{50}は70.4及び37.2 ng/mL）。さらに、アカゲザルの場合、$\alpha_4\beta_7$インテグリンの発現プロファイルもヒトのプロファイルと類似している[37]。

以下に示した項目を観察することでMLN0002がアカゲザルEAEモデルのCNSの免疫監視機構に影響を及ぼすか否かについて溶媒対照と比較し評価した。

1) EAEの症状
2) 脳の病変量（磁気共鳴撮像 [MRI] によって評価）
3) 脳の炎症及び脱髄（組織学によって評価）
4) CSFにおける白血球の頻度及び比率

皮下注射により自己抗原MOGで免疫することで、各サルにEAEを誘導した。対照溶媒（n = 8）、陽性対照抗体natalizumab（n = 7）又はMLN0002（n = 7）を週1回持続静注した。natalizumab及びMLN0002は、サルに投与したヒト化IgGに対して従来と同様のPKプロファイルを示した。対照溶媒と比べ、natalizumab又はMLN0002投与後、各動物で大量の曝露が達成された。natalizumab群の動物7匹中6匹のnatalizumabトラフ濃度は、*in vitro*におけるα_4インテグリンの飽和に対するEC_{50}（18.6 ng/mL）を上回った（図2.6.2.2-9A）。MLN0002に曝露させた7匹のすべての動物のMLN0002トラフ濃度は7～21日目の間で*in vitro*でおける$\alpha_4\beta_7$インテグリンの飽和に対するEC_{50}（27.6 ng/mL）を上回った（図2.6.2.2-9B）。試験を通じ、natalizumabよりもMLN0002において総じて高い曝露量が達成された（図2.6.2.2-9A及び図2.6.2.2-9B）。14日目に、PAHAが7匹すべてのサルで観察され、21日目及び26日目においてnatalizumabに対する曝露量の減少が観察された（図2.6.2.2-9A及び図2.6.2.2-9C）。MLN0002を投与したサル7匹中6匹は、14日目にPAHA抗体反応が現れたが（図2.6.2.2-9D）、当該抗体反応に対応する曝露量の減少は観察されなかった（図2.6.2.2-9B）。PAHAは、動物7匹中2匹に

おいて、natalizumab の PD に対して中和作用をもたらし、14～21 日目に、α_4 インテグリンへの natalizumab の結合率を低下させた（図 2.6.2.2-9E ; $CD3^+CD4^+CD45RA^-$細胞は代表的サンプルとして提示）。PAHA は、MLN0002 の PD に対しては中和作用をもたらすことなく、試験期間中、すべての動物において $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの飽和状態が持続した（図 2.6.2.2-9F）。

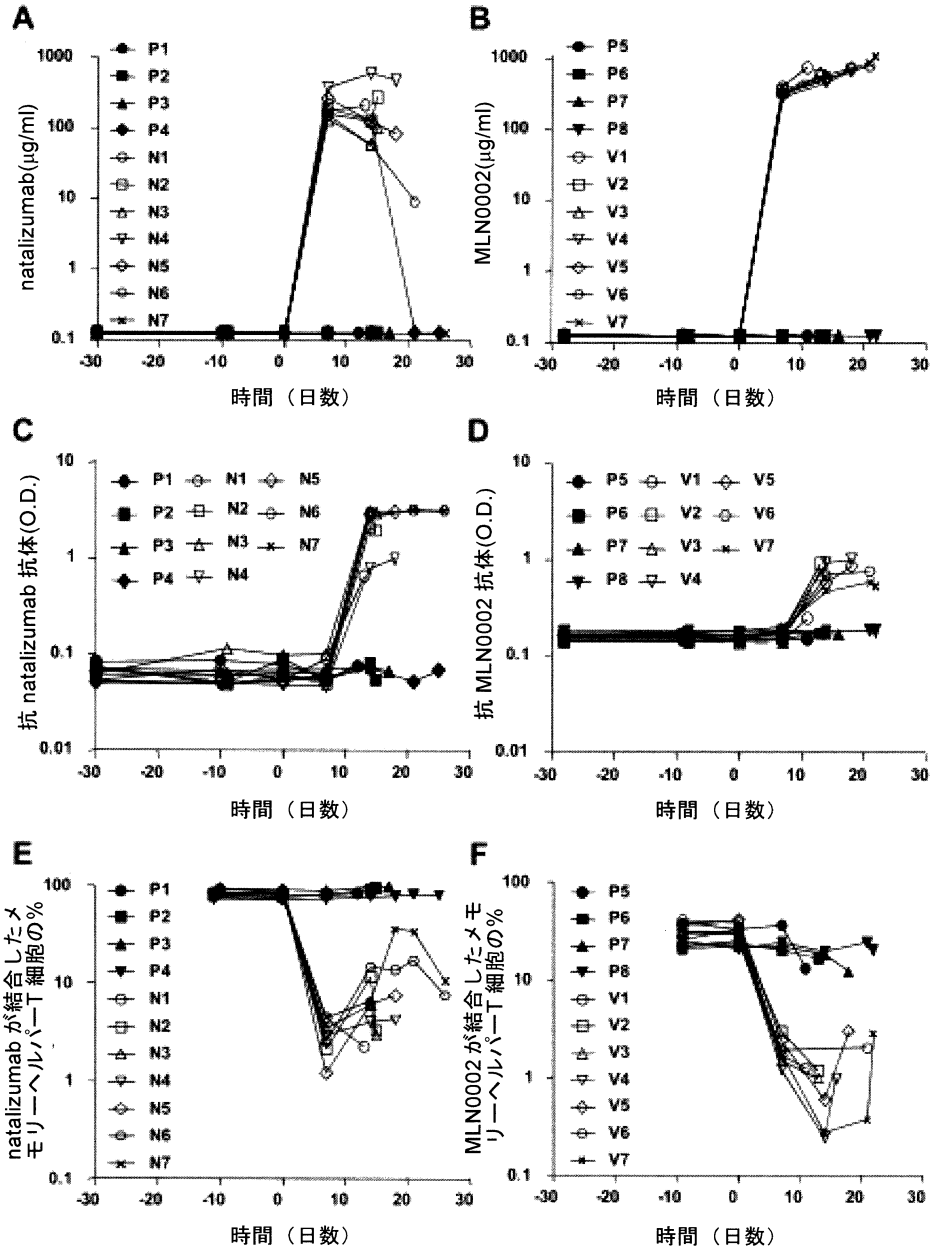


図 2.6.2.2-9　アカゲザルにおける natalizumab 及び MLN0002 の PK、免疫原性及び PD

出典：報告書番号 RPT-01673 Amendment 1, Haanstra 2013[10]
黒塗りの記号は溶媒対照動物（P1-P8）を示し、白抜きの記号は natalizumab（N1-N7）又は MLN0002（V1-V7）のいずれかを 30 mg/kg の用量で週 1 回持続静注した動物を示す。いずれかの mAb の投与前（-30 日目、-10 日目及び 0 日目）並びに投与中（7～26 日目）における、個々の動物の血清中の natalizumab（A）及び MLN0002（B）トラフ濃度。C, D）いずれかの mAb 投与前（-30 日目、-10 日目及び 0 日目）及び投与後（7～26 日目）での個々の動物の血清中の霊長類（サル）の抗ヒト抗体（PAHA）濃度。E）投与前（-11 日目～0 日目）及び natalizumab トラフ濃度時点で（7～26 日目）、個々の動物からの末梢血のメモリーヘルパー（$CD4^+/CD45RA^-$）T リンパ球によって発現された α_4 インテグリンへの外因性 natalizumab の結合率。F）投与前（-11～0 日目）及び natalizumab トラフ濃度時（7～26 日目）、個々の動物からの末梢血の $\alpha_4\beta_7^+$メモリーヘルパーT リンパ球によって発現された $\alpha_4\beta_7^+$インテグリンへの MLN0002 の結合率。

MOG に対する免疫応答をモニターし、α_4 インテグリンを拮抗阻害することで、皮下注射による抗原曝露部位から排除された抗原が流れ込む二次リンパ器官において病原性細胞の増殖を阻止するか否かを判断した。MOG での免疫前、免疫後は週 1 回、及び剖検時に末梢血を採取した。メモリーT リンパ球の抗 MOG 増殖性応答を末梢血では週 1 回、脾臓では剖検時にモニターした（図 2.6.2.2-10A）。各動物からの脾臓細胞及び PBMC で、抗 MOG 増殖性応答が観察された。溶媒投与群（対照群）、natalizumab 群及び本剤群の各群平均値は同程度であった。さらに重要なこととして、剖検時に最も弱い抗 MOG 増殖性応答を示した 2 匹の動物が EAE を発症していた。

剖検時、各動物の血清中に MOG に対する TDAR も検出された（図 2.6.2.2-10B）。対照群、natalizumab 群及び本剤群における抗 MOG IgG レベルの平均値も同程度であった。ここでもまた、最も弱い抗 MOG IgG 応答を示した動物がみられたが、いずれも EAE の症状が観察された。

これらのデータは、natalizumab 及び MLN0002 が、病原性細胞の誘導に影響を及ぼさないことを示している。また、二次リンパ器官及び体循環において EAE を誘導するために十分な数の抗 MOG リンパ球が存在していた。

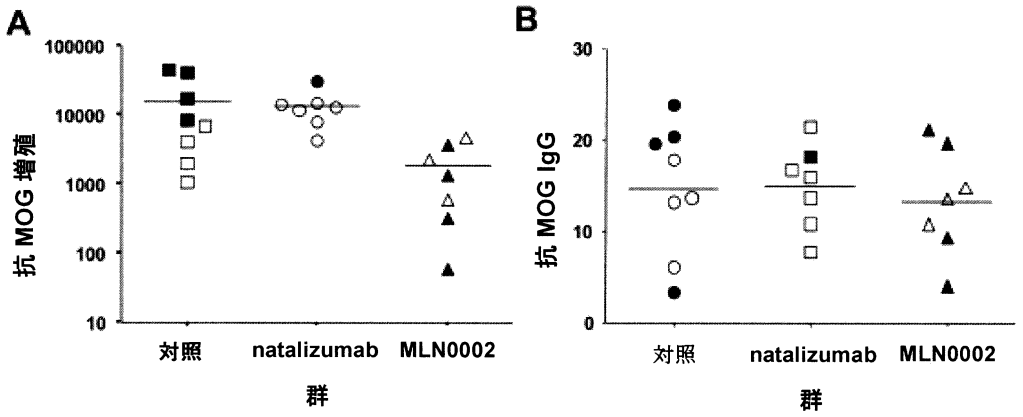


図 2.6.2.2-10　*in vivo* での natalizumab 又は MLN0002 への曝露がミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白に対する免疫応答に与える影響

出典：報告書番号 RPT-01673 Amendment 1, Haanstra 2013[10]
in vivo における natalizumab 又は MLN0002 への曝露は、MOG に対する免疫応答に影響を及ぼさなかった。白抜きの記号は、剖検前に EAE の臨床徴候を示さなかった個々の動物に値を示し、黒塗りの記号は、剖検前に EAE の臨床徴候を示していた個々の動物の値を示す。水平線は群平均値を示す。MOG *ex vivo* でパルスした各動物からの脾臓細胞の増殖性応答（A）。増殖は、動物に対する刺激培地の総計数率（cpm）から、未刺激培地におけるバックグラウンド計数率を差し引いて算出した。*in vivo* における MOG 免疫グロブリン（Ig）G に対する免疫応答（B）。血清中の MOG IgG に対する免疫応答は、剖検時の光学濃度値を MOG 曝露前値で除算することで算出した。

