サノフィ株式会社

マブキャンパス点滴静注 30mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 18

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 6

2.1　移植片拒絶予防におけるアレムツズマブの効果 6

2.2　GVHD 予防におけるアレムツズマブ の効果 6

2.2.1　In vivo 6

2.2.1.1　GVHD モデルマウスにおけるアレムツズマブ投与の効果 6

2.2.1.2　GVHD モデルマウスにおけるアレムツズマブ誘導ヒト Treg 細胞投与の効果 9

3　副次的薬理試験 13

4　安全性薬理試験 14

5　薬力学的薬物相互作用試験 15

6　考察及び結論 16

7　図表 17

参 考 文 献 18

図　目　次

図 1 - hu-PBL-SCID マウスの生存率推移 7

図 2 - hu-PBL-SCID マウスの体重及び GVHD スコアの推移 8

図 3 - hu-PBL-SCID マウスにおけるサイトカインストーム抑制効果 9

図 4 - Xenogeneic GVHD マウスの生存率及び体重推移 10

図 5 - Xenogeneic GVHD マウスのヒト PBMC 移植後血清中ヒト IFN-γ、IL-6 及びマウス血清アミロイド A 濃度 11

図 6 - Xenogeneic GVHD マウスの盲腸 12

略号と用語の定義

略号、用語	定義
GVHD	移植片対宿主病（graft-versus host disease）
IFN	インターフェロン（interferon）
IL	インターロイキン（interleukin）
PBMC	末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cells）
TNF	腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor）
Treg 細胞	制御性 T 細胞（regulatory T cell）

1　まとめ

マブキャンパス点滴静注 30mg［一般名：アレムツズマブ（遺伝子組換え）］は、細胞表面抗原 CD52 を標的とするヒト化モノクローナル抗体である。

アレムツズマブによる同種造血幹細胞移植の際の移植片拒絶予防は、CD52 を発現するレシピエントの免疫細胞がアレムツズマブにより除去されることによるものと考えられる。この免疫細胞除去作用については初回申請 CTD Module 2.6.2 の 2 項「効力を裏付ける試験」を参照のこと。

アレムツズマブによる同種造血幹細胞移植の際の移植片対宿主病（GVHD）予防に関しては、本申請にあたって社内で追加実施された非臨床薬理試験はなく、文献情報を用いて評価した。

GVHD の hu-PBL-SCID モデルマウス及び xenogeneic GVHD モデルマウスを用いた *in vivo* 試験において、ヒト PBMC 移植後の GVHD がアレムツズマブあるいはアレムツズマブで誘導したヒト制御性 T 細胞（Treg 細胞）により抑制されることが示された。

2　効力を裏付ける試験

2.1　移植片拒絶予防におけるアレムツズマブの効果

アレムツズマブによる同種造血幹細胞移植の際の移植片拒絶予防は、CD52 を発現するレシピエントの免疫細胞がアレムツズマブにより除去されることによるものと考えられる。この免疫細胞除去作用については初回申請 CTD Module 2.6.2 の 2 項「効力を裏付ける試験」を参照のこと。

2.2　GVHD 予防におけるアレムツズマブ の効果

2.2.1　In vivo

2.2.1.1　GVHD モデルマウスにおけるアレムツズマブ投与の効果

Chen X ら（2013）(1)

Taconic（Rensselaer、NY）から SCID マウス（C.B-*Igh-1*^{b}/IcrTac-*Prkdc*^{scid}; 5～7 週齢）を購入し、以下に示す Wilson らの方法 (2) に従って、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）移植 hu-PBL-SCID マウス GVHD モデルを作製した。滅菌マイクロアイソレーションケージに収容し、オートクレーブした食物および水を与えた。10 日間の馴化期間の後、試験 －1 日目に各マウスに 20 µL のアシアロ GM-1 を腹腔内投与し、放射線照射（325 cGy）を実施した。翌日（試験 0 日目）に、各マウスに無血清治療グレード AIM-V 培地 200 µL に懸濁した 5×10^{7} 個の新鮮なヒト末梢血単核細胞（PBMC）を腹腔内投与した。

