

サノフィ株式会社

デュピルマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 － 非臨床概要

2.6.2 薬理試験の概要文（気管支喘息）

Total number of pages: 22

目 次

略号と用語の定義	4
1 まとめ	5
2 効力を裏付ける試験	7
2.1 <i>In vivo</i> 薬理作用	7
2.1.1 デュピルマブのマウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける type 2 免疫応答に対する作用	7
2.1.2 REGN1103 のマウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける type 2 免疫応答に対する作用	10
2.1.3 デュピルマブのマウス 4 週間アレルギー性喘息モデルにおける肺機能及び炎症細胞浸潤に対する作用	13
3 副次的薬理試験.....	17
4 安全性薬理試験.....	18
5 薬力学的薬物相互作用試験	19
6 考察及び結論	20
参 考 文 献.....	21

図 目 次

図 1 - デュピルマブの <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける血中総 IgE 濃度及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度に対する作用	8
図 2 - デュピルマブの <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける肺への好酸球浸潤に対する作用.....	9
図 3 - デュピルマブの <i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける杯細胞化生に対する作用.....	10
図 4 - REGN1103 の Balb/c マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける血中総 IgE 濃度及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度に対する作用	11
図 5 - REGN1103 の Balb/c マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける肺への好酸球浸潤に対する作用	12
図 6 - REGN1103 の Balb/c マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける杯細胞化生に対する作用.....	13
図 7 - デュピルマブの HDM 誘発喘息モデルにおける肺への好酸球浸潤に対する作用.....	15
図 8 - デュピルマブの HDM 誘発喘息モデルにおける肺機能障害に対する作用.....	16

略号と用語の定義

AHR	Airway hyperresponsiveness／気道過敏性
<i>Ccl11</i>	C-C motif chemokine 11, also known as eotaxin1／C-C モチーフ ケモカイン 11、別名エ オタキシン 1
CD	Cluster of differentiation／分化抗原
γ c	Common gamma chain／共通ガンマ鎖
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay／酵素結合免疫吸着測定法
FEV ₁	Forced expiratory volume in 1 second／1 秒量
FEV _{0.1}	Forced expiratory volume in 0.1 second／0.1 秒量
HDM	House dust mite／チリダニ
IgE	Immunoglobulin E／免疫グロブリン E
IgG	Immunoglobulin G／免疫グロブリン G
IL	Interleukin／インターロイキン
IL-4R α	IL-4 receptor α subunit／IL-4 受容体 α サブユニット
IL-13R α 1	IL-13 receptor α 1 subunit／IL-13 受容体 α 1 サブユニット
MCh	Methacholine／メタコリン
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1／単球走化性タンパク質 1
PAS	Periodic acid Schiff／過ヨウ素酸シッフ
TARC	Thymus and activation-regulated chemokine／胸腺及び活性化制御ケモカイン
Th2	T helper 2 cells／type 2 ヘルパーT 細胞

1 まとめ

アレルギー性疾患及びアトピー性疾患においては、全身性 type 2 炎症がみられる。IL-4 及び IL-13 は、type 2 炎症の主要な炎症性サイトカインであり、機能的に重複しないものと重複するものがあるが、アレルギー性疾患の基本的特徴である炎症の誘導相及びエフェクター相にみられる抗原提示及び type 2 ヘルパーT 細胞 (Th2 細胞) への分化 (プライミング)、好酸球の組織への移行、B 細胞の活性化、並びに B 細胞での IgE へのクラススイッチ誘導などに重要な役割を果たしている(1)。IL-4 は、IL-4 受容体 α サブユニット (IL-4R α) 及び共通ガンマ鎖 (γ c) で構成される I 型 IL-4 受容体を介してシグナルを伝達する。また、IL-4 及び IL-13 とも IL-4R α 及び IL-13 受容体 α 1 サブユニット (IL-13R α 1) で構成される II 型 IL-4 受容体を介してシグナルを伝達する。デュピルマブ (REGN668) は、ヒト IL-4R α に特異的なヒト抗体である。デュピルマブは、Regeneron 社の [REDACTED] プラットフォーム(2)(3) を用いて単離され、ヒト κ 鎖定常領域に融合したヒト軽鎖可変領域及びヒト IgG4 定常領域に融合したヒト重鎖可変領域を含む。IgG4 定常領域において、ヒンジ領域のセリンをプロリンに置換し (EU 番号 S228P、IgG4^P と称す)、 [REDACTED] (4)。IL-4R α に対する結合特異性により、デュピルマブは IL-4 /IL-13 シグナル伝達の二重阻害薬として作用する。デュピルマブはマウス IL-4R α に結合せず、マウス IL-4 はヒト IL-4R α に結合しないことから、内因性マウス IL-4 及び IL-4R α の外部領域の両方を、相当するヒト配列で置換した遺伝子改変マウス (Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}) を作製し、このマウスにアレルギー性炎症を誘導し、デュピルマブの有効性を評価した。これらの二重ヒト化マウスは、マウス IL-13 に対して正常に反応する。また、野生型マウス及び二重ヒト化マウスはいずれも、チリダニ (HDM) 抽出物への曝露により、同等の好酸球肺浸潤及び杯細胞化生を示す ([Module 1.13.1.3] アトピー性皮膚炎申請資料 Module 2.6.2 及び Module 2.6.3)。

呼吸器が HDM に曝露されると、気道炎症及び粘液産生亢進など、気管支喘息 (以下、喘息) の様々な病理学的特徴が再現される。アレルギー性喘息患者に HDM を投与すると、投与後最長 5 週間にわたり、血清中の IgE 並びに type 2 サイトカインである IL-4、IL-5 及び IL-13 の濃度が上昇する(5)。同様に、マウスに HDM を反復投与すると、type 2 サイトカインの肺中濃度が顕著に上昇し、肺への好酸球浸潤が亢進し、気道上皮中の杯細胞数が増加して粘液産生が亢進することが明らかになっている(6)(7)。また、循環血中の IgE 及び HDM 特異的 IgG1 濃度が上昇し、IL-5 及び IL-13 などの type 2 炎症性サイトカインが誘導される(7)(8)(9)。