MLN0002 は EAE の症状に影響を及ぼさなかった

この試験では、溶媒投与動物の 50%（8 匹中 4 匹）及び MLN0002 投与動物の 57%（7 匹中 4 匹）が、各群ほぼ同じ時間経過時点で EAE の症状が観察された。これは、動物の 14%（7 匹中 1 匹）が EAE の症状がみられた natalizumab 陽性対照群とは対照的であることを示している（この 1 匹の動物（N2）は 14 日目時点で(図 2.6.2.2-9E)、中和作用を有する PAHA 産生

のエビデンスを有していた）。さらに、本剤群における症状の発生頻度は、対照群で観察されるものと類似していた。これは、MLN0002 が EAE の発症に影響を及ぼさないことを示している。

MLN0002 は脳の免疫監視機構に影響を及ぼさなかった

EAE の症状は、自己反応性 T リンパ球によって誘導される脳での炎症及び脱髄性病変に起因している[31] [34]。これらの病理学的変化は、投与割付について知らされていない（ブラインド条件下）医療用画像情報専門技師が、死後にホルマリン固定脳半球に MRI を施行しスコア化した。従来型 T2 強調・T2 緩和時間定量測定（T2-weighted quantitative T2 relaxation time）イメージマップ及び磁化移動率（MTR）イメージマップを利用して、大脳白質病変を計測し、スコアが高い程、病変頻度が多く EAE が重度、すなわち、CNS の免疫監視機構が正常に機能しているように数値で表した。脳半球における病変量の平均値は、対照群及び MLN0002 群において類似していた（図 2.6.2.2-11）。それとは対照的に、natalizumab 群の平均値は、対照群に対する平均値よりも有意（$p < 0.05$）に低かった（図 2.6.2.2-11）。natalizumab を投与した動物における白質病変の頻度の低下は、MS 患者での T2 高信号病変に対する natalizumab の作用と一致している[38] [39]。以上のことから、炎症からもたらされる脳白質病変の放射分析は、MLN0002 は CNS の免疫監視機構に影響しないというコンセプトを支持している。

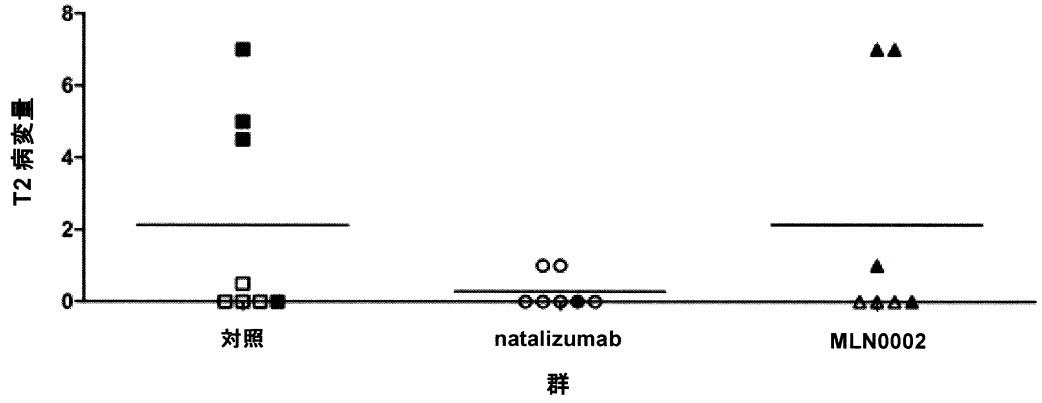


図 2.6.2.2-11　MLN0002 の大脳白質病変の形成への影響作用

出典：報告書番号 RPT-01673 Amendment 1, Haanstra 2013[10]
白質病変の存在（T2 病変量スコア）を、0（白質構造に病変がない）と 10（白質構造全体が病変の影響を受けている）の間で定量的に等級付けした。白抜きの記号は、剖検前に EAE の徴候を示さなかった個々の動物にスコアを示し、黒塗りの記号は、剖検前に EAE を発症していた個々の動物のスコアを示す。水平線は群平均値を示す。

MLN0002 は脳炎症及び脱髄を抑制しなかった

脳組織セクションにおける炎症及び脱髄の程度は、ブラインド条件下で解剖病理学者によってスコア化した。炎症及び脱髄の混合スコアにおいて natalizumab 群の平均値は、対照（溶媒投与）群よりも有意に低く（1.4 ± 0.4 に対して 0.1 ± 0.1；$p = 0.0098$）、一方、MLN0002 群の平均値については、対照（溶媒投与）群との間に有意差を認めなかった（図 2.6.2.2-12）。これらのデータは、natalizumab が両方の活性を阻害したが、MLN0002 は免疫による脳炎症

及び脱髄を阻止しなかった明らかな違いを示している。またこれらのデータは、natalizumabを処置したMS患者並びに一例のPML患者の死後解析でみられた同様の脳における炎症低減がみられた報告と一致している[40]。

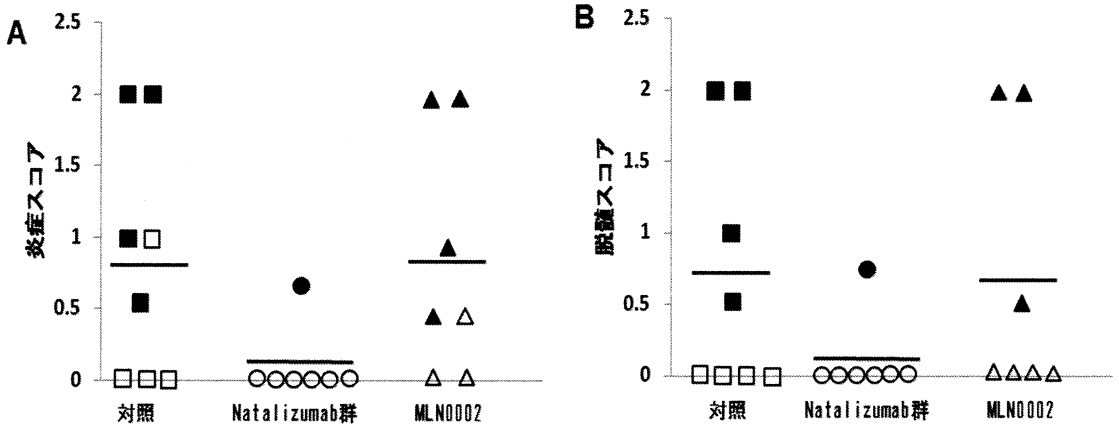


図 2.6.2.2-12　MLN0002 の脳炎症及び脱髄への影響

出典：報告書番号 RPT-01673 Amendment 1, Haanstra 2013[10]
各半球のほぼ同じ領域から切除した 3 ブロックの組織からのセクションでの脳炎症（A）及び脱髄（B）の定量（スコア）化。白抜きの記号は、剖検前に EAE の徴候を示さなかった個々の動物を示し、黒塗りの記号は、剖検前に EAE を発症していた個々の動物を示す。水平線は群平均値を示す。

MLN0002 は白血球による脳脊髄液の浸潤に影響を及ぼさなかった

CNS の免疫監視機構に起因する炎症をさらに評価するため、サルの CSF 中の白血球サブタイプを測定した。このモデルでは、CNS の免疫監視機構の機能について、EAE の発症がみられる動物を用いて CSF 中での白血球レベルの増減によって評価した。すなわち、CNS の免疫監視機構が正常な場合は、CSF 中の白血球数の増加がみられる。MLN0002 への処置前、処置後 1 週間及び 2 週間、並びに剖検時にそれぞれ CSF を採取した。その結果、対照（溶媒投与）及び MLN0002 群における CSF 中の白血球平均数は処置前のレベルと比較し、剖検時点において同程度の増加がみられた（図 2.6.2.2-13）。この増加した白血球のサブタイプは主に、B リンパ球又は NK 細胞ではなく、ヘルパーT リンパ球（$CD4^+$）、細胞傷害性 T リンパ球（$CD8^+$）及び単球であった（図 2.6.2.2-13）。それとは対照的に、natalizumab 群の CSF 中の白血球平均数は、処置前のレベルと比較して変化は確認できなかった（図 2.6.2.2-13）。したがって、natalizumab は、CSF における炎症（CNS への白血球の浸潤）を阻害するが、一方、対照及び MLN0002 は阻害しないことが判明した。すなわち、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する特異的な拮抗薬である MLN0002 は、アカゲザル EAE モデルにおいて、CNS の免疫監視機構及び炎症を阻害しなかった（表 2.6.2.2-9）。

これらのデータは、GLP 適用での健康な非ヒト霊長類（サル）を用いた 26 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3；4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]、及び健康成人を対象に MLN0002 の CSF 中のリンパ球数への影響を評価した海外臨床試験（5.3.4.1-1 総括報告書 C13012）における CSF の分析結果と一致していた。