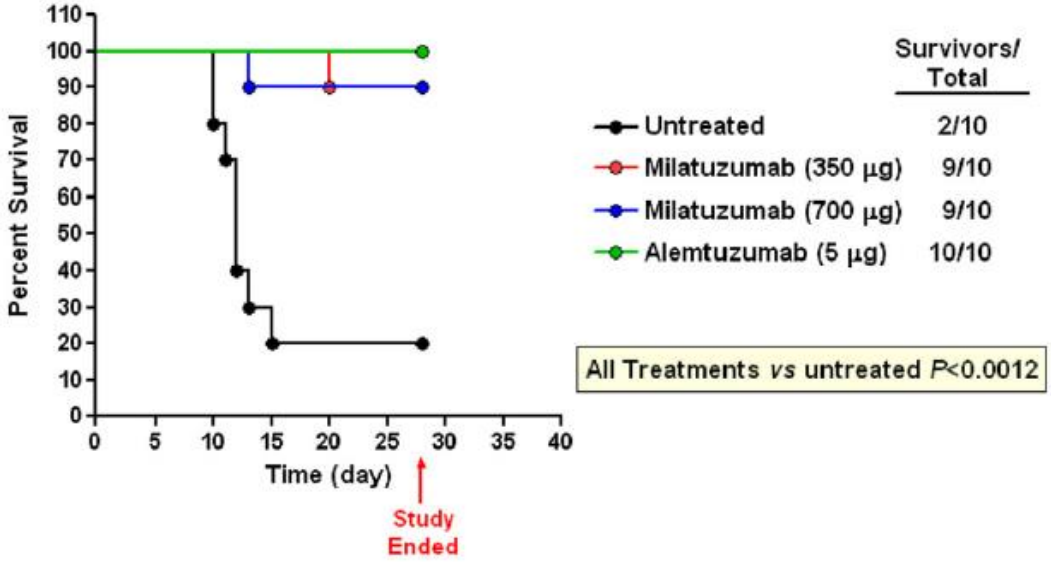
ヒト PBMC 移植の 3 時間前に、抗 CD74 抗体である milatuzumab を 350 又は 700 µg/マウス、あるいはアレムツズマブを 5 µg/マウスの用量で腹腔内投与した。これらの他に抗体を投与しない無処置対照群を設けた。

GVHD の臨床徴候に関連する 6 つの項目、すなわち体重減少、姿勢、活動、毛皮の質感、皮膚の完全性、及び下痢について GVHD 採点システムとして記録し、毎日マウスを評価した。

28 日間の観察期間中、無処置マウスでは 8/10 匹が死亡したが、アレムツズマブ投与マウスには死亡は認められなかった（図 1）。無処置対照群と比べ、アレムツズマブ投与マウスでは有意な体重減少の抑制及び GVHD スコアの低下が認められ、その程度は milatuzumab（700 µg/マウス）投与と同様であった（図 2）。