コントロール不良な持続性喘息患者に共通受容体サブユニット IL-4R α を標的とするデュピルマブを投与すると、肺機能が改善し、重度の増悪が抑制されることが明らかになっている(10)。杯細胞過形成及び粘液分泌過多による気道狭窄、並びに基底膜肥厚及び平滑筋過形成などの構造変化は機能障害をもたらす。このような機能障害はヒトにおいては、1 秒量 (FEV₁)、マウスにおいては 0.1 秒量 (FEV_{0.1}) として評価可能である。気道過敏性 (AHR) は、気管支収縮薬、例えばメタコリン (MCh) の吸入濃

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

度に応じた FEV_1 （又は $FEV_{0.1}$ ）の変化を測定することによって評価される肺機能の動的尺度である。気道炎症はヒト AHR の原因の一つであり(11)、急性マウス HDM 誘発喘息モデルの気道炎症もまた AHR と関連している(12)。マウスを用いて実施した種々の肺機能試験のうち、厳密な AHR 試験で治療的介入を評価することにより、ヒトでの反応をより正確に予測しうる(13)。

HDM 誘発性 type 2 炎症マウスモデルを用いて、デュピルマブ及びマウス相同抗体（REGN1103）の *in vivo* 有効性を評価した。デュピルマブの有効性は $Il4^{ra^{hu/hu}} Il4^{hu/hu}$ マウスを用いて評価し（2.1.1項）、REGN1103 の有効性は野生型 Balb/c マウスを用いて評価した（2.1.2項）。両試験において、デュピルマブ及び REGN1103 は、いずれも血中 IgE 濃度及び血中アレルギー特異的 IgG1 濃度を低下させ、肺好酸球浸潤を抑制し、杯細胞化生を抑制した。本モデルにおける REGN1103 の 25 mg/kg での有効性は、デュピルマブの 25 mg/kg での有効性と同程度であった。

また、 $Il4^{ra^{hu/hu}} Il4^{hu/hu}$ マウスを用いた HDM 誘発喘息モデルにおいて、デュピルマブを 10 mg/kg の用量で週 2 回皮下投与すると、好酸球の肺浸潤が抑制されると同時に、血液中の好酸球数がわずかに増加した（2.1.3項）。また、25 mg/kg を週 2 回皮下投与したときには、MCh 惹起前及び惹起中の $FEV_{0.1}$ によって評価される HDM 誘発性肺機能障害が抑制された。

2 効力を裏付ける試験

2.1 *In vivo* 薬理作用

2.1.1 デュピルマブのマウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける type 2 免疫応答に対する作用

[Module 4.2.1.1-2: REGN668-MX-052]

Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} マウスを用いて、4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおけるデュピルマブの効果を評価した。本マウス肺炎モデルでは、HDM アレルゲンとして、HDM 抽出物を用い、反復鼻腔内投与した(7)。HDM アレルゲンは屋内アレルギーの重要な原因となっている(14)。HDM アレルゲンによる本炎症は古典的 type 2 免疫応答を示し、肺好酸球浸潤の増加、気道の杯細胞化生の増加並びに血清中総 IgE 濃度及び血清中アレルゲン特異的 IgG1 濃度の上昇が誘発される。

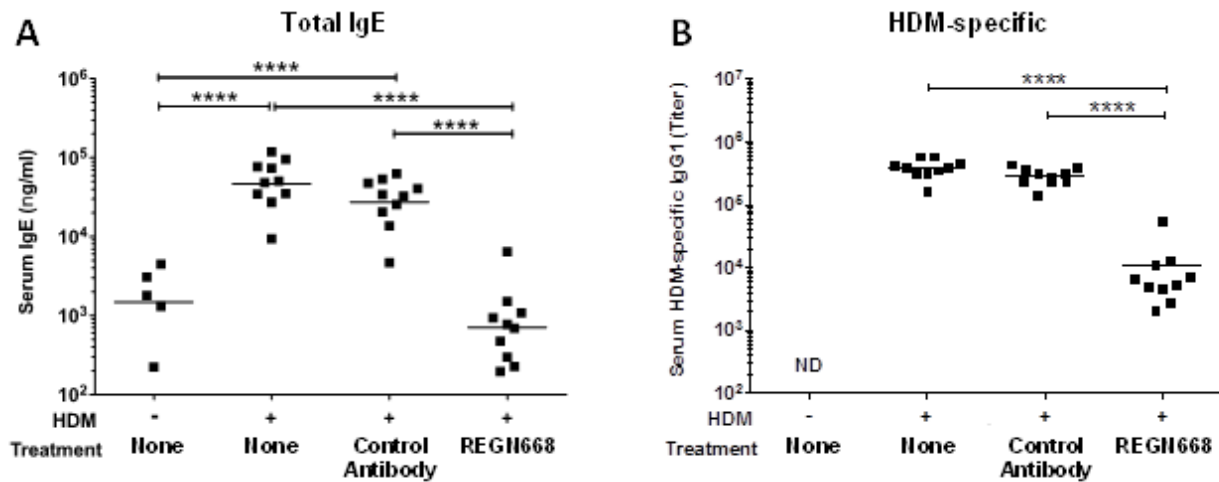
Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} マウスを 4 群に分け、生理食塩液又は HDM 抽出物を週 3 回、連続 4 週間鼻腔内投与した。2 群の HDM 処置マウスに、25 mg/kg のデュピルマブ又はアイソタイプ対照抗体を、1 週目から 4 週目まで週 2 回皮下投与した。有効性及び作用機序を確認するために、本試験では高投与用量を選択した。試験の 30 日目に、すべてのマウスを安楽殺し、血液を心臓穿刺によって採取し、血清中総 IgE 濃度、血清中 HDM 特異的 IgG1 濃度及びデュピルマブの血清中濃度の測定に供した。また、同マウスから肺を採取して、肺好酸球の割合をフローサイトメトリーで解析するとともに、杯細胞化生について組織学的に検査した。