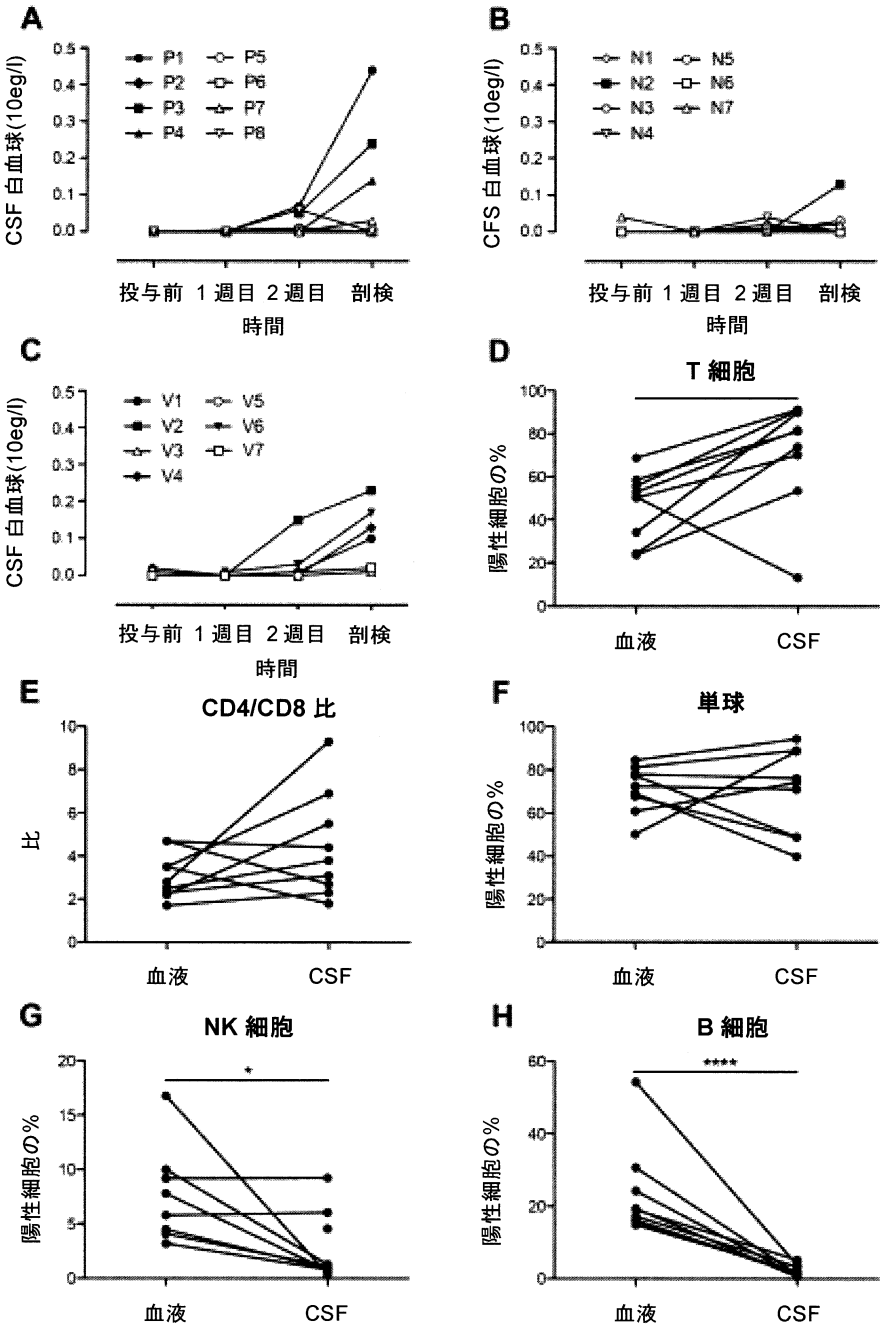


図 2.6.2.2-13　MLN0002 のサル脳脊髄液中の白血球レベルへの影響

出典：報告書番号[redacted] Haanstra 2013[10]

白血球浸潤は、EAE の CSF 症状と同時に発生した。動物には、プラセボ（A）、natalizumab（B）及び MLN0002（C）を投与した。白抜きの記号は、剖検前に EAE の徴候を示さなかった個々の動物の値を示し、黒塗りの記号は、剖検前に EAE を発症していた個々の動物の値を示す。CSF への浸潤は、T リンパ球（D）、ヘルパー及び細胞傷害性のサブタイプの両方（E）、並びに単球（F）で構成されたが、ナチュラルキラー（NK）細胞（G）又は B リンパ球（H）で構成されなかった。血液コンタミネーション（赤血球 [RBC] > 0.01 × 10^{12}/L）を含む CSF サンプルは、分析から除いた（サンプル総数 88 本中 11 本）。

表 2.6.2.2-9　アカゲザルの実験的自己免疫性脳脊髄炎における中枢神経系の免疫監視機構に対する MLN0002 の影響の概要

脳脊髄炎の臨床症状	阻害せず
脳炎症及び脱髄（MRI）	阻害せず
脳炎症及び脱髄（組織病理学）	阻害せず
脳脊髄液への白血球浸潤	阻害せず

出典：報告書番号 RPT-01673 Amendment 1
MRI = 磁気共鳴撮像

2.6.2.3 副次的薬理試験

：添付資料番号 4.2.1.2-1（参考）

リンパ球は、血管と末梢組織との間を再循環する。リンパ球は、血管から遊出し、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に戻る。インテグリン拮抗薬を用いて、リンパ球の血管系への戻りを阻害せずに、血管からの遊出を阻害すると、リンパ球が血管に蓄積される[41]。$\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現する白血球サブタイプは、$\alpha_4\beta_1$ インテグリンを発現するサブタイプよりも小さい（2.6.2.2.2.6）。したがって、$\alpha_4\beta_7$ インテグリン阻害による副次的な PD 作用は、$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリン二重阻害作用よりも小さい。アカゲザルの EAE 試験では、natalizumab による $\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリン二重阻害は、これらの動物の末梢血において、白血球数の有意な上昇をもたらした（$p < 0.05$）（図 2.6.2.3-1）（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-23 報告書番号 RPT-01673 Amendment 1）[10]。この末梢血における白血球増加は、T リンパ球総数・メモリーヘルパーT リンパ球総数・メモリー細胞傷害性 T リンパ球総数及び B リンパ球総数を含む、単球・好酸球及びリンパ球の有意な上昇で構成された（$p < 0.05$）。一方で、好中球数は変わらなかった（図 2.6.2.3-1）。これは、これらの白血球が α_4 インテグリンを発現しないことと一致している（概要表 2.6.3.2；4.2.1.1-3 報告書番号[redacted] [15] [16] [37]。白血球増加の範囲は、$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンをブロックすると白血球総数の 60%以上が影響を受けるが、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンを特異的にブロックすることによって影響を受ける白血球の亜集団は極めて小さいことを示す。
natalizumab と同程度の MLN0002 をアカゲザルに曝露しても、これらの白血球サブタイプの数には影響を及ぼさなかった（図 2.6.2.3-1）。カニクイザルからも類似したデータがみられており[32]、同様の相違点は臨床試験でも観察されている。すなわち、natalizumab は、CD 患者において、白血球増加、リンパ球増加、単球増加、好塩基球増加及び好酸球増加を誘導したが[5] [6]、MLN0002 は、UC 又は CD 患者の末梢血中でのこれらの細胞数に影響を及ぼさなかった[8] [9]。

MLN0002 は、メモリーT 細胞の腸管ホーミング（$\alpha_4\beta_7^{high}$）サブタイプの血中レベルを上昇させたが、それは末梢血白血球全体の約 1%であった[32]。これらのデータは、MLN0002 の PD 作用の範囲が $\alpha_4\beta_1$ インテグリン及び $\alpha_4\beta_7$ インテグリン二重拮抗薬で引き起こされる PD 作用の範囲の約 60 分の 1 であることを示す。これらのデータは、MLN0002 が、$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンに対する二重拮抗薬ほど広範囲に末梢組織の免疫監視機構を抑制するものではないことを意味している。

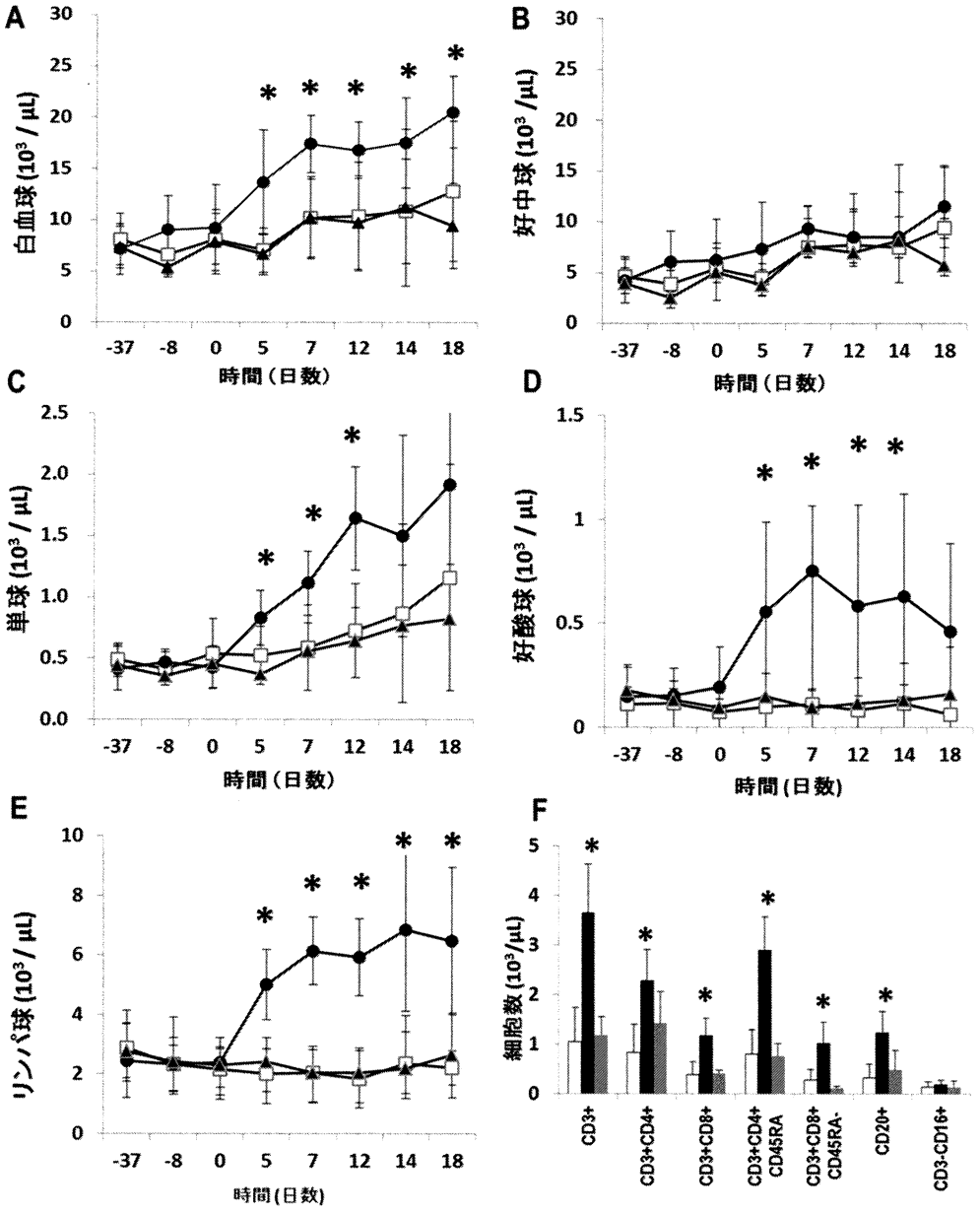


図 2.6.2.3-1　MLN0002 の選択的な副次的薬力学的作用

出典：報告書番号 RPT-01673 Amendment 1

動物に、溶媒対照（□）、natalizumab30 mg/kg（●）又は MLN0002 30 mg/kg（▲）を週 1 回 3 週間にわたり投与した。natalizumab への曝露は、曝露前ベースライン（-37 日目～-8 日目）及びタイムポイントが同じ溶媒対照と比較し、曝露後（5～18 日目）の白血球（A）絶対数を増加させたが、MLN0002 は増加させなかった。いずれの mAb に対しても好中球数（B）での有意な変化は観察されなかった。natalizumab は、5 日間曝露後に、ベースライン及びタイムポイントが同じ溶媒対照と比較し、単球（C）、好酸球（D）及びリンパ球（E）の絶対数を有意に増加させたが、MLN0002 は増加させなかった。natalizumab（黒色のバー）は、溶媒対照（白色のバー）と比較し、12 日間曝露後、T リンパ球（$CD3^+$）、ヘルパーT リンパ球（$CD3^+CD4^+$）、細胞傷害性 T リンパ球（$CD3^+CD8^+$）、メモリーヘルパーT リンパ球（$CD3^+CD4^+CD45RA$）、メモリー制帽傷害性 T リンパ球（$CD3^+CD8^+CD45RA^-$）、B リンパ球（$CD20^+$）の総数レベルを上昇させたが、MLN0002（灰色のバー）は増加させなかった。さらに、いずれもナチュラルキラー（NK）細胞（$CD3^-CD16^+$）のレベルを上昇させなかった。算出レベル = リンパ球絶対数 × リンパ球ゲート率。数値はすべて、各群に対する平均値及び標準偏差を示す。*印は、当日の溶媒対照に対して統計学的に有意な差（$p < 0.05$）があったことを示す。