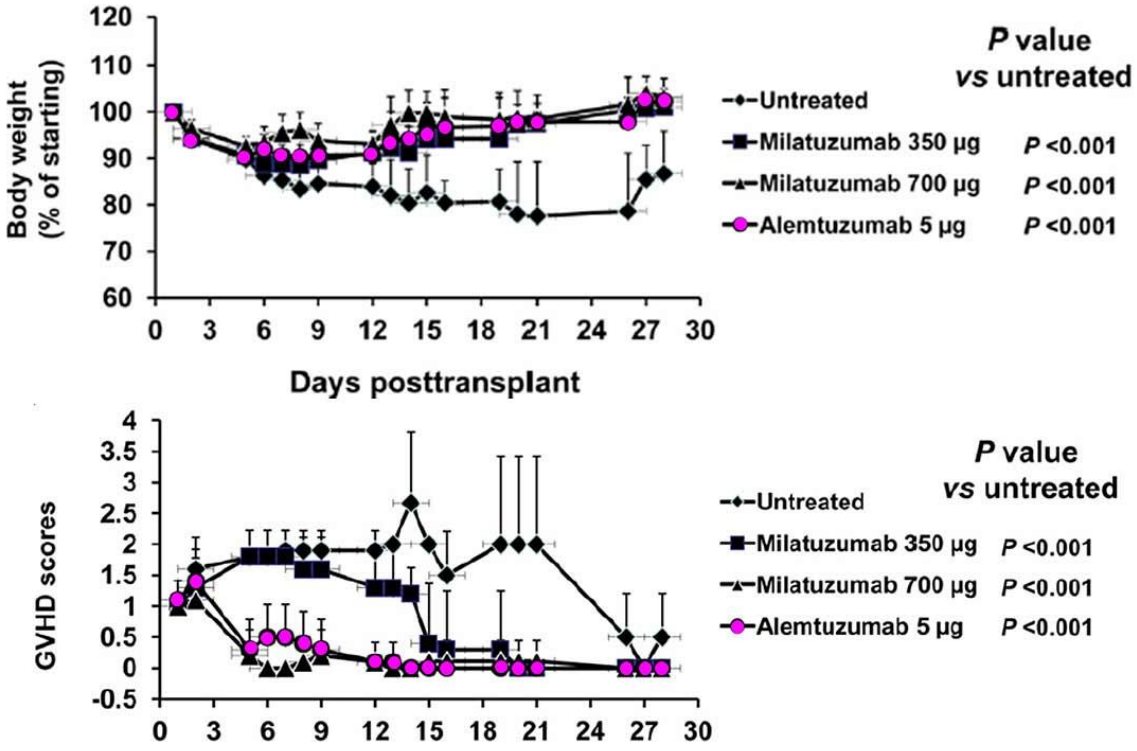
また、アレムツズマブはヒト PBMC 移植後のインターフェロン-γ（IFN-γ）及びインターロイキン-5（IL-5）の血清中濃度上昇、すなわちサイトカインストームを、有意に抑制した（図 3）。