デュピルマブを投与した HDM 処置 *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}* マウスは、非投与 HDM 処置マウス及び対照抗体を投与した HDM 処置マウスと比較して、血中 IgE 濃度及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度が有意に低かった (図 1)。デュピルマブ投与マウスは、対照抗体投与マウスと比較して、肺における総好酸球の割合の低下傾向を示し、活性化好酸球の浸潤が有意に少なかった (図 2)。また、デュピルマブを投与した HDM 処置マウスは、対照抗体投与マウスと比較して、杯細胞化生も有意に少なかった (図 3)。以上のように、本アレルギー誘発性肺炎モデルにおいて、デュピルマブは、25 mg/kg の週 2 回投与により、type 2 気道炎症に関連するこれらの病理マーカーを抑制し、有効性を示した。安楽殺時に採取した血清中の平均デュピルマブ濃度は 377.5 µg/mL であった (抗 hIgG 抗体の ELISA を用いて測定)。

2.6.2 薬理試験の概要文

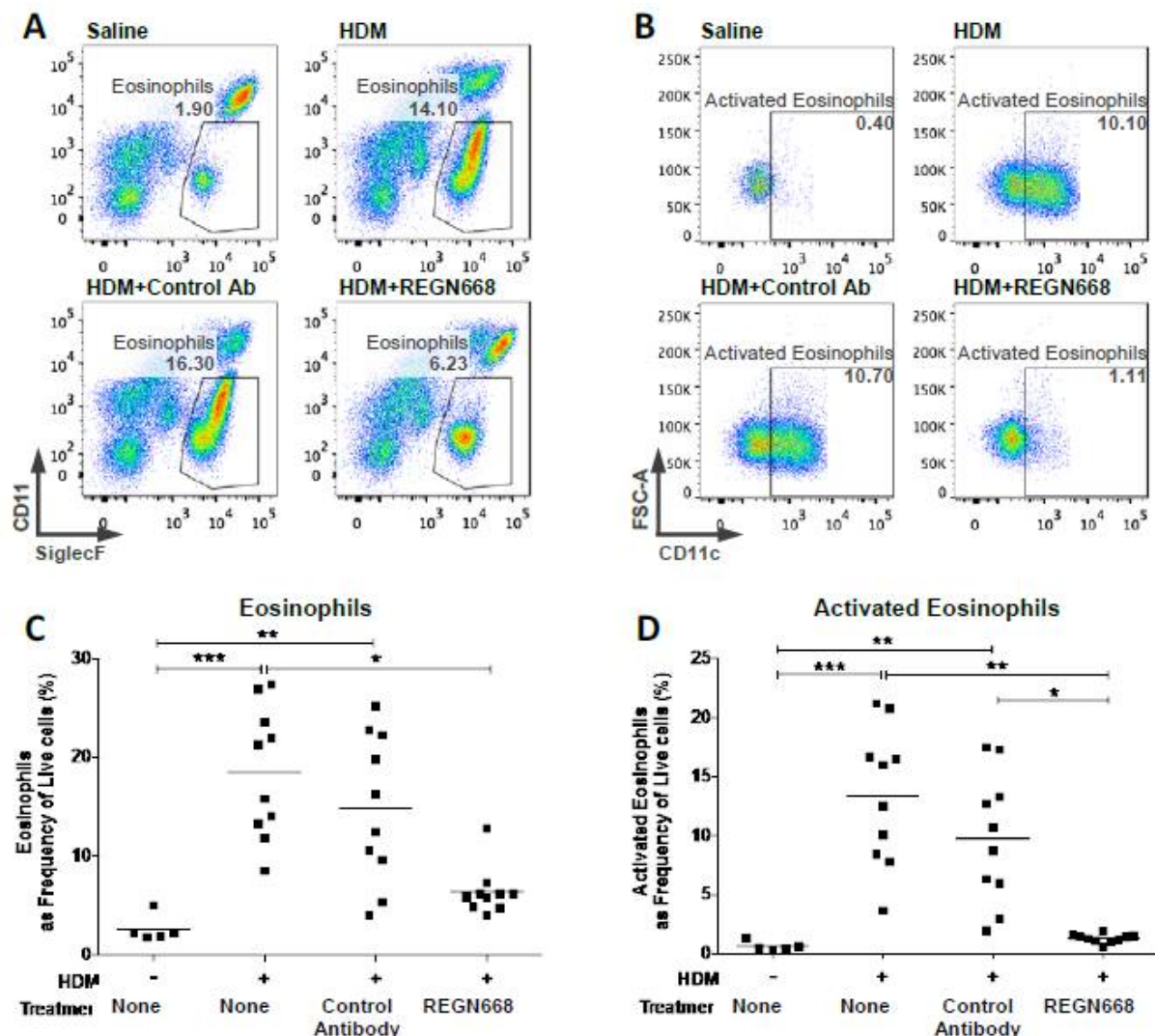
SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

図 1 - デュピルマブの *Il4ra^{hu/hu}* *Il4^{hu/hu}* マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける血中総 IgE 濃度及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度に対する作用



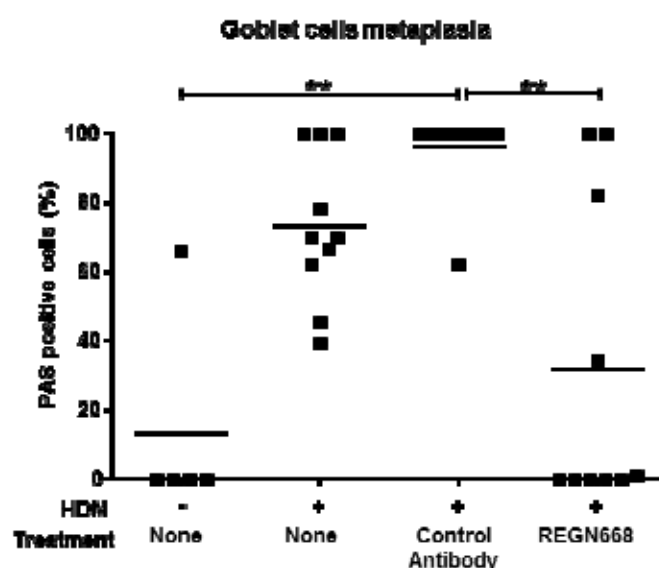
Il4ra^{hu/hu} *Il4^{hu/hu}* マウスに、生理食塩液 (n=5) 又は HDM 抽出物 (1 群 n=10) を週 3 回、4 週間鼻腔内投与した。2 群のマウスに、25 mg/kg の対照抗体又はデュピルマブ (REGN668) を 1 週目から 4 週目まで週 2 回皮下投与した。最後の HDM 処置及びデュピルマブ投与を行ってから 4 日後の 30 日目に全血を採取し、血清を分離した。血中総 IgE 濃度 (パネル A) 及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度 (パネル B) を ELISA によって測定した。HDM 非処置群では、HDM 特異的 IgG1 抗体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