2.6.2.4 安全性薬理試験

日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイダンス S7A「ヒト医薬品に関する安全性薬理試験ガイドライン」[42]及び S7B「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価」[43]に従い、薬理学的に適切な反応を示す動物種を用いた GLP 適用での最長 26 週間反復投与毒性試験において、消化管系、泌尿器系、呼吸器系及び中枢神経系に対する MLN0002 の機能的及び病理的な影響が、体系的かつ包括的に評価された（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]）。その結果、いずれの試験においても無毒性量（NOAEL）は、最高用量である 100 mg/kg であり、同用量において、標的である末梢リンパ球の $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する MLN0002 の結合飽和が維持された。すなわち、MLN0002 は、100 mg/kg の用量において、消化管系、泌尿器系、呼吸器系、中枢神経系及び心血管系に有害な機能的又は病理的な影響を引き起こさず、同用量における C_{max} 平均値は、ヒトに 300 mg を静脈内点滴投与した際の C_{max} の幾何平均の約 42 倍に相当した（2.6.6.3；4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]）（5.3.5.3-3 MLN0002/NDA001）。これは、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンが白血球表面においてのみ発現され、消化管系、泌尿器系、呼吸器系及び中枢神経系の実質細胞には発現しないという事実と一致するものである。

さらに、カニクイザルを用いた MLN0002 単回投与による心血管系への影響を検討する安全性薬理試験を GLP 適用で実施したが（概要表 2.6.3.4；4.2.1.3-1 報告書番号[redacted]）、本試験においても、前述の反復投与毒性試験と同様、心電図（ECG）異常は観察されなかった（2.6.6.3；4.2.3.2-5 報告書番号[redacted]及び 4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]）。

2.6.2.4.1 カニクイザルを用いた MLN0002 投与による心血管系への影響を検討する安全性薬理試験

：添付資料番号 4.2.1.3-1（評価）

ICH ガイダンス S7A[42]及び S7B[43]に従って、心血管系に対する影響を検討するため、GLP 適用試験を実施した（概要表 2.6.3.4；4.2.1.3-1 報告書番号[redacted]）。溶媒を 1 時間持続静注した 5 日後に、MLN0002（ロット番号 0002-807-G0）の 10 及び 100 mg/kg を各 4 匹の動物に 1 時間持続静注し、投与前及び投与後にテレメトリーによって心血管系データを記録した。また、一般状態変化及び摂餌量についても評価を実施した。MLN0002 は、良好な忍容性を示し、最高用量である 100 mg/kg においても、MLN0002 に関連した一般状態変化、又は、心拍数、平均動脈圧及び ECG パラメータ（定性的及び定量的）に対する影響はみられなかった。なお、100 mg/kg の用量における C_{max} 平均値（2.6.6.3；4.2.3.2-6 報告書番号[redacted]）は、ヒトに 300 mg を静脈内点滴投与した際の C_{max} 値の約 42 倍に相当する（5.3.5.3-3 MLN0002/NDA001）。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

MLN0002 はヒト化抗体であり、薬剤代謝に影響を及ぼす可能性がある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又は計画しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$インテグリンに対する特異性があるという点で、二重インテグリン拮抗薬である natalizumab[5] [6]($\alpha_4\beta$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンの両方に結合)、並びに etrolizumab[7]（$\alpha_E\beta_7$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンの両方に結合）などの他のインテグリン拮抗薬とは異なる。MLN0002 は、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とによって $\alpha_4\beta_7$インテグリンの機能を阻害するが、$\alpha_4\beta_7$インテグリンの VCAM-1 に対する接着は阻害しない。このように、選択的に阻害作用があることで、MLN0002 の薬力学的作用は、他の $\alpha_4\beta_7$インテグリン拮抗薬と異なり、$\alpha_4\beta_7$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。

MLN0002 は作動薬ではなく、サイトカインの放出は惹起しない。MLN0002 は、実際 $\alpha_4\beta_7$インテグリンを発現する Treg 細胞によるサイトカインの産生も阻害しない。さらに、MLN0002 には Fc 受容体を活性化させないので、CDC もしくは ADCC 等の標的細胞の傷害も惹起しない。この特性により、MLN0002 を除去すると、$\alpha_4\beta_7$インテグリン機能の比較的急速な再構築が可能になる。すなわち、MLN0002 が標的とする細胞の $\alpha_4\beta_7$インテグリン機能活性は、MLN0002 を完全に除去後 24 時間以内に、投与前レベルの約 50%に回復し、4 日後にはほぼ完全に回復した。

MLN0002 の主な標的細胞は、$\alpha_4\beta_7$インテグリンを高発現する白血球サブタイプである。この細胞は、腸管炎症の重要なメディエーターであり、$\alpha_4\beta_7$インテグリン機能を阻害することで、腸管に対して抗炎症活性がもたらされることが示されている。またこの機序は、霊長類においても確認されているものであり、サルに Act-1 モノクローナル抗体を投与すると、慢性大腸炎が寛解した。（4.2.1.1-22）

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が存在することから、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の遊出の阻害により、結果的に血管系内の白血球が増加する作用が、MLN0002 投与群より natalizumab 投与群で明らかに高い実験結果は、MLN0002 が白血球に及ぼす影響が natalizumab に比べはるかに少ないことを示している。また、免疫監視機構には、静脈からの白血球の漏出が必要なことから、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は、サル EAE モデルを用いて実証した。すなわち、MLN0002 は、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 の病状を抑制した。これらの結果は、健康成人を対象とした MLN0002 の海外臨床試験において、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）。

また、他のデータからも、MLN0002 の PD 作用が消化管選択的であること、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）。これらのデータは、MLN0002 が 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 適用での毒性試験データを裏づけている（2.6.6.3.5 及び 2.6.6.9.2.1）。ま

た、これらの結果は、健康成人に MLN0002 750 mg を単回投与したとき、MLN0002 の曝露は、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は影響を及ぼさない一方、経口コレラワクチンに対するセロコンバージョン率を減弱させることを示した臨床試験データと整合する（5.3.4.1-2 総括報告書 C13013）。つまり、MLN0002 は粘膜投与型ワクチンには影響を及ぼすが、筋肉内接種ワクチンには影響を及ぼさないことからも、その選択性が明確に示された（5.3.4.1-2 総括報告書 C13013）。さらに、適切な薬理学的反応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引き起こさなかった（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]）。以上、これまでの試験データから、MLN0002 が消化管以外の免疫監視機構を損ねることのない消化管選択的な薬理学的プロファイルを持つことが示された。

UC 及び CD の現行の生物学的治療薬に関連して発生する感染症は、$\alpha_4\beta_1$ インテグリンや腫瘍壊死因子 α（TNF-α）を阻害による全身性の免疫抑制に起因する。一方、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンは、消化管指向性のリンパ球に特異的に発現する標的であるため、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とすることができる。MLN0002 は、消化管選択的な抗炎症作用を示すことで、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。

2.6.2.7 参考文献

[1] 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.

[2] Butcher EC, Williams M, Youngman K, Rott L, Briskin M. Lymphocyte trafficking and regional immunity. Adv Immunol. 1999;72:209-53.

[3] Briskin MJ, McEvoy LM, Butcher EC. MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. Nature. 1993;363(6428):461-4.

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

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

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

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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.

[10] Haanstra KG, Hofman SO, Blezer EL, Wyant T, Bauer J, Fedyk ER, et al. Antagonizing the alpha4beta1 integrin, but not alpha4beta7, inhibits leukocytic infiltration of the CNS in rhesus monkey experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2013:190(5):1961-73.

[11] Von Andrian UH, Engelhardt B. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. N Engl J Med. 2003;348:68-72.

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

[13] 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.

[14] Cox D, Brennan M, Moran N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. Nat Rev Drug Discov. 2010;9(10):804-20.

[15] 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.

[16] DeNucci CC, Pagan AJ, Mitchell JS, Shimizu Y. Control of alpha4beta7 integrin expression and CD4 T cell homing by the beta1 integrin subunit. J Immunol. 2010;184(5):2458-67.

[17] Döring A, Pfeiffer F, Meier M, Dehouck B, Tauber S, Deutsch U, et al. TET inducible expression of the $\alpha_4\beta_7$-integrin ligand MAdCAM-1 on the blood-brain barrier does not influence the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. Eur J Immunol. 2011;41(3):813-21.

[18] Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. Trafficking of immune cells in the central nervous system. J Clin Invest. 2010;120(5):1368-79.

[19] Yu Y, Zhu J, Mi LZ, Walz T, Sun H, Chen J, et al. Structural specializations of alpha4beta7, an integrin that mediates rolling adhesion. J Cell Biol. 2012;196(1):131-46.

[20] Smith SL. Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. J Transpl Coord. 1996;6(3):109-19.

[21] Rituxan® (rituximab) injection for intravenous use [package insert]. South San Francisco (CA, USA): Genentech, Inc; 2016.

[22] Tidswell M, Pachynski R, Wu SW, Qiu SQ, Dunham E, Cochran N, et al. Structure-function analysis of the integrin beta 7 subunit: identification of domains involved in adhesion to MAdCAM-1. J Immunol. 1997;159(3):1497-505.

[23] 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.

[24] Brandtzaeg P, Farstad IN, Haraldsen G. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. Immunol Today. 1999;20(6):267-77.

[25] Rott LS, Briskin MJ, Butcher EC. Expression of alpha4beta7 and E-selectin ligand by circulating memory B cells: implications for targeted trafficking to mucosal and systemic sites. J Leukoc Biol. 2000;68(6):807-14.

[26] Postigo AA, Sánchez-Mateos P, Lazarovits AI, Sánchez-Madrid F, de Landázuri MO. Alpha 4 beta 7 integrin mediates B cell binding to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1. Expression and function of alpha 4 integrins on human B lymphocytes. J Immunol. 1993;151(5):2471-83.

[27] 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.

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

[29] 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(3):1912-25.

[30] Fedyk ER, Wyant T, Yang L-L, Csizmadia V, Burke K, Yang H, et al. Exclusive antagonism of the $\alpha_4\beta_7$ integrin by vedolizumab confirms the gut-selectivity of this pathway in primates. Inflamm Bowel Dis. 2012;18:2107-19.

[31] Engelhardt B, Coisne C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. Fluids Barriers CNS. 2011;8(1):4.

[32] 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.

[33] 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.

[34] 't Hart BA, Bauer J, Brok HP Amor S. Non-human primate models of experimental autoimmune encephalomyelitis: Variations on a theme. J Neuroimmunol. 2005;168:1-12.

[35] 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.

[36] 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.

[37] Pereira LE, Onlamoon N, Wang X, Wang R, Li J, Reimann KA, et al. Preliminary *in vivo* efficacy studies of a recombinant rhesus anti-alpha(4)beta(7) monoclonal antibody. Cell Immunol. 2009;259(2):165-76.

[38] Coisne C, Mao W, Engelhardt B. Cutting edge: Natalizumab blocks adhesion but not initial contact of human T cells to the blood-brain barrier *in vivo* in an animal model of multiple sclerosis. J Immunol. 2009;182(10):5909-13.