図 1 - hu-PBL-SCID マウスの生存率推移



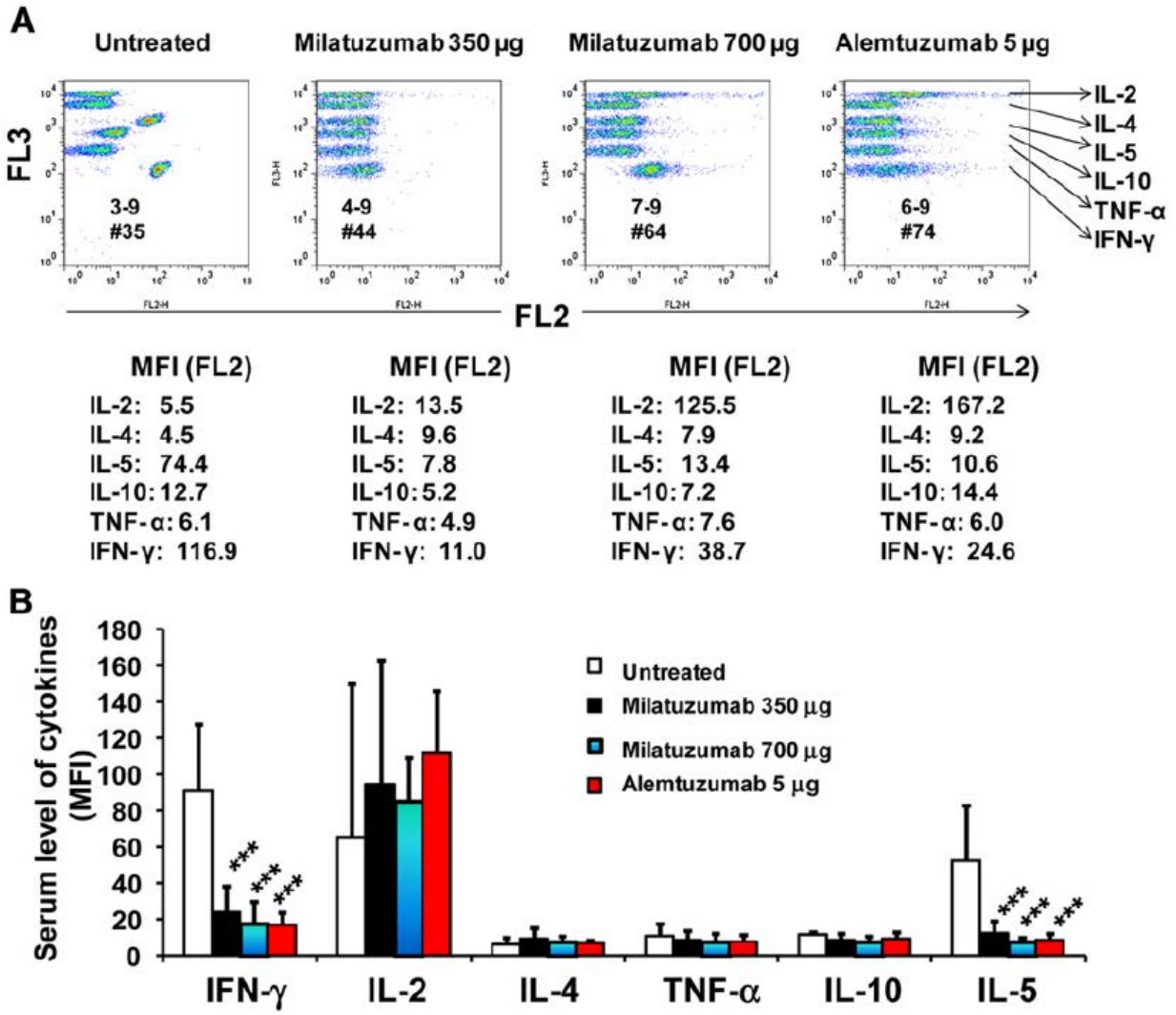
Alemtuzumab=アレムツズマブ、検定：paired *t* test（文献の図 4A を引用）

図 2 - hu-PBL-SCID マウスの体重及び GVHD スコアの推移



Alemtuzumab=アレムツズマブ、検定：体重変化は一般化線形モデル適用 ANOVA、GVHD スコアは一般化推定方程式アプローチ（文献の図 4C 及び D を改変引用）

図 3 - hu-PBL-SCID マウスにおけるサイトカインストーム抑制効果



試験 28 日目に採取した血清サンプルを用いて測定
略号 : MFI=平均蛍光強度、IL=インターロイキン、TNF=腫瘍壊死因子、IFN=インターフェロン、Alemtuzumab=アレムツズマブ、検定：paired *t* test、***：無処置対照群に対して p<0.001（文献の図 6 を引用）

2.2.1.2 GVHD モデルマウスにおけるアレムツズマブ誘導ヒト Treg 細胞投与の効果

Watanabe T ら（2006）(3)