図 2 - デュピルマブの *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}* マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける肺への好酸球浸潤に対する作用



Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} マウスに、生理食塩液 (n=5) 又は HDM 抽出物 (1 群 n=10) を週 3 回、4 週間鼻腔内投与した。2 群のマウスに、25 mg/kg の対照抗体又はデュピルマブ (REGN668) を 1 週目から 4 週目まで週 2 回皮下投与した。最後の HDM 処置及びデュピルマブ投与を行ってから 4 日後の 30 日目にマウスを安楽殺し、肺を採取、分離して単一細胞懸濁液とし、好酸球のフリーサイトメトリー分析に供した。好酸球は、単一生存 CD45⁺、F4/80⁺、Ly6G⁻、CD11c^{lo-int}、SiglecF^{hi} とした。各投与群の肺好酸球の典型的プロットを示す (パネル A)。活性化好酸球は、単一生存 CD45⁺、F4/80⁺、Ly6G⁻、CD11c^{int}、SiglecF^{hi} とした。パネル A の CD11c^{lo-int}、SiglecF^{hi} 集団からゲーティングした各投与群の活性化好酸球の典型的プロットを示す (パネル B)。肺の好酸球 (パネル C) 及び活性化好酸球 (パネル D) は、細胞懸濁液中の生細胞に対する出現頻度として示す。各シンボルは個別値を示す。データは GraphPad Prism (バージョン 6) を用いて解析した。Kruskal-Wallis の一元配置 ANOVA 後の Dunn の多重比較検定によって検討した好酸球の統計的有意性を示す (パネル C、* : p<0.05、** : p<0.01、*** : p<0.001)。一元配置 ANOVA 後の Tukey の多重比較検定によって検討した活性化好酸球の統計的有意性を示す (パネル D、* : p<0.05、** : p<0.01、*** : p<0.001)。

図 3 - デュピルマブの *Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}* マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける杯細胞化生に対する作用



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

2.1.2 REGN1103 のマウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける type 2 免疫応答に対する作用

[Module 4.2.1.1-3: REGN1103-MX-050]

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

REGN1103 を投与した HDM 処置野生型 Balb/c マウスは、非投与 HDM 処置マウス及び対照抗体を投与した HDM 処置マウスと比較して、血中 IgE 濃度及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度が有意に低かった (図 4)。REGN1103 投与マウスでは、非投与 HDM 処置マウス及び対照抗体を投与した HDM 処置

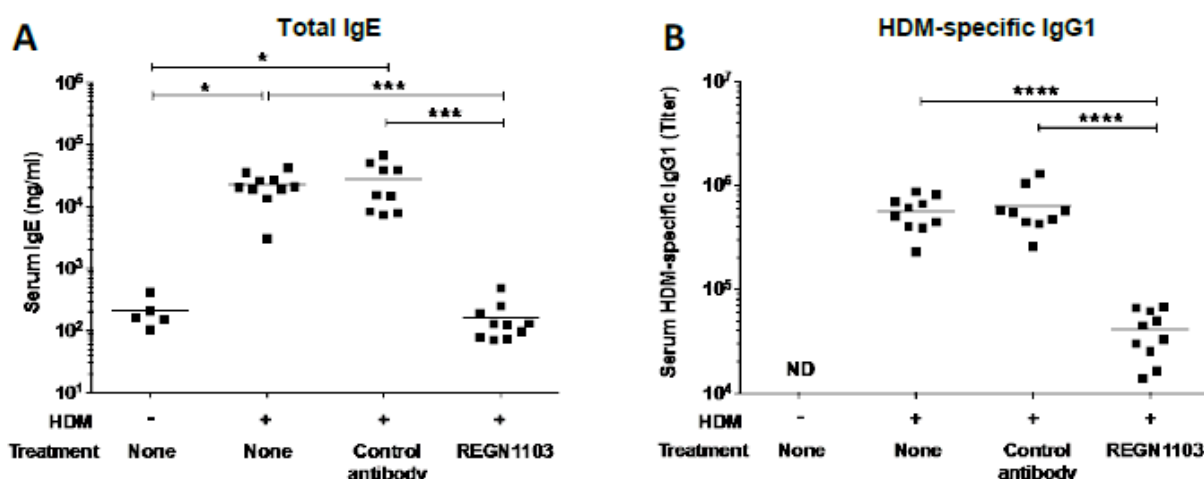
2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

マウスと比較して、肺における総好酸球及び活性化好酸球の割合が有意に低かった（図 5）。また、REGN1103 を投与した HDM 処置マウスは、対照抗体投与マウスと比較して、杯細胞化生も有意に少なかった（図 6）。25 mg/kg の用量を週 2 回投与して評価したすべてのエンドポイントにおいて有効性が認められた。抗 mIL-4R α 抗体の ELISA により測定した安楽殺時の平均血清中 REGN1103 濃度は 387.07 μ g/mL であった。