[39] Miller DH, Soon D, Fernando KT, MacManus DG, Barker GJ, Yousry TA, et al. MRI outcomes in a placebo-controlled trial of natalizumab in relapsing MS. Neurology. 2007;68(17):1390-401.

[40] del Pilar Martin M, Cravens PD, Winger R, Frohman EM, Racke MK, Eagar TN, et al. Decrease in the numbers of dendritic cells and CD4+ T cells in cerebral perivascular spaces due to natalizumab. Arch Neurol. 2008;65(12):1596-603.

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

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

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

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.3.4 安全性薬理試験 28

図

図 2.6.3.2-1 *in vitro* でのヒトメモリーCD4 T リンパ球における $\alpha_4\beta_7$ インテグリン機能の回復性 20

※2.6.3.3 は 2.6.3.2 と重複試験のため省略

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：Act-1 及び MLN0002

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付資料番号	区分
効力を裏付ける試験						
結合特異性	RPMI8866、 RAMOS 細胞及び $\alpha_E\beta_7$ L1.2 細胞トランスフェクタント	*in vitro*	Millennium	RPT-01097 Amendment 1	4.2.1.1-1	評価
$\alpha_4\beta_7$インテグリンの発現パターン	ヒト全血白血球	*in vitro*	Millennium	[redacted]	4.2.1.1-2、4.2.1.1-3	参考
T リンパ球活性化及びサイトカイン産生	ヒト全血	*in vitro*	Millennium	RPT-01140	4.2.1.1-4	参考
T リンパ球増殖	ヒト PBMC	*in vitro*	[redacted]	RPT-01954	4.2.1.1-5	参考
CDC 作用	ヒト PBMC	*in vitro*	Millennium	RPT-01139	4.2.1.1-6	参考
ADCC 作用	RPMI8866 細胞	*in vitro*	Millennium	RPT-01138	4.2.1.1-7	参考
$\alpha_4\beta_7$インテグリン-リガンド相互作用に対する拮抗阻害の選択性	RPMI8866 及び RAMOS 細胞	*in vitro*	Millennium	RPT-01098	4.2.1.1-8	参考
組織交差反応性（アッセイ条件の最適化）	カニクイザル及びヒトの組織	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1-9	参考
組織交差反応性（サル）	カニクイザルの組織	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1-10	評価
組織交差反応性（ヒト）	ヒトの組織	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1-11	評価
	ヒトの組織	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1-12	評価
	ヒトの組織	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1-13	評価
Th17 細胞及び Treg 細胞への結合	ヒト全血	*in vitro*	Millennium	[redacted]	4.2.1.1-14	参考
in vitro での $\alpha_4\beta_7$インテグリン機能の回復性	ヒト全血	*in vitro*	Millennium	RPT-01436	4.2.1.1-15	参考
異種間での $\alpha_4\beta_7$との交差反応性	マウス、ラット、モルモット、ウサギ及びカニクイザルの PBMC	*in vitro*	Millennium	RPT-00709	4.2.1.1-16	評価
結合親和性	ウサギ及びカニクイザルの全血	*in vitro*	Millennium	RPT-01101 Amendment 1	4.2.1.1-17	評価
結合親和性	カニクイザル及びヒトの PBMC	*in vitro*	Millennium	RPT-01052	4.2.1.1-18	評価
結合親和性	アカゲザル、カニクイザル及びヒトの PBMC	*in vitro*	Millennium	RPT-01337	4.2.1.1-19	参考
結合親和性	カニクイザル及びヒトの T 細胞	*in vitro*	Millennium	[redacted]	4.2.1.1-20	参考
ロット間での効力比較	ヒト B 及びメモリーCD4 T リンパ球	*in vitro*	Millennium	[redacted]	4.2.1.1-21	参考

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：Act-1 及び MLN0002

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付資料番号	区分
効力を裏付ける試験（続き）						
慢性大腸炎の非臨床モデルにおける有効性	ワタボウシタマリン	IV 及び IM	[redacted]	Hesterberg 1996	4.2.1.1-22	参考
EAE の非臨床モデルにおける CNS に対する影響	アカゲザル	IV	[redacted]	RPT-01673 Amendment 1	4.2.1.1-23	参考
MLN0002 の作用機序（MOA）	N/A；概要報告書	N/A	N/A	[redacted]	4.2.1.1-3	参考
副次的薬理試験						
EAE 試験並びに 13 週間及び 26 週間反復投与毒性試験の一環として評価 [c]						
安全性薬理試験						
心血管系への影響を検討する安全性薬理試験 [b]	カニクイザル	IV	[redacted]	[redacted]	4.2.1.3-1	評価
薬力学的薬物相互作用試験						
実施せず						

ADCC = 抗体依存性細胞傷害作用；[redacted]；CDC = 補体依存性細胞傷害作用；CNS = 中枢神経系；[redacted]；EAE = 実験的自己免疫性脳脊髄炎；IM = 筋肉内；IV = 静脈内；Millennium = Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)；N/A=該当なし；[redacted]；PBMC = 末梢血単核球。

a 概要表 2.6.7.17 を参照のこと。

b 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）に準拠。

c 概要表 2.6.7.7D 及び 2.6.7.7E を参照のこと。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

		被験物質：Alexa-647-MLN0002（製造法 B）
		実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)
		報告書番号：RPT-01097 Amendment 1
試験の種類：$\alpha_4\beta_1$-及び $\alpha_E\beta_7$ のインテグリンと対比した $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する MLN0002 の結合の選択性		
試験系	濃度	特記すべき所見
α_4 及び β_7 のインテグリンを発現するが、β_1 又は α_E のインテグリンを発現しない RPMI8866 細胞 α_4 及び β_1 のインテグリンを発現するが、β_7 又は α_E のインテグリンを発現しない RAMOS 細胞 α_E 及び β_7 のインテグリンを発現するが、α_4 又は β_1 のインテグリンを発現しない $\alpha_E\beta_7$L1.2 細胞トランスフェクタント	最高 400 μg/mL	RPMI8866 細胞は、抗 α_4 インテグリン抗体及び抗 β_7 インテグリン抗体は結合したが、抗 β_1 インテグリン抗体は結合しなかった。これは、RPMI8866 細胞が $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現するが $\alpha_4\beta_1$ インテグリンを発現しないことを示す。Alexa-647-MLN0002 は RPMI8866 細胞に結合した。この結合は 50 μg/mL Act-1 とのプレインキュベーションによって阻害された。これは、Alexa-647-MLN0002 が $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに結合することを示す。 RAMOS 細胞は、抗 α_4 インテグリン抗体及び抗 β_1 抗体は結合したが、抗 β_7 抗体は結合しなかった。これは、RAMOS 細胞が $\alpha_4\beta_1$ インテグリンを発現するが $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現しないことを示す。これらの細胞に対し、Alexa-647-MLN0002 は結合しなかった。 L1.2 細胞は、抗 α_E インテグリン抗体及び抗 β_7 インテグリン抗体は結合したが、抗 α_4 インテグリン抗体は結合しなかった。これは、L1.2 細胞が $\alpha_E\beta_7$ インテグリンを発現するが $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現しないことを示す。これらの細胞は、Alexa-647-MLN0002 は結合しなかった。 Alexa-647-MLN0002 は、-飽和濃度（5 μg/mL）で RPMI8866 細胞には結合したが、RAMOS 細胞又は $\alpha_E\beta_7$ L1.2 細胞トランスフェクタントには結合しなかった。したがって、MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対して特異的に結合し、$\alpha_4\beta_1$ インテグリン単独、$\alpha_E\beta_7$ インテグリン単独、α_4 インテグリン単独又は β_7 インテグリン単独には結合しなかった。$\alpha_4\beta_1$ 又は $\alpha_E\beta_7$ の両インテグリンと対比しての $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する結合特異性は、400 μg/mL でも維持された。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

	被験物質：Alexa-647-MLN0002（製造法 B）	
	実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)	
	報告書番号：[redacted]	
試験の種類：$\alpha_4\beta_7$インテグリンの発現パターン		
試験系：ヒト全血	濃度：最高 100 μg/mL	
特記すべき所見：白血球表面での $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの発現パターンは、$\alpha_4\beta_1$ インテグリンの発現パターンよりも制限されていた。$\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$ のインテグリンは、メモリーT リンパ球によって相反的に発現した。MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$ インテグリンに選択的に結合し、$\alpha_4\beta_1$ インテグリンには結合しなかった。		
細胞タイプ	ゲートされたポピュレーション表面での $\alpha_4\beta_1$ インテグリンの平均発現率	ゲートされたポピュレーション表面での $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの平均発現率
好中球	4.60%	2.98%
好酸球	100.00%	88.99%
単球	99.48%	15.49%
リンパ球	92.90%	60.25%
細胞タイプ	ゲートされたポピュレーション	ゲートされたポピュレーション
ナチュラルキラー細胞	99.56%	64.05%
B リンパ球	99.99%	88.23%
ヘルパーT リンパ球	89.83%	56.24%
ナイーブヘルパーT リンパ球	90.90%	72.34%
メモリーヘルパーT リンパ球（$CD4^+$）	79.07%	35.92%
細胞障害性 T リンパ球（$CD8^+$）	98.69%	63.98%
$\alpha_4\beta_1$ プロファイル	$CD4^+$ $\alpha_4\beta_1^+$ サブセット表面での $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの平均発現率	$CD8^+$ $\alpha_4\beta_1^+$ サブセット表面での $\alpha_4\beta_7$ インテグリンの平均発現率
$\alpha_4^{hi}\beta_1^{hi}$	21.16	35.38
$\alpha_4^{hi}\beta_1^{lo}$	96.29	82.13
$\alpha_4^{lo}\beta_1^{hi}$	5.31	25.60
$\alpha_4^{lo}\beta_1^{lo}$	69.93	80.13

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

報告書番号：RPT-01140

試験の種類：T リンパ球活性化及びサイトカイン産生

特記すべき所見：MLN0002 は、T リンパ球活性及びサイトカイン放出に影響を及ぼさなかった。

希釈全血を MLN0002 又は LPS 及び PHA（陽性対照）とインキュベートした後の CD69 のアップレギュレーション

	対照[a]				LPS + PHA 5 μg/mL[b]				MLN0002 400 μg/mL[a]			
	5.5 時間		24 時間		5.5 時間		24 時間		5.5 時間		24 時間	
	% $CD69^+$	GMFI	% $CD69^+$	GMFI	% $CD69^+$	GMFI	% $CD69^+$	GMFI	% $CD69^+$	GMFI	% $CD69^+$	GMFI
ドナー1	0.9%	2.8	0.3%	2.8	72.5%	39.0	88.5%	146.0	0.4%	2.7	0.7%	2.7
ドナー2	1.6%	3.3	1.8%	2.9	58.0%	41.0	73.8%	102.0	0.9%	3.2	0.9%	3.0
ドナー3	1.2%	2.9	0.0%	2.7	56.4%	33.0	92.6%	171.0	0.6%	2.7	0.3%	2.7
平均値	1.2%	3.0	0.7%	2.8	62.3%	38.0	85.0%	140.0	0.6%	2.8	0.6%	2.8
SD	0.4%	0.2	1.0%	0.1	8.9%	4.3	9.9%	34.8	0.3%	0.3	0.3%	0.2