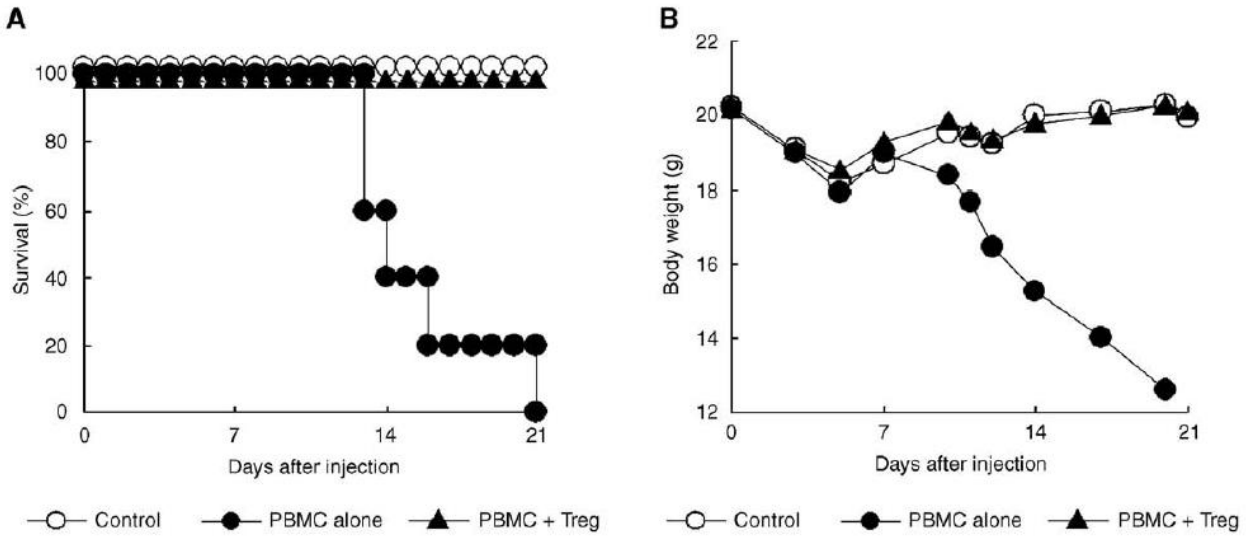
ヒト $CD4^+$細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD52 抗体で共刺激して培養すると、抗 CD3 単独での刺激と比べてより強く Treg 細胞が誘導されることが報告されているが(4)、抗 CD52 抗体であるアレムツズマブで誘導した Treg 細胞を GVHD モデルマウスに投与した場合の効果が調べられている。

アレムツズマブ誘導ヒト Treg 細胞は、以下の方法で調製した。健常ヒト PBMC から分離した $CD4^+$ T 細胞を抗 CD3 抗体 orthoclone OKT3（100 ng/mL）及びアレムツズマブ（30 μg/mL）でコートした 48 ウェル細胞培養プレート上で 3 日間処理（8×10^5 細胞/ウェル）した後に回収、洗浄し、IL-2（100U/mL）存在下で 7~8 日間培養（5 日目に 1×10^6 細胞/ウェルになるよう希釈）後、抗 CD3 抗体及びアレムツズマブで再度 3 日間処理し、その後 4 日間、抗体及び IL-2 非存在下で培養した。

Xenogenic GVHD モデルマウスとして、8 週齢の雌 CB-17/Icr-scid (SCID)マウス（クレア、東京）にヒト PBMC を注射する 1 日前に、抗 IL-2 受容体 β 鎖抗体（TM-β1）を 20 μg 腹腔内投与し、コンディショニングとして亜致死量全身放射線照射（2.5 Gy）した後、ヒト PBMC（1×10^7）を単独あるいは抗 CD3 抗体とアレムツズマブで誘導したヒト Treg 細胞（1×10^7）と共に腹腔内投与した。対照群にはヒト PBMC でなくリン酸緩衝生理食塩水を腹腔内投与した。各群 10 匹のマウスを用い、5 匹については生存率及び体重推移を 21 日間観察し、他の 5 匹については細胞移植後 11 日目に安楽殺してヒトサイトカイン、マウス血清アミロイド A 測定及び消化管の病理組織学的検査を実施した。