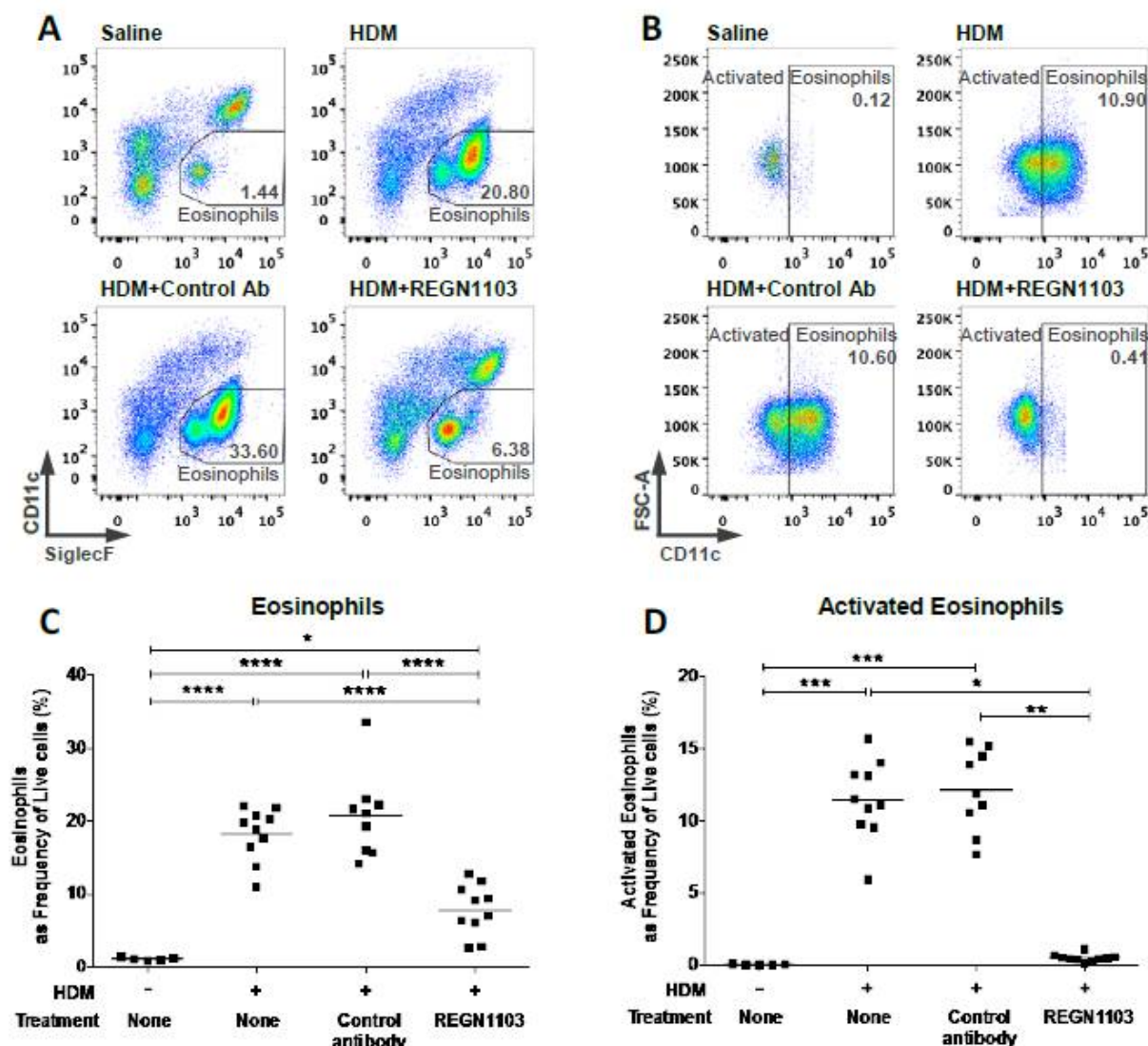
Balb/c マウスを用いた HDM 誘発性肺炎モデルにおける REGN1103 の有効性は、*Il4ra*^{hu/hu} *Il4*^{hu/hu} マウスにおけるデュピルマブの有効性と同程度であった。デュピルマブの試験では、REGN1103 の試験で用いたマウスと比較して、投与群内の個体間変動が大きかった。これは、REGN1103 の試験は同種（homogenous）遺伝子型のマウスを用いて実施したのに対して、デュピルマブの試験では混合系（mixed strain）遺伝子型のマウスを用いて実施したためと考えられる。

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



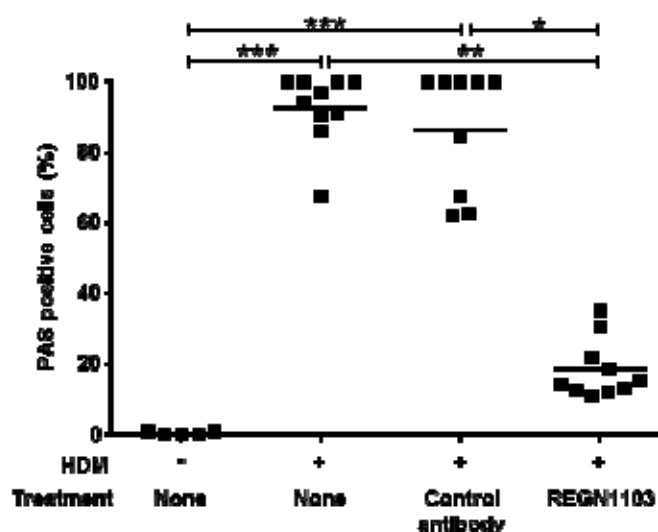
野生型 Balb/c マウスに、生理食塩液（n=5）又は HDM 抽出物（1 群 n=9~10）を週 3 回、4 週間鼻腔内投与した。2 群のマウスに、25 mg/kg の対照抗体又は REGN1103 を 1 週目から 4 週目まで週 2 回皮下投与した。最後の HDM 処置及び REGN1103 投与を行ってから 3 日後の 30 日目に全血を採取し、血清を分離した。血中総 IgE 濃度（パネル A）及び血中 HDM 特異的 IgG1 濃度（パネル B）を ELISA によって測定した。HDM 非処置群では、HDM 特異的 IgG1 抗体は、検討した最低希釈（1:100）で検出不可能であっ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

図 5 - REGN1103 の Balb/c マウス 4 週間アレルギー誘発性肺炎モデルにおける肺への好酸球浸潤に対する作用



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

Goblet cell metaplasia



2.1.3 デュピルマブのマウス4週間アレルギー性喘息モデルにおける肺機能及び炎症細胞浸潤に対する作用

以前実施した試験においては、肺摘出前に瀉血処置を行っても、肺組織に血液を供給する血管内に残存する好酸球と、肺組織に浸潤した好酸球を分離して評価することはできなかった。また、肺機能に対するデュピルマブの作用は検討されていなかった。そのため、以下の項目に対するデュピルマブの作用を検討するため、3つの独立した試験を新たに実施した。