GMFI = 蛍光強度の幾何平均値；LPS = リポ多糖；PHA = 植物性血球凝集素；SD = 標準偏差。

a 全集団の GMFI 値。

b CD69 陽性集団の GMFI 値。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

報告書番号：RPT-01140

試験の種類：T リンパ球活性化及びサイトカイン産生（続き）

特記すべき所見：MLN0002 は、T リンパ球活性及びサイトカイン放出に影響を及ぼさなかった。

希釈全血を MLN0002 又は LPS 及び PHA（陽性対照）とインキュベートした後の CD25 のアップレギュレーション

	対照[a]				LPS + PHA 5 μg/mL[b]				MLN0002 400 μg/mL[a]			
	5.5 時間		25 時間		5.5 時間		25 時間		5.5 時間		25 時間	
	% $CD25^+$	GMFI	% $CD25^+$	GMFI	% $CD25^+$	GMFI	% $CD25^+$	GMFI	% $CD25^+$	GMFI	% $CD25^+$	GMFI
ドナー1	0.6%	2.2	0.3%	2.2	2.9%	23.5	49.8%	68.9	0.6%	2.1	0.1%	2.1
ドナー2	0.9%	2.3	0.9%	2.2	2.9%	28.3	38.7%	74.1	1.3%	2.3	0.6%	2.3
ドナー3	0.5%	2.3	1.5%	2.2	2.5%	50.1	56.8%	75.2	0.8%	2.2	0.8%	2.3
平均値	0.7%	2.2	0.9%	2.2	2.8%	34.0	48.4%	73.0	0.9%	2.2	0.5%	2.2
SD	0.2%	0.0	0.6%	0.0	0.2%	14.2	9.1%	3.4	0.4%	0.1	0.4%	0.1

GMFI = 蛍光強度の幾何平均値；LPS = リポ多糖；PHA = 植物性血球凝集素；SD = 標準偏差。

a 全集団の GMFI 値。

b CD25 陽性集団の GMFI 値。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

報告書番号：RPT-01140

試験の種類：T リンパ球活性化及びサイトカイン産生（続き）

特記すべき所見：MLN0002 は、サイトカイン放出に影響を及ぼさなかった。

反応時間	試料	血漿中サイトカイン濃度(ng/mL)									
		IFNγ		IL-1β		IL-2		IL-4		IL-6	
		平均値 (n = 4)	SD	平均値 (n = 3)[a]	SD	平均値 (n = 4)	SD	平均値 (n = 4)	SD	平均値 (n = 4)	SD
0 hr	陰性対照	1.6	2.4	0.2	0.9	1.2	0.9	0.9	0.2	1	1.4
5.5 hr	陰性対照	2.2	3.5	0.2	2.0	1.8	2.0	1.0	0.4	7	7.8
5.5 hr	LPS（5 μg/mL）+ PHA（5 μg/mL）	38.7	12.9	117.9	9.5	19.1	9.5	9.2	3.2	25,517.0	9613.8
5.5 hr	MLN0002（400 μg/mL）	2.95	5.0	0.2	2.3	1.9	2.3	1.4	1.1	9	8.2
25 hr	陰性対照	2.8	4.4	0.2	2.6	3.9	2.6	1.0	0.3	112	191.0
25 hr	LPS（5 μg/mL）+ PHA（5 μg/mL）	4345	2862.7	3403.3	29.9	49.7	29.9	16.8	1.8	49,258.0	9606.3
25 hr	MLN0002（400 μg/mL）	3.6	6.2	0.2	3.3	3.6	3.3	0.9	0.4	77	122.2

IFN = インターフェロン；IL = インターロイキン；LPS = リポ多糖；PHA = 植物性血球凝集素；SD = 標準偏差。

a　IL-1β 及び IL-12（P70）は、ドナー4（実験 2）では測定せず。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

報告書番号：RPT-01140

試験の種類：T リンパ球活性化及びサイトカイン産生（続き）

特記すべき所見：MLN0002 は、サイトカイン放出に影響を及ぼさなかった。

反応時間	試料	血漿中サイトカイン濃度(ng/mL)							
		IL-8		IL-12（p70）		IL-17		TNFα	
		平均値 (n = 4)	SD	平均値 (n = 3)[a]	SD	平均値 (n = 4)	SD	平均値 (n = 4)	SD
0 hr	陰性対照	0	0.0	0.5	0.1	2.0	2.3	2.8	0.8
5.5 hr	陰性対照	30	49.7	0.8	0.3	6.9	6.0	5.5	6.0
5.5 hr	LPS（5 μg/mL）+ PHA（5 μg/mL）	5755	1902.6	1.9	1.3	56.2	31	659.2	210.9
5.5 hr	MLN0002（400 μg/mL）	29	36.3	1.1	0.9	7.4	9.2	7.2	9.2
25 hr	陰性対照	422	685.4	1.1	0.8	26.6	33.5	14.8	13.9
25 hr	LPS（5 μg/mL）+ PHA（5 μg/mL）	2292	3632.3	4.0	2.9	95.9	83.1	1408.3	517.2
25 hr	MLN0002（400 μg/mL）	126	123.6	1.4	1.4	31.3	37.1	22.2	24.6

IL = インターロイキン；LPS = リポ多糖；PHA = 植物性血球凝集素；SD = 標準偏差；TNF = 腫瘍壊死因子。

a　IL-1β 及び IL-12（P70）は、ドナー4（実験 2）では測定せず。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 C）

実施施設：[redacted]UK)

報告書番号：RPT-01954

試験の種類：T リンパ球増殖

特記すべき所見：MLN0002 は、植物性血球凝集素（PHA）で刺激されたヒト末梢血 T 細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。

			抗 $\alpha_4\beta_7$ インテグリン mAb MLN0002 (μ/mL)			抗 α_4 インテグリン mAb natalizumab (μg/mL)			抗 β_7 インテグリン mAb FIB504 (μg/mL)			アイソタイプ対照 (μg/mL)		
ドナー	繰返し連番	溶媒対照	0.2	0.02	0.002	0.2	0.02	0.002	0.2	0.02	0.002	0.2	0.02	0.002
1	1	58,409	60,614	54,998	60,685	44,191	47,634	59,483	55,363	46,895	44,791	58,650	51,301	51,408
	2	44,649	52,545	56,111	39,876	41,273	51,446	56,081	52,905	46,498	41,656	53,050	45,722	55,976
2	1	20,140	24,729	20,146	21,158	18,101	27,204	20,668	20,177	21,452	22,991	20,235	19,750	24,308
	2	23,673	26,034	19,075	20,198	19,773	24,092	24,525	19,665	20,407	16,678	19,033	20,257	21,352
3	1	124,284	74,273	45,048	73,115	84,983	81,420	115,110	69,216	72,462	64,513	67,461	91,627	73,492
	2	112,919	89,792	63,988	73,544	87,675	74,157	93,921	98,624	63,154	56,816	93,509	81,621	62,076
	3	79,955	97,281	85,666	59,040	80,651	88,124	88,775	74,197	58,918	82,086	73,618	71,191	81,534
	平均値	66,290	60,753	49,290	49,659	53,807	56,297	65,509	55,735	47,112	47,076	55,079	54,496	52,878
	SD	41,233	28,667	23,800	22,753	30,338	25,643	35,647	28,681	20,047	22,961	27,399	28,460	22,922

mAb = モノクローナル抗体；SD = 標準偏差。

注記：データは、各ウェルにおける細胞絶対数を示す。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 C）

実施施設：[redacted]UK)

報告書番号：RPT-01954

試験の種類：T リンパ球増殖（続き）

特記すべき所見：MLN0002 は、抗 CD3/CD28 ビーズで刺激されたヒト末梢血 T 細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。

			抗 $\alpha_4\beta_7$ インテグリン mAb MLN0002 (μg/mL)			抗 α_4 インテグリン mAb Natalizumab (μg/mL)			抗 β_7 インテグリン mAb FIB504 (μg/mL)			アイソタイプ対照 (μg/mL)		
ドナー	繰返し連番	溶媒対照	0.2	0.02	0.002	0.2	0.02	0.002	0.2	0.02	0.002	0.2	0.02	0.002
1	1	7343	42,189	-	5939	4622	4904	3876	8332	12,228	10,028	13,825	11,227	8833
	2	10,981	6331	6526	13,302	20,635	11,204	8742	14,016	8702	27,061	9138	10,614	10,850
2	1	32,212	26,562	29,023	31,510	48,168	43,930	19,507	30,578	49,003	45,246	33,735	38,403	36,039
	2	25,789	22,423	23,026	33,526	46,088	47,254	26,963	28,796	47,376	43,717	31,889	36,701	45,059
3	1	ND	37,196	36,299	44,305	26,242	37,964	74,007	50,278	55,453	44,562	59,816	47,249	47,892
	2	46,983	94,044	35,695	40,635	30,399	25,330	49,253	58,291	53,953	ND	76,339	48,354	50,469
	平均値	24,662	38,124	26,114	28,203	29,359	28,431	30,391	31,715	37,786	34,123	37,457	32,091	33,190
	SD	16,153	30,118	12,219	15,302	16,325	17,580	26,684	19,599	21,403	15,453	26,142	17,041	18,741

mAb = モノクローナル抗体；- = 実験不成立のため値を採用せず；SD = 標準偏差。

注記：データは、各ウェルにおける細胞絶対数を示す。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

報告書番号：RPT-01139

試験の種類：補体依存性細胞傷害作用（CDC）

特記すべき所見：MLN0002 は、CDC 作用を誘発しなかった。

抗体濃度 (μg/mL)	細胞傷害率（%）					
	OKT3IgG2a		MLN0002		huIgG1/κ	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
PBMC + 10[a]	3.5	2.4	-2.3	2.0	-5.2	4.7
10	36.8	4.5	-4.5	1.6	-5.8	2.5
2	31.7	3.9	-3.6	4.6	-2.3	1.5
0.4	29.5	4.5	-5.0	2.4	-3.6	3.1
0.08	25.2	4.9	-4.1	1.6	-4.7	2.0
0.016	7.7	3.1	-4.1	4.1	-2.0	1.8
0.0032	1.1	3.9	-2.3	2.1	-2.3	2.2
0	5.6	2.5	-0.3	1.8	4.3	0.9

Ig = 免疫グロブリン；PBMC = 末梢血単核球；SD = 標準偏差。

注記：記載値は、各抗体について 4 回測定した値の平均である。

a　PBMC + 10 は、PBMC 及び表記載抗体 10 μg/mL を含むが、補体を除去した試料を意味する。それ以外のすべての試料は、PBMC、補体及び表記載濃度の抗体を含む。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

報告書番号：RPT-01138

試験の種類：抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)

特記すべき所見：MLN0002 は、ADCC 作用を誘発しなかった。

抗体濃度 (μg/mL)	細胞傷害率（%）					
	rituximab		MLN0002		Act-1	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
RPMI + 10[a]	2.6	2.4	2.6	5.5	2.3	4.1
PBMC + 10[b]	1.8	2.1	0.4	1.9	-0.3	0.8
10	69.9	10.1	20.0	11.5	24.2	18.3
2	67.4	11.7	23.8	16.5	23.9	14.1
0.4	69.8	13.4	21.8	13.7	23.6	16.3
0.08	70.1	10.7	21.3	14.9	25.1	12.0
0.016	60.0	9.9	20.4	12.3	23.3	11.3
0.0032	47.4	11.9	21.8	14.9	22.6	8.7
0	27.6	14.4	20.9	10.2	22.2	10.5