21 日間の観察期間中、ヒト PBMC のみを投与したマウスでは全例（5/5 匹）が死亡したが、ヒト PBMC と共にアレムツズマブ誘導ヒト Treg 細胞を投与したマウスには死亡は認められず（図 4 A）、体重もリン酸緩衝生理食塩水投与対照群と同様の推移を示した（図 4 B）。

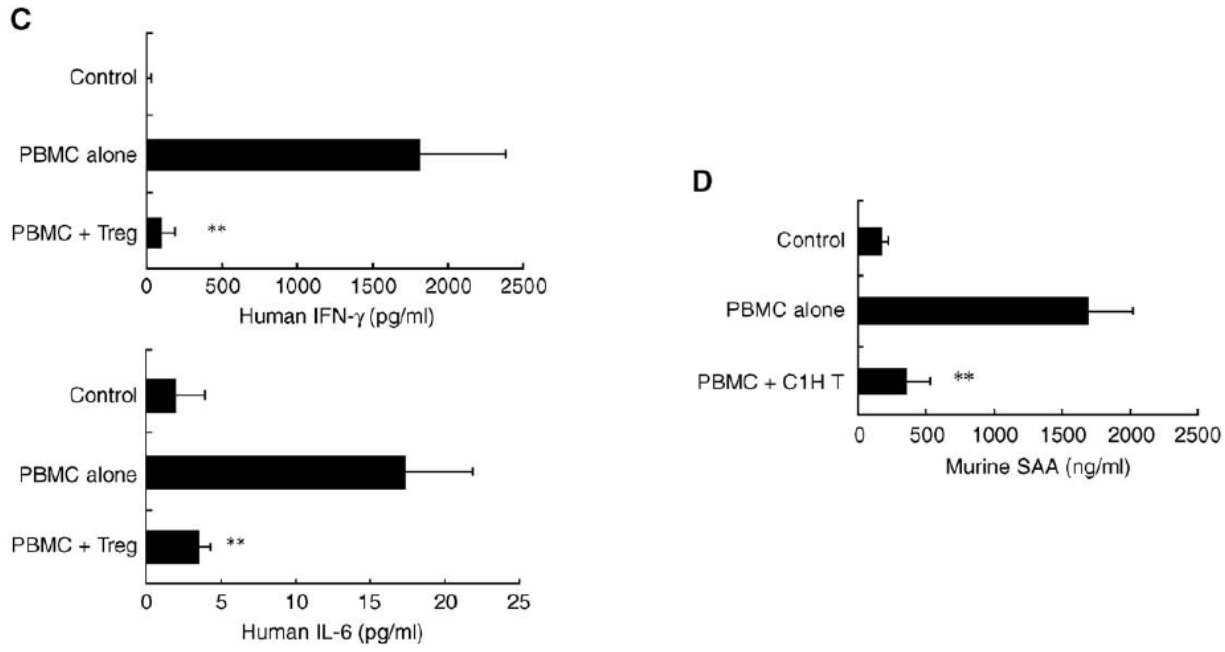
図 4 - Xenogeneic GVHD マウスの生存率及び体重推移



匹数：各群 5 匹
略号：Treg：アレムツズマブ誘導ヒト Treg 細胞（文献の図 5A、B を引用）

また、細胞移植 11 日後に安楽殺（各群 5 匹）して採取した血清中のヒト IFN-γ、IL-6 及びマウス血清アミロイド A の濃度は、ヒト PBMC のみを投与したマウスでは上昇しており、移植したヒト細胞の活性化（おそらく T 細胞）及びマウスの炎症反応が生じていたことを示していたが、アレムツズマブ誘導ヒト Treg 細胞をヒト PBMC と共に投与した場合では、その上昇が有意に抑制された（図 5）。