- 1) 血液から肺への免疫細胞の浸潤
- 2) 肺でのケモカイン及び **type 2** 炎症性サイトカインの発現
- 3) 肺機能及びムスカリン受容体アゴニストである **MCh** 刺激時の **AHR**

各試験において、3群の *Il4ra^{hu/hu}* *Il4^{hu/hu}* マウス (n=9 又は 10/群) に HDM を週 3 回 4 週間にわたり鼻腔内投与し、対照 (非感作) 群には生理食塩液を鼻腔内投与した (n=5 又は 9/群)。HDM 処置した 1 群に、アイソタイプ対照 IgG4^D 抗体を、1 群に用量 10 mg/kg (試験 1) 若しくは 25 mg/kg (試験 2)

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

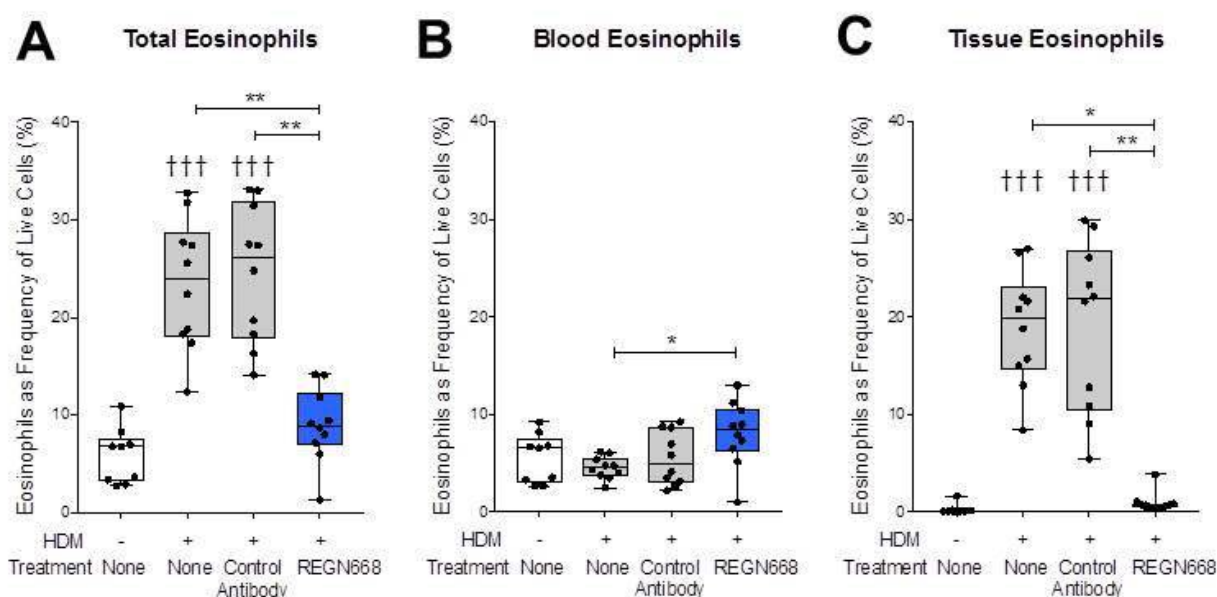
及び3) のデュピルマブのいずれかを週2回皮下投与した。もう1群には抗体を投与しなかった（抗体非投与対照群）。

両用量のデュピルマブにより、HDM 誘発性 IgE 抗体価上昇が抑制された。

血液中の免疫細胞と肺組織中の免疫細胞を区別するために二重染色法を用いて評価した(15)。4週間の HDM 曝露により、肺への好酸球浸潤の有意な増加がみられた。アイソタイプ対照抗体は好酸球浸潤に影響を及ぼさなかったが、4週間にわたりデュピルマブを投与すると、肺への好酸球浸潤が抑制された（アイソタイプ対照抗体との比較で 96%低下、 $p < 0.01$ 、図 7 C）。この肺への好酸球浸潤に対する強力な抑制作用に伴って、血液中の好酸球数は、抗体非投与対照群（4.5%、 $p < 0.05$ ）又はアイソタイプ対照抗体群（5.5%、 $p = ns$ ）に比べて、デュピルマブ投与群（8%）では増加又は増加傾向が認められた（図 7 B）。これらの試験結果から、デュピルマブは好酸球の産生及び骨髄から血液中への放出に影響することなく、肺組織への好酸球浸潤を抑制する結果、血液コンパートメント中で好酸球の軽度の蓄積を生じることが示唆された。喘息患者にデュピルマブを投与したときにも、同様に血液中の好酸球増加が認められている（[Module 2.7.4]）。

デュピルマブは、血液及び肺組織の両方において、活性化 CD23⁺ B 細胞、並びにアレルギー性疾患に関連すること(16)、IL-5 を放出する組織常在型病原性メモリーTh2 細胞サブセットであること (17) が報告されている病原性 ST2⁺ CD4⁺ T 細胞の出現頻度を顕著に低下させた。さらに、デュピルマブは、HDM によって誘導される主要な好酸球走化性因子エオタキシン 1 (*Ccl11*) 並びに type 2 炎症性サイトカイン *IL4*、*IL5* 及び *IL6* の mRNA 発現もアイソタイプ対照抗体と比較して有意（すべて $p < 0.05$ ）に抑制した。また、デュピルマブ投与マウスにおいて測定したケモカイン及びtype 2 サイトカイン(*Ccl11*、*Ccl24*、*Ccl17* [TARC]、*Ccl2* [MCP-1]、*IL4*、*IL5*、*IL13* 及び *IL6*) の mRNA 発現量はすべて HDM 無処置マウスと同程度であった。これらのデータから、デュピルマブは、病原性免疫細胞を組織へと誘引し、組織炎症を促進する強力な化学誘引物質であるケモカイン及び type 2 サイトカインの発現を抑制することにより、HDM 処置マウスの肺への免疫細胞浸潤を阻害する可能性が示唆された。