Conc = 濃度；PBMC = 末梢血単核球；RPMI = Roswell Park Memorial Institute；SD = 標準偏差。

注記：平均値及び標準偏差（SD）は、独立して実施した 3 つの実験結果に基づく。上表には、平均値及び SD を算出するために使用した各独立して実施した実験の（各実験当たり 3 回測定した結果の）平均値と、当該平均値を使用して算出した SD を収載した。

a RPMI + 10 は、標的細胞（RPMI 8866）のみ（PBMC は含まない）及び抗体 10 μg/mL を意味する。この組合せの値は、2007 年 9 月 11 日及び 18 日に実施した 2 つの実験の平均値を示す；この組合せでの試験は、2007 年 8 月 23 日には実施しなかった。

b PBMC + 10 は、エフェクター細胞（PBMC）のみ（RPMI 8866 細胞は含まない）及び抗体 10 μg/mL の試料を意味する。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

報告書番号：RPT-01098

試験の種類：$\alpha_4\beta_7$インテグリン-リガンド相互作用に対する拮抗阻害の選択性

特記すべき所見：MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$インテグリン-リガンド相互作用を選択的に拮抗阻害した。

Mn^{+2}の存在下又は非存在下での$\alpha_4\beta_7$インテグリン発現 RPMI8866 細胞のヒト MAdCAM-1 への結合に対する MLN0002 及び抗α_4インテグリン抗体の拮抗阻害

Mn^{+2}濃度 (mM)	実験	最大阻害率	IC_{50} (μg/mL)	
			MLN0002	抗α_4インテグリン抗体
0	1A	100%	0.028	ND
	1B	100%	0.041	0.027
	1C	100%	0.031	0.030
	1D	100%	0.013	0.026
	1E	100%	0.026	0.021
	1F	100%	0.009	0.013
	1G	100%	0.012	0.011
	IC_{50}平均値	N/A	0.023	0.021
	SD	N/A	0.012	0.008
1	1A	2 μg/mL のとき 79%	0.050	0.032
	1C	2 μg/mL のとき 74%	0.088	0.158
	1F	2 μg/mL のとき 82%	0.028	ND
	1G	2 μg/mL のとき 75%	0.044	0.039
	1H	20 μg/mL のとき 83%	0.085	0.041
	1I	20 μg/mL のとき 57%	0.055	0.075
	IC_{50}平均値	N/A	0.058	0.069
	SD	N/A	0.024	0.052

IC_{50} = 50%阻害濃度；MAdCAM-1 = 粘膜アドレシン細胞接着分子-1；N/A = 該当せず；ND = 実施せず；SD = 標準偏差。

注記：対照抗体は、結合を阻害しなかった。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

報告書番号：RPT-01098

試験の種類：$\alpha_4\beta_7$インテグリン-リガンド相互作用に対する拮抗阻害の選択性（続き）

特記すべき所見：MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$インテグリン-リガンド相互作用を選択的に拮抗阻害した。

Mn+2 の存在下又は非存在下での $\alpha_4\beta_7$インテグリン発現 RPMI8866 細胞のヒト VCAM-1 への結合に対する抗 α_4インテグリン抗体の拮抗阻害

Mn^{+2} 濃度 (mM)	実験	最大阻害率	抗 α_4インテグリン抗体 IC_{50} (μg/mL)
0	2A	100%	0.028
	2B	100%	0.043
	2C	100%	0.031
	IC_{50} 平均値	100%	0.034
	SD	N/A	0.008
1	2A	20 μg/mL のとき 95%	ND
	2B	100%	0.103
	2C	100%	0.153
	2D	5 μg/mL のとき 79%	ND
	IC_{50} 平均値	N/A	0.128
	SD	N/A	0.035

IC_{50} = 50%阻害濃度；N/A = 該当せず；ND = 実施せず；VCAM-1 = 血管細胞接着分子-1。

注記：MLN0002 及び対照抗体は、結合を阻害しなかった。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

報告書番号：RPT-01098

試験の種類：$\alpha_4\beta_7$インテグリン-リガンド相互作用に対する拮抗阻害の選択性（続き）

特記すべき所見：MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$インテグリン-リガンド相互作用を選択的に拮抗阻害した。

Mn^{+2}の存在下又は非存在下での$\alpha_4\beta_1$インテグリン発現 RAMOS 細胞の VCAM-1 への結合に対する抗α_4インテグリン抗体の拮抗阻害

Mn^{+2}濃度 (mM)	実験	最大阻害率	抗α_4インテグリン抗体 IC_{50} (μg/mL)
0	3A	100%	0.028
	3B	100%	0.044
	3C	100%	0.043
	IC_{50}平均値	N/A	0.038
	SD	N/A	0.009
1	3A	20 μg/mL のとき 87%	0.195
	3B	20 μg/mL のとき 79%	1.503
	3C	100	0.109
	3D	100	0.085
	IC_{50}平均値	N/A	0.473
	SD	N/A	0.688

IC_{50} = 50%阻害濃度；N/A = 該当せず；SD = 標準偏差；VCAM-1 = 血管細胞接着分子-1。

注記：MLN0002 及び対照抗体は、結合を阻害しなかった。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）		
実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)		
報告書番号：RPT-01098		
試験の種類：$\alpha_4\beta_7$インテグリン-リガンド相互作用に対する拮抗阻害の選択性（続き）		
特記すべき所見：MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$インテグリン-リガンド相互作用を選択的に拮抗阻害した。		
1 mM Mn^{+2}の存在下での$\alpha_4\beta_7$インテグリン発現 RPMI8866 細胞のフィブロネクチンへの結合に対する MLN0002 及び抗 α4 インテグリン抗体の拮抗阻害		
実験	IC_{50} (μg/mL)	
	MLN0002	抗 α_4インテグリン抗体
4A	0.013	0.02
4B	0.039	0.040
4C	0.015	0.015
4D	0.015	0.017
平均値	0.020	0.023
SD	0.012	0.012

IC_{50} = 50%阻害濃度；SD = 標準偏差。
注記：対照抗体は、結合を阻害しなかった。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002 及び Act-1

試験の種類	動物種及び系統	投与方法	報告書番号	投与期間	投与量 (mg/kg)	GLP	実施施設	区分
組織交差反応性試験								
	ヒト及びカニクイザル	*in vitro*	IM353	N/A	MLN0002：1、2、4、5、8、10、15 及び 20 µg/mL Act-1：1、5、10、15 及び 20 µg/mL	非適	PAI	参考
	カニクイザル	*in vitro*	IM1741	N/A	MLN0002: 2 及び 20 µg/mL	適	CRL-PA	評価
	ヒト	*in vitro*	IM433	N/A	Act-1：5 及び 20 µg/mL	適	PAI	評価
	ヒト	*in vitro*	IM434	N/A	MLN0002: 5 及び 20 µg/mL	適	PAI	評価
	ヒト	*in vitro*	IM1493	N/A	MLN0002: 2 及び 20 µg/mL	適	CRL-PA	評価

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準； CRL-PA = Charles River Laboratories Pathology Associates – Maryland (Frederick, MD, USA)； PAI = Pathology Associates International (Frederick, MD, USA) ； N/A = 該当せず；IV = 静脈内；SC = 皮下；IM = 筋肉内；Act-1 = MLN0002 のマウスホモログ前駆体。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

報告書番号：[redacted]

試験の種類：*in vitro* でのヒト末梢血における MLN0002 の Th17 細胞及び Treg 細胞への結合

特記すべき所見：MLN0002 は、Th17 細胞（27%）及び Treg（9%）細胞サブセットに結合した。

IL-17 に対して陽性を示した細胞の割合（%）

調製した細胞	MLN0002$^+$	MLN0002$^-$	α_4^+	α_4^-	β_7^+	β_7^-
メモリーCD4$^+$	34	66	81	19	36	64
メモリーCD4$^+$	25	75	90	10	26	74
メモリーCD4$^+$	19	81	77	24	20	80
PBMC	29	71	86	14	30	70
PBMC	30	70	73	27	33	67
メモリーCD4$^+$	26	74	75	25	31	69
平均値	27	73	80	20	29	71
SD	5	5	7	7	6	6

FoxP3 に対して陽性を示した細胞の割合（%）

調製した細胞	MLN0002$^+$	MLN0002$^-$	α_4^+	α_4^-	β_7^+	β_7^-
メモリーCD4$^+$	13	87	57	43	13	87
メモリーCD4$^+$	5	95	45	55	6	94
メモリーCD4$^+$	ND	ND	55	45	15	85
メモリーCD4$^+$	ND	ND	62	38	17	83
平均値	9	91	55	45	13	87
SD	6	6	7	7	5	5

IL = インターロイキン；ND = 実施せず；PBMC = 末梢血単核球；SD = 標準偏差；Treg = 制御性 T 細胞。

注記：Th17 細胞は IL-17 に対して陽性；Treg 細胞は FoxP3 に対して陽性。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

			被験物質：MLN0002（製造法 B）
			実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)
			報告書番号：RPT-01436
試験の種類：*in vitro* での、MLN0002 除去後のヒトメモリーCD4$^+$ T リンパ球における $\alpha_4\beta_7$ 発現の再構築のキネティクス			
特記すべき所見：$\alpha_4\beta_7$ インテグリンが 4 日後再び現れ、MAdCAM-1-mFc 結合能の観点で機能していた。			
	MLN0002 除去後、MLN0002 に対して陽性染色を示した細胞の割合		
投与薬剤	0 日目	1 日目	4 日目
対照溶媒 (n = 3)	22.3	20.1	18.9
MLN0002 (n = 3)	0.23 1.0[a]	11.0 54.9[a]	15.9 84.3[a]

MAdCAM-1 = 粘膜アドレッシン細胞接着分子-1。

a　対照溶媒の割合。

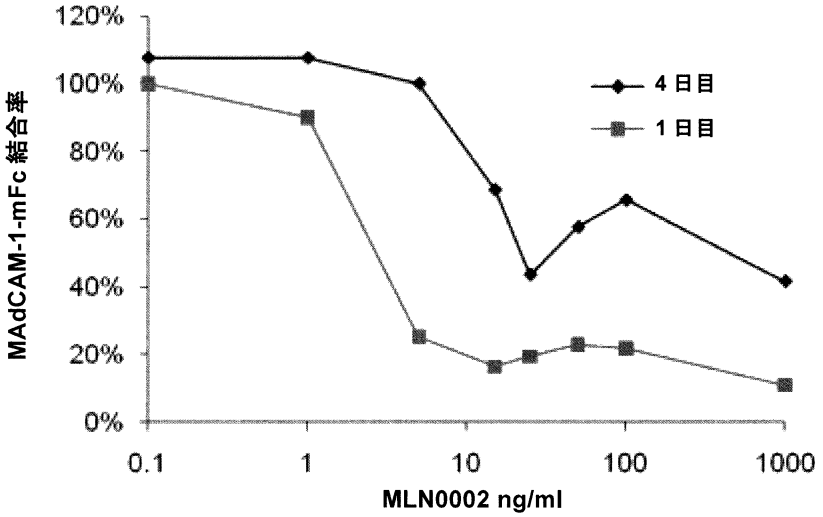


図 2.6.3.2-1　*in vitro* でのヒトメモリーCD4 T リンパ球における $\alpha_4\beta_7$ インテグリン機能の回復性

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

		被験物質：MLN0002（製造法 A）
		実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)
		報告書番号：RPT-00709
試験の種類：PBMC 表面の $\alpha_4\beta_7$インテグリンに結合する MLN0002 及び Act-1 の種間交差反応性		
試験系	濃度	特記すべき所見
マウス、ラット、モルモット、ウサギ、カニクイザル及びヒトの PBMC	MLN0002（濃度 10 又は 100 ng/mL） Act-1（濃度 10 又は 100 ng/mL）	MLN0002 及び Act-1 は、ウサギ、カニクイザル及びヒトの血液試料中の $\alpha_4\beta_7$インテグリン発現リンパ球に結合したが、マウス、ラット又はモルモットの血液試料中の $\alpha_4\beta_7$インテグリン発現リンパ球には結合しなかった。