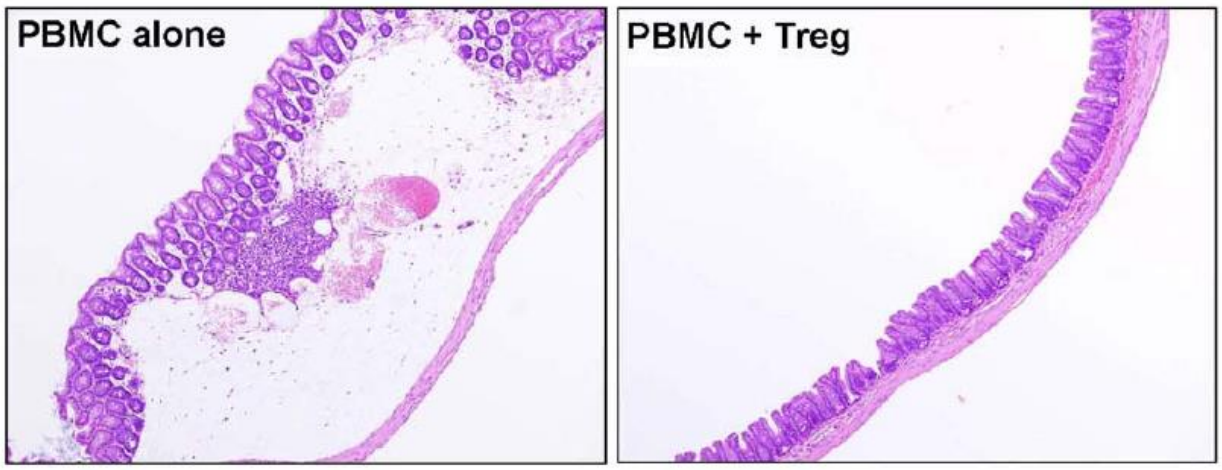
図 5 - Xenogeneic GVHD マウスのヒト PBMC 移植後血清中ヒト IFN-γ、IL-6 及びマウス血清アミロイド A 濃度



匹数：各群 5 匹、平均±標準偏差、**：ヒト PBMC のみ投与群と比べて p<0.01（unpaired t 検定）
略号：Treg 及び C1H T：アレムツズマブ誘導ヒト Treg 細胞、SAA：血清アミロイド A（文献の図 5C、D を引用）

細胞移植 11 日後の盲腸の病理組織学的検査において、ヒト PBMC のみを腹腔内投与したマウスでは粘膜下に顕著な浮腫及び出血がヒト $CD3^+$ T 細胞浸潤を伴って認められたが（図 6 左）、アレムツズマブ誘導ヒト Treg 細胞をヒト PBMC と共に投与したマウスでは変化は認められなかった（図 6 右）。

図 6 - Xenogeneic GVHD マウスの盲腸



略号：Treg：アレムツズマブ誘導ヒト Treg 細胞（文献の図 5E を引用）

3　副次的薬理試験

今回の一部変更承認申請に伴う副次的薬理試験資料はない。本剤の初回申請時に実施した副次的薬理試験については、初回申請 CTD Module 2.6.2 を参照のこと。

4　安全性薬理試験

今回の一部変更承認申請に伴う安全性薬理試験資料はない。本剤の初回申請時に実施した安全性薬理試験については、初回申請 CTD Module 2.6.2 を参照のこと。

5　薬力学的薬物相互作用試験

アレムツズマブの薬力学的薬物相互作用の試験は実施していない。

6　考察及び結論

アレムツズマブによる同種造血幹細胞移植の際の移植片拒絶予防は、CD52 を発現するレシピエントの免疫細胞がアレムツズマブにより除去されることによるものと考えられる。この免疫細胞除去作用については初回申請 CTD Module 2.6.2 の 2 項「効力を裏付ける試験」を参照のこと。

同種造血幹細胞移植の際の GVHD 予防に関しては、本申請にあたって社内で追加実施された非臨床薬理試験はなく、文献情報を用いて評価した。

Chen らが実施した *in vivo* 試験(1)では、ヒト PBMC 腹腔内投与 hu-PBL-SCID モデルマウスにおいて、ヒト PBMC 移植 3 時間前にアレムツズマブを腹腔内投与したところ、移植後の GVHD 反応（死亡、体重減少、サイトカインストーム）が抑制された。同様の結果は Wilson らが実施した試験でも得られており(2)、表面に CD52 抗原を発現しているヒト PBMC 由来の T 細胞が、アレムツズマブにより除去されたことによるものと推察された。同種造血幹細胞移植における GVHD は、ドナー由来の免疫細胞がレシピエントの器官・組織を攻撃することにより生じる移植関連の合併症であるが、アレムツズマブが表面に CD52 抗原を発現しているドナー由来の T 細胞を除去することにより、同種造血幹細胞移植後の重篤な合併症である GVHD を抑制することが期待された。

Watanabe らが実施した *in vivo* 試験(3)では、ヒト PBMC 腹腔内投与 xenogenic GVHD モデルマウスにおいて、ヒト PBMC 移植と同時にアレムツズマブを用いて誘導したヒト Treg 細胞を腹腔内投与したところ、移植後 GVHD 反応（死亡、血清中ヒト IFN-γ、IL-6 及びマウス血清アミロイド A 濃度上昇、盲腸の粘膜下水腫、出血及び細胞浸潤）が抑制された。初回申請において示したように、*in vitro* で正常ヒト T 細胞をアレムツズマブ及び補体と共に補体依存性細胞傷害作用処理した後に残存した細胞集団では、Treg 細胞の割合（%）が対照と比較し有意に増加していた（10GSTR058 試験）。この Treg 細胞は、同種異系樹状細胞の刺激に対するアネルギー性や自己 T 細胞の同種異系反応抑制作用で示される機能的な調節性活性を示していた。また、アレムツズマブを 12 mg/日の用量で連日 5 日間、その後 12 ヵ月目に連日 3 日間持続静注した再発寛解型多発性硬化症患者では、T リンパ球枯渇後の再構成で拡張（expansion）した Treg 細胞が 2 回目投与後も長期（～2 年）にわたり維持されていることが確認されている(5)。これらのことから、アレムツズマブ投与後に残存、増殖したドナー由来 Treg 細胞による GVHD 抑制が期待された。

以上のようにマウスモデルにおいてアレムツズマブによる GVHD 抑制効果が示され、ヒトにおいても同様の効果が期待された。

7　図表

本文中に記載した。

参 考 文 献

1. Chen X, Chang CH, Stein R, Cardillo TM, Gold DV, Goldenberg DM. Prevention of acute graft-versus-host disease in a xenogeneic SCID mouse model by the humanized anti-CD74 antagonistic antibody milatuzumab. Biol Blood Marrow Transplant. 2013;19:28-39.
2. Wilson J, Cullup H, Lourie R, Sheng Y, Palkova A, Radford KJ, Dickinson AM, Rice AM, Hart DN, Munster DJ. Antibody to the dendritic cell surface activation antigen CD83 prevents acute graft-versus-host disease. J Exp Med. 2009;206:387-98.
3. Watanabe T, Masuyama J, Sohma Y, Inazawa H, Horie K, Kojima K, Uemura Y, Aoki Y, Kaga S, Minota S, Tanaka T, Yamaguchi Y, Kobayashi T, Serizawa I. CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4+ regulatory T cells. Clin Immunol. 2006;120:247-59.
4. Masuyama J, Kaga S, Kano S, Minota S. A novel costimulation pathway via the 4C8 antigen for the induction of CD4+ regulatory T cells. J Immunol. 2002;169:3710-6.
5. De Mercanti S, Rolla S, Cucci A, Bardina V, Cocco E, Vladic A, Soldo-Butkovic S, Habek M, Adamec I, Horakova D, Annovazzi P, Novelli F, Durelli L, Clerico M. Alemtuzumab long-term immunologic effect: Treg suppressor function increases up to 24 months. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2016:21;3:e194.