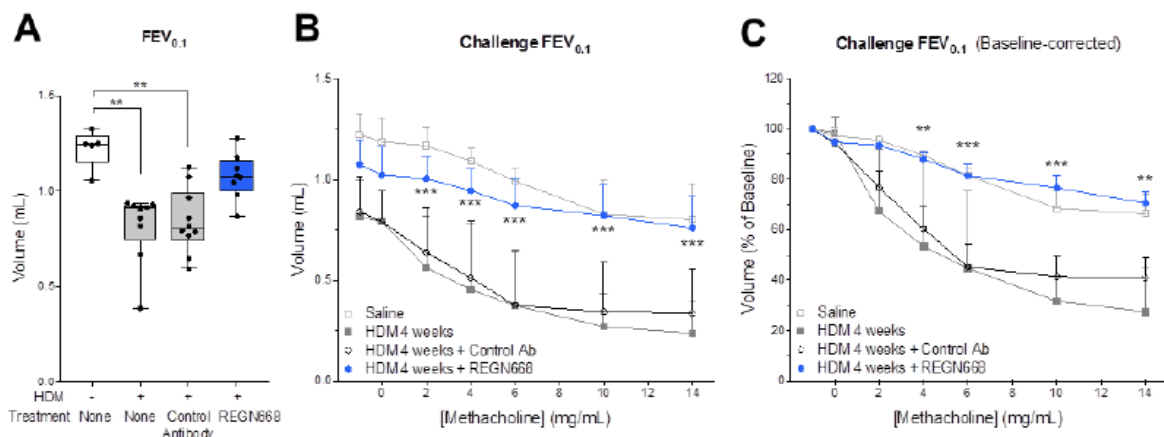
図 7 - デュピルマブの HDM 誘発喘息モデルにおける肺への好酸球浸潤に対する作用



Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu} マウスに生理食塩液 (n=9、白ボックス) 又は HDM (n=10/群、灰色及び青ボックス) を週 3 回 4 週間にわたり鼻腔内投与した。2 群の HDM 処置マウスには、初回 HDM 処置 1 日後からアイソタイプ対照抗体又はデュピルマブを 10 mg/kg の用量で週 2 回皮下投与した。最終 HDM 処置 4 日後（試験 30 日目）に、循環血中のすべての免疫細胞を標識するため、マウスに BV650 標識抗 CD45 抗体を投与し、5 分後に安楽殺した。肺を摘出して単細胞浮遊液へと解離させ、フローサイトメトリー分析により、総計 (A)、血液 (B) 及び組織特異的 (C) 炎症細胞を測定した。血中の免疫細胞は *in vivo* CD45^{hi}、*ex vivo* CD45^{lo-int} と定義し、組織免疫細胞は *in vivo* CD45^{lo-int}、*ex vivo* CD45^{hi} と定義した。さらに、好酸球は、live, singlet, CD45⁺, F4/80⁺, Ly6G⁻, CD11c^{lo-int}, SiglecF^{hi} と定義し、細胞浮遊液中の生細胞に対する出現頻度として示した。各プロットはマウスの個別値を表す。データは GraphPad Prism (バージョン 6) を用いて解析した。好酸球総計及び組織中の好酸球に関する統計学的有意性は、Kruskal Wallis の一元配置分散分析後の Dunn の多重比較検定により判定し、血液中の好酸球に関する統計学的有意性は、一元配置分散分析後の Tukey の多重比較検定により判定した。**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 は群間比較、†*p*<0.05, ††*p*<0.01, †††*p*<0.001 は HDM 無処置マウスとの比較を示す。

4 週間の HDM 処置により、0.1 秒量 (FEV_{0.1}) が有意に低下し、2 mg/mL 超の MCh により惹起される反応にも有意な障害が生じた。一方、デュピルマブを 4 週間投与すると、MCh 惹起前 (図 8A) 及び惹起中 (図 8B 及び C) の FEV_{0.1} の低下が抑制され、HDM 誘発性肺機能障害抑制効果が認められた。デュピルマブ投与マウスは、HDM 無処置マウスと同等の AHR を示した。アイソタイプ対照抗体は、肺機能及び MCh 惹起反応に対して影響を及ぼさなかった。

図 8 - デュピルマブの HDM 誘発喘息モデルにおける肺機能障害に対する作用



Il4ra^{hu/hu} マウスに生理食塩液 (n=5) 又は HDM (n=9 又は 10/群) を週 3 回 4 週間にわたり鼻腔内投与した。2 群の HDM 処置マウスには、初回 HDM 処置 1 日後からアイソタイプ対照抗体又はデュピルマブの 25 mg/kg を週 2 回皮下投与した。最終 HDM 処置 72~100 時間後、強制振動法及び flexiVent®法を用いた陰圧強制呼気により、マウスの肺機能及び AHR を評価した。初回測定 (A) 後、マウスに漸増用量 (0、2、4、6、10 及び 14 mg/mL) の MCh を 1 回当たり 10 秒間噴霧し、肺機能を記録した。なお、次の用量に進む前に、volume history を正常化させ、マウスの呼吸器系に残存する MCh を除去するため、deep inflation を実施した。表示用量の MCh での FEV_{0.1} を絶対値 (B) 及び、ベースラインに対する相対値 (C) で示す。各プロットは個別値 (A) 又は平均値+標準偏差 (B 及び C) を表す。FEV_{0.1} に関する統計学的有意性は、Kruskal Wallis の一元配置分散分析後の Dunn の多重比較検定により判定し、惹起後の FEV_{0.1} (絶対値及びベースライン補正值) に関する統計学的有意性は、二元配置分散分析後の Tukey の多重比較検定により判定した。データは GraphPad Prism (バージョン 6) を用いて解析した。**p*<0.05、***p*<0.01、****p*<0.001。B 及び C では、デュピルマブ投与群と対照抗体投与群の比較を示す。

以上より、デュピルマブは、本アレルギー性喘息モデルマウスにおいて、炎症性サイトカイン及びケモカインの発現、肺への免疫細胞浸潤、肺炎及び杯細胞化生、アレルギー誘発性肺機能障害を抑制すると考えられた。