PBMC = 末梢血単核球。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

試験の種類：$\alpha_4\beta_7$インテグリンに対する結合親和性

動物種	報告書番号	B リンパ球				メモリーCD4 T リンパ球			
		EC_{50}		IC_{50}		EC_{50}		IC_{50}	
		μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM
New Zealand white ウサギ	RPT-01101 Amendment 1	0.03	0.21	0.04	0.26	0.02	0.13	0.06	0.42
アカゲザル	RPT-01337	ND	ND	ND	ND	0.03	0.19	0.01	0.08
カニクイザル	RPT-01052	0.06	0.37	0.06	0.39	0.06	0.39	0.06	0.37
	RPT-01337	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	0.09
ヒト	RPT-01052	0.06	0.40	0.06	0.4	0.05	0.33	0.06	0.38
	RPT-01101 Amendment 1	0.06	0.41	0.05	0.34	0.05	0.31	0.07	0.47
	RPT-01337	ND	ND	ND	ND	0.02	0.14	0.01	0.06

EC_{50} = 最大染色の 50%を生じさせた標識抗体濃度；IC_{50} = EC_{50} で使用された標識抗体の結合を 50%阻害する抗体濃度；ND = 実施せず。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 A）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

報告書番号：[redacted]

試験の種類：カニクイザル及びヒトのリンパ球表面の $\alpha_4\beta_7$ インテグリン-に対する MLN0002 (製造法 A)の結合親和性

	$CD4^+$ T リンパ球		$CD8^+$ T リンパ球	
動物種	EC_{50} (μM)	IC_{50} (nM)	EC_{50} (μM)	IC_{50} (nM)
カニクイザル	0.001	0.9 ± 0.2	0.0019	0.4 ± 0.1
ヒト	0.005	0.9 ± 0.1	0.0011	0.9 ± 0.2

EC_{50} = 最大染色の 50%を生じさせた標識抗体濃度；IC_{50} = EC_{50} で使用された標識抗体の結合を 50%阻害する抗体濃度。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：Act-1 及び MLN0002（製造法 A 及び製造法 B）

実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)

報告書番号[redacted]

試験の種類：ヒトリンパ球表面の $\alpha_4\beta_7$ インテグリンに対する Act-1 及び複数ロット MLN0002 の結合親和性

被験物質		CD19$^+$ B リンパ球		CD4$^+$ T リンパ球	
	EC_{50}	IC_{50} (μg/mL)		IC_{50} (μg/mL)	
	(μg/mL)	Act-1	MLN0002	Act-1	MLN0002
MLN0002（ロット番号 0002-807-G0）	ND	0.056 ± 0.018	0.050 ± 0.005	0.053 ± 0.024	0.051 ± 0.005
MLN0002（ロット番号 MLN0002-807A）	ND	0.052 ± 0.014	0.060 ± 0.015	0.054 ± 0.012	0.055 ± 0.014
MLN0002（ロット番号 RS-010-2）	75.65 ± 12.43	0.049 ± 0.006	0.045 ± 0.003	0.049 ± 0.016	0.046 ± 0.010
MLN0002（ロット番号 B30-1）	ND	0.054 ± 0.014	0.048 ± 0.015	0.048 ± 0.009	0.054 ± 0.016
Act-1	42.99 ± 5.62	0.062 ± 0.010	0.059 ± 0.008	0.078 ± 0.032	0.065 ± 0.003

EC_{50} = 最大染色の 50%を生じさせた標識抗体濃度；IC_{50} = EC_{50} で使用された標識抗体の結合を 50%阻害する抗体濃度；ND = 実施せず。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：Act-1

実施施設：[redacted]USA)

報告書番号：Hesterberg 1996

試験の種類：慢性大腸炎の非臨床モデルにおける有効性

試験系	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与経路及びレジメン	特記すべき所見
慢性大腸炎ワタボウシタマリン（4匹／群）	対照 IgG	0	1日目に IV ボーラス注射；2日目～8日目は、QD で IM 注射	Act-1 投与群では、3日目までにすべての動物で下痢の寛解がもたらされ、これは、試験終了日（20日目）まで、すなわち、Act-1 の最終投与から 12 日間持続した。5日目に、大腸粘膜生検により、Act-1 が大腸の粘膜固有層内の $\alpha_4\beta_7$ 陽性リンパ球に局在することが明らかになった。治療前の粘膜生検と比較すると、Act-1 は、炎症活性（腸粘膜固有層の白血球浸潤）を低減させ、5日目までの構造的な退行性変化と関連していた。免疫組織学的に調製した生検組織の形態計測解析により、5～20日目にかけて、$\alpha_4\beta_7$ 陽性リンパ球、並びに $\alpha_4\beta_7^-$ 陰性好中球及びマクロファージの粘膜中濃度の低下が明らかになった。対照動物ではいずれにおいても、症状又は免疫組織学的な改善はみられなかった。 ワタボウシタマリンへの Act-1 投与は、一般的に ≥ 10 μg/mL の血清濃度をもたらし、2～10 日目（当該パラメータに対する最終評価日）までリンパ球の $\alpha_4\beta_7$ サブユニットを飽和させた。
	Act-1	2.0		

Ig = 免疫グロブリン；IM = 筋肉内；IV = 静脈内；QD = 1日1回。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002（製造法 B）

実施施設：[redacted]The Netherlands)

報告書番号：RPT-01673 Amendment 1

試験の種類：EAE の非臨床モデルにおける CNS に対する影響

フェーズ 1（natalizumab を用いたモデルバリデーション。このバリデーションにより、モルモット及びマウスの EAE モデルにおける有効性を証明）

試験系	被験物質	投与量（mg/kg）	投与経路及びレジメン	特記すべき所見
EAE を誘導したアカゲザル（雄）	溶媒 (n = 4)	0	0 日目（EAE 誘導）から 1 週の間隔で最大 3 週目まで IV ボーラス注射	natalizumab は、脳脊髄炎、CSF への白血球浸潤、脳炎症及び脱髄（MRI 及び顕微鏡検査により測定）の症状を阻害し、末梢血における白血球増加、リンパ球増加及び単球増加を誘導した。
	natalizumab (n = 7)	30		

フェーズ 2（アカゲザル EAE モデルにおける CNS 免疫監視機構に対する MLN0002 の影響を判定）

試験系	被験物質	投与量（mg/kg）	投与経路及びレジメン	特記すべき所見
EAE を誘導したアカゲザル	溶媒（雄 3 匹及び雌 1 匹）	0	0 日目（EAE 誘導）から 1 週の間隔で最大 3 週目まで IV ボーラス注射	MLN0002 は、脳脊髄炎、CSF への白血球浸潤、脳炎症及び脱髄（MRI 及び顕微鏡検査により測定）の症状を阻害せず、末梢血における白血球、リンパ球及び単球のレベルに影響を及ぼさなかった。これらの成績により、MLN0002 は、この EAE モデルにおいて、CNS 免疫監視機構に対して影響を及ぼさないことが示された。
	MLN0002（雄 5 匹及び雌 2 匹）	30		

CNS = 中枢神経系；CSF = 脳脊髄液；EAE = 実験的自己免疫性脳脊髄炎；IV = 静脈内；MRI = 磁気共鳴撮像。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：MLN0002 (製造法 B 及び製造法 C)	
実施施設：Millennium Pharmaceuticals, Inc (Cambridge, MA, USA)	
報告書番号：[redacted]	
試験の種類：$\alpha_4\beta_7$インテグリン拮抗薬 MLN0002 と $\alpha_4\beta_1$ 及び $\alpha_4\beta_7$インテグリン拮抗薬 natalizumab との間の作用機序の違い、並びに PML 発生頻度との関連性	
評価	特記すべき所見
Millennium が実施した非臨床試験及び臨床試験からのデータ提示による、腸管選択的 $\alpha_4\beta_7$インテグリン拮抗薬 MLN0002 と多面的 $\alpha_4\beta_1$インテグリン及び $\alpha_4\beta_7$インテグリン拮抗薬の作用機序（MOA）の包括的評価	MLN0002 は、腸管選択的な抗炎症生物学的製剤であり、この点が natalizumab の多面的な薬理学的プロファイルとは異なる。この腸管選択的プロファイルは、2 つの薬理学的特性に起因する。MLN0002 は、natalizumab と異なり、$\alpha_4\beta_7$インテグリンには結合するが $\alpha_4\beta_1$インテグリンには結合しないことから、MLN0002 の結合は、腸管指向性白血球サブセットに制限される。MLN0002 は、$\alpha_4\beta_7$インテグリンの他の分子への結合も選択的に拮抗阻害するため、これによって、腸管指向性白血球の血管の内皮内腔表面の VCAM-1 への接着を制限することなく、MAdCAM-1 への接着がさらに制限される。対照的に、natalizumab は、$\alpha_4\beta_7$インテグリンの MAdCAM-1 と VCAM-1 の両方への結合を拮抗阻害する（すなわち、非選択的拮抗薬）。 査読の実施される科学雑誌でこれまで発表された科学的な根拠（Scientific Evidence）をレビューすると、natalizumab に関連して報告されている PML の原因は、$\alpha_4\beta_7$インテグリンではなく、$\alpha_4\beta_1$インテグリンを拮抗阻害していることであるというコンセプトが支持される。PML に対する包括的なリスク評価及びリスク最小化計画（RAMP）の文脈において、これまでのところ臨床試験で PML の症例は認められていない。現時点で利用可能な科学的な根拠によれば、natalizumab と違って MLN0002 は患者を PML に感染しやすくさせないということが示唆されるが、その単純な理由は、MLN0002 の作用機序に $\alpha_4\beta_1$インテグリンに影響を及ぼす仕組みがないからである。

MAdCAM-1 = 粘膜アドレシン細胞接着分子-1；PML = 進行性多巣性白質脳症；VCAM-1 = 血管細胞接着分子-1。

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：MLN0002（製造法 B）							
評価対象器官系	動物種／系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	動物数/性別/群	特記すべき所見	GLP	報告書番号
心血管	カニクイザル	1 時間持続静注	0	8 匹（雄）	MLN0002 は、良好な忍容性を示した。MLN0002 に関連した一般状態変化、又は、心拍数、平均動脈圧及び ECG パラメータ（定性的及び定量的）に対する影響はみられなかった。	適用	[redacted]
			10	4 匹（雄）			
			100	4 匹（雄）			

ECG = 心電図；GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準。