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

3 副次的薬理試験

該当なし

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

4 安全性薬理試験

該当なし

5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし

6 考察及び結論

デュピルマブ投与により、コントロール不良な持続性喘息患者で肺機能が改善し、重度の増悪が抑制されるとともに(10)、エオタキシンが減少することが明らかになっている(18)。アレルギー性喘息モデルマウスを用いた試験においても、デュピルマブ投与により、*Ccl11* の発現が強力に阻害され、これに伴って肺への好酸球浸潤が抑制され、肺機能障害が妨げられた。本 type 2 炎症モデルにおいて、デュピルマブ及び REGN1103 は、いずれも血中 IgE 濃度及び血中アレルギー特異的 IgG1 濃度を低下させ、肺好酸球浸潤を抑制し、杯細胞化生を抑制した。また、デュピルマブ投与により、血液中の好酸球数は増加傾向を示したものの、肺機能障害が抑制されたことから、血液中の好酸球数と、組織中の好酸球数及び肺機能は区別して考える必要があると考えられた。臨床試験においても同様に、血液中の好酸球数が増加したにもかかわらず、肺機能が改善したという結果が得られている([Module 2.7.4])。

参 考 文 献

1. Gandhi NA, Bennett BL, Graham NM, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2016 15:35-50.
2. Macdonald LE, Karow M, Stevens S, Auerbach W, Poueymirou WT, Yasenchak J, et al. Precise and in situ genetic humanization of 6 Mb of mouse immunoglobulin genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014 111(14):5147-52.
3. Murphy AJ, Macdonald LE, Stevens S, Karow M, Dore AT, Pobursky K, et al. Mice with megabase humanization of their immunoglobulin genes generate antibodies as efficiently as normal mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014 111(14):5153-8.
4. Yang X, Ambrogelly A. Enlarging the repertoire of therapeutic monoclonal antibodies platforms: domesticating half molecule exchange to produce stable IgG4 and IgG1 bispecific antibodies. *Curr Opin Biotech*. 2014 30:225-9.
5. van de Pol MA, Lutter R, van Ree R, van der Zee JS. Increase in allergen-specific IgE and ex vivo Th2 responses after a single bronchial challenge with house dust mite in allergic asthmatics. *Allergy*. 2012 67(1):67-73.
6. Gregory LG, Causton B, Murdoch JR, Mathie SA, O'Donnell V, Thomas CP, et al. Inhaled house dust mite induces pulmonary T helper 2 cytokine production. *Clin Exp Allergy*. 2009 39(10):1597-610.
7. Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, et al. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 169(3):378-85.
8. Johnson JR, Roos A, Berg T, Norm M, Fuxe J. Chronic respiratory aeroallergen exposure in mice induces epithelial-mesenchymal transition in the large airways. *PloS ONE*. 2011 6(1) e16175: 1-9.
9. Llop-Guevara A, Colangelo M, Chu DK, Moore CL, Steiber NA, Walker TD, et al. In vivo-to-in silico iterations to investigate aeroallergen-host interactions. *PloS ONE*. 2008 3(6) e2426:1-10
10. Wenzel S, Castro M, Corren J, Maspero J, Wang L, Zhang B. et al. Dupilumab efficacy and safety in adults with uncontrolled persistent asthma despite use of medium-to-high-dose inhaled corticosteroids plus a long-acting B2 agonist: a randomised double-blind placebo-controlled pivotal phase 2b dose-ranging trial. *Lancet* 2016 388:31-44.
11. Busse, WW and Lemanske R. Asthma . *N Engl J Med*. 2001 344:350-62.
12. Devos, FC, Maaske A, Robichaud A, Pollaris L, Seys S, Lopez CA, et al. Forced expiration measurements in mouse models of obstructive and restrictive lung diseases. *Res Rep*. 2017 18(123): 1-14.
13. Walker JKL, Kraft M, Fisher JT. Assessment of murine lung mechanics outcome measures: alignment with those made in asthmatics. *Front Physiol*. 2012 3(491): 1-14.

2.6.2 薬理試験の概要文

SAR231893 - デュピルマブ（遺伝子組換え）

14. Calderón MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, De Blay F, Hernandez Fernandez de Rojas D, Virchow JC, et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J Allergy Clin Immunol*. 2015 136(1):38-48.
15. Turner DL, Bickham KL, Thome JJ, Kim CY, D'Ovidio F, Wherry EJ, et al. Lung niches for the generation and maintenance of tissue-resident memory T cells. *Mucosal Immunol*. 2014 7(3): 501-10.
16. Wambre E, Bajzik V, Delong JH, O'Brien K, Nguyen QA, Speake C, et al. A phenotypically and functionally distinct human Th2 cell subpopulation is associated with allergic disorders. *Sci Transl Med*. 2017 9(401) eaam9171: 1-10.
17. Endo Y, Hirahara K, Yagi R, Tumes DJ, Nakayama T. Pathogenic memory type Th2 cells in allergic inflammation. *Trends Immunol*. 2014 35(2): 69-78.
18. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Lawrence S, Skobieranda F, et al. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med*. 2013 368: 2455-66.

サノフィ株式会社

デュピルマブ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 – 非臨床概要

2.6.3 薬理試験概要表（気管支喘息）

Total number of pages: 8

目 次

表 目 次.....	3
1 薬理試験一覧表.....	4
2 効力を裏付ける試験	5
3 副次的薬理試験.....	6
4 安全性薬理試験.....	7
5 薬力学的薬物相互作用試験	8

表 目 次

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program	4
---	---

1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program

Primary Pharmacodynamics				
Overview	Test Article: dupilumab			
Type of Study	Test System	Testing Facility	Study Number	Location
Efficacy of dupilumab on Lung Function and Inflammatory Cell Infiltrate in a Four-Week Model of Allergic Asthma (non-GLP)	<i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> mouse	██████████	R668-PH-████214-SR-01V1	[4.2.1.1-1]
Efficacy of dupilumab in a four-week mouse model of allergen-induced lung inflammation (non-GLP)	<i>Il4ra^{hu/hu} Il4^{hu/hu}</i> mouse	██████████	REGN668-MX-████052	[4.2.1.1-2]
Efficacy of REGN1103 in a four-week mouse model of allergen-induced lung inflammation (non-GLP)	Balb/c mouse	██████████	REGN1103-MX-████050	[4.2.1.1-3]

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

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

2 効力を裏付ける試験

試験結果は Module 2.6.2 に記載した。

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

3 副次的薬理試験

該当なし

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

4 安全性薬理試験

該当なし

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

5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし