第 2 部　CTD の概要

一般名：アニフロルマブ（遺伝子組換え）

版番号：[redacted]

2.6.1　緒言
アニフロルマブ（遺伝子組換え）

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

目次 2
略語及び専門用語一覧表 3
2.6.1.1 緒言 4
2.6.1.2 アニフロルマブに関する一般情報 6
2.6.1.2.1 一般的名称 6
2.6.1.2.2 一般特性 6
2.6.1.2.3 製剤 7
2.6.1.2.4 安定性 7
2.6.1.2.5 構造 7
2.6.1.2.6 効能又は効果（案）、用法及び用量（案） 7
2.6.1.3 参考文献 7

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
ADAR	Adenosine deaminase acting on RNA gene
BAFF	B cell activating factor：B 細胞活性化因子
CD	Cluster of differentiation：白血球分化抗原
DAMP	Damage associated molecular patterns：ダメージ関連分子パターン
DNA	Deoxyribonucleic acid：デオキシリボ核酸
Fc	Fragment crystallisable：結晶形成フラグメント
FcRn	Neonatal Fc receptor：胎児性 Fc 受容体
FcγR	Fcγ receptor：Fcγ 受容体
IFN	Interferon：インターフェロン
IFNAR	Interferon alpha receptor：I 型インターフェロン α 受容体
IFNAR1	Interferon alpha receptor subunit 1：I 型インターフェロン α 受容体のサブユニット 1
IFIH1	Interferon induced with helicase C domain 1 gene
IgG1κ	Immunoglobulin G1 kappa ：免疫グロブリン G1κ
IRF5	Interferon regulatory factor 5：インターフェロン制御因子 5
ISRE	IFN-stimulated response element：インターフェロン応答配列
JAK1	Janus kinase 1：Janus キナーゼ 1
NETs	Neutrophils extracellular traps：好中球細胞外トラップ
pDC	Plasmacytoid dendritic cell：形質細胞様樹状細胞
RNA	Ribonucleic acid：リボ核酸
RNASEH2A	Ribonuclease H2 Subunit A gene
RNASE2C	Ribonuclease 2C gene
SLE	Systemic lupus erythematosus：全身性エリテマトーデス
STAT	Signal transducer and activator of transcription ：シグナル伝達兼転写活性化因子
Th17	T helper 17 cells：IL-17 産生ヘルパーT 細胞
TLR	Toll-like receptor：Toll 様受容体
TNFAIP3	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 gene
TREX1	Three-prime repair exonuclease-1 gene
TYK2	Tyrosine kinase 2：チロシンキナーゼ 2

2.6.1.1 緒言

アストラゼネカはアニフロルマブについて、標準治療を受けた中等症から重症の全身性エリテマトーデス（SLE）の成人患者の治療を適応として開発を進めている。

アニフロルマブはI型インターフェロンα受容体のサブユニット1（IFNAR1）に結合してそのシグナル伝達を阻止し、IFN-α、IFN-β及びIFN-ωを含む全てのI型IFNの生物活性を阻害するヒト免疫グロブリンG1κ（IgG1κ）のモノクローナル抗体である。アニフロルマブはまた、IFNAR1の細胞内移行を誘導し、それにより、受容体会合に利用可能な細胞表面のIFNAR1の発現レベルも低下させる。受容体を介したI型IFNのシグナル伝達を遮断することにより、IFN応答性の遺伝子発現と下流の炎症及び免疫のプロセスや事象も抑制される（Riggs et al 2018）。これまでのところ、このような薬理学的作用機序を有し、製造販売承認された治療薬はない。

SLEは、全身のあらゆる器官系が冒されうる複雑で慢性の経過をたどる不均一な自己免疫疾患である。そのため、SLE患者は様々な臨床症状を呈する。これらの臨床症状は多くの患者にとっては深刻なものであり、身体機能の低下、雇用の喪失、健康関連の生活の質への重大な影響、度重なる入院加療、累積的で不可逆的な臓器障害を来し、早期死亡の原因にもなりうる（Nived et al 2002、Alarcon et al 2004）。臓器障害は、SLEの疾患の作用 そのものや、ステロイドや他の免疫抑制剤の慢性使用に伴う治療関連の副作用によって蓄積する。

SLEの症状は患者ごとに不均一なものであることを考慮すると、単一の治療パラダイムは存在せず、患者個々の臨床症状に応じテーラーメイド治療を提供する集学的治療戦略が不可欠である（Fanouriakis and Bertsias 2019）。現在の治療法には、様々な非ステロイド性抗炎症薬、経口コルチコステロイド（プレドニゾン）、抗マラリア薬（ヒドロキシクロロキン）、免疫抑制剤（メトトレキサート及びアザチオプリンを含む）、化学療法（シクロホスファミド）、生物学的製剤（ベリムマブ及びリツキシマブを含む）、及び補助療法がある。現在の治療法・治療薬の多くは非特異的なものであり、必ずしもSLEの発症機序に関連するとはいえない広範な炎症経路を阻害するため、これが重大な毒性や臓器障害の原因となっている（Lichtman et al 2012）。過去60年間にSLEの治療薬として承認を取得した標的治療薬はベリムマブのみであり（Wallace 2015）、そのため、患者は通常、細胞毒性を有する非特異的な免疫抑制薬と副腎皮質ステロイド（糖質コルチコイド）で治療されるが、免疫抑制薬は効果が中程度であることが多く、副腎皮質ステロイドは重大な副作用を伴うものである。したがって、効果的で良好な忍容性プロファイルを有する治療薬に対するアンメットメディカルニーズは依然として高い。

SLEの発症機序には免疫系の自然免疫と獲得免疫両者の免疫調節異常が関与しており、遺伝的感受性だけでなく、ウイルス感染や紫外線などの環境因子及び特定の治療薬の投与も、SLEの進展及びフレアの誘導に寄与しうる。一般に、SLE患者では細胞残屑の除去障害が原因で、寛容性の破綻、自己抗体の産生及び免疫複合体の形成を来すとされている（Munoz et al 2005、Rahman and Isenberg 2008）。免疫複合体、損傷関連分子パターン（damage associated moleculara patterns: DAMPs）及びI型IFNは好中球細胞外トラップ（NETs）の形成を促進しうるとされており、NETsから放出された核内物質が自己抗原のソースとなって自己免疫応答を増幅させ、形質細胞様樹状細胞（pDC）によるI型IFNの産生を促すのではないかと考えられている（Yu and Su 2013）。幾つかの臨床症状は自己抗体及び免疫複合体の組織への沈着に起因している可能性があり、この沈着により二次的な炎症反応及び組織損傷が生じているのかもしれない（Mayadas et al 2009）。抗二本鎖DNA抗体、抗Ro抗体、抗リボ核蛋白質抗体など、核内抗原を標的とする抗核抗体の存在はSLEの重要な血清学的特徴といえる。これらの自己抗体はI型IFN活性及びI型IFN誘導性遺伝子発現と強い相関がある（Weckerle et al 2011、Kirou et al 2005）。

I 型 IFN は SLE をはじめとする自己免疫疾患の免疫学的病原性において中心的な役割を果たしているようである（Lichtman et al 2012、Psarras et al 2017）。*IRF5*、*TNFAIP3*、*STAT4* などの複数の遺伝子多型が I 型 IFN のシグナル伝達を促進し、SLE に対する感受性の増大に関連しているとされている（Deng and Tsao 2014）。インターフェロン症（interferonopathy）として知られている不均一性の高い重症遺伝子疾患のグループ（主に常染色体劣性遺伝のパターンを示す）は、I 型 IFN の恒常的なアップレギュレーションを特徴としている。最も研究が進んでいるインターフェロン症の Aicardi-Goutières 症候群は通常、幼児期に SLE に類似した症状がみられる（Crow and Manel 2015）。I 型 IFN の調節異常には、核酸のセンシング及びプロセシングに関連する *TREX1*、*IFIH1*、*RNASEH2A*、*RNASE2C* 及び *ADAR* などの遺伝子の変異が関与しており、これは I 型 IFN と自己免疫との関連性を強く裏付けるものである。さらに、ウイルス性肝炎患者に対する I 型 IFN の治療的使用もループス様症候群を誘発する可能性があり（Ioannou and Isenberg 2000）、IFN による治療前に抗核抗体が既存すると、SLE、関節リウマチ及び多発性筋炎を伴う自己免疫疾患症状を発現するリスクが高まる（Okanoue et al 1996）。女性は I 型 IFN 活性の基礎レベルが男性よりも高く、また、エストロゲンは TLR-7 を介した I 型 IFN の産生を促す可能性があり、ループスが女性に多くみられるはこのことが原因ではないかと考えられる（Seillet et al. 2011）。

SLE 患者の末梢血中及び皮膚では、I 型 IFN 又は IFN 誘導性遺伝子の発現レベルが著しく高く、SLE の疾患活動性及び発疹、関節痛、発熱、白血球減少症といった特定の臨床症状と相関している（Ytterberg and Schnitzer 1982、Baechler et al 2003、Bengtsson et al 2000、Kirou et al 2005; Chiche et al 2014）。I 型 IFN 産生に特化した細胞である pDC も、病変部位の皮膚や腎臓で増殖が見られる（Saadeh et al 2016、Tucci et al 2008）。脳脊髄液中の I 型 IFN 濃度の上昇とループス精神病症状の発現との関連性も指摘されている（Shiozawa et al 1992）。SLE のマウスモデルにおいては、I 型 IFN は腎臓での免疫複合体の沈着を増加させることにより糸球体腎炎を悪化させること（Fairhurst et al 2008）が示されている。

I 型 IFN は関連したサイトカインからなる 1 つの大きなファミリーであり、9 番染色体上にクラスターを成す 13 種の IFN-α 遺伝子、1 種の IFN-β 遺伝子、1 種の IFN-τ 遺伝子、1 種の IFN-κ 遺伝子及び 1 種の IFN-ω 遺伝子によって発現している（Theofilopoulos et al 2005）。感染時には実質的にいかなる有核細胞も I 型 IFN の発現が可能であるが、主た I 型 IFN 産生細胞は pDC として知られる特殊な免疫細胞である（Liu 2005）。

全ての I 型 IFN は IFNα/β 受容体（IFNAR）を介してシグナルを伝達する。IFNAR は IFNAR1 と IFNAR2 のサブユニットからなり、ほとんどの有核細胞上に低レベルで広範に発現している（Mogensen et al 1999）。IFNAR1 及び IFNAR2 は、予め Janus キナーゼ 1（JAK1）及び非受容体型チロシンキナーゼ 2（TYK2）と共に不活性なコンフォメーションで会合しているが、I 型 IFN と結合すると、受容体鎖どうしが近接して、JAK1 と TYK2 のトランスリン酸化が可能になる（Stark et al 1998）。次いで、シグナル伝達兼転写活性化因子（STAT）蛋白が動員され、その保存されたアミノ酸残基がリン酸化されて受容体から放出される。リン酸化 STAT1/STAT2 のヘテロ二量体は IFN 制御因子 9 と複合体を形成し、IFN 刺激遺伝子因子 3（IFN-stimulated gene factor 3）と呼ばれるこの転写因子複合体が核内に移行して、プロモーター内の IFN 応答配列（ISRE）に結合し数百もの IFN 誘導性遺伝子の発現を誘導する。I 型 IFN は、古典的 STAT1/2 シグナル伝達に加え、他の IFN 誘導性遺伝子のプロモーターに含まれる IFN-γ 活性化部位（GAS）エンハンサー配列を活性化する他の STAT 複合体（例：STAT1 ホモ二量体など）も活性化する可能性がある。重要なことに、IFNAR を標的とすることは I 型 IFN に直接影響を与えるだけであり、IFN-γ 及び III 型 IFN による抗ウイルス反応（それぞれ II 型 IFNGR 及び III 型 IL-10R2/IFNLR1 を介してシグナル伝達される）には影響は生じない。

ウイルス感染により IFN が一時的に誘導されるが、SLE 患者においては主に核酸関連（自己）抗原を標的とする自己抗体によって I 型 IFN 経路が慢性的に活性化されていると考えられる。I 型 IFN の主な産生源は pDC であり（Blanco et al 2001）、pDC は結晶形成フラグメントγ受容体（FcγR）IIA（CD32A）を介して DNA/RNA を含む免疫複合体を取り込む（Båve et al 2003）。DNA/RNA が細胞内に取り込まれると、細胞内の核酸認識 Toll 様受容体（TLR）が活性化されて I 型 IFN の産生が誘導される（Lövgren et al 2004、Means et al 2005、Vollmer et al 2005）。I 型 IFN は細胞傷害作用を示して組織損傷を誘発する可能性があり、また自然免疫及び獲得免疫の両方に著しい影響を与える可能性もあり、このことがループスにおける自己免疫の発症と持続の原因になっている可能性がある。I 型 IFN は強力な免疫賦活作用を示し、それにより樹状細胞を活性化し成熟を促し、T 細胞応答を誘導する活性化の閾値を低下させる（Blanco et al 2001、Banchereau et al 2004）。I 型 IFN は、自己応答性 T 細胞の増大を引き起こしうる制御性 T 細胞の機能を抑制しつつ、活性化 T 細胞の生存を延長し、CD4 陽性及び CD8 陽性のメモリーT 細胞の発生を刺激して、Th17 の分化を促進する（Parlato et al 2001、Axtell et al 2013、Gangaplara et al 2018）。I 型 IFN はまた、B 細胞増殖因子 BAFF（腫瘍壊死因子ファミリーに属する B リンパ球活性化因子）の発現も増大させ、B 細胞の分化、クラススイッチ組換え及び抗体産生を促進する（Jego et al 2003、Le Bon et al 2006）。形質芽細胞及び形質細胞の増殖は SLE の指標の 1 つであり、疾患活動性と正の相関を示す（Banchereau et al 2016）。

以上のことから SLE においては、環境因子及び遺伝的感受性が I 型 IFN 経路の調節異常を助長し、SLE の発症及び進行を促進する可能性がある。I 型 IFN は免疫系を活性化させて、核抗原に対する自己免疫応答の発生を誘導し、それにより免疫複合体介在性の病態及び I 型 IFN の産生が引き起こされる可能性があり、これらのサイトカインは SLE にみられる組織損傷と免疫活性化という悪循環において中心的な役割を果たしていると考えられる（Bengtsson and Rönnblom 2017）。

2.6.1.2 アニフロルマブに関する一般情報

2.6.1.2.1 一般的名称

本申請資料に記載する医薬品のコード名は MEDI-546 である。MEDI-546 について米国で採用された名称及び国際一般名はアニフロルマブである。

2.6.1.2.2 一般特性

アニフロルマブは I 型インターフェロン α 受容体のサブユニット 1（IFNAR1）に対するヒト IgG1κモノクローナル抗体であり、2 本の同一軽鎖と 2 本の同一重鎖で構成され、抗体全体の分子量は約 148 kDa である。

アニフロルマブの作用機序

アニフロルマブは I 型 IFN のシグナル伝達を阻害し、IFN-α、IFN-β 及び IFN-ω を含む全ての I 型 IFN の生物活性を阻害する。アニフロルマブはまた、IFNAR1 の細胞内移行を誘導し、それにより、受容体会合に利用可能な細胞表面の IFNAR1 の発現レベルも低下させる。受容体を介した I 型 IFN のシグナル伝達を遮断することにより、IFN 応答性の遺伝子発現が抑制され、下流の炎症及び免疫のプロセスや事象も抑制される（Riggs et al 2018）。これまでのところ、このような薬理学的作用機序を有し、製造販売承認された治療薬はない。

アニフロルマブはヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ株に由来する。アニフロルマブは、補体依存性細胞傷害の発現に必要な C1q 蛋白質複合体（免疫グロブリンの補体結合部位に多価に結合する）を介した補体活性化作用を示さないように特別に改変された抗体である。アニフロルマブはまた、多くの FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB 及び FcγRIIIA に対する結合活性も示さないように改変されている。このように遺伝子組換えによって結合活性を失わせていることから、抗体依存性細胞傷害が発現する可能性はないと考えられる。しかし、アニフロルマブは Fc 領域を改変したものの、胎児性 Fc 受容体（FcRn）に対しては野生型免疫グロブリン G1（IgG1）が有するのと同程度の結合活性を保持しており、そのため、FcRn を介した生理的リサイクルは維持される。

アニフロルマブは、GS-NS0 マウス骨髄腫細胞（NS0 細胞）株で発現させたものである。

2.6.1.2.3 製剤

本項目の情報は 3.2.P.1 項に記載する。

2.6.1.2.4 安定性

本項目の情報は 3.2.S.7.1 項及び 3.2.P.8.1 項に記載する。

2.6.1.2.5 構造

重鎖および軽鎖について予測されたアニフロルマブのアミノ酸配列を 3.2.S.1.2 項に示す。

2.6.1.2.6 効能又は効果（案）、用法及び用量（案）

4. 効能又は効果（案）

既存治療で効果不十分な全身性エリテマトーデス

6. 用法及び用量（案）

通常、成人にはアニフロルマブ（遺伝子組換え）として、300mg を 4 週間ごとに 30 分以上かけて点滴静注する。

2.6.1.3 参考文献

Alarcon et al 2004

Alarcón GS, McGwin G Jr, Uribe A, Friedman AW, Roseman JM, Fessler BJ et al. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic lupus cohort (LUMINA). XVII. Predictors of self-reported health-related quality of life early in the disease course. Arthritis Rheum. 2004;Jun 15;51(3):465-74.

Axtell et al 2013

Axtell RC, Raman C, Steinman L. Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity. Clin Rev Allergy Immunol. 2013;44(2):114-20.

Baechler et al 2003

Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. PNAS 2003;100(5):2610-15.

Banchereau et al 2004

Banchereau J, Pascual V, Palucka AK. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation. Immunity. 2004 May;20(5):539-50.

Banchereau et al 2016

Banchereau R, Hong S, Cantarel B, Baldwin N, Baisch J, Edens M et al. Personalized immunomonitoring uncovers molecular networks that stratify lupus patients. Cell. 2016;165(3):551-65.

Båve et al 2003

Båve U, Magnusson M, Eloranta M-L, Perers A, Alm GV, Rönnblom L. Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-α-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-α production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. J Immunol. 2003;171(6):3296-302.

Bengtsson et al 2000

Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm G, Vallin H et al. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. Lupus. 2000;9:664-71.

Bengtsson and Rönnblom 2017

Bengtsson AA, Rönnblom L. Role of interferons in SLE. Best Practice and Research Clinical Rheumatology. 2017;31:415-428.

Blanco et al 2001

Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. Science. 2001;294(5546):1540-3.

Chiche et al 2014

Chiche L, Jourde-Chiche N, Whalen E, Presnell S, Gersuk V, Dang K et al. Modular transcriptional repertoire analyses of adults with systemic lupus erythematosus reveal distinct type I and type II interferon signatures. Arthritis Rheumatol. 2014;66(6):1583-95.

Crow and Manel 2015

Crow YJ, Manel N. Aicardi-Goutieres syndrome and the type I interferonopathies. Nat Rev Immunol. 2015;15(7):429-40.

Deng and Tsao 2014

Deng Y, Tsao BP. Advances in lupus genetics and epigenetics. Current Opinion in Rheumatology. 2014;26(5):482-92.

Fairhurst et al 2008

Fairhurst AM, Mathian A, Connolly JE, Wang A, Gray HF, George TA et al. Systemic IFN alpha drives kidney nephritis in B6.Sle123 mice. European Journal of Immunology. 2008;38(7):1948-60.

Fanouriakis and Bertsias 2019

Fanouriakis A and Bertsias G. Changing paradigms in the treatment of systemic lupus erythematosus. Lupus Sci Med. 2019 Feb 8;6(1):e000310.

Gangaplara et al 2018

Gangaplara A, Martens C, Dahlstrom E, Metidji A, Gokhale AS, Glass DD et al. Type I interferon signaling attenuates regulatory T cell function in viral infection and in the tumor microenvironment. PLoS pathog. 2018;14(4):e1006985.

Ioannou and Isenberg 2000

Ioannou Y, Isenberg DA. Current Evidence For The Induction Of Autoimmune Rheumatic Manifeststions By Cytokine Therapy. arthritis and rheumatism. 2000;43(7):1431-1442.

Jego et al 2003

Jego GAK, Palucka JP, Blanck CC, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. Immunity. 2003;19: 225-34.

Kirou et al 2005

Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Peterson MGE, Crow MK. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. Arthritis and Rheumatism. 2005;52(5):1491-1503.

Le Bon et al 2006

Le Bon A, Thompson C, Kamphuis E, Durand V, Rossmann C, Kalinke U et al. Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. J Immunol. 2006;176(4):2074-8.

Lichtman et al 2012

Lichtman EI, Helfgott SM, Kriegel MA. Emerging therapies for systemic lupus erythematosus--focus on targeting interferon-alpha. Clin Immunol. 2012 Jun;143(3):210-21.

Liu 2005

Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. Annu. Rev. Immunol. 2005;23:275-306.

Lövgren et al 2004

Lövgren T, Eloranta ML, Båve U, Alm GV, Rönnblom L. Induction of interferon-α production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. Arthritis Rheum. 2004;50(6):1861-72.

Mayadas et al 2009

Mayadas TN, Tsokos GC, Tsuboi N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. Circulation 2009;120(20):2012-24.

Means et al 2005

Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody–DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. The Journal of clinical investigation. 2005;115(2):407-17.

Mogensen et al 1999

Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uze G. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. J Interferon Cytokine Res. 1999;19:1069-98.

Munoz et al 2005

Munoz LE, Gaipl US, Franz S, Sheriff A, Voll RE, Kalden JR et al. SLE-a disease of clearance deficiency? Rheumatology (Oxford). 2005;44(9):1101-7.

Nived et al 2002

Nived O, Jonsen A, Bengtsson AA, Bengtsson C, Sturfelt G. High predictive value of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for survival in systemic lupus erythematosus. The Journal of Rheumatology. 2002:29(7):1-4.

Okanoue et al 1996

Okanoue T, Sakamoto S, Itoh Y, Minami M, Yasui K, Sakamoto M et al. Side effects of high-dose interferon therapy for chronic hepatitis C. J Hepatol. 1996;25(3):283-91.

Parlato et al 2001

Parlato S, Santini SM, Lapenta C, Di Pucchio T, Logozzi M, Spada M et al. Expression of CCR-7, MIP-3β, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. Blood. 2001;98(10):3022-9.

Psarras et al 2017

Psarras A, Emery P, Vital EM. Type I interferon – mediated autoimmune diseases: pathogenesis, diagnosis and targeted therapy. Rheumatology. 2017;56:1662-75.

Rahman and Isenberg 2008

Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. N Engl J Med. 2008 Feb 28;358(9):929-39.

Riggs et al 2018

Riggs JM, Hanna RN, Rajan B, Zerrouki K, Karnell JL, Sagar D et al. Characterisation of anifrolumab, a fully human anti-interferon receptor antagonist antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus. Lupus Science & Medicine. 2018;5:1-11.

Saadeh et al 2016

Saadeh D, Kurban M, Abbas O. Update on the role of plasmacytoid dendritic cells in inflammatory/autoimmune skin diseases. Exp Dermatol. 2016;25(6):415-21.

Seillet et al 2011

Seillet C, Laffont S, Trémollières F, Rouquié N, Ribot C, Arnal JF et al. The TLR-mediated response of plasmacytoid dendritic cells is positively regulated by estradiol in vivo through cell-intrinsic estrogen receptor α signaling. Blood. 2012;119(2):454-64.

Shiozawa et al 1992

Shiozawa S, Kuroki Y, Kim M, Hirohata S, Ogino T. Interferon-Alpha in Lupus Psychosis. Arthritis and Rheumatism. 1992;35(4):417-22.

Stark et al 1998

Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem. 1998;67:227-64.

Theofilopoulos et al 2005

Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. Annu Rev Immunol. 2005. 23:307-36.

Tucci et al 2008

Tucci M, Quatraro C, Lombardi L, Pellegrino C, Dammacco F, Silvestris F. Glomerular accumulation of plasmacytoid dendritic cells in active lupus nephritis: role of interleukin-18. Arthritis Rheum. 2008;58(1):251-62.

Vollmer et al 2005

Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. J Exp Med. 2005;202(11):1575-85.

Wallace 2015

Wallace, Daniel J. Belimumab: Where Are We Three Years After FDA Approval? Current Treatment Options in Rheumatology. 2015;1:42-50.

Weckerle et al 2011

Weckerle CE, Franek BS, Kelly JA, Kumabe M, Mikolaitis RA, Green SL et al. Network analysis of associations between serum interferon-α activity, autoantibodies, and clinical features in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2011;63(4):1044-53.

Ytterberg and Schnitzer 1982

Ytterberg SR, Schnitzer TJ. Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1982;25(4):401-6.

Yu and Su 2013

Yu Y and Su K. Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus. J Clin Cell Immunol. 2013;4:139.

第 2 部　CTD の概要

一般名：アニフロルマブ（遺伝子組換え）

版番号：[redacted]

2.6.2　薬理試験の概要文
アニフロルマブ（遺伝子組換え）

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

目次 2
略語及び専門用語一覧表 5
2.6.2.1 まとめ 7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 8
2.6.2.2.1 *In vitro* 薬理試験 8
2.6.2.2.1.1 アニフロルマブの作製 8
2.6.2.2.1.2 ヒト及びカニクイザル PBMC におけるアニフロルマブの平衡解離定数（K_D）の測定 8
2.6.2.2.1.3 アニフロルマブの結合エピトープのマッピング 9
2.6.2.2.1.4 アニフロルマブは IFNAR 発現細胞への IFN-α2a の結合を阻害し、IFNAR1 の細胞内移行を誘導する 12
2.6.2.2.1.5 アニフロルマブによる I 型 IFN 誘導性 STAT1 リン酸化の阻害 17
2.6.2.2.1.5.1 アニフロルマブはヒト I 型 IFN 誘導性 ISRE 活性化を阻害する 18
2.6.2.2.1.6 固定化アニフロルマブは ISRE-ルシフェラーゼアッセイにおいてアゴニスト活性を示さない 23
2.6.2.2.1.7 アニフロルマブの動物種間交差反応性 – アニフロルマブは ISRE-ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて組換えカニクイザル I 型 IFN を阻害するが、組換えマウス I 型 IFN は阻害しない 25
2.6.2.2.1.7.1 アニフロルマブは CpG-A 刺激 PBMC による I 型 IFN 誘導性遺伝子発現を抑制する 29
2.6.2.2.1.8 アニフロルマブは I 型 IFN 自己増幅ループの抑制を介し、pDC 機能を抑制する 31
2.6.2.2.1.9 アニフロルマブは I 型 IFN 誘導性単球分化並びに炎症性サイトカイン及びケモカインの誘導を阻害する 34
2.6.2.2.1.10 アニフロルマブは FcγR に対する結合性が抑制されているが、FcRN に対する結合性は保持している 36
2.6.2.2.1.11 アニフロルマブは ADCC 及び CDC 活性を誘導しない 39
2.6.2.2.2 *In vivo* 薬理試験 40
2.6.2.2.2.1 ループス加速発症モデル NZB/W F1 マウスにおいて、マウス用サロゲート抗体である抗マウス IFNAR1 モノクローナル抗体 5A3 は保護効果をもたらす 40
2.6.2.2.2.2 全身性強皮症マウスモデルにおけるマウスサロゲート IFNAR1 特異的モノクローナル抗体の有効性 42
2.6.2.3 副次的薬理試験 48
2.6.2.4 安全性薬理試験 48
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 48
2.6.2.6 考察及び結論 48
2.6.2.7 参考文献 50

表目次

表 1　非臨床薬理試験成績の要約 7
表 2　ヒト及びカニクイザルの PBMC 上に発現した IFNAR1 に対するアニフロルマブの K_D（±SD） 9
表 3　アニフロルマブは 100 IU/mL の組換え I 型 IFN で誘導される ISRE シグナル伝達を強力に阻害する（ルシフェラーゼレポーターアッセイによる） 21
表 4　アニフロルマブ又は R3-47 固定化抗体はルシフェラーゼ活性を誘導しない 24
表 5　アニフロルマブによる組換えカニクイザル I 型 IFN 誘導性 ISRE-ルシフェラーゼ活性阻害に関する概要 29
表 6　アニフロルマブによるヒト単球からの白血球 IFN 誘導性サイトカイン及びケモカイン産生の阻害 35

図目次

図 1　ヒト PBMC におけるアニフロルマブの K_D の測定 9
図 2　ポリクローナル抗ヒト IFNAR1 及びアニフロルマブで検出した、完全長コンストラクトにおけるヒト及びマウス IFNAR1 サブドメイン交換変異体のウェスタンブロット 11
図 3　ポリクローナル抗ヒト IFNAR1 及びアニフロルマブで検出した、ヒト IFNAR1 完全長コンストラクトのノックアウト変異体のウェスタンブロット 11
図 4　アニフロルマブ結合エピトープ部位におけるヒト、アフリカミドリザル及びカニクイザルの IFNAR1 のアミノ酸配列の比較 12
図 5　Daudi B 細胞に対する ^{125}I-標識 IFN-α2a の結合の競合 13
図 6　Alexa647 標識アニフロルマブによる THP-1 細胞の細胞表面特異的な染色 14
図 7　THP-1 細胞上の Alexa647 標識アニフロルマブの細胞内への移行 15
図 8　アニフロルマブの作用により IFNAR1 は単球表面から迅速に細胞内移行する 16
図 9　アニフロルマブによる I 型 IFN 誘導性 STAT1 シグナル伝達の阻害 17
図 10　組換え IFN-α2、及び CpG-A 若しくは DNA-IC により刺激した pDC の培養上清は HEK293-ISRE レポーター活性を誘導する 19
図 11　アニフロルマブは組換え IFN-α2 及び pDC 由来 I 型 IFN により誘導される ISRE 活性化を阻害する 20
図 12　アニフロルマブは SLE 患者血清中に存在する I 型 IFN によって誘導される ISRE-ルシフェラーゼ活性を強力に阻害する 22
図 13　アニフロルマブは SLE 患者血清中の I 型 IFN を阻害する 23
図 14　ISRE-ルシフェラーゼ導入 HEK293H 細胞における白血球 IFN によるルシフェラーゼ活性の誘導 24
図 15　アニフロルマブはマウス組換え IFN-α 誘導性 ISRE-ルシフェラーゼ活性を阻害しない 26
図 16　ヒト及びカニクイザルの IFNAR1 アミノ酸配列相同性 27
図 17　アニフロルマブは組換えカニクイザル I 型 IFN 誘導性 ISRE-ルシフェラーゼ活性を阻害する 28

図 18 アニフロルマブは 21 の IFN 誘導性遺伝子発現を用量依存的に阻害する..... 30
図 19 アニフロルマブは 21 の IFN 誘導性遺伝子発現を阻害する..... 31
図 20 アニフロルマブは I 型 IFN 自己分泌増幅ループの阻害により、I 型 IFN の誘導、共刺激分子のアップレギュレーション、及び炎症性サイトカイン産生を抑制する..... 33
図 21 アニフロルマブによる I 型 IFN 依存的形質細胞分化の抑制..... 34
図 22 アニフロルマブは白血球 IFN 誘導性単球分化を阻害する..... 35
図 23 アニフロルマブは単球による白血球 IFN 誘導性 IP-10 産生を用量依存的に阻害する..... 36
図 24 アニフロルマブは組換え FcγR に対する結合性が抑制されている（親抗体 9D4 との比較による）..... 37
図 25 アニフロルマブ及び親抗体 9D4 の FcRn への結合等温線..... 38
図 26 アニフロルマブは B 細胞に対する ADCC 若しくは CDC を誘導しない..... 39
図 27 抗 IFNAR モノクローナル抗体 5A3 投与は、Adv-IFN-α5a で誘導された PBMC における IFN 誘導性遺伝子発現増加を改善する..... 41
図 28 抗 IFNAR モノクローナル抗体 5A3 投与は Adv-IFN-α5a 感染 NZB/W F1 マウスにおける蛋白尿の重症度を有意に低減する..... 42
図 29 I 型 IFN シグナル伝達の遮断は GVH-SSc の臨床スコアを低下させる..... 43
図 30 抗 IFNAR1 モノクローナル抗体（5A3）投与マウスにおける免疫グロブリン及び補体の沈着の差異..... 44
図 31 GVHD-SSc の皮膚における IFN 誘導の動態及び I 型 IFN 誘導性遺伝子発現に対する抗 IFNAR1 抗体（5A3）投与の影響..... 46
図 32 抗 IFNAR1 抗体（5A3）投与は GVHD-SSc の皮膚において炎症性遺伝子及びリモデリング遺伝子の発現を正常化する..... 47

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
ADCC	Antibody-dependent cell cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害
ANA	Anti-nuclear antibodies：抗核抗体
CCL2	C-C motif chemokine 2
CD	Cluster of differentiation：白血球分化抗原
CDC	Complement-dependent cytotoxicity：補体依存性細胞傷害
[redacted]	[redacted]
CPS	Counts per second：カウント/秒
CYP	Cytochrome P450：チトクローム P450
DNA	Deoxyribonucleic acid：デオキシリボ核酸
DNA-IC	DNA immune complex：DNA 免疫複合体
EPGN	Epithelial mitogen
Fc	Fragment crystallisable：結晶形成フラグメント
FcRn	Neonatal Fc receptor：胎児性 Fc 受容体
FcγR	Fcγ receptor：Fcγ 受容体
GVH-SSc/GVHD-SSc	Graft-vs-host-induced systemic sclerosis/ Graft-vs-host disease systemic sclerosis：移植片対宿主誘発全身性強皮症
HEK	Human embryonic kidney cells：ヒト胎児腎臓細胞
IFN	Interferon：インターフェロン
IFNAR	Interferon alpha receptor：I 型インターフェロン α 受容体
IFNAR1	Interferon alpha receptor subunit 1：I 型インターフェロン α 受容体のサブユニット 1
IgG1κ	Immunoglobulin G1 kappa：免疫グロブリン G1κ
IL-6	Interleukin-6：インターロイキン-6
IL-8	Interleukin-8：インターロイキン-8
IP-10	Interferon-inducible protein 10：インターフェロン誘導タンパク質
ISGF3	Interferon stimulated gene factor 3：インターフェロン刺激遺伝子因子 3
ISRE	IFN-stimulated response element：インターフェロン応答配列
JAK1	Janus kinase 1：Janus キナーゼ 1
K_D	Equilibrium dissociation constant：平衡解離定数
KLF10	Krüppel-like factor 10
mAb	Monoclonal antibody：モノクローナル抗体
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
MCP-2	Monocyte chemotactic protein 2
miHag	minor histocompatibility antigens：マイナー組織適合抗原
MMP9	matrix metalloproteinase 9
PBMC	peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核細胞
pDC	Plasmacytoid dendritic cell：形質細胞様樹状細胞
SLE	Systemic lupus erythematosus：全身性エリテマトーデス
STAT	Signal transducer and activator of transcription：シグナル伝達兼転写活性化因子

略語及び専門用語	用語の説明
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR	Toll-like receptor：Toll 様受容体
TNFα	Tumor necrosis factor alpha：腫瘍壊死因子アルファ
TYK2	Tyrosine kinase 2：チロシンキナーゼ 2

2.6.2.1 まとめ

アニフロルマブ（別称 MEDI-546）は、I 型インターフェロン α 受容体のサブユニット 1（IFNAR1）に対するヒト免疫グロブリン G1 kappa（IgG1κ）モノクローナル抗体（mAb）である。アニフロルマブは、I 型インターフェロン（IFN）と IFNAR1 との結合を競合的に阻害することにより、I 型 IFN の細胞内シグナル伝達を抑制する。

ここでは、アニフロルマブの生化学的及び機能的特性を述べる。一連の非臨床薬理試験を実施し、以下の項目について検討した。

- ヒト及びカニクイザルの末梢血単核細胞（PBMC）上のアニフロルマブの平衡解離定数（K_D）
- アニフロルマブ結合エピトープ
- アニフロルマブの作用機序：アニフロルマブによる IFN-α2a と IFNAR 発現細胞間の結合阻害及び IFNAR1 の細胞内移行の誘導
- I 型 IFN 誘導性 STAT1 リン酸化の阻害
- 組換え及び内在性ヒト I 型 IFN 誘導性の IFN 応答配列（ISRE）活性化の阻害
- 組換えカニクイザル及びマウス I 型 IFN 誘導性 ISRE 活性の阻害
- I 型 IFN 誘導性遺伝子発現の阻害
- I 型 IFN 自己増幅ループ、形質細胞様樹状細胞の活性化及びサイトカイン産生、並びに形質細胞分化の抑制
- I 型 IFN 誘導性の単球分化、並びに炎症性サイトカイン及びケモカイン産生の阻害
- アニフロルマブの Fcγ 受容体（FcγR）及び胎児性 Fc 受容体（FcRn）との結合
- アニフロルマブの抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性及び補体依存性細胞傷害（CDC）活性
- ループス及び全身性強皮症マウスモデルにおけるサロゲート抗体である抗 IFNAR 抗体（5A3）の薬力学的活性

アニフロルマブの非臨床薬理試験の概要を表 1 に示す。

表 1　　非臨床薬理試験成績の要約

Study Number	Study Title	Species/ROA	GLP Yes/No
Primary Pharmacodynamics			
RIA546-0001	Absence of Binding of MEDI-546 to Fc Gamma Receptors I and IIIA	*In Vitro*	No
RIA546-0002	Determination of the Equilibrium Dissociation Constants (K_D) of MEDI-546 in Human and Cynomolgus Monkey PBMCs	*In Vitro*	No
RIA546-0004	Mapping of the MEDI-546 Binding Epitope	*In Vitro*	No
RIA546-0003	MEDI-546 Antagonizes the Binding of IFN-a2a to IFNAR Expressing Cells and Induces the Internalization of IFNAR1	*In Vitro*	No
RIA546-0006	Inhibition of Type-1 IFN Induced Activation of the Interferon Stimulated Response Element by MEDI-546	*In Vitro*	No
RIA546-0008	Effect of Immobilized MEDI-546 on Activation of the Interferon Stimulated Response Element	*In Vitro*	No

表 1　　非臨床薬理試験成績の要約

Study Number	Study Title	Species/ROA	GLP Yes/No
RIA546-0010	Anti-IFNARI Monoclonal Antibody (MEDI-546) Binds Fc Gamma Neonatal Receptor (FcRn) but not Fc Gamma Receptors IIA and IIB	*In Vitro*	No
RIA546-0012	Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity Assays with MEDI-546	*In Vitro*	No
RIA546-0009	MEDI-546 Does Not Exhibit Complement-Dependent Cytotoxicity *In Vitro*	*In Vitro*	No
RIA546-0011	Protection by Anti-Mouse IFNAR1 mAb 5A3 in an Accelerated NZB/W F1 Mouse Model of Lupus	Murine/IP	No
RIA546-0007	Efficacy of a Mouse Surrogate Anti-Interferon Alpha Receptor 1 Monoclonal Antibody in a Murine Model of Systemic Sclerosis	Murine/IP	No
Safety Pharmacology			
Safety pharmacology studies were not conducted, but safety pharmacology parameters were assessed as components of the nonclinical safety studies.			

Fc = fragment crystallizable; FcRn = Neonatal Fc receptor; IFN = interferon; IFNAR = interferon alpha receptor; IP = intraperitoneal; MEDI-546 = anifrolumab; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; ROA = route of administration

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　*In vitro* 薬理試験

2.6.2.2.1.1　アニフロルマブの作製

[redacted] 社は[redacted]を発現する [redacted] 細胞で [redacted]（[redacted]）[redacted]を免疫し、IFNAR1 に特異的な完全ヒト型モノクローナル抗体を作製した。IgG1κ 抗体である 9D4 が治療薬候補として選抜された。その後、3 つのアミノ酸置換（L234F/L235E/P331S）を導入することにより Fc 部分を修飾し、FcγR 及び免疫グロブリンの補体（C1q）の結合を減少させ、IgG 媒介エフェクター機能を阻害した（Canfield and Morrison 1991, Chappel et al 1991, Idusogie et al 2000, Hezareh et al 2001, Oganesyan et al 2008b）。この 9D4 トリプルアミノ酸バリアント抗体であるアニフロルマブ（MEDI-546）を開発候補として選択した（試験番号 RIA546-0001）。アニフロルマブの薬理学的特性については後述する。

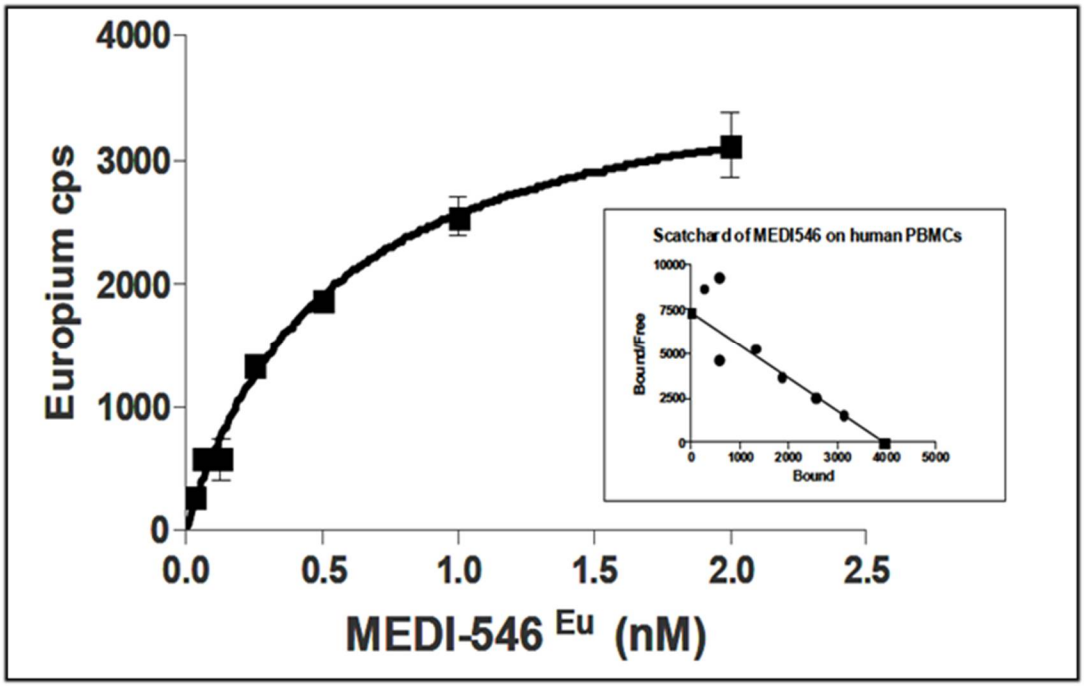
2.6.2.2.1.2　ヒト及びカニクイザル PBMC におけるアニフロルマブの平衡解離定数（K_D）の測定

直接飽和結合試験を使用して、新鮮なヒト及びカニクイザルの PBMC 上に発現した IFNAR1 とアニフロルマブとの平衡解離定数（K_D）を測定した（試験番号 RIA546-0002）。

本手法は、PBMC 上に発現した IFNAR1 のアニフロルマブによる飽和及び PBMC 上の結合可能部位に対するアニフロルマブとユーロピウム（Eu^{3+}）標識アニフロルマブとの競合に依存している。アニフロルマブによる IFNAR1 の飽和度の違い、又は Eu^{3+}標識アニフロルマブ結合部位との競合の程度の違いを定量する。

代表的な実験結果を図 1 に示す。独立した 7 回の測定におけるヒト PBMC に対するアニフロルマブの K_D は 0.29 ± 0.29 nM であり、1448 ± 1183 箇所の IFNAR1 結合サイトが検出された（表 2）。独立した 3 回の実験によるカニクイザル PBMC に対するアニフロルマブ結合の平均 K_D は 0.65 ± 0.74 nM であり、648 ± 353 箇所の IFNAR1 結合サイトが検出された。ヒト及びカニクイザルの PBMC 上に発現した IFNAR1 とアニフロルマブとの K_D 値は同程度である。

図 1　　ヒト PBMC におけるアニフロルマブの K_D の測定



Binding of anifrolumab to PBMCs are represented by average counts per second of Eu^{3+}-anifrolumab subtracted from average counts per second in the presence of 100-fold excess of unlabelled antibodies. Values were plotted to fit a non-linear regression 1-site competition curve, and corresponding apparent K_D estimates were calculated using GraphPad Prism 4 analysis software.
MEDI-546 = anifrolumab

表 2　　ヒト及びカニクイザルの PBMC 上に発現した IFNAR1 に対するアニフロルマブの K_D（±SD）

	Cells	K_D (nM)	Number of Sites
Anifrolumab	Human PBMCs	0.29 ± 0.29	1448 ± 1183
Anifrolumab	Cynomolgus Monkey PBMCs	0.65 ± 0.74	648 ± 353

2.6.2.2.1.3　アニフロルマブの結合エピトープのマッピング

ヒト IFNAR1 に対するアニフロルマブの結合エピトープを決定する一連の実験を実施した。まず、蛋白分解断片のウェスタンブロット分析及びアミノ酸配列分析により、結合ドメインを古典的手法でマッピングした。欠失変異体との相互作用及びドメインスワッピング実験により、4 つの IFNAR1 サブドメインのうち、アニフロルマブと相互作用したものを確認し、最終的にファー

ジライブラリのスクリーニングから重要な結合エピトープを特定した（試験番号 RIA546-0004、Peng et al 2015）。

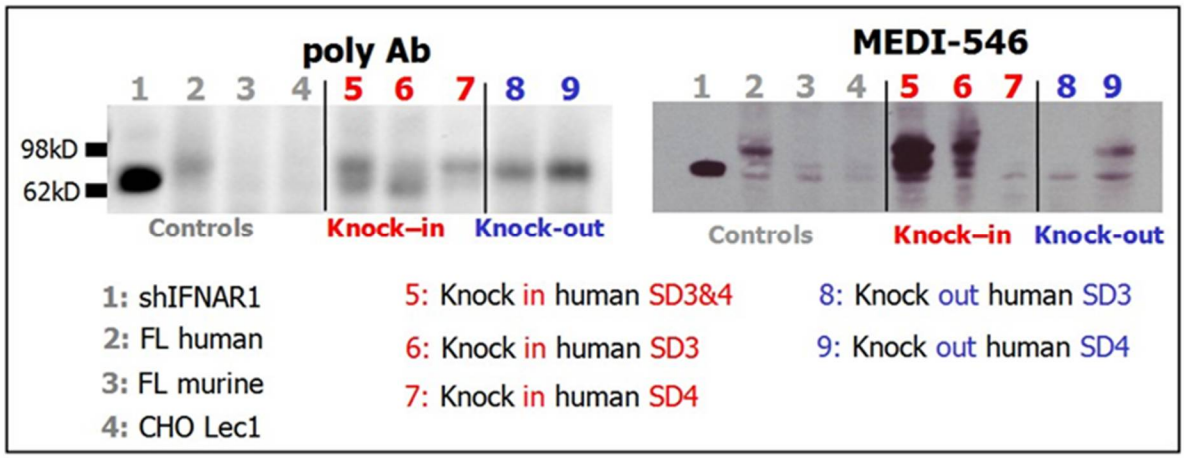
可溶性の組換えヒト IFNAR1（rhuIFNAR1）蛋白を限定分解し、生じた断片を SDS-PAGE で分離した。アニフロルマブは変性及び部分変性されたヒト IFNAR1 を認識し、このブロットで分離した断片から配列を決定した。これらのフラグメントから得られたアミノ酸含量により、アニフロルマブの結合ドメインを古典的手法でマッピングした結果、成熟蛋白の 265 から 357 番目のアミノ酸に位置し、これはサブドメイン 3 及び 4 の一次配列中の 93 アミノ酸にわたる領域に相当した。

ヒト IFNAR1 の［1＋2］又は［3＋4］の複合サブドメインを持つ欠失変異体を作製し、正常より短い（truncated）可溶性蛋白を発現させた。全ての欠失変異体蛋白が発現し分泌されたが、アニフロルマブが認識したのは、ヒト IFNAR1 のサブドメイン 3 及び 4 をコードする蛋白のみであった。

アニフロルマブは、ヒト IFNAR1 に結合するが、マウス IFNAR1 には結合しないので、サブドメイン 3 及び 4 に焦点を置いて交換変異体を構築した。ここでは、構築のための鋳型としてマウス（ノックイン）又はヒト（ノックアウト）のいずれかの IFNAR1 を使用して、サブドメイン 3 及び／又は 4 をもう一方の生物種のものと置き換えた。アニフロルマブは、マウスのサブドメイン 1 及び 2 とヒトのサブドメイン 3 及び 4 の組み合わせをコードする IFNAR1 変異体を認識し、ヒトのサブドメイン 3 のみをコードするマウス IFNAR1 ノックイン変異体も認識したが、ヒトのサブドメイン 4 のみをコードするマウス IFNAR1 変異体は認識しなかった（図 2、レーン 5、6 及び 7）。アニフロルマブは、マウスのサブドメイン 3 をコードするヒト IFNAR1 ノックアウト変異体を認識しなかったが、マウスのサブドメイン 4 を含むヒト IFNAR1 には、低レベルながら結合した（図 2、レーン 8 及び 9）。全ての完全長変異体蛋白は、同程度のレベルで発現した。これらの所見から、アニフロルマブの結合エピトープはヒト IFNAR1 のサブドメイン 3 の C 末端部分の 43 アミノ酸（アミノ酸 265 から 307）の範囲内にマッピングされた。

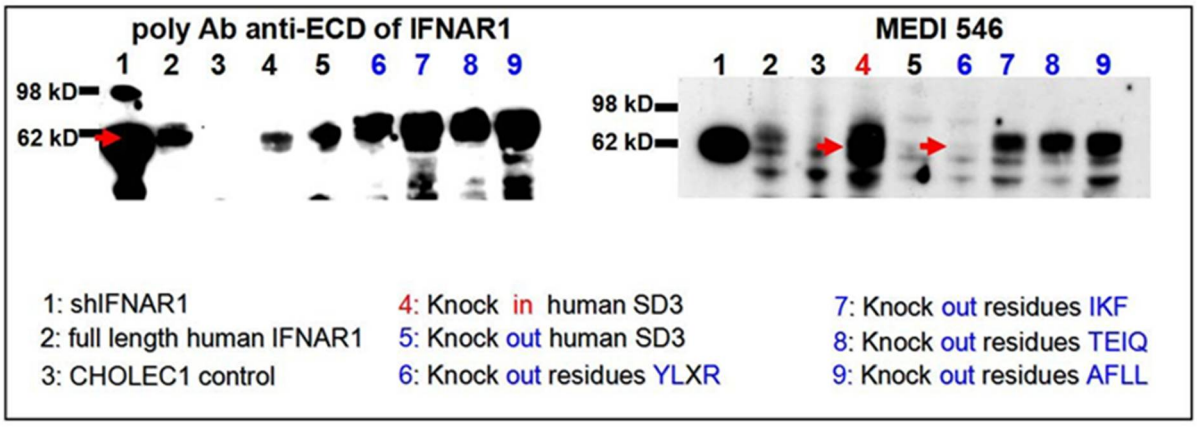
完全長ヒト IFNAR1 の変異体を、サブドメイン 3 の少数のアミノ酸を同等のマウス配列に置き換えて 4 種作製した。これら変異体についてウェスタンブロットを行い、ポリクローナル抗ヒト IFNAR1 を使用した発現解析、及びアニフロルマブとの結合について検討を行った。変異体 YLLR はマウス FFLH（276～279 位）に、変異体 IKF はマウス KFI（295～297 位）に、変異体 TEIQ はマウス SQKH（299～302 位）に、変異体 AFLL はマウス ILPS（303～306 位）に変換され、全ての変異体蛋白は同程度のレベルで発現した。アニフロルマブは、ヒトのサブドメインをマウスのアミノ酸残基に置き換えたノックアウト変異体である“IKF”、“TEIQ”及び“AFLL”を認識した（図 3、レーン 7、8 及び 9）。一方で、ヒトのサブドメイン 3 の 276～279 のアミノ酸残基をマウスの FFLH 残基で置換した完全長のヒトノックアウト変異体“YLXR”はアニフロルマブによって認識されなかった。

図 2　　ポリクローナル抗ヒト IFNAR1 及びアニフロルマブで検出した、完全長コンストラクトにおけるヒト及びマウス IFNAR1 サブドメイン交換変異体のウェスタンブロット



Western blots of whole cell lysates from knock-in and knock-out swap mutant transfections in CHO Lec1 cells. Protein from soluble rhuIFNAR1 (lane 1) and full length-TMD human IFNAR1 (lane 2) are positive controls. Protein from full length-TMD murine IFNAR1 (lane 3) and un-transfected CHO Lec1 cells (lane 4) are negative controls. Polyclonal anti-human IFNAR1 is used to monitor expression of each mutant (left). Knock-ins: anifrolumab binds to murine IFNAR1 encoding human sub-domains 3+4 (right, lane 5) and human sub-domain 3 (right, lane 6) but not human sub-domain 4 (right lane 7). Knock-outs: anifrolumab binds to human IFNAR1 encoding murine sub-domain 4 (right, lane 9), but not murine sub-domain 3 (right, lane 8).
MEDI-546 = anifrolumab

図 3　　ポリクローナル抗ヒト IFNAR1 及びアニフロルマブで検出した、ヒト IFNAR1 完全長コンストラクトのノックアウト変異体のウェスタンブロット

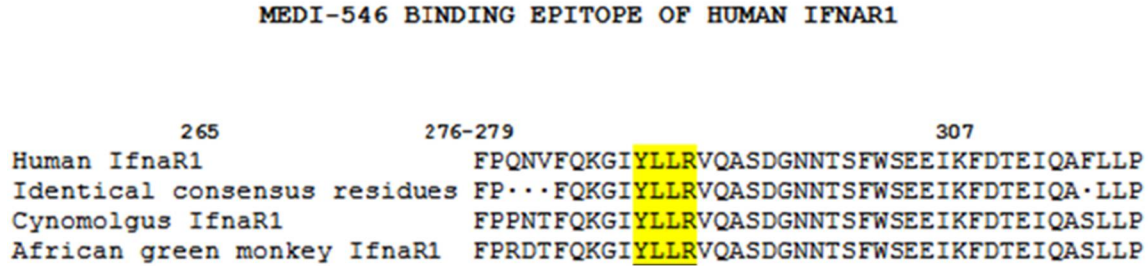


Western blots of whole cell lysates from knock-in and knock-out variant transfections in CHO Lec1 cells. Protein from soluble rhuIFNAR1 (lane 1), full length-TMD human IFNAR1 (lane 2) and murine knock-in SD3 (lane 4) are positive controls, where protein from untransfected CHO Lec1 cells (lane 3) and knock-out human SD3 (lane 5) are negative controls. Polyclonal anti-human IFNAR1 is used to monitor expression of each mutant (left). Knock-out variants: Anifrolumab binds to human IFNAR1 variants encoding murine residues in SD3 corresponding to human amino acids IKF (right, lane 7), TEIQ (right, lane 8) and AFLL (right, lane 9), but not to the YLXR variant encoding murine residues at positions 276-279 in human SD3 (right, lane 6, red arrow).
MEDI-546 = anifrolumab

これらの結果から、サブドメイン 3 に存在する重要な結合エピトープがアミノ酸残基 276～279（YLLR）であることが示された。またこれらの結果と一致して、ファージペプチドライブラリのスクリーニングにより、コンセンサス配列 YLX（R/K）を含むペプチドは、アニフロルマブとの結合について IFNAR1 と競合することが示された。

注目される点として、この領域内において、ヒト、カニクイザル、及びアフリカミドリザルの IFNAR1 のアミノ酸配列は同一であった（図 4）。対照的に、マウス及びラットの IFNAR1 アミノ酸配列は、ヒト及びヒト以外の霊長類のアニフロルマブ結合エピトープと比較して配列相同性は低かった。

図 4　　アニフロルマブ結合エピトープ部位におけるヒト、アフリカミドリザル及びカニクイザルの IFNAR1 のアミノ酸配列の比較



Alignment of the amino acids 265-307 sequence of human, African green monkey, and cynomolgus monkey IFNAR1. Identical consensus residues are between the sequences. Residues that differ are noted with dots. The epitope of binding for anifrolumab are highlighted in yellow.
MEDI-546 = anifrolumab

2.6.2.2.1.4　アニフロルマブは IFNAR 発現細胞への IFN-α2a の結合を阻害し、IFNAR1 の細胞内移行を誘導する

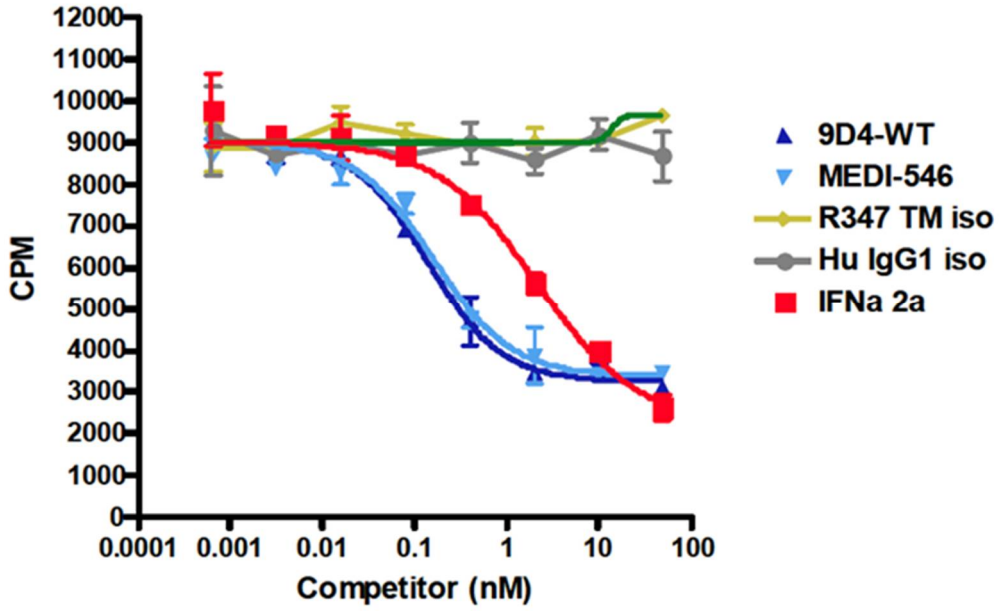
IFNAR は IFNAR1 鎖及び IFNAR2 鎖から成るヘテロ二量体の細胞表面受容体であり、I 型 IFN は IFNAR に結合する（Mogensen et al 1999）。I 型 IFN の IFNAR2 との結合親和性は低く、3 次元構造モデリングから、I 型 IFN-IFNAR2 複合体は IFNAR1 に結合し、細胞外受容体ポケットを形成すると推定される（Cajean-Feroldi et al 2004、Quadt-Akabayov et al 2006）。IFNAR1 は予めチロシンキナーゼ 2（TYK2）と会合しており、リガンド-IFNAR2-IFNAR1 複合体の相互作用では、JAK 及び STAT 蛋白がリクルートされてシグナル伝達が行われる（Mogensen et al 1999）。

アニフロルマブが I 型 IFN を介したシグナル伝達を阻害する作用機序を検討するために、Daudi B 細胞上に発現した IFNAR に対する IFN-α2a の結合にアニフロルマブが及ぼす影響について検討を行った（試験番号 RIA546-0003、Peng et al 2015)。アニフロルマブ結合時の IFNAR1 の細

胞内移行についても、THP-1 細胞及び単球にて評価した（試験番号 RIA546-0003、Wang et al 2013、Riggs et al 2018）。

段階希釈を行ったアニフロルマブ、9D4-Wt 又は非標識 IFN-α2a の存在下で、放射性ヨウ素標識 IFN-α2a（^{125}I-IFN-α2a、最終濃度 2 nM）と Daudi 細胞をインキュベートした。その結果、アニフロルマブ及び 9D4-Wt の両者が、受容体を有する細胞への ^{125}I-IFN-α2a の結合を競合的に阻害したことが示された（図 5）。非線形回帰分析からアニフロルマブ及び 9D4-Wt が同程度の EC_{50} 値を有することが示され、その値はそれぞれ 0.14 nM 及び 0.16 nM であった。いずれの抗 IFNAR1 抗体も、非標識 IFN-α2a の 10 倍を上回る効力でリガンド-受容体の結合を阻害した。アイソタイプ対照抗体では、IFN-α2a の細胞への結合に対し測定可能な作用は認められなかった。これらの観察所見は、受容体を有する細胞に対してアニフロルマブが競合的に結合することで、IFN-α2a で誘導される生物活性の阻害が生じることを示している。

図 5　　Daudi B 細胞に対する ^{125}I-標識 IFN-α2a の結合の競合

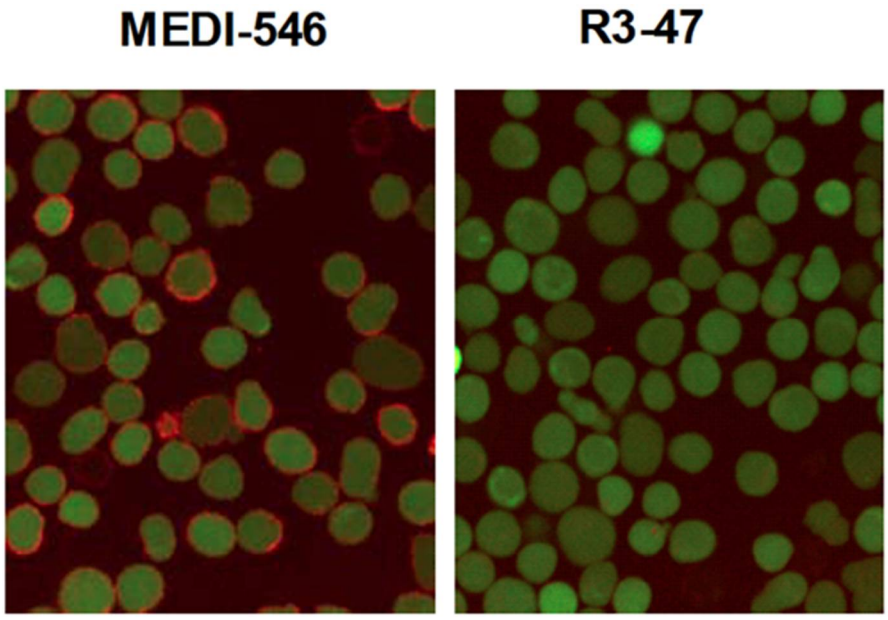


Daudi cells were incubated with radio-iodinated IFN-α2a (^{125}I-IFN-α2a, 2 nM final concentration) in the presence or absence of serially diluted anifrolumab (MEDI-546), parental antibody (9D4-WT), isotype control antibodies or unlabelled IFN-α2a. Total radioactivity of ^{125}I-IFN-α2a bound to receptor-bearing Daudi B cells was analysed on a gamma counter. Values were plotted to fit a non-linear regression 1-site competition curve using the GraphPad Prism 4 software; the corresponding EC_{50} values were calculated accordingly.
CPM = counts per minute

IFNAR1 を有する THP-1 細胞におけるアニフロルマブの細胞内移行を評価するため、第一段階として Alexa647 標識アニフロルマブ及び対照の Alexa647-R3-47 抗体を用いた特異的染色により確認した（図 6）。動態を 60 分間にわたって記録し、Alexa647 標識アニフロルマブが細胞表面から細胞質コンパートメントにある点状のスポットへと内部移行することが示された（図 7）。得られた画像は、CFSE 染色領域（図中緑色部分）を細胞質コンパートメントとして、また CFSE 染色との境界にあるリング状領域を細胞膜表面領域として識別するアルゴリズムにより解析した。細胞膜表面領域（図中赤色部分）及び細胞質コンパートメントにおいて Alexa647 標識アニ

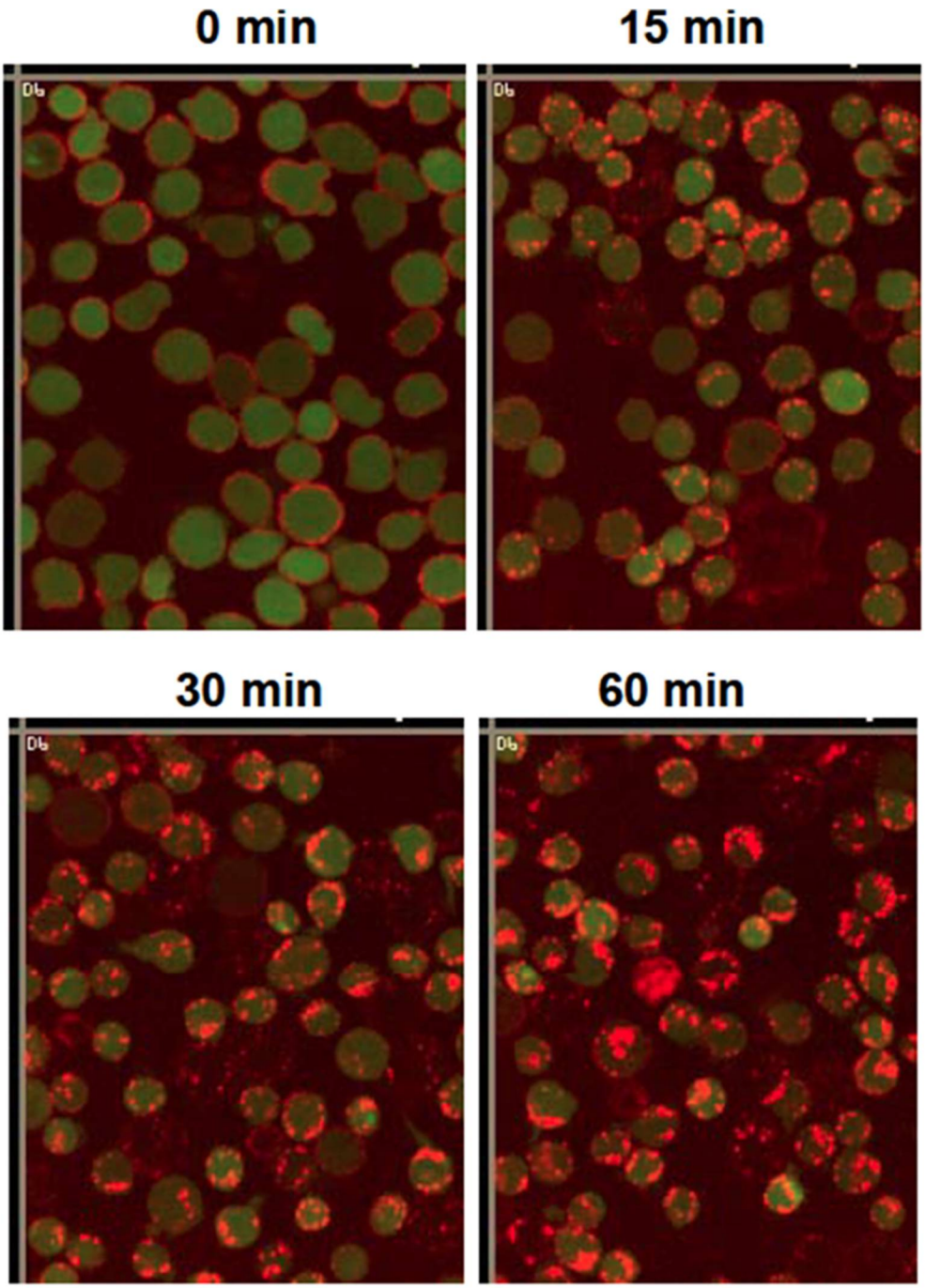
フロルマブの蛍光強度を測定し、蛍光強度の値を経時的にプロットした。SAAM II ソフトウェアを使用し、細胞内移行の速度を細胞質コンパートメントにおける蛍光の蓄積速度に基づいて算出した。50%のアニフロルマブが内部移行するのには 25～35 分を要した。

図 6　　Alexa647 標識アニフロルマブによる THP-1 細胞の細胞表面特異的な染色



Images indicate specific binding of Alexa647-anifrolumab on THP-1 cell membranes. THP-1 cells were stained with 1 μM CFSE (green color) in a 37°C CO_2 incubator for 10 minutes followed by 1 μg/mL of Alexa647 anifrolumab (red color) or Alexa647-R347 on ice for 1 hour.
MEDI-546 = anifrolumab

図 7　　THP-1 細胞上の Alexa647 標識アニフロルマブの細胞内への移行

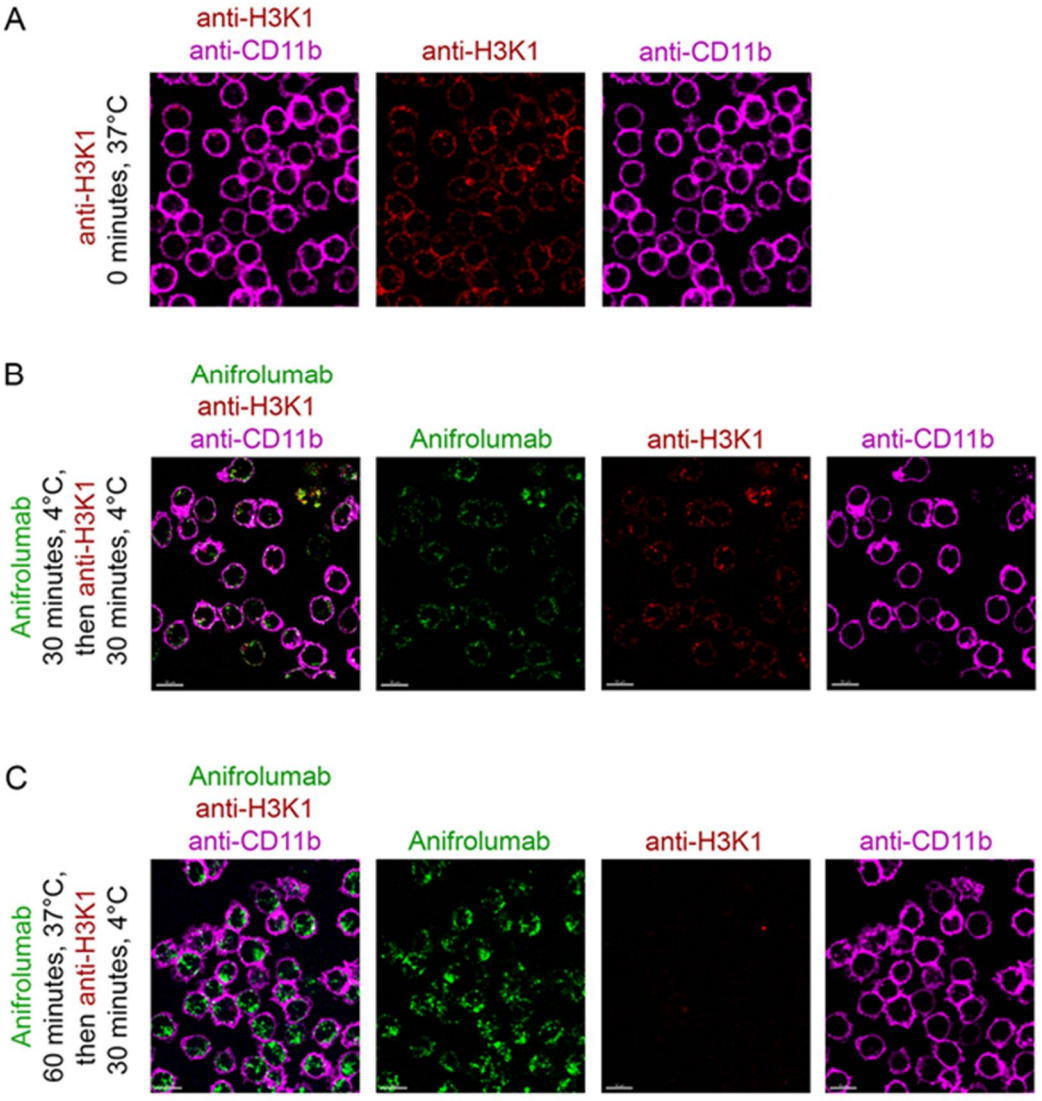


Kinetic images indicate anifrolumab internalization. THP-1 cells were stained with 1 μM CFSE (green color) in a 37°C CO_2 incubator for 10 minutes followed by 1 μg/mL of Alexa647-anifrolumab (red color) on ice for 1 hour. Cells were then incubated at 37°C in an environmentally controlled chamber for 15 to 60 minutes, as indicated.
MEDI-546 = anifrolumab

同様の実験により、アニフロルマブが単球において迅速に細胞内移行することが確認された（Riggs et al 2018）。非競合抗 IFNAR1 抗体（H3K1）を用いることで、アニフロルマブが細胞表

面から内部移行するのに伴い、IFNAR1 が細胞表面から完全に消失することが実証された（図 8［Figure S1 in Riggs et al 2018］）。

図 8　　アニフロルマブの作用により IFNAR1 は単球表面から迅速に細胞内移行する



Binding of Alexa488-labeled anifrolumab and Alexa594-labeled anti-H3K1 antibody to IFNAR1, and APC conjugated anti-CD11b antibody to the membrane marker, CD11b, in monocytes imaged by confocal microscopy. (A) The anti-H3K1 antibody binds to cell surface IFNAR1 at 37°C. (B) The anti-H3K1 antibody does not compete with anifrolumab for IFNAR1 binding at 4°C. (C) Anifrolumab elicits IFNAR1 internalization at 37°C, markedly diminishing cell surface IFNAR1 availability for subsequent binding by the anti-H3K1 antibody.

APC = allophycocyanin; CD11b = cluster of differentiation molecule 11b; IFNAR1 = type I interferon receptor subunit 1; MEDI-546 = anifrolumab

したがって、アニフロルマブの結合はI型IFNのIFNAR1への結合を競合的に阻害し、IFNAR1を迅速に細胞内移行させ細胞表面での存在量を減少させることで、I型IFN-IFNAR2を介したヘテロ二量体化及び下流へのシグナル伝達を抑制することが示された。

2.6.2.2.1.5　アニフロルマブによるI型IFN誘導性STAT1リン酸化の阻害

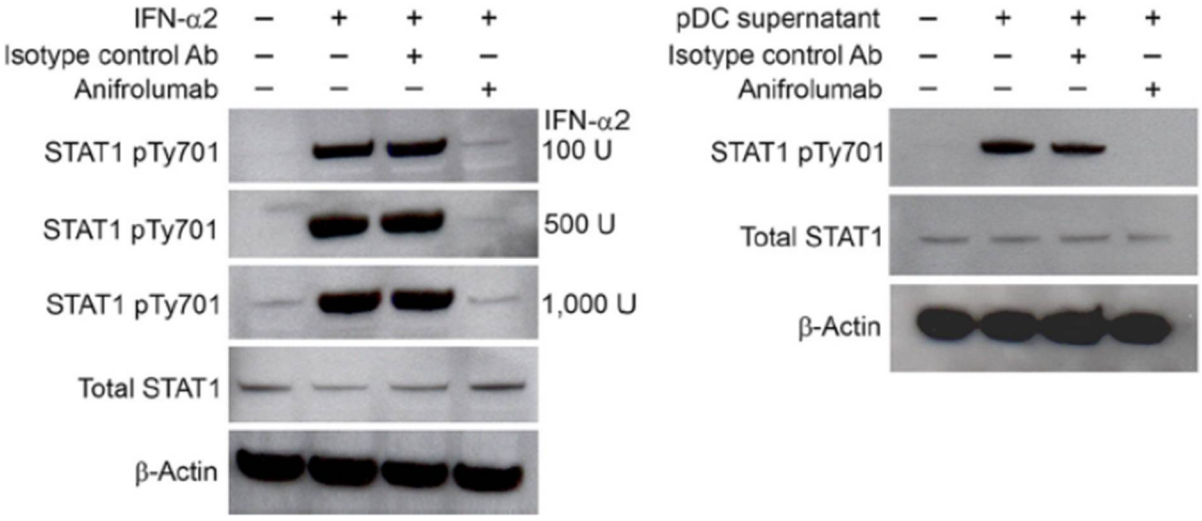
I型IFN誘導性のIFNAR1/2ライゲーションでは、構造的に結合したTYK2及びJanusキナーゼ1（JAK1）は一連のリン酸化反応によりSTAT蛋白の受容体複合体上のドッキングサイトの形成を誘導する。続いて、STATはJAKによってチロシン部位がリン酸化され、活性化される（Platanias 2005、van Boxel-Dezaire et al 2006、Vilcek 2006）。I型IFNシグナル伝達は種々のSTATホモ二量体及びヘテロ二量体を活性化する可能性があるが、古典的シグナル伝達経路はSTAT1/2シグナル伝達により促進される。STAT1/STAT2ヘテロ二量体はIRF9と結合して、IFN刺激遺伝子因子3（ISGF3）と呼ばれる主要な転写因子複合体を形成し、ISGF3は多くのIFN感受性遺伝子のプロモーターに存在するISREに結合する（Platanias 2005、van Boxel-Dezaire et al 2006）。

アニフロルマブのI型IFN誘導性STAT1 Tyr701リン酸化に対する阻害能について検討した（試験番号RIA546-0006、Riggs et al 2018）。

アニフロルマブ又は対照抗体の存在下若しくは非存在下で、ヒト単球を組換えIFN-α2又はCpG-A刺激したpDC（形質細胞様樹状細胞）培養上清中に存在するI型IFNにより刺激した。5～20分間のインキュベーション後、細胞溶解物を採取して変性させ、NuPAGE® 10% Bis-Trisポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。ニトロセルロース膜に蛋白質を転写してブロッキングし、続いて総STAT1蛋白、pTyr701リン酸化STAT1及びβ-アクチンでプローブし検出した。

組換えIFN-α2及びpDC上清は共にSTAT1 pTyr701リン酸化を誘導した。アニフロルマブは、1000 Uまでの IFN-α2又はpDC培養上清で刺激した細胞においてSTAT1リン酸化を完全に阻害したが、アイソタイプの対照抗体では阻害は認められなかった（図9［Figure 1 in Riggs et al 2018］）。

図9　　アニフロルマブによるI型IFN誘導性STAT1シグナル伝達の阻害



Western blots showing the induction of STAT1 pTyr701 with 100, 500 and 1,000 Units of recombinant IFN-α2 (left) and endogenous type I IFNs from CpG-A stimulated pDC supernatants (right). Human monocytes were pre-treated with 10 µg/mL of anifrolumab or isotype control antibody (R3-47 TM) as indicated.

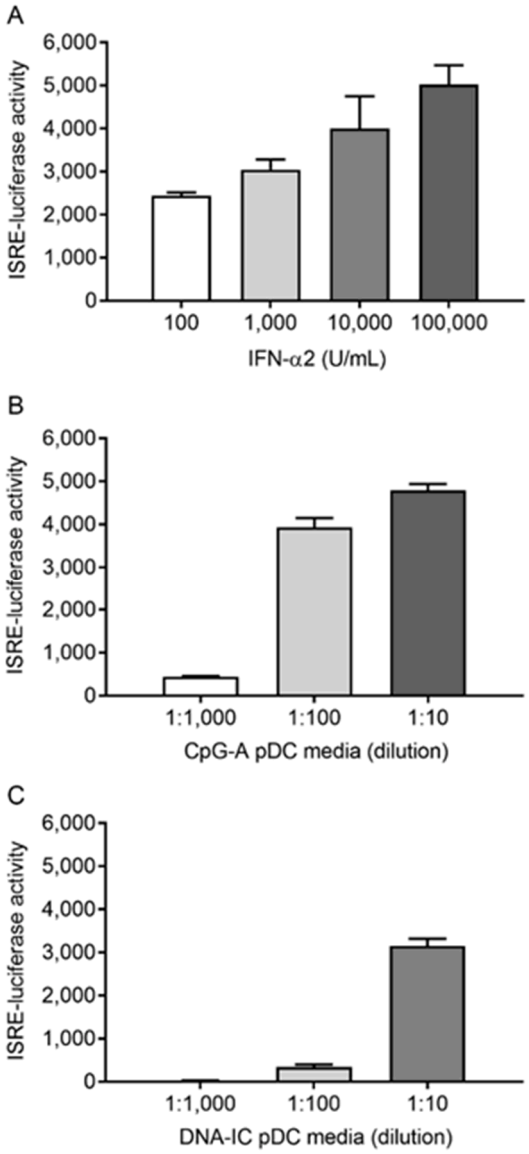
2.6.2.2.1.5.1　アニフロルマブはヒトI型IFN誘導性ISRE活性化を阻害する

I型IFNがIFNARに結合すると、IFNARに結合しているTYK2及びJAK1の活性化が誘導され、STATのドッキング及びリン酸化が可能になる。続いて、活性化されたSTAT1/2のヘテロ二量体は核内へ移行しIRF9と結合して、多くのIFN感受性遺伝子のプロモーターに存在するISREに結合する、ISGF3といわれる主要な転写因子複合体を形成する（Platanias 2005、van Boxel-Dezaire et al 2006）。

ヒトISRE-ルシフェラーゼレポーターを用いたバイオアッセイにより、I型IFN誘導性のISRE活性化に対するアニフロルマブの阻害能を評価した（試験番号RIA546-0006、Riggs et al 2018）。

まず最初に、ヒト胎児腎臓細胞293H（HEK293H）にpHTS-ISRE-ルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的にトランスフェクトし、組換えヒトIFN-α2、又はエンドソームのToll様受容体（TLR）に対するアゴニストCpG-A或いはDNA免疫複合体（DNA-IC）で刺激したpDCの培養上清で刺激した。一晩インキュベーションした後、細胞を溶解し、Promega ISRE-ルシフェラーゼアッセイシステムを用いてルシフェラーゼ活性を評価した。ルシフェラーゼ発光の測定により、各試験系においてI型IFNが用量依存的にISREプロモーターの活性化を誘導することが示された（図10［Figure S2 in Riggs et al 2018］）。アニフロルマブは、組換えヒトIFN-α2誘導性、及びヒトpDCのCpG-A刺激又はDNA-IC刺激により誘導されるI型IFN誘導性のISRE-ルシフェラーゼ活性を用量依存的に阻害したが、アイソタイプ対照抗体には阻害は認められなかった（図11［Figure 2 in Riggs et al 2018］）。

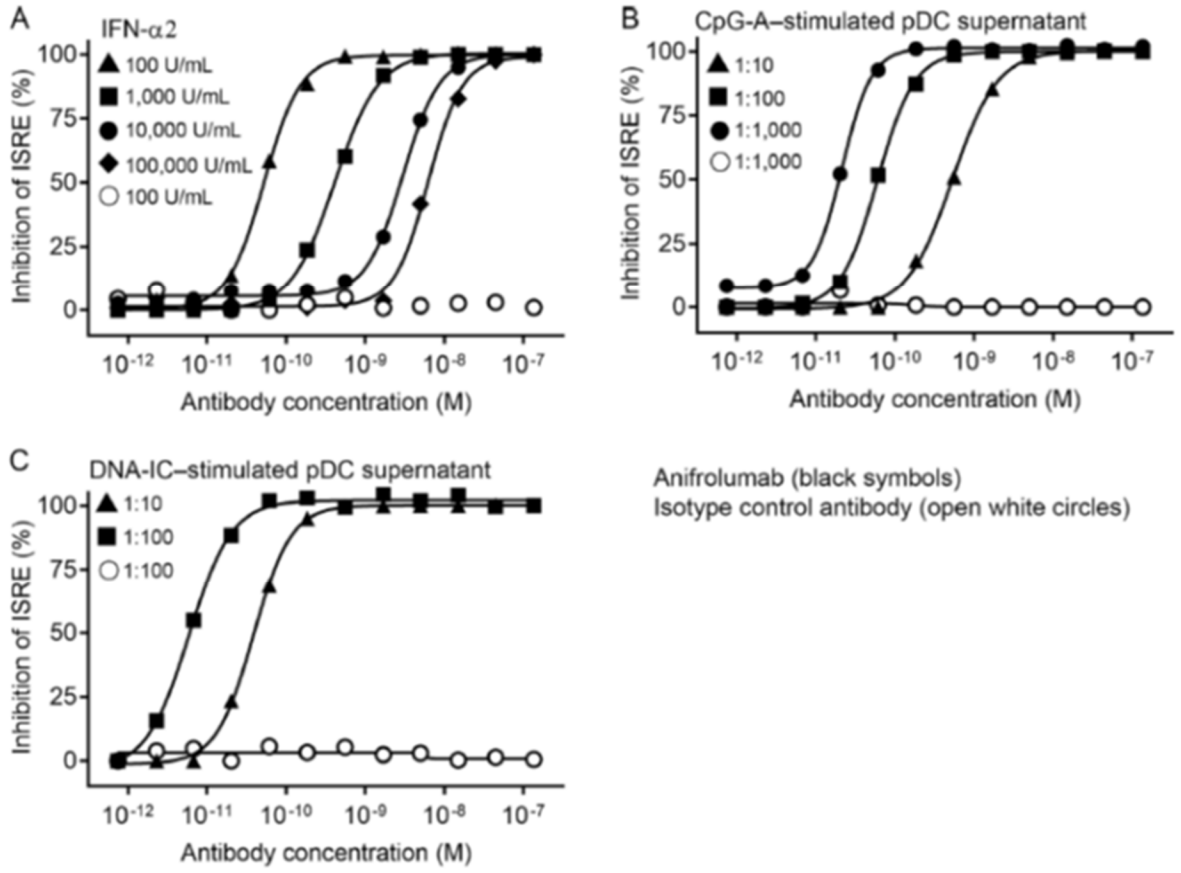
図 10　　組換え IFN-α2、及び CpG-A 若しくは DNA-IC により刺激した pDC の培養上清は HEK293-ISRE レポーター活性を誘導する



HEK293-ISRE reporter cell luciferase activity stimulated for 18 h with (A) 100, 1,000, 10,000, or 100,000 U/mL of recombinant IFN-α2, and 1:1000, 1:100, 1:10 dilutions of (B) CpG-A–stimulated pDC media or (C) DNA IC stimulated pDC media. Data are from one representative experiment of 3 replicate experiments.

IC = immune complex; IFN = interferon; ISRE = IFN-stimulated response element; pDC = plasmacytoid dendritic cell

図 11　　アニフロルマブは組換え IFN-α2 及び pDC 由来 I 型 IFN により誘導される ISRE 活性化を阻害する



Type I IFN–induced luciferase activity in HEK293-ISRE reporter cells elicited by (A) recombinant IFN-α2 protein (100 [triangles], 1,000 [squares], 10,000 [circles], or 100,000 [diamonds] U/mL), (B and C) CpG A stimulated and DNA-IC–stimulated pDC supernatant (diluted 1:10 [triangles], 1:100 [squares], or 1:1000 [circles]), with preincubation with anifrolumab (black symbols) or isotype control antibody (white open circles). Luciferase luminescence values were plotted to fit a non-linear regression 1-site competition curve and calculation of half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) were determined using Prism 6 software. The anifrolumab IC_{50}s for IFN-α2 for 100, 1,000, 10,000 and 100,000 U were 0.149, 0.528, 3.048, 9.748 nM respectively. The anifrolumab IC_{50}s for CpG-A stimulated pDC media at dilutions of 1/1000, 1/100 and 1/10 were 0.021, 0.075, and 0.721 nM respectively. The anifrolumab IC_{50}s for DNA-IC stimulated pDC media at dilutions of 1/1000, 1/100 and 1/10 were 0.060, 0.113 and 0.214 nM respectively.
MEDI-546 = anifrolumab

ヒト I 型 IFN ファミリーは、13 種の IFN-α サブタイプ、IFN-β、IFN-δ、IFN-ε、IFN-κ 及び IFN-ω を含む。種々の I 型 IFN に対する阻害能を検討するため、利用可能な全ての組換えヒト I 型 IFN 100 IU/mL をそれぞれアニフロルマブの存在下又は非存在下で HEK293-ISRE-ルシフェラーゼレポーターとインキュベートした。表 3 に示すように、アニフロルマブは検討した 14 種全ての I 型 IFN サブタイプを 0.004～0.3 nM の範囲の IC_{50} 値で強力に阻害した（Riggs et al 2018）。

表 3　アニフロルマブは 100 IU/mL の組換え I 型 IFN で誘導される ISRE シグナル伝達を強力に阻害する（ルシフェラーゼレポーターアッセイによる）

Type I IFN Subtype	IC_{50} (nM) [a]
IFN-α1	0.004 ± 0.01
IFN-α2	0.3 ± 0.02
IFN-α4	0.004 ± 0.01
IFN-α5	0.01 ± 0.01
IFN-α6	0.04 ± 0.01
IFN-α7	0.04 ± 0.02
IFN-α8	0.03 ± 0.04
IFN-α10	0.01 ± 0.01
IFN-α14	0.02 ± 0.01
IFN-α16	0.02 ± 0.03
IFN-α17	0.04 ± 0.03
IFN-α21	0.01 ± 0.002
IFN–β1	0.03 ± 0.025
IFN–ω	0.07 ± 0.03

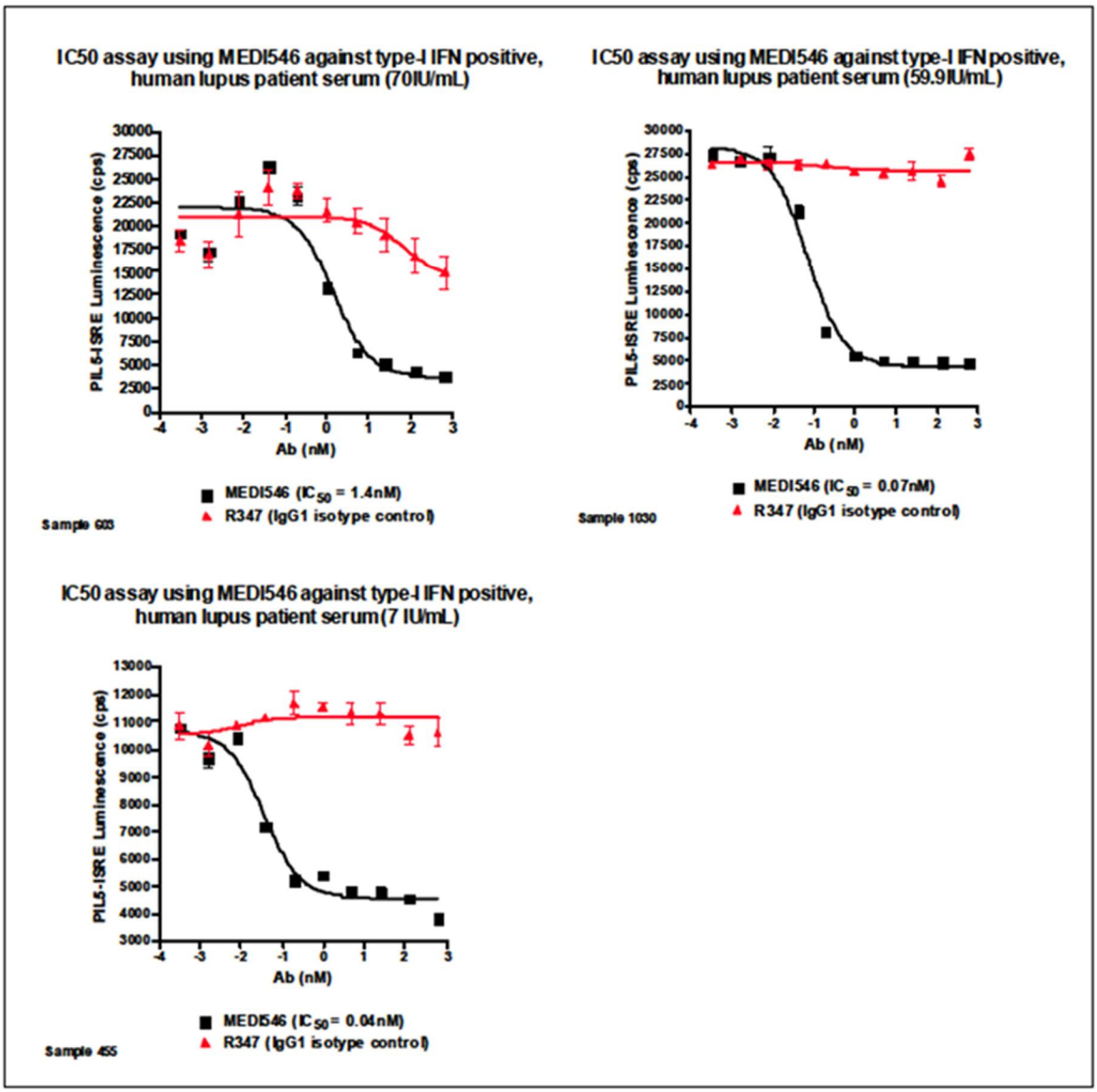
[a] Data represent means +/1 standard deviations from 3 to 5 individual experiments.

IC_{50} = half inhibitory concentration; IFN = interferon; ISRE = interferon-stimulated response element; MEDI 546 = anifrolumab

SLE 患者において、I 型 IFN 蛋白質レベルの上昇が検出される（Rodero et al 2017）。ISRE-ルシフェラーゼをトランスフェクトした PIL-5 単球細胞を用いて、SLE 患者の血清中に存在する内在性 I 型 IFN により誘導された ISRE シグナル伝達に対し、アニフロルマブの阻害能を評価した（Riggs et al 2018）。SLE 患者から採取した血清サンプル（最終希釈率 50%）と共に、PIL-5 ISRE-ルシフェラーゼ細胞をアニフロルマブ又はアイソタイプ対照抗体（R3-47TM）の存在下又は非存在下で一晩インキュベートした。その後細胞を溶解し、Promega ISRE-ルシフェラーゼアッセイ系を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

SLE 患者の血清によって誘導される ISRE-ルシフェラーゼ活性は 3 例のドナーごとに異なっていたものの、アニフロルマブがこの活性を強力に阻害することが示され（0.32 ± 0.5 nM）、一方、対照抗体にはその作用は認められなかった（図 12、試験番号 RIA546-0006）。10 µg/mL の固定濃度を用いた場合、アニフロルマブは 20 例の I 型 IFN 陽性 SLE 患者の血清において、I 型 IFN 誘導性 ISRE-ルシフェラーゼ活性を 96%阻害した（図 13［Figure 2 in Riggs et al 2018］）。

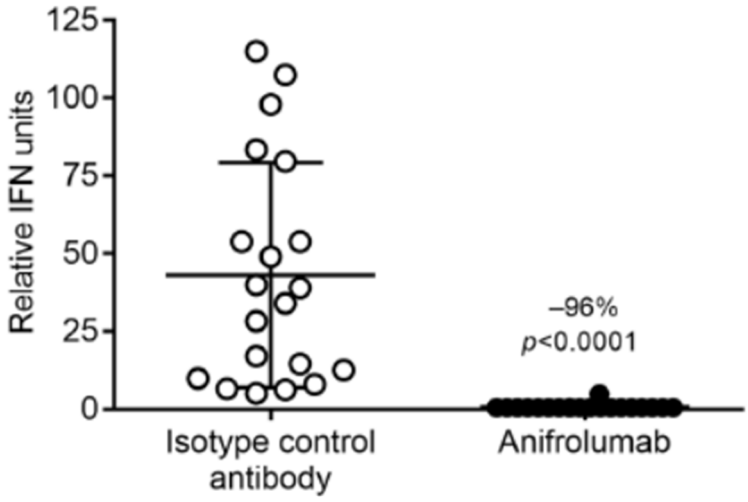
図 12　　アニフロルマブは SLE 患者血清中に存在する I 型 IFN によって誘導される ISRE-ルシフェラーゼ活性を強力に阻害する



Pil-5 ISRE-luciferase cells were incubated with SLE sera samples at 70, 59.9 and 7 IU/mL (left, right and bottom panel, respectively) in the presence of anifrolumab or the isotype negative control antibody, R3-47. Luciferase luminescence values were plotted to fit a non-linear regression 1-site competition curve; the corresponding IC_{50} values were calculated accordingly. Anifrolumab (filled squares), and IgG1 negative control isotype (filled triangles).

MEDI-546 = anifrolumab

図 13　　アニフロルマブは SLE 患者血清中の I 型 IFN を阻害する



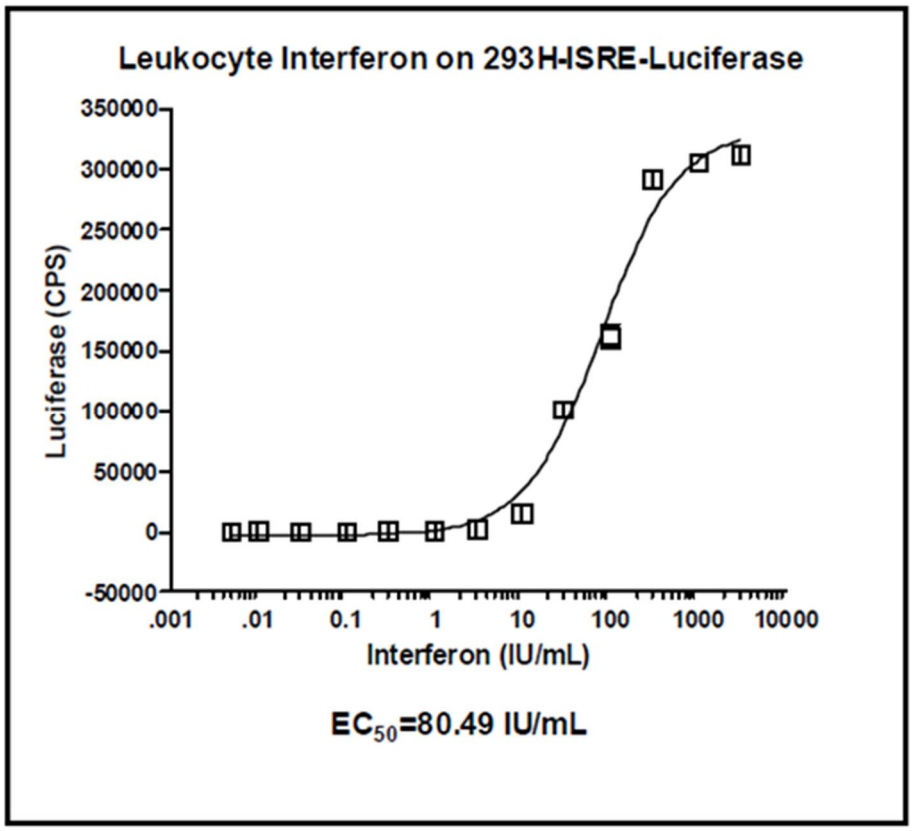
Pil-5 ISRE-luciferase cells were incubated with 50% sera from 20 type I IFN-positive SLE patients with either 10 µg/mL of isotype control antibody (R3-47 TM) or anifrolumab. Anifrolumab significantly inhibited the sera induced type I IFN activity compared to the isotype control antibody (p <0.0001).
MEDI-546 = anifrolumab

2.6.2.2.1.6　固定化アニフロルマブは ISRE-ルシフェラーゼアッセイにおいてアゴニスト活性を示さない

特定のアゴニスト特性をもつ固定化された抗 IgM 抗体、抗 CD4 抗体及び他の抗体は、これまで T 細胞や B 細胞を含む種々の細胞サブセットを活性化するために用いられてきた（Leptin 1985、Geppert and Lipsky 1987、Takayama et al 1987、Suzuki et al 1995）。アニフロルマブがアゴニスト活性を有するか否かを明らかにするために、ISRE-ルシフェラーゼ導入 HEK293H 細胞株を用いて ISRE の活性に対する固定化アニフロルマブの作用を評価した（試験番号 RIA546-0008）。

陽性対照として使用するために、ISRE-ルシフェラーゼを導入した HEK293H 細胞を段階希釈した白血球 IFN で刺激した。図 14 に示すように、使用した白血球 IFN の最低濃度は約 1.7 IU/mL であり、この濃度では 1833 ± 251 カウント/秒（CPS）のルシフェラーゼ活性が得られ、これはバックグラウンドレベルの 3 倍を上回っていた。使用した白血球 IFN の最大濃度は約 3000 IU/mL であり、この濃度では 312298 ± 9194 CPS のルシフェラーゼ活性が得られた。

図 14　　ISRE-ルシフェラーゼ導入 HEK293H 細胞における白血球 IFN によるルシフェラーゼ活性の誘導



HEK293H ISRE-luciferase cells (clone 8G12) were stimulated with serially diluted (667–0.3 IU/mL) Leukocyte-IFN overnight at 37ºC with 5% CO_2. After overnight incubation, supernatants were discarded, and cells were lysed at -80ºC for 15 minutes to ensure uniform and complete lysis of the monolayer. Luciferase luminescence intensity from the thawed lysates was evaluated using the Promega luciferase assay system and a [redacted] luminometer. Luciferase luminescence values (open squares) were plotted to fit a non-linear regression one-site competition curve using the [redacted] software. The corresponding EC_{50} values were determined accordingly.

固定化アニフロルマブは、濃度 679 nM において平均 315 ± 75 CPS のルシフェラーゼ活性を誘導した。この値は陰性対照抗体 R3-47 で誘導される活性（431 ± 9 CPS）と同程度であり（表 4）、白血球 IFN で誘導されたルシフェラーゼ活性の最小検出レベルである 1833 ± 251 CPS（1.7 IU/mL の白血球 IFN に相当）を下回っていた。したがって、アニフロルマブは IFNAR1 特異的なアゴニストの特性を示さなかった。

表 4　　アニフロルマブ又は R3-47 固定化抗体はルシフェラーゼ活性を誘導しない

Antibody (Concentration)	Average ± Standard Deviation (CPS)
Anifrolumab (679 nM)	315 ± 75
Anifrolumab (67.9 nM)	329 ± 17
Anifrolumab (6.79 nM)	425 ± 97
Anifrolumab (0.679 nM)	387 ± 54

Antibody (Concentration)	Average ± Standard Deviation (CPS)
R3-47 (679 nM)	431 ± 9
R3-47 (67.9 nM)	437 ± 15
R3-47 (6.79 nM)	418 ± 20
R3-47 (0.679 nM)	320 ± 41

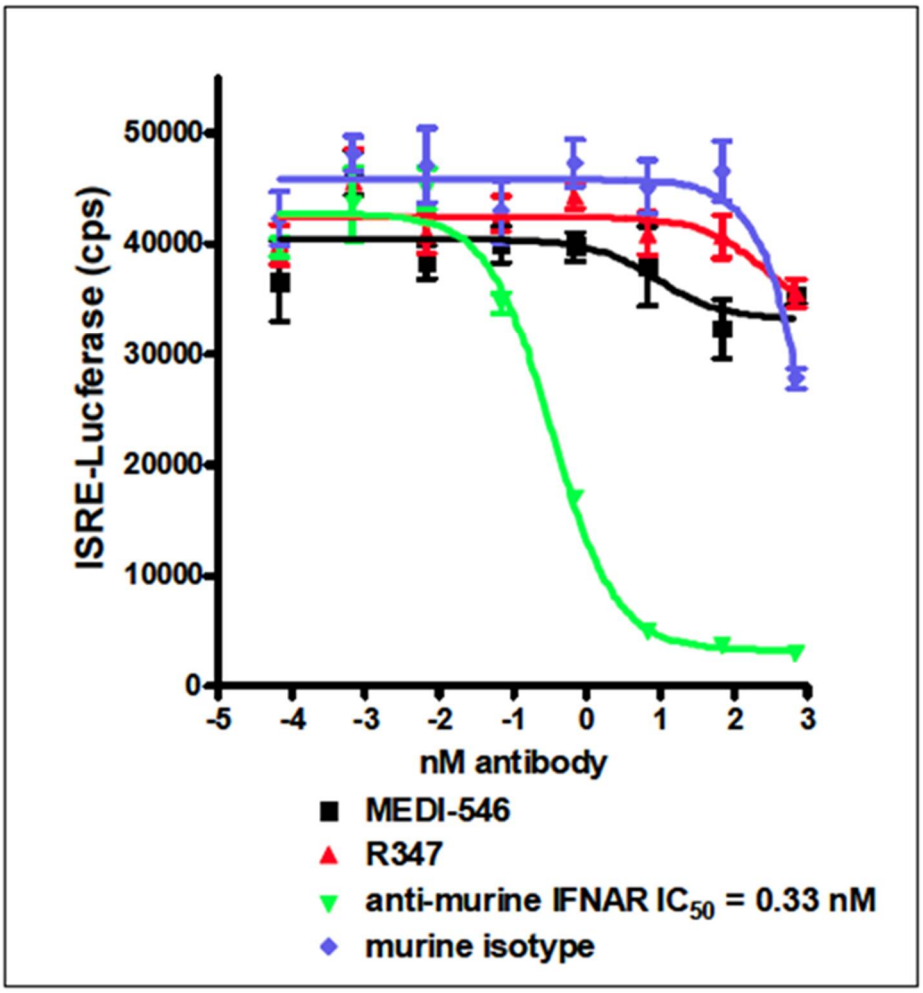
MaxAdsorb plates were coated overnight at 4°C with dilutions of anifrolumab or R3-47 antibodies in 1X PBS (679, 67.9, 6.79, and 0.679 nM). Subsequently, 8 x 10^4 293H ISRE- luciferase cells (clone 8G12) were added to each well and the plates were incubated overnight at 37ºC with 5% CO_2. After overnight incubation, supernatants were discarded, and cells were lysed using 25 µl of a 1X preparation of Promega cell culture lysis reagent. Cells were then frozen at -80°C for 15 minutes to ensure uniform and complete lysis of the monolayer. According to manufacturer's instructions, luciferase luminescence intensity from the thawed lysates was evaluated using the Promega luciferase assay system and a [redacted] luminometer.
MEDI-546 = anifrolumab

2.6.2.2.1.7 アニフロルマブの動物種間交差反応性 - アニフロルマブはISRE-ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて組換えカニクイザルI型IFNを阻害するが、組換えマウスI型IFNは阻害しない

ISRE-ルシフェラーゼレポーター細胞アッセイにより、アニフロルマブが複数の組換えヒトI型IFN、pDC由来I型IFN及びヒト血清中のI型IFNを強力に阻害することが示された。毒性試験においてカニクイザルが適切な動物種であることを支持するため、同様のISRE-ルシフェラーゼレポーターアッセイを用い、組換えマウス及びカニクイザルのI型IFNに対するアニフロルマブの阻害能を評価した（試験番号RIA546-0006）。

マウスMLE細胞にISRE-ルシフェラーゼレポーターをトランスフェクトし、マウス組換えIFN-α 100 IU/mLで刺激して、アニフロルマブ、抗マウスIFNAR1抗体（陽性対照）又はアイソタイプ対照抗体の存在下又は非存在下で一晩インキュベートした。陽性対照である抗マウスIFNAR1抗体はマウス組換えIFN-αで誘導されたISREの活性化を完全に阻害したが、一方でアニフロルマブとアイソタイプ対照抗体にこの阻害作用は認められなかった（図15）。アニフロルマブがマウス組換えIFN-αにより誘導されたISREの活性化を阻害しなかったことは、ヒトのIFNAR1サブドメイン3をマウス由来のもので置換することでアニフロルマブの結合が阻害されたエピトープマッピングデータと一致している（2.6.2.2.1.3項参照）。これらのデータは、マウスがアニフロルマブの薬理学的毒性を評価するための適切な動物種ではないことを示している。

図 15　　アニフロルマブはマウス組換え IFN-α 誘導性 ISRE-ルシフェラーゼ活性を阻害しない



Anifrolumab (MEDI-546), mouse anti-IFNAR surrogate positive control antibody and R3-47 (IgG1 isotype negative control) antibodies were titrated in the presence of recombinant murine IFN-α (100 IU/mL, R&D) and incubated at 37ºC with MLE-12 ISRE-luciferase cells for 20 hours. Neutralization activity was assessed by the inhibition of luciferase activity using a luciferase assay system and a Victor2 luminometer. Luciferase luminescence values were plotted to fit a non-linear regression one-site competition curve using the GraphPad Prism 4 software. The corresponding IC_{50}s were determined accordingly.
MEDI-546 = anifrolumab

カニクイザルの I 型 IFN は、対応するヒト I 型 IFN のアミノ酸配列と高い一致率を示した（81%～95%）。マウスとは異なり、カニクイザルの IFNAR1 は対応するヒト IFNAR1 のアミノ酸配列と高い一致率を示す（90.8%）（図 16）。同様に、アフリカミドリザルの IFNAR1 もヒト及びカニクイザルの IFNAR1 と高いアミノ酸相同性を示す。さらに、アニフロルマブはヒト及びカニクイザルの IFNAR1 に対し、同程度の結合親和性を示した（2.6.2.2.1.2 項参照）。

図 16　　ヒト及びカニクイザルの IFNAR1 アミノ酸配列相同性



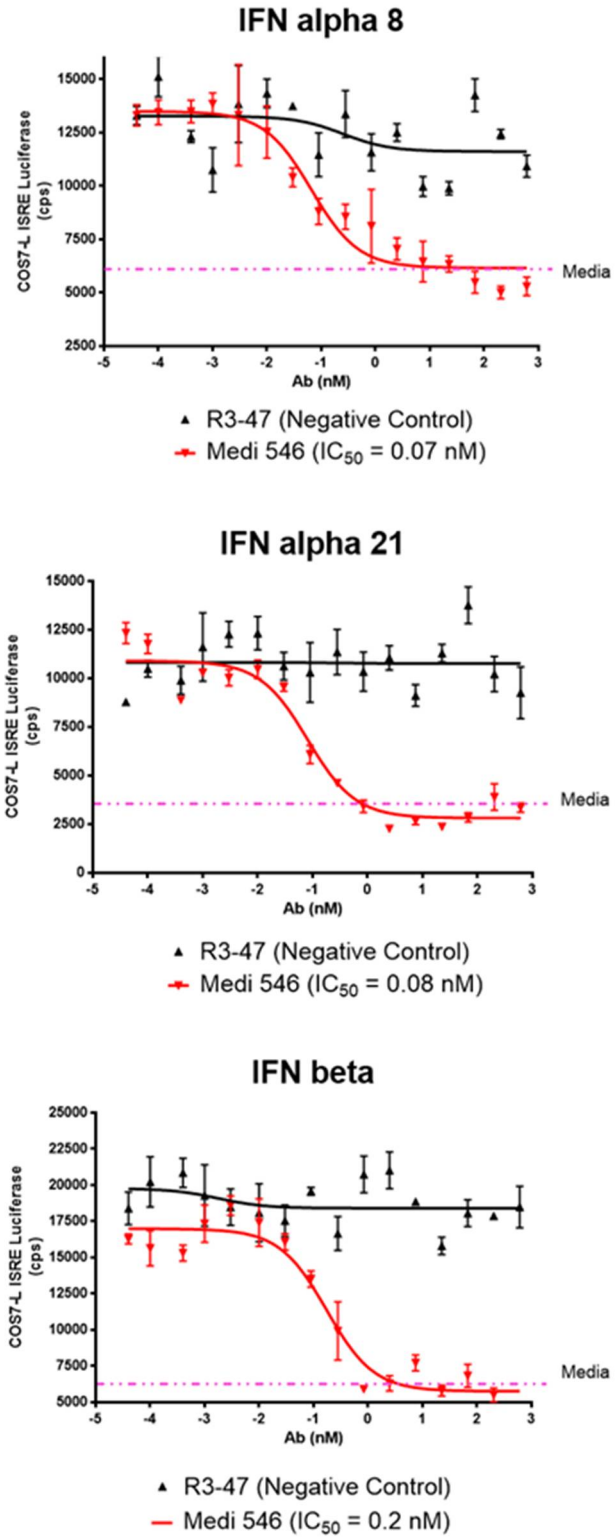
Amino acid sequence alignment of human and cynomolgus monkey IFNAR1. Amino acids which differ between the two sequences are highlighted.

カニクイザル I 型 IFN 誘導性シグナル伝達に対するアニフロルマブの阻害能についても確認するため、非ヒト霊長類の細胞株（アフリカミドリザル由来 COS7）に ISRE-ルシフェラーゼを一過的にトランスフェクトし、ISRE-ルシフェラーゼアッセイを開発した。組換えカニクイザル IFN-α のサブタイプ、IFN-β、及び IFN-ω をクローニングし発現させた。COS7 ISRE-ルシフェラーゼ細胞を 100 IU/mL の各組換えカニクイザル I 型 IFN と、アニフロルマブ又はアイソタイプ対照抗体（R3-47）の存在下又は非存在下で一晩インキュベートした。細胞を溶解し、ルシフェラーゼ値を計測した上でプロットし、非線形回帰一部位競合曲線で近似して IC_{50} 値を算出した。アニフロルマブは、組換えカニクイザル IFN-α8、IFN-α16、IFN-α21、IFN-β 及び IFN-ω 誘導性の ISRE-ルシフェラーゼ活性を強力に阻害した。カニクイザル IFN-α8、IFN-α21 及び IFN-β 誘導性 ISRE-ルシフェラーゼ活性に対するアニフロルマブの阻害能について、代表的なプロットを図 17 に示し、概要を表 5 に示す。アニフロルマブは複数のカニクイザル I 型 IFN が誘導する ISRE 活性に対し強力な阻害能を示したが、これは既述の組換えヒト I 型 IFN での阻害能と同様であった（2.6.2.2.1.5 項参照）。

さらに、カニクイザルを用いたアニフロルマブの単回投与毒性試験において（試験番号 7140-131）、*ex vivo* 刺激モデルにおける全血試料中の IFN α/β 誘導性遺伝子発現は、アニフロルマブ投与後 14 日間まで用量依存的に減少することが認められた（2.6.6.2.2 項参照）。

これらのデータから、サル細胞におけるアニフロルマブの結合活性及び中和活性に基づき、非臨床安全性評価のための薬力学的に適切な毒性モデルとしてカニクイザルを選択した。

図 17　　アニフロルマブは組換えカニクイザル I 型 IFN 誘導性 ISRE-ルシフェラーゼ活性を阻害する



COS7 ISRE-luciferase cells were incubated with 100 IU/mL of individual recombinant cynomolgus monkey type I IFNs with or without anifrolumab (MEDI-546) or isotype control antibody (R3-47). After 18-20 hours incubation, cells were lysed, luciferase values were determined. Data was plotted to fit a non-linear regression 1-site competition curves and IC_{50} values were calculated using GraphPad Prism4 software.
MEDI-546 = anifrolumab

表 5　アニフロルマブによる組換えカニクイザル I 型 IFN 誘導性 ISRE-ルシフェラーゼ活性阻害に関する概要

Inhibition of Recombinant Cyno Type I IFN with Anifrolumab IC_{50} Values (nM)					
Cynomolgus Type I IFN Subtype	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Mean	Std Dev
IFN-α8	0.03	0.07	-	0.05	0.03
IFN-α16	0.03	0.2	-	0.12	0.12
IFN-α21	0.1	0.03	0.08	0.07	0.04
IFN-β	0.1	0.2	1	0.43	0.49
IFN-ω	0.1	0.3	-	0.2	0.14

MEDI-546 = anifrolumab

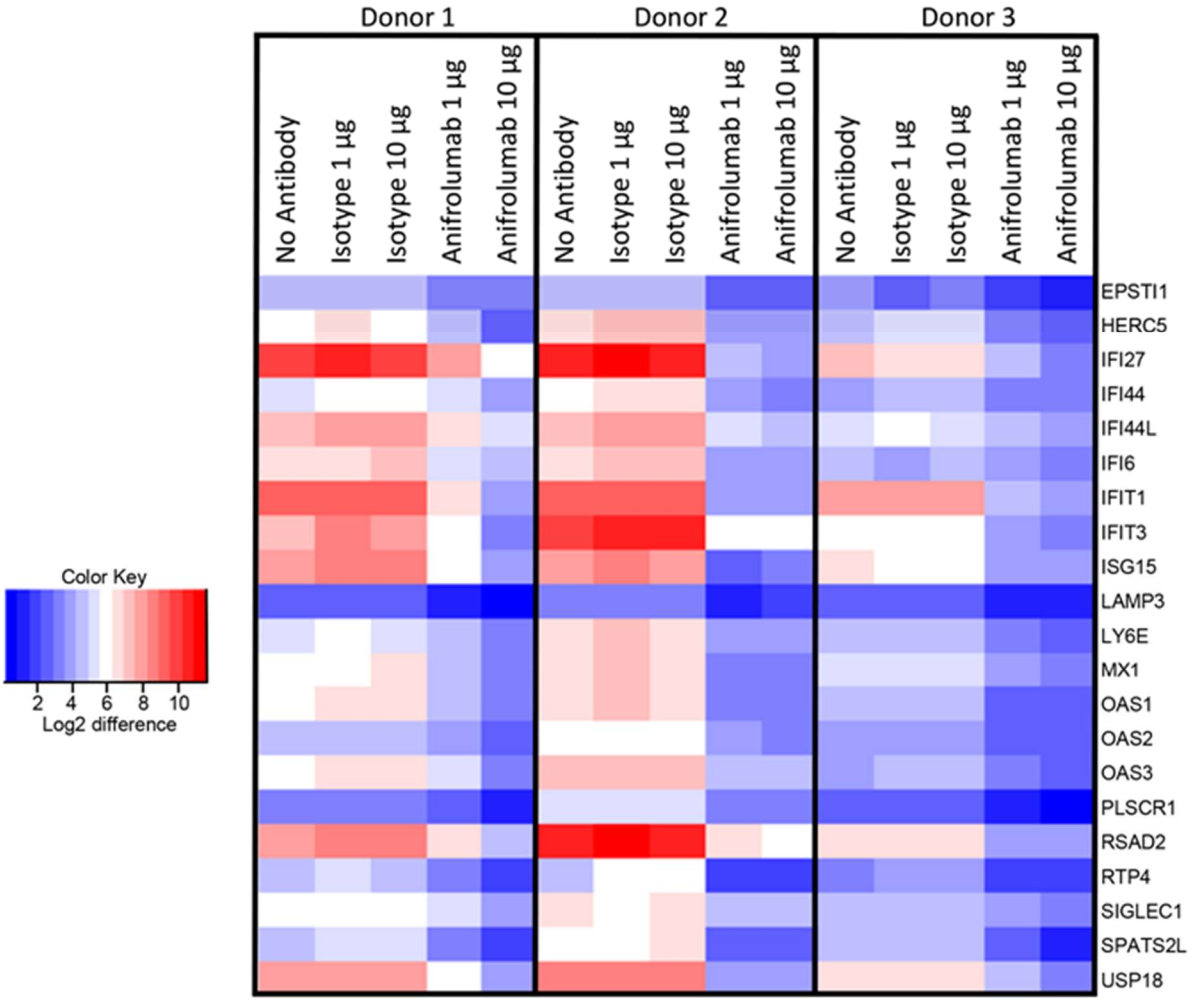
2.6.2.2.1.7.1　アニフロルマブは CpG-A 刺激 PBMC による I 型 IFN 誘導性遺伝子発現を抑制する

I 型 IFN 誘導性 IFNAR1/2 複合体形成の下流では、活性化された STAT ヘテロ二量体は核内に移行し、遺伝子プロモーター内の ISRE に結合する STAT/IRF9 転写複合体が形成され、数百の IFN 誘導性遺伝子が発現する。これらのうちの 21 遺伝子の発現に基づく I 型 IFN 誘導性遺伝子発現が確認されている（Yao et al 2009）。

アニフロルマブがこの 21 の I 型 IFN 誘導性遺伝子発現を抑制し得るかを評価するために、アニフロルマブ又はアイソタイプ対照抗体の存在下又は非存在下で、TLR アゴニスト CpG-A により PBMC を刺激した（Riggs et al 2018）。

CpG-A で PBMC を刺激すると、この 21 の I 型 IFN 誘導性遺伝子発現は 20～100 倍に増加した。ヒートマップに示すように、アニフロルマブで前処理を行うと CpG-A による IFN 誘導性遺伝子発現は用量依存的に抑制された（図 18［Figure S3 in Riggs et al 2018］）。アニフロルマブは濃度 67.7 nM において、7 例のドナーの 21 の I 型 IFN 誘導性遺伝子発現を抗体処理なしと比較し平均 86%阻害したが、アイソタイプ対照抗体にこのような作用は認められなかった（図 19［Figure 3 in Riggs et al 2018］）。

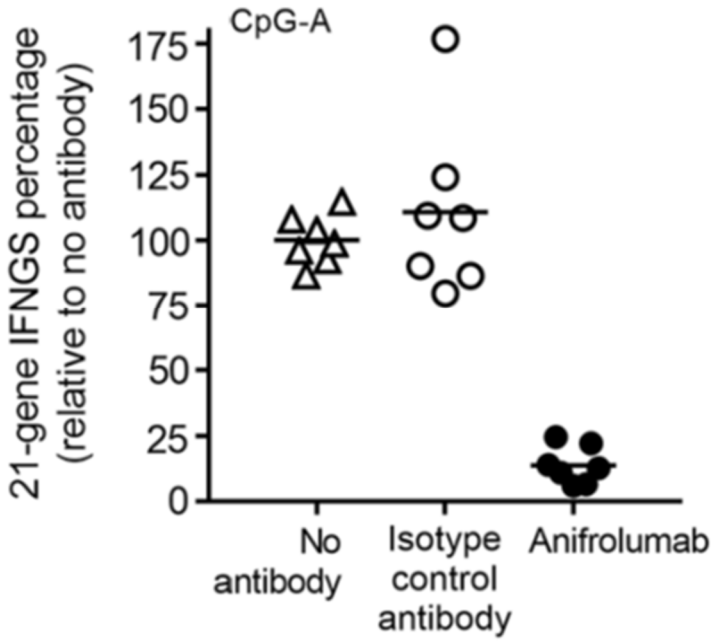
図 18　　アニフロルマブは 21 の IFN 誘導性遺伝子発現を用量依存的に阻害する



Heat map demonstrating Log2-fold change in expression of individual genes in the 21-gene interferon gene signature of CpG-A–stimulated PBMCs with and without preincubation with anifrolumab or isotype control antibody. Results are displayed compared with untreated control samples not stimulated with CpG-A for each of three representative donors.

MEDI-546 = anifrolumab

図 19　　アニフロルマブは 21 の IFN 誘導性遺伝子発現を阻害する



Healthy donor PBMCs from seven individuals were stimulated with CpG-A to induce production of type I IFNs, and the downstream induction of type I IFN genes. The PBMCs were preincubated with either no antibody, or 67.7 nM of Anifrolumab or control antibody. The plot represents the mean expression of the 21-gene signature are relative to the CpG-A stimulation without antibody.
MEDI-546 = anifrolumab

2.6.2.2.1.8　アニフロルマブは I 型 IFN 自己増幅ループの抑制を介し、pDC 機能を抑制する

前項において、アニフロルマブは I 型 IFN の結合、STAT1 のリン酸化、ISRE の活性化及び I 型 IFN 誘導性遺伝子発現を阻害することが示された。I 型 IFN の主な産生源である pDC は、I 型 IFN のシグナル伝達に応答し、自己分泌増幅ループにおいて I 型 IFN 産生の増加を導く I 型 IFN 機構のコンポーネントの発現を増加させる可能性があることも報告されている（Hall and Rosen 2010、Liao et al 2010）。

この自己増幅ループに対するアニフロルマブの抑制能を調べるために、CpG-A 又は I 型 IFN 産生を刺激するエンドソーム TLR リガンドである DNA-IC の存在下で、pDC による I 型 IFN 産生が評価された（Riggs et al 2018）。共刺激分子のアップレギュレーション及び CpG-A 刺激 pDC による他の炎症性サイトカイン産生をアニフロルマブが抑制するか否かについても調べられている（Riggs et al 2018）。最後に、CpG-A で刺激した pDC/B 細胞共培養系で、形質細胞の分化に対しアニフロルマブが阻害能を持つかについても評価した。

アニフロルマブ又はアイソタイプ対照抗体の存在下又は非存在下において、濃縮したヒト pDC を一晩 CpG-A 又は DNA-IC で刺激し、IFN-α 産生を ELISA により測定した。アニフロルマブは、アイソタイプ対照抗体に比較して用量依存的に I 型 IFN-α の産生を阻害した。67.7 nM の固

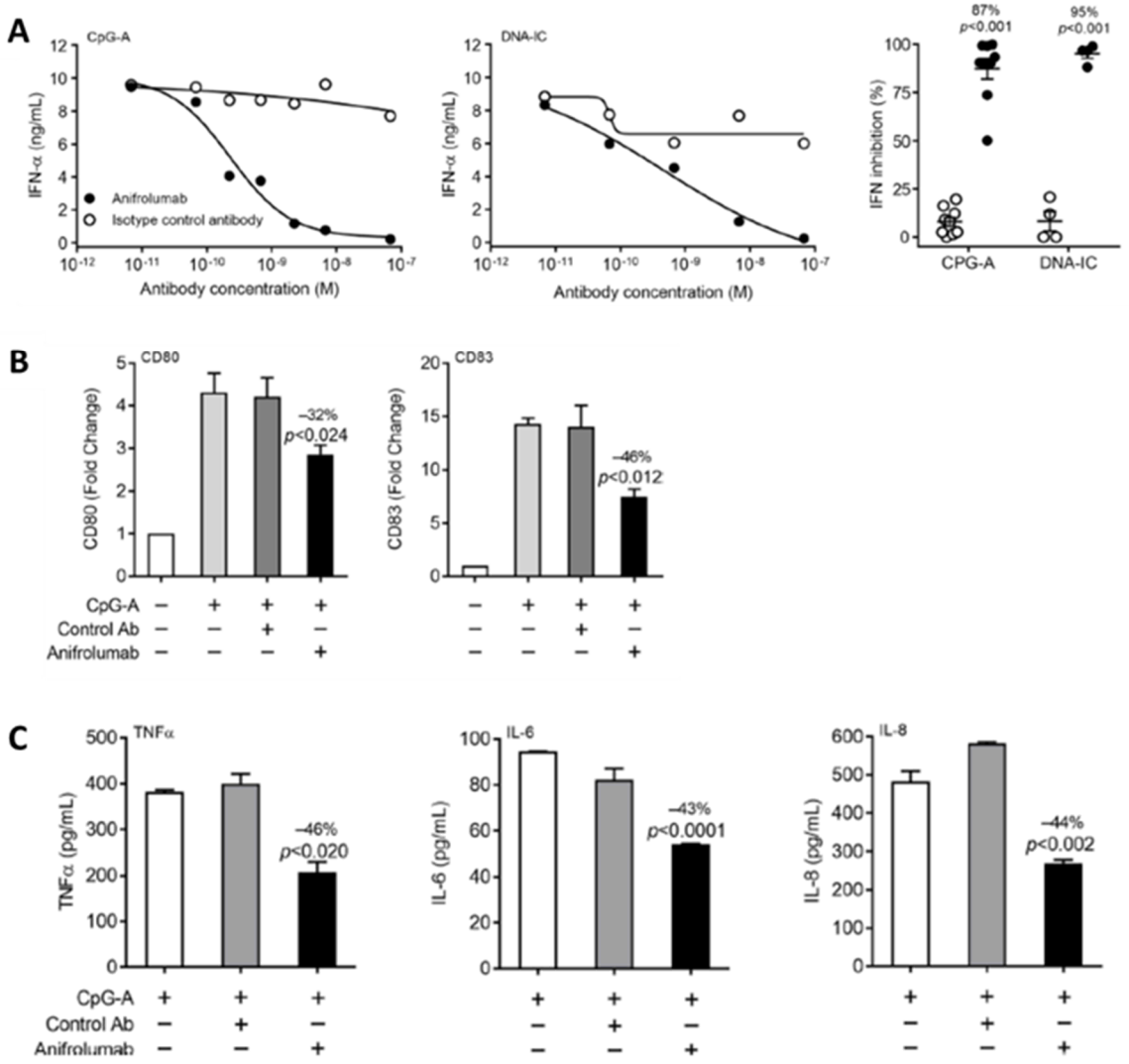
定濃度を用いた場合、アニフロルマブはI型IFN-αの産生について80%を超える阻害を見せた（図20A［Figure 3 in Riggs et al 2018］）。

同様に、アニフロルマブ又はアイソタイプ対照抗体の存在下又は非存在下において、pDCを一晩CpG-Aで刺激し、細胞表面共刺激マーカーCD80及びCD83の発現をフローサイトメトリーで評価し、培養上清における炎症性サイトカインTNFα、IL-6及びIL-8の産生をELISAによって測定した。67.7 nMのアニフロルマブによるIFNAR1の遮断は、刺激されたpDC上のCD80及びCD83のアップレギュレーションをそれぞれ32%及び46%有意に抑制し（図20B［Figure 3 in Riggs et al 2018］）、TNFα、IL-6及びIL-8の産生を約45%有意に抑制した（図20C［Figure 3 in Riggs et al 2018］）。

I型IFNの遮断がB細胞分化に影響を与えるか否かを判断するため、アニフロルマブ又はアイソタイプ対照抗体の存在下又は非存在下において、pDC/B細胞共培養系をCpG-Aで刺激してI型IFN産生を誘導し、MEGACD40L®でB細胞を活性化した。CpG-Aで刺激したpDCの存在によりB細胞の形質細胞への分化が促進され、アニフロルマブはこれを抑制したが、アイソタイプ対照抗体では抑制が起こらなかった（図21［Figure 4 in Riggs et al 2018］）。

これらの結果より、アニフロルマブがI型IFN産生の自己分泌による増幅を阻害し、共刺激及び炎症性サイトカインの産生を抑制し、限局性の炎症及び組織損傷に寄与する可能性のある形質細胞分化を抑制し得ることが示された。

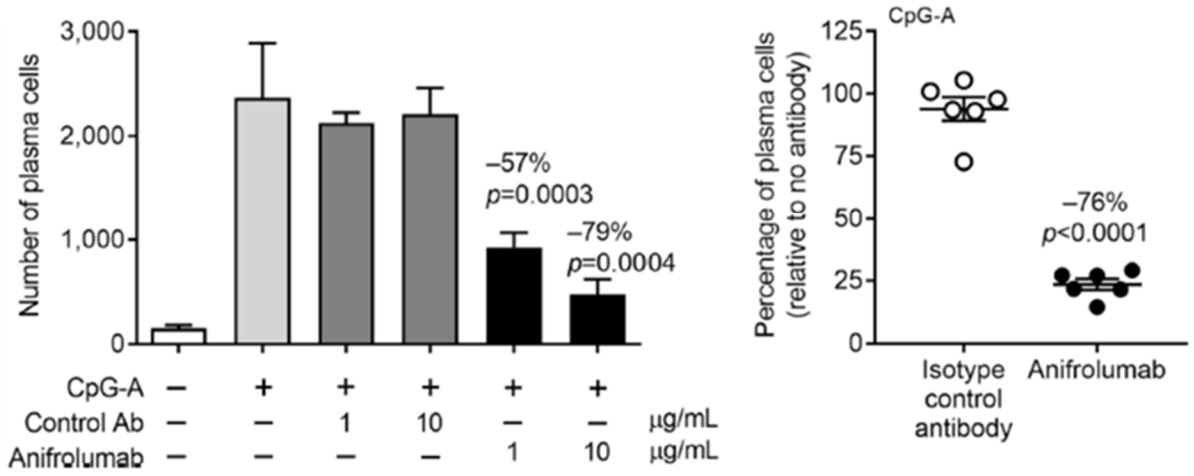
図 20　　アニフロルマブは I 型 IFN 自己分泌増幅ループの阻害により、I 型 IFN の誘導、共刺激分子のアップレギュレーション、及び炎症性サイトカイン産生を抑制する



(A) IFN-α production by CpG-A– and DNA-IC–stimulated pDCs with and without preincubation with anifrolumab or isotype control antibody. Dose response curves of antibody inhibition of IFN-α from a representative donor stimulated with CpG-A (left panel), DNA-IC (middle panel), and quantification of IFN inhibition from multiple donors at 10 µg/mL (67.7 nM) anifrolumab or isotype control antibody (right panel). (B) CD80 activation and CD83 maturation surface marker expression in CpG-A–stimulated pDCs with and without preincubation with 10 µg/mL (67.7 nM) anifrolumab or isotype control antibody. (C) TNFα, IL-6, and IL-8 secretion from CpG-A–stimulated pDCs with and without preincubation with 10 µg/mL (67.7 nM) anifrolumab or isotype control antibody. One representative experiment of six replicate experiments in all panels. Values are means and standard deviations.

MEDI-546 = anifrolumab

図 21　　アニフロルマブによるⅠ型 IFN 依存的形質細胞分化の抑制



B cells and pDC were cocultured at a 10:1 ratio in media containing 10 ng/mL IL-3 and stimulated with 0.5 µM CpG-A and 1.5 nM MEGACD40L®. The number of CD19+, CD27hi, CD38hi plasma cells in the cultures after 6 or 7 days was determined by flow cytometry. Left panel depicts a representative experiment with and without anifrolumab or isotype control antibody as indicated. Right panel shows the mean inhibition of plasma cell differentiation with 10 µg/mL of anifrolumab relative to isotype control antibody from multiple donors. Means and standard deviations are shown.
MEDI-546 = anifrolumab

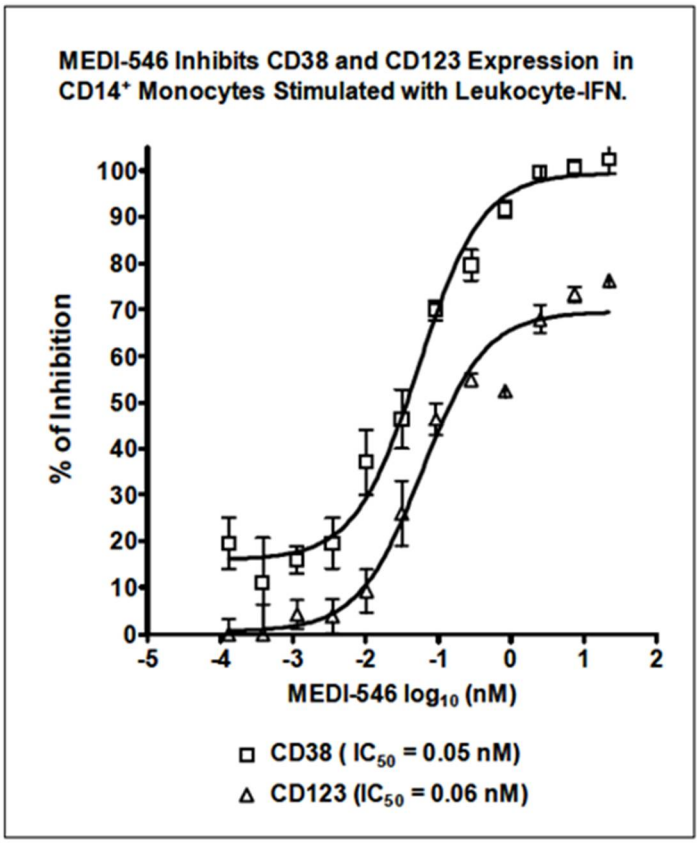
2.6.2.2.1.9　アニフロルマブはⅠ型 IFN 誘導性単球分化並びに炎症性サイトカイン及びケモカインの誘導を阻害する

Ⅰ型 IFN は免疫応答を調節する重要な役割を果たす。Ⅰ型 IFN は単球の樹状細胞への分化や（Blanco et al 2001）、炎症性サイトカイン及びケモカインの産生を誘導する（Bussfeld et al 2000, Asselin et al 2001, Salazar-Mather et al 2003）。

分化マーカーCD38 及び CD123 のアップレギュレーション、並びに IL-6、MCP-1（CCL2）、MCP-2（CCL8）及び IP-10（CXCL10）の産生を調べることにより、アニフロルマブのⅠ型 IFN 誘導性の単球活性化に対する作用を評価した（試験番号 RIA546-0006）。

アニフロルマブの存在下及び非存在下において、精製した CD14+単球を 100 IU/mL の白血球 IFN（センダイウイルスに感染させた PBMC 由来のⅠ型 IFN を含む）で 48 時間刺激し、細胞を洗浄後、解離緩衝液を使用して培養プレートから回収し、CD38 及び CD123 の発現をフローサイトメトリーにより測定した。白血球 IFN は、CD38 及び CD123 マーカーの発現をそれぞれ 1.9 倍及び 2.65 倍増強した。アニフロルマブは CD38 及び CD123 のアップレギュレーションを用量依存的に阻害した（図 22）。アニフロルマブは、アイソタイプ対照抗体に比べて CD38 のアップレギュレーションを 95%阻害し IC_{50} 値は 0.05 nM、CD123 のアップレギュレーションを 73%阻害し IC_{50} 値は 0.06 nM であった。

図 22　　アニフロルマブは白血球 IFN 誘導性単球分化を阻害する



A representative experiment showing the dose-dependent inhibition of leukocyte-IFN induced expression of the cell surface differentiation markers CD38 and CD123.
MEDI-546 = anifrolumab

サイトカイン及びケモカイン誘導に対するアニフロルマブの作用を評価するために、単球をアニフロルマブ又はアイソタイプ対照抗体（R347）の存在下及び非存在下において 100 IU/mL の白血球-IFN で 24 時間刺激し、培養上清中の IL-6、MCP-1、MCP-2 及び IP-10 のレベルを ELISA に基づく手法により評価した。

単球の白血球 IFN 刺激により、IL-6、IP-10、MCP-1 及び MCP-2 産生は平均 3～19 倍増加した。表 6 に示すように、20 nM のアニフロルマブはサイトカイン及びケモカインの誘導を完全に抑制した。白血球 IFN 誘導性 IP-10 産生に対するアニフロルマブの用量依存的な阻害例を図 23 に示す。

表 6　　アニフロルマブによるヒト単球からの白血球 IFN 誘導性サイトカイン及びケモカイン産生の阻害

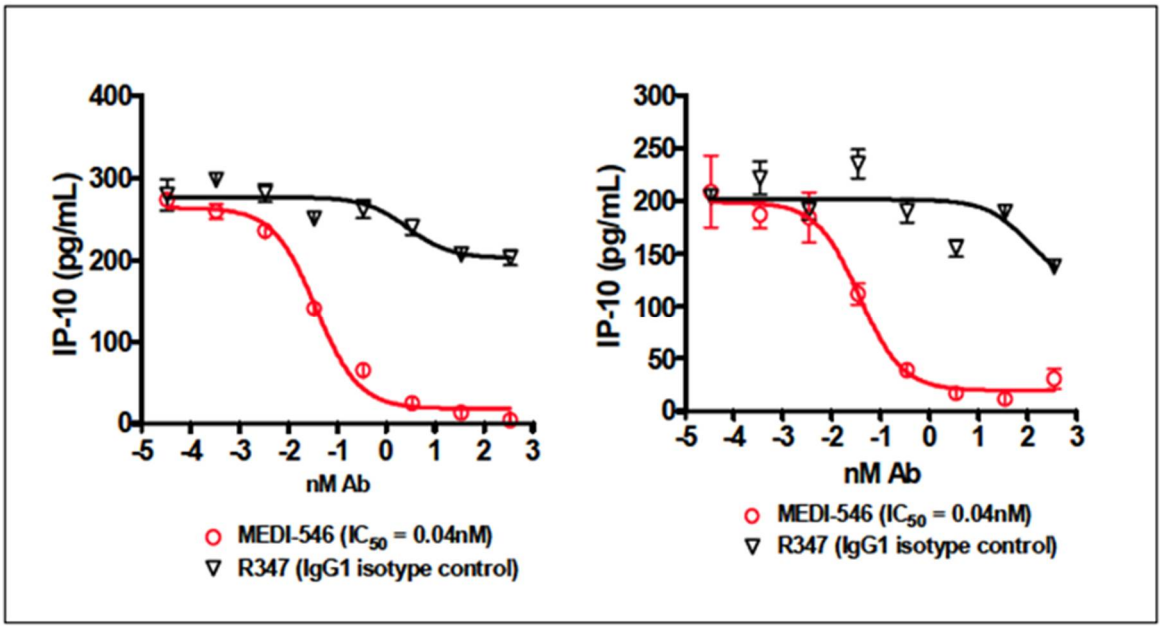
Cytokine/ Chemokine	Untreated (pg/mL)	Leukocyte-IFN Treated (pg/mL)	Fold Induction	Leukocyte-IFN + Anifrolumab Treated (pg/mL)	Percent Inhibition
IL-6	8.1	25.6	3.2	7.7	100
IP-10	23.1	332.8	14.4	12.3	100

表 6　　アニフロルマブによるヒト単球からの白血球 IFN 誘導性サイトカイン及びケモカイン産生の阻害

Cytokine/ Chemokine	Untreated (pg/mL)	Leukocyte-IFN Treated (pg/mL)	Fold Induction	Leukocyte-IFN + Anifrolumab Treated (pg/mL)	Percent Inhibition
MCP-1	25.8	510.6	19.8	23.8	100
MCP-2	1.6	30.3	19	1.2	100

MEDI-546 = anifrolumab

図 23　　アニフロルマブは単球による白血球 IFN 誘導性 IP-10 産生を用量依存的に阻害する



Representative examples show the dose-dependent inhibition of leukocyte type I IFN inducted IP-10 by anifrolumab compared to the isotype control antibody (R3-47). Data and IC_{50} values were extrapolated using a logarithmic non-linear, 1-site competition regression analysis using GraphPad Prism4 software.
MEDI-546 = anifrolumab

2.6.2.2.1.10　アニフロルマブは FcγR に対する結合性が抑制されているが、FcRN に対する結合性は保持している

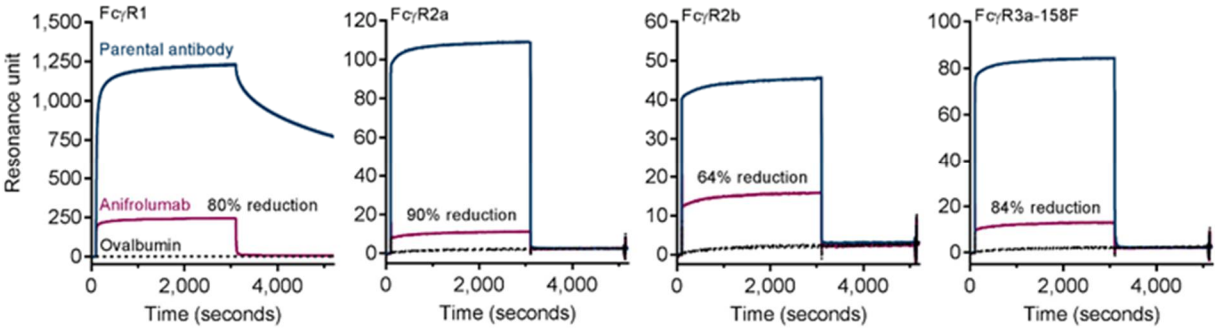
細胞表面に結合した、又は組織内で凝集した IgG 分子の Fc 領域には FcγR 保有細胞への結合能があり、抗体依存性細胞傷害（ADCC）若しくは食作用等のエフェクター機能の活性化を促進する可能性がある。細胞上の IgG の Fc 領域に対する補体成分の結合もまた、補体依存性細胞傷害（CDC）を促進する可能性がある。哺乳類細胞において IFNAR1 の発現は低レベルなものであるが、結合した抗体がこれらのエフェクター機能を誘発する可能性はあるものと考えられる。この懸念を減ずるために、アニフロルマブには Fc 領域に 3 つの変異（L234F、L235E、P331S）が導入されている。これらの変異導入により、FcγR 及び C1q 結合が減少し、抗体を介するエフェク

ター機能が抑制される（Canfield and Morrison 1991, Chappel et al 1991, Idusogie et al 2000, Hezareh et al 2001）。アニフロルマブの細胞表面 FcγR への結合は潜在的に望ましくない効果となるが、これとは対照的に、アニフロルマブとエンドソームの FcRn 間の相互作用の保持は好ましいものと考えられる。FcRn は主に血管内皮で発現しており、IgG をリサイクルすることで IgG の恒常性を維持し、これによって循環血液中の抗体半減期を延ばす重要な役割を果たしている（Akilesh et al 2007）。

BIAcore を用いた解析により、FcγR への結合能をアニフロルマブ（Fc 領域の 3 つの変異を含む）及び野生型 Fc 領域を有するその親抗体（9D4）で比較した（Riggs et al 2018）。FcRn に対するアニフロルマブ及び親抗体 9D4 の結合能についても、BIAcore を用いて評価した（試験番号 RIA546-0010）。

標準的なアミンカップリング法により、アニフロルマブ若しくは親抗体 9D4 を CM4 センサーチップ上の別個のフローセルに高密度で固定化した。組換え FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa-158F 及び陰性対称（オボアルブミン）を測定器用緩衝液 HBS-EP を用いて 1 mM に調製し、IgG をコートしたセル及び基準セルの両表面上に送液した。結合は BIAcore T200 により 50 分にわたって計測された。代表的なセンサーグラムから、アニフロルマブの Fc 領域に導入された 3 つの変異（L234F、L235E、P331S）が、野生型 Fc 領域を有する親抗体 9D4 と比較して、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb 及び FcγRIIIa-158F への結合を 64%から 90%の間で減少させることが明らかになった（図 24［Figure S4 in Riggs et al 2018］）。組換え FcγRI 及び組換え FcγRIIIA に対するアニフロルマブの結合は最小レベルのものとなっており、この 3 つの変異の導入によって FcγR 結合の抑制に成功したものと考えられる。

図 24　　アニフロルマブは組換え FcγR に対する結合性が抑制されている（親抗体 9D4 との比較による）

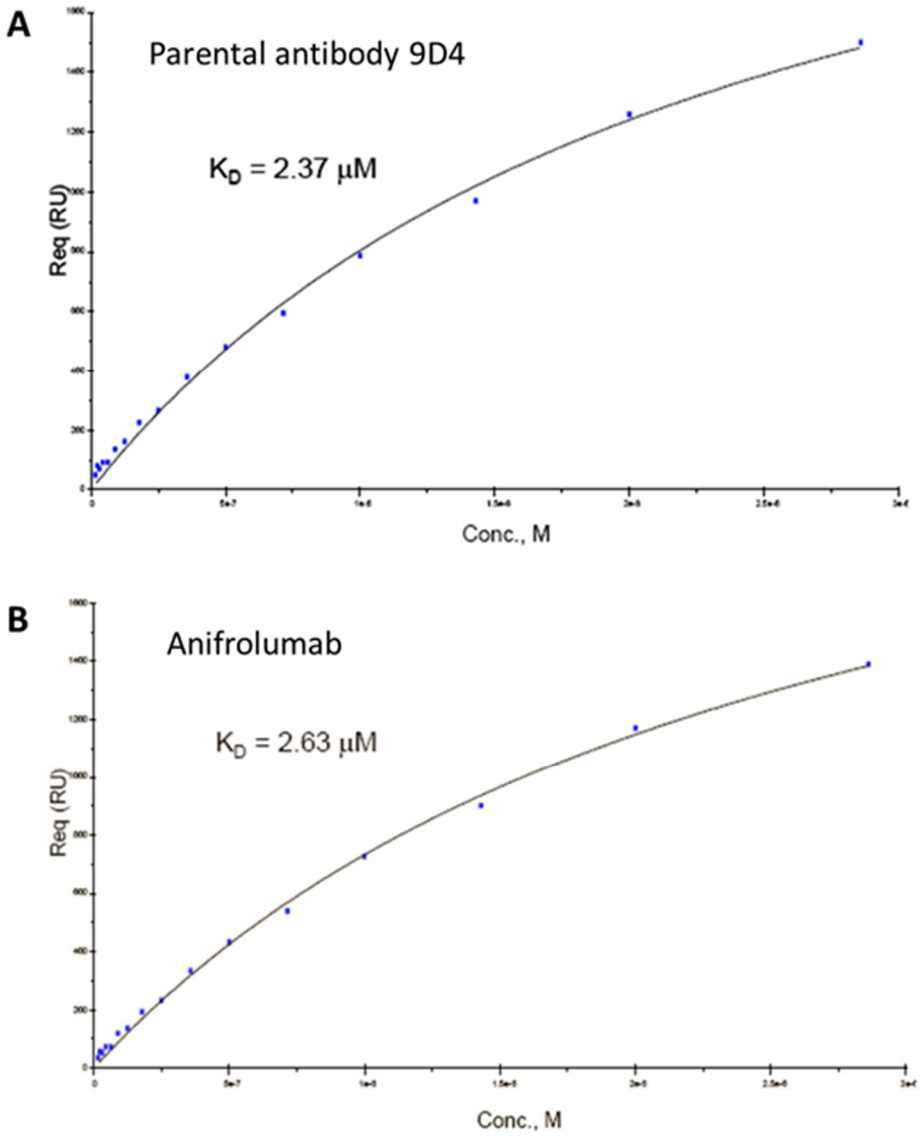


BIAcore sensorgram overlays showing binding of recombinant FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, and FcγRIIIa-158F to anifrolumab and its parental antibody 9D4 which bears a wild-type Fc domain were generated using Prism 6 software. The results are representative of three independent assessments.
MEDI-546 = anifrolumab

アニフロルマブ及び野生型 Fc 領域を有する親抗体 9D4 に対するヒト FcRn の K_D は、BIAcore3000 を用いた表面プラズモン共鳴により測定した。簡潔に述べると、まず抗体を標準的なアミンカップリング法により CM5 センサーチップの別個のフローセル上に高密度で固定化した。装置を緩衝液でプライミングした後、一連のヒト FcRn 濃縮液を抗体及び対照細胞表面上に注入し、結合データを 50 分間収集した。すべての結合データを収集後、各濃度における結合性について個別データセットの平均値を求めてプロットし、1：1 結合等温線で近似した。ここから [redacted] により K_D を算出した。

ヒト FcRn の 9D4 及びアニフロルマブに対する結合等温線を図 25 に示す。FcRn の 9D4 に対する K_D は 2.37 μM であり、アニフロルマブに対しては 2.63 μM であった。この平衡結合定数の類似性は、アニフロルマブの 3 つの変異が FcRn 結合に影響を与えていないことを示している。

図 25　　アニフロルマブ及び親抗体 9D4 の FcRn への結合等温線



FcRn binding isotherms and equilibrium constants for (A) parental antibody 9D4, and (B) anifrolumab. Anifrolumab and 9D4 were immobilized at high density on a CM5 sensor chip. Final surface IgG densities were 7172 RUs and 6952 RUs, respectively. A reference flow cell without protein was used to correct the raw data sets for injection artifacts and/or non-specific binding. Two-fold dilutions of human FcRn with buffer (PBS + 0.05% Tween 20, pH 6) were injected over both the IgG and reference cell surfaces at a flow rate of 5 µL/minute on a BIAcore 3000 instrument. Binding data was collected for 50 minutes, followed by multiple 60 second pulses of PBS + 0.05% Tween 20, pH 7.4 between injections to regenerate (remove bound FcRn) the IgG surfaces. Individual data sets were corrected and averaged for binding at each concentration, and then fit to a 1:1 binding isotherm plot. Equilibrium binding constants, K_D, were calculated with [redacted].
MEDI-546 = anifrolumab

2.6.2.2.1.11　アニフロルマブは ADCC 及び CDC 活性を誘導しない

Fc 依存性エフェクター機能を回避するため、アニフロルマブは重鎖定常 Fc 領域に 3 つのアミノ酸変異（L234F/L235E/P331S）が導入されており、これにより FcγR 及び C1q との結合が減少し、抗体媒介性のエフェクター機能が最小化されるように設計されている（Oganesyan et al 2008a）。これらの Fc 修飾により、アニフロルマブの FcγR への結合性は親抗体 9D4 と比較して減少していた（2.6.2.2.1.10 項参照）。

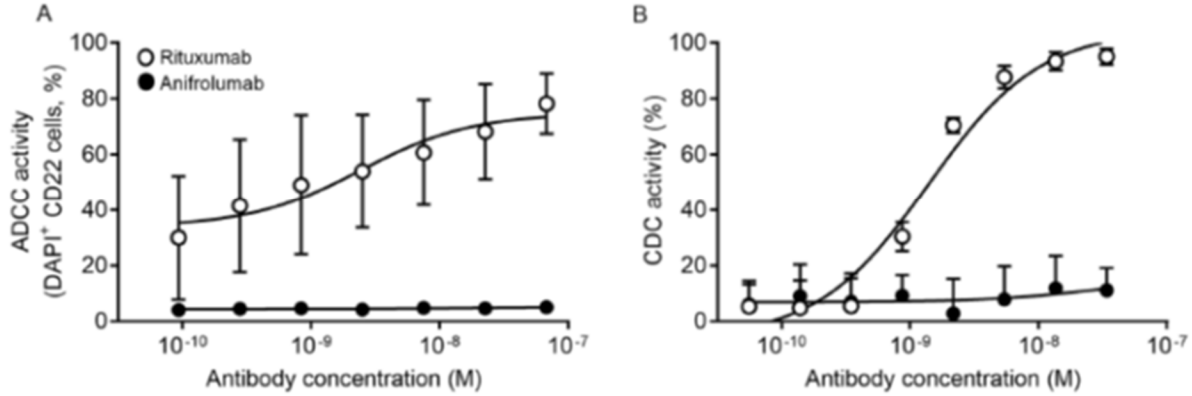
アニフロルマブの抗体媒介性エフェクター機能を誘導する能力を評価するため、ADCC 及び CDC アッセイを行った（Riggs et al 2018、試験番号 RIA546-0012 及び RIA546-0009）。

B 細胞は他のほとんどの細胞種と比較して相対的に高く IFNAR を発現しているため（Pogue et al 2004）、健常者から得られた新鮮な B 細胞、若しくは Daudi B 細胞株を、それぞれ ADCC 及び CDC アッセイに使用した。リツキシマブは B 細胞を枯渇させる作用を持つ抗体であり、ADCC 及び CDC 活性の両方を有しているため（Reff et al 1994）、これを陽性対照として使用した。

PBMC をエフェクター細胞として使用した初代培養 B 細胞の ADCC 誘導実験において、リツキシマブはこれを用量依存的に誘導したが、一方でアニフロルマブは検出可能な ADCC 活性を示さなかった（図 26A［Figure 5 in Riggs et al 2018］）。IFNAR を発現する HEK293F 細胞や NK 細胞株（KC1333）をエフェクター細胞として用いた同様の実験では、アニフロルマブは全く ADCC 活性を示さなかった（試験番号 RIA546-0012）。

また、リツキシマブは用量依存的に Daudi B 細胞の CDC も誘導したが、アニフロルマブは検出可能な CDC 活性を示さなかった（図 26B［Figure 5 in Riggs et al 2018］、試験番号 RIA546-0009）。

図 26　　アニフロルマブは B 細胞に対する ADCC 若しくは CDC を誘導しない



ADCC of primary B cells by anifrolumab and rituximab (positive control) (A). Serial dilutions of antibodies were incubated with PBMC and 150 ng/mL of recombinant human IL-2 (R&D Systems) for 20 hours at 37°C. ADCC was assessed by quantifying the proportion of DAPI+ CD22+ B cells using flow cytometry. The plot represents the mean data of three experiments from different donors. CDC of Daudi B cells by anifrolumab and rituximab (positive control) (B). Serial dilutions of antibodies were incubated with RPMI medium containing 10% human serum for 4-5 hours at 37°C. Heat-inactivated serum in parallel assays was used as a negative control. Cell viability was assessed with [redacted] ([redacted]) and luminescence assessed on an [redacted] ([redacted], [redacted], [redacted], USA). Percentage CDC with anifrolumab was determined relative to the maximal CDC activity exhibited with rituximab. The plot represents the mean of three independent experiments.
MEDI-546 = anifrolumab

2.6.2.2.2 *In vivo* 薬理試験

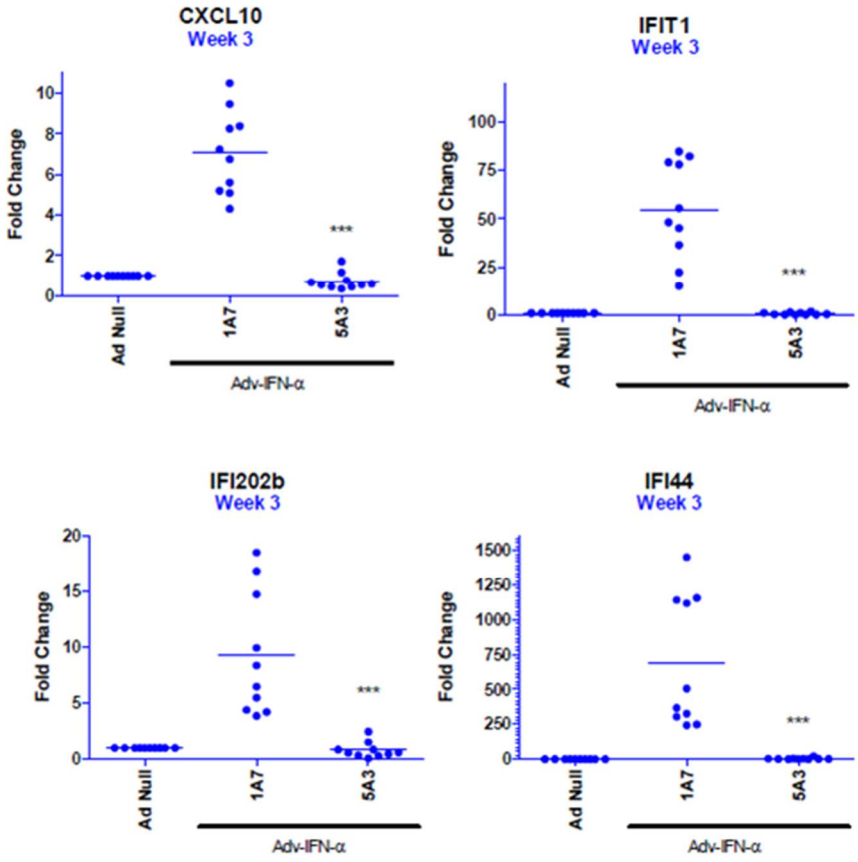
2.6.2.2.2.1 ループス加速発症モデル NZB/W F1 マウスにおいて、マウス用サロゲート抗体である抗マウス IFNAR1 モノクローナル抗体 5A3 は保護効果をもたらす

NZB × NZW の F1 世代（NZB/W F1）マウスは、ヒトの SLE で認められるいくつかの特徴に似た疾患を自然発症する（Andrews et al 1978）。これらのマウスは、抗核抗体（ANA）を産生して免疫複合体を形成し、これにより糸球体腎炎が発現して、最終的には 6 カ月齢から 1 年齢の間に死に至る。この自然発症 NZB/W F1 モデルの加速版として、マウス IFN-α5a を（非複製性）アデノウイルスベクター導入法によって NZB/W F1 マウスに投与した。本モデルでは、マウス IFN-α5a が過剰発現されることで、疾患の発症が加速される（Mathian et al 2005）。

アニフロルマブはマウス IFNAR に結合せず、マウス I 型 IFN 誘導性 ISRE 活性を阻害しない（2.6.2.2.1.3 項及び 2.6.2.2.1.7 項参照）。したがって、マウス用のサロゲート抗体である抗マウス IFNAR1 モノクローナル IgG1 抗体 5A3（Sheehan et al 2006）を用い、アデノウイルス媒介 IFN-α によるループス加速発症モデル NZB/W F1 マウスにおいて、IFNAR 遮断の影響を評価した（試験番号 RIA546-0011）。

10 週齢の雌 NZB/W F1 マウスに対し、IFN-α5a を発現する非複製性アデノウイルスベクターを感染させた。感染後 2 週間で、CXCL10/IP-10、IFIT1、IFI202b 及び IFI44 等の I 型 IFN 誘導性遺伝子の発現が増加した。抗 IFNAR 抗体 5A3 により 1 週間処理（2 回投与）を行うと、アイソタイプ対照抗体と比べこれら遺伝子の発現が有意に低下した（図 27）。

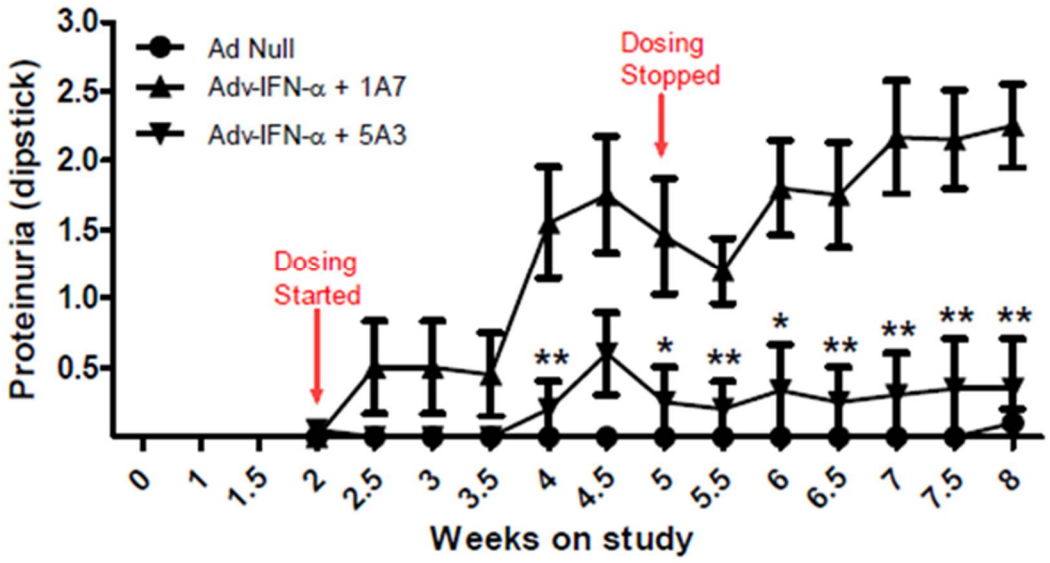
図 27　　抗 IFNAR モノクローナル抗体 5A3 投与は、Adv-IFN-α5a で誘導された PBMC における IFN 誘導性遺伝子発現増加を改善する



Ten-week old female NZB/W F1 mice were infected with 0.3 x 10^{10} viral particles of empty adenoviral vector (Ad Null) or adenoviral mIFN-α5a (Adv-IFN-α). Two weeks after infection, mice were treated twice weekly for three weeks with 0.3mgs either anti-IFNAR Ab (5A3) or isotype control antibody (1A7). After one week of treatment (2 doses), retro-orbital blood samples were collected, red blood cells were lysed, and RNA was isolated and purified from the remaining cells. cDNA was synthesized, and the expression levels of CXCL10/IP-10, IFIT-1, IFI202b and IFI44 were determined using TaqMan on a 7500 FAST Real-time PCR system. Adenoviral mIFN-α5a increased the expression of these type I IFN inducible genes expressed in peripheral blood cells compared to the empty adenoviral vector. PBMCs from anti-IFNAR (5A3) treatment mice had significantly lower expression of type I IFN genes compared to the murine IgG1 isotype control (1A7). ***P<0.0001.

感染後約 2.5 週目から始まる尿中の蛋白量の増加で示されるように、アデノウイルス-IFN-α5a の感染によって疾患の発症が加速される結果となった。5A3 による IFNAR 遮断によって、マウス尿中の蛋白量が顕著に低下した（図 28）。この保護効果は投与開始後 2 週目には早くも観察され、本試験終了時の 8 週目まで持続した。これらのデータは、I 型 IFN がループスの重要なドライバーであり、I 型 IFNAR 遮断が SLE の効果的な治療法である可能性を示している。

図 28　　抗 IFNAR モノクローナル抗体 5A3 投与は Adv-IFN-α5a 感染 NZB/W F1 マウスにおける蛋白尿の重症度を有意に低減する



Ten-week old female NZB/W F1 mice were infected with 0.3 x 10^{10} viral particles of empty adenoviral vector (Ad Null) or adenoviral mIFN-α5a (Adv-IFNα). Two weeks after infection, mice were treated twice weekly for three weeks with 0.3mgs either anti-IFNAR Ab (5A3) or isotype control antibody (1A7) as indicated. Urine was tested for proteinuria using dipsticks (Chemstrip 2 GP, Roche Diagnostics) twice weekly. Each data point represents the group average (n=10 mice) +/- standard error of the mean. Treatment with 5A3 had significantly reduced proteinuria scores compared to murine isotype control antibody (1A7) at the time-points indicated. (*P<0.05, **P<0.01; 5A3 using Wilcoxon non-parametric analysis).

2.6.2.2.2.2　全身性強皮症マウスモデルにおけるマウスサロゲート IFNAR1 特異的モノクローナル抗体の有効性

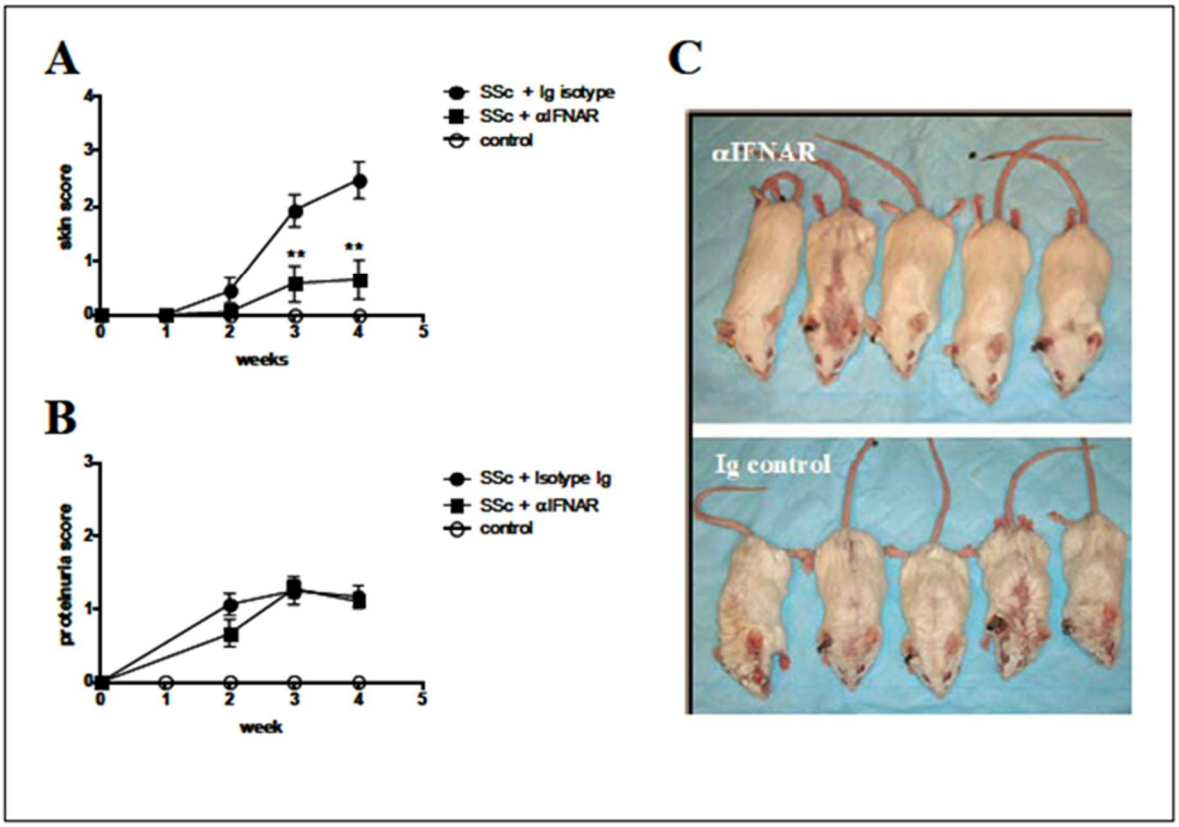
移植片対宿主誘発強皮症（GVH-SSc）は強皮症のマウスモデルであり、病因はマイナー組織適合抗原（miHag）不適合に対する抗宿主反応である。アニフロルマブはマウス IFNAR に結合せず、マウスの I 型 IFN 誘導性 ISRE 活性を阻害しない（2.6.2.2.1.3 項及び 2.6.2.2.1.7 項参照）。したがって、マウス用のサロゲート抗体である抗マウス FNAR1 モノクローナル IgG1 抗体 5A3（Sheehan et al 2006）を用いて、GVH-SSc 誘導性真皮線維化に対する IFNAR 遮断の影響を調べた（Delaney et al 2016、試験番号 RIA546-0007）。

B10.D2-*Hc*^{l} *H2*^{d} *H2-T18*^{c}/nSnJ マウス由来の脾臓白血球 3.0 × 10^{7} 個を *Rag2*$^{-/-}$（recombination activating gene 2）コンジェニックマウス（Taconic 社）の外側尾静脈に注入し、GVH-SSc を誘発した。対照として、同系の Balb/c マウスの脾細胞を *Rag2*$^{-/-}$マウスに移植した。移植の 1 日前に *Rag2*$^{-/-}$マウスを治療群に割り付け、200 µg の抗マウス IFNAR1 モノクローナル抗体（5A3）若しくはアイソタイプ対照モノクローナル抗体（1A7）、又は PBS を腹腔内投与した。投与は 28 日目まで週 2 回行った。

抗 IFNAR1 モノクローナル抗体 5A3 の週 2 回の予防的投与は、陰性対照抗体 1A7 及び未処置の SSc マウスと比較して皮膚病変の重症度及び発現率を低下させた。移植の 4 週間後、1A7 投与 SSc マウスに比べて 5A3 投与群では平均臨床スコアが 78%低下し（p<0.004、3 回の反復実験の平

均）（図 29A 及び C）、投与中止後更に 4 週間その低下は維持された（図示せず）。対照的に、SSc マウスにおいて、軽度の蛋白尿は 5A3 投与にかかわらず発症した（図 29B）。

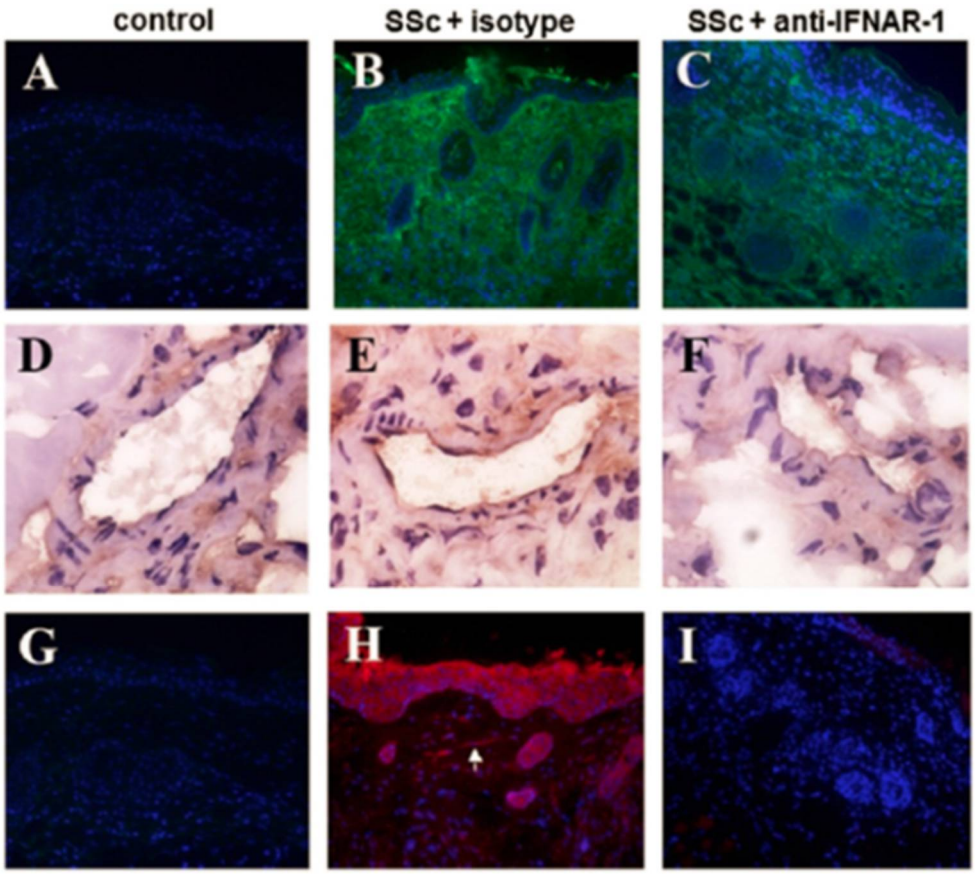
図 29　　I 型 IFN シグナル伝達の遮断は GVH-SSc の臨床スコアを低下させる



One day prior to grafting, *Rag2*$^{-/-}$ mice were placed into treatment groups and administered 0.1 mL sterile IgG1 (either 200 µg of anti-murine IFNAR1 5A3 or isotype control 1A7) or PBS via intraperitoneal injection. Mice were dosed twice weekly until study Day 28. Baseline skin scores and proteinuria measurements were obtained on Day 0, and weekly until study Day 28 when animals were euthanized for tissue harvesting. In one study, treatment groups were monitored for an additional 4 weeks after termination of Ig dosing. (A,C) Skin was scored as follows: 0= normal; 1 = lesion <1cm^2; 2= lesion 1-2cm^2; 3 = lesion > 2cm^2. Extremities (ear, tail, paws) appearing scaly were given a score of 0.3, for a maximum total score of 3.9 per animal. (B) Proteinuria was measured by Chemstrip, with a score of 1 = 30 mg/deciliter (mg/dl); 2 = 100 mg/dl; 3 = 500 mg/dl.

4 週目時点の凍結皮膚切片を免疫組織化学染色法により免疫グロブリン及び C1q 沈着について調べた。コンジェニック GVHD マウスの上皮下真皮層に多く検出された免疫グロブリン沈着は、5A3 を投与しても有意な減少はみられなかった（図 30A～C［Figure 3 in Delaney et al 2016］）。対照的に、5A3 の投与により血管内皮における免疫グロブリン沈着は完全に阻害された（図 30D～F［Figure 3 in Delaney et al 2016］）。C1q 沈着物はコンジェニック GVHD マウスの皮膚の真皮線維芽細胞を含むいくつかの細胞型で検出されたが、5A3 投与により改善された（図 30G～I［Figure 3 in Delaney et al 2016］）。

図 30　　抗 IFNAR1 モノクローナル抗体（5A3）投与マウスにおける免疫グロブリン及び補体の沈着の差異



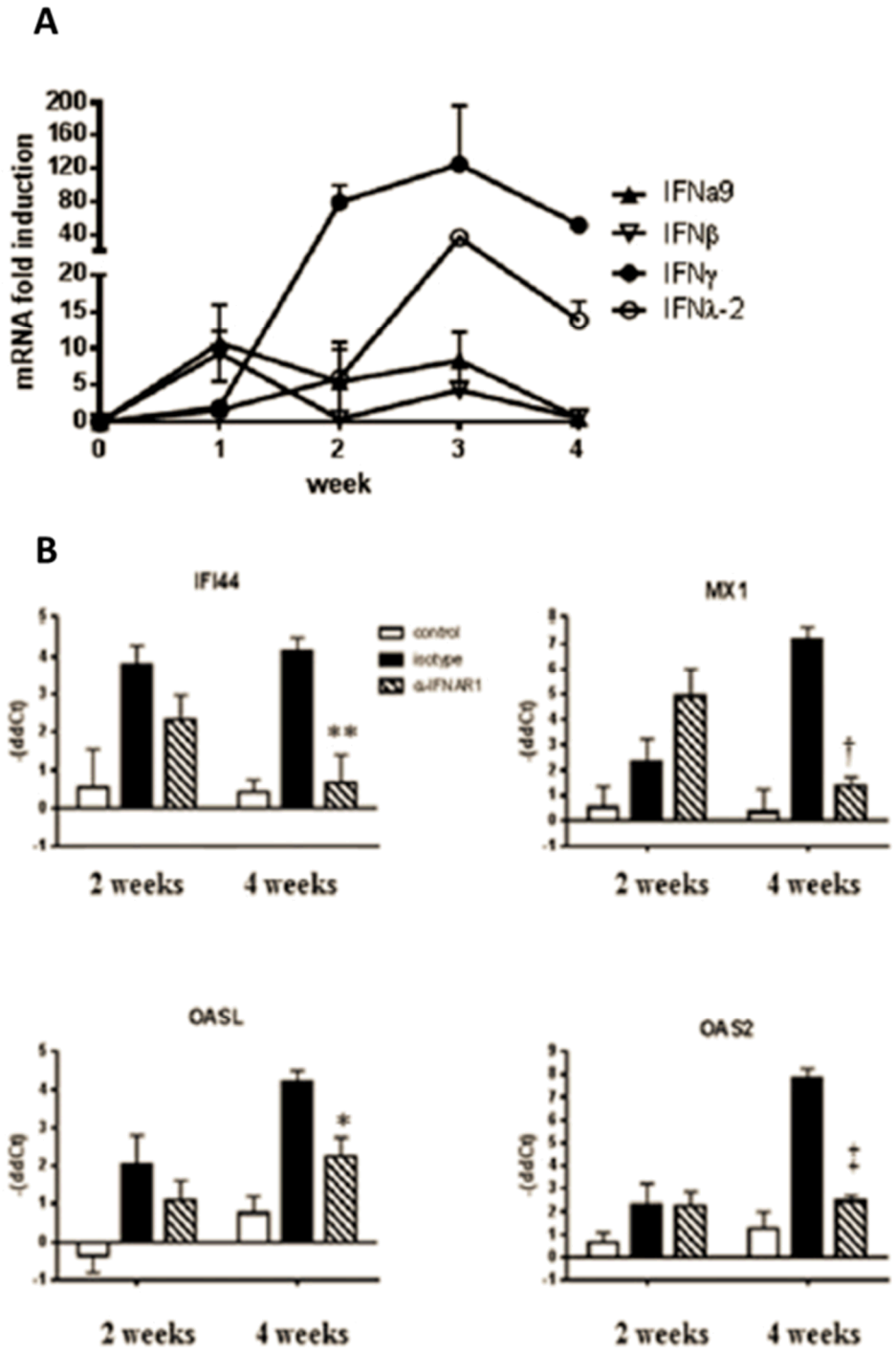
(A-C) Immunohistochemical localization of Ig deposition (green) in syngeneic graft control (A), GVHD with control Ab (B), and GVHD with anti-IFNAR1 (5A3) treatment (C). (D-F) IgG deposition (brown, nuclei counterstained blue) in endothelium of dermal arterioles in syngeneic graft control (D), GVHD with control Ab (E), and GVHD with anti-IFNAR1 (5A3) treatment (F). (G-I) Immunohistochemical staining of C1q (red) in syngeneic graft control (G), GVHD with control Ab (H), and GVHD with anti-IFNAR1 (5A3) treatment (I).

皮膚生検の定量的 RT-PCR により、移植後 1 週間で IFN-β の上昇が見られ、IFN-α9、IFN-γ 及び IFN-λ2 は顕著に増加して移植後 3 週で最高値を示した（図 31A［Figure 4 in Delaney et al 2016］）。組織学的に線維化が確認された 4 週目においては、IFN-γ のみが引き続き高値であった。2 週目及び 4 週目において、同系対照と比較して GVHD-SSc における I 型 IFN 誘導性遺伝子発現は顕著な増加を示した。2 週目では抗 IFNAR1 抗体（5A3）の投与による I 型 IFN 誘導性遺伝子発現の有意な阻害は認められなかった。ただし、4 週目では抗 IFNAR1 抗体（5A3）の投与により IFI44、MX1 及び OAS2 の発現がそれぞれ 94%、85%及び 81%減少し（図 31B［Figure 5 in Delaney et al 2016］）、I 型 IFN 誘導性遺伝子発現の著明な阻害が認められたことから、このモデルにおいて慢性の IFNAR1 依存型 IFN 誘導性遺伝子発現が皮膚疾患の重症度と密接に相関することが示唆された。

I 型 IFN の遮断によって、炎症性遺伝子のアップレギュレーションも抑制された。4 週目にはアイソタイプ対照抗体を投与した GVHD-SSc 群と比較して、5A3 を投与した群では TNFα 及び IL-6 の遺伝子発現に 100%、誘導性一酸化窒素合成酵素及びミエロペルオキシダーゼにそれぞれ

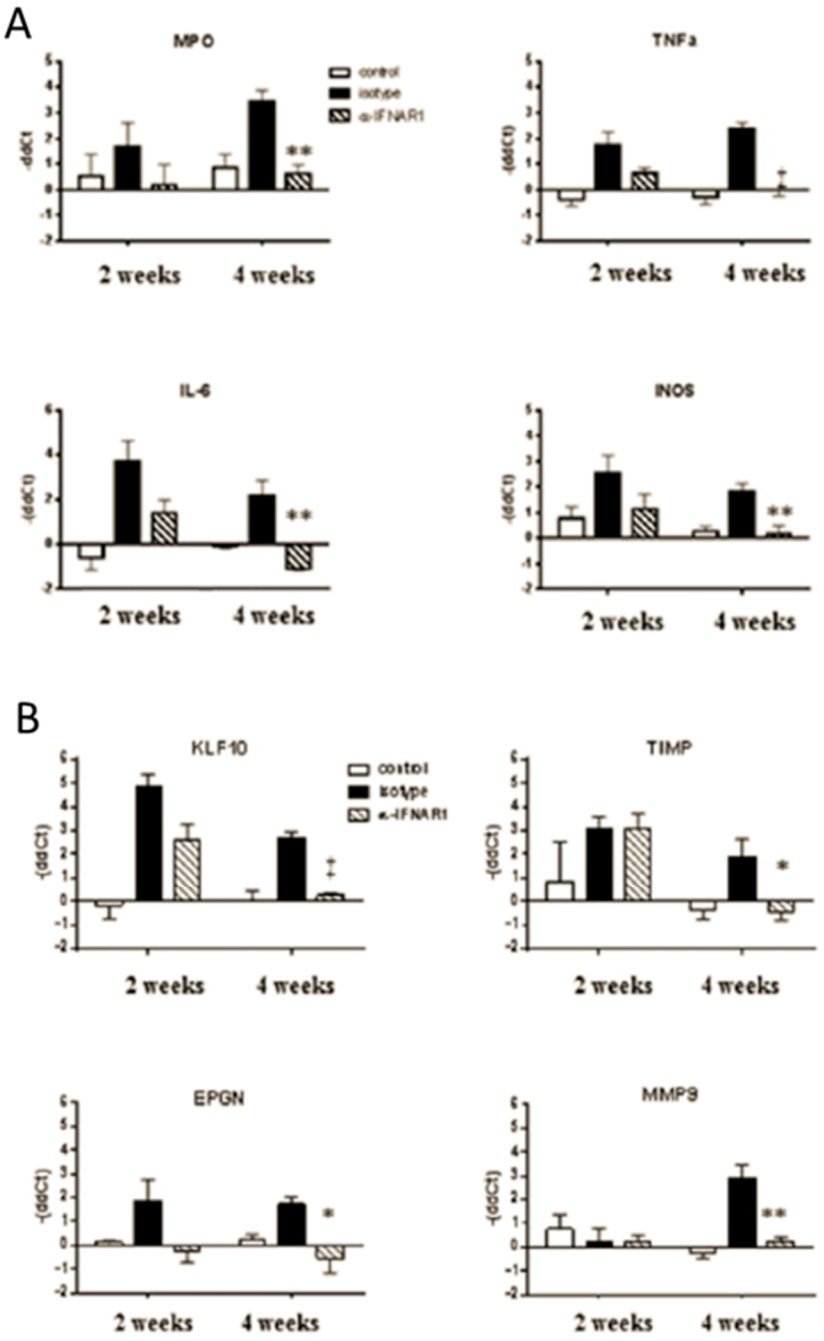
92%及び 82%の大幅な低下が認められた（図 32A［Figure 5 in Delaney et al 2016］）。同様に、5A3 を投与した GVHD-SSc マウスの皮膚において、TGF-β 誘導性の Krüppel-like factor 10（KLF10）、tissue inhibitor of metalloproteinase（TIMP）、matrix metalloproteinase 9（MMP9）及び epithelial mitogen（EPGN）の全ての遺伝子発現が 4 週目時点で有意に抑制されており、5A3 投与による I 型 IFN の阻害が組織リモデリングに関する遺伝子発現を抑制することも示された（図 32B［Figure 5 in Delaney et al 2016］）。4 週目における背部皮膚サンプルのマイクロアレイ分析により、同系移植片対照と比較して GVHD-SSc により 308 の遺伝子発現が 50%を超えた増加を見せ（$p<0.05$）、5A3 の投与により 50%を超えた減少を見せる（$p<0.05$）ことが示された。パスウェイ解析により、5A3 が細胞接着、アポトーシス、炎症及び細胞骨格のリモデリングに関連する遺伝子を抑制することも示された（図示せず）。これらのデータを総合すると、I 型 IFN が GVHD-SSc の皮膚炎症、脈管障害及び線維化において重要な役割を果たすことが裏付けられた。

図 31　　GVHD-SSc の皮膚における IFN 誘導の動態及び I 型 IFN 誘導性遺伝子発現に対する抗 IFNAR1 抗体（5A3）投与の影響



(A) Induction of IFN-α9, IFN-β, IFN-γ, IFN-λ in GVH2D-SSc skin measured by quantitative PCR. The fold-change is relative to syngeneic controls. (B) Expression of type I IFN inducible genes IFI44, MX1, OASL and OAS2 in syngeneic control (open bars), and GVHD-SSC with control antibody (filled black bars), and GVHD SSC with anti-IFNAR1 (5A3) treatment (hatched bars).

図 32　　抗 IFNAR1 抗体（5A3）投与は GVHD-SSc の皮膚において炎症性遺伝子及びリモデリング遺伝子の発現を正常化する



Impact of IFNAR1 blockade on the gene expression at 2 and 4 weeks of (A) proinflammatory genes MPO, TNFα, IL-6 and INOS, (B) remodeling genes KLF10, TIMP, EPGN, and MMP9. Syngeneic control (open bars), and GVHD-SSc with control antibody (filled black bars), and GVHD-SSc with anti-IFNAR1 (5A3) treatment (hatched bars).

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

アニフロルマブの安全性薬理については、カニクイザルの皮下及び静脈内への単回又は反復投与による毒性試験で評価した（2.6.6 項参照）。中枢神経系（行動観察）、呼吸器系（呼吸数）、腎臓（尿検査）及び心血管系（心拍数、心電図及び血圧）について評価し、いずれのパラメータでもアニフロルマブ投与に関連した所見は認められなかった。さらに、これらの試験では病理学的検鏡も行ったが、生命維持を司る主要な臓器でアニフロルマブ投与に起因した有害な影響は認められなかった。以上の結果から、非臨床安全性試験で評価した安全性薬理のパラメータのいずれについても、アニフロルマブ投与に関連した有害所見は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的作用に基づく薬物相互作用を評価する試験は実施しなかった。

アニフロルマブによる I 型 IFN の生理学的レベルの遮断はチトクローム P450（CYP）の活性に影響を及ぼさないと考えられ、用量調整を必要とする臨床的に意味のある薬物間相互作用をもたらさないと考えられる。

併用薬によるアニフロルマブの代謝に対する影響については、アニフロルマブの代謝における CYP 酵素の寄与は小さいため、薬物動態的に関わる薬物相互作用を起こす可能性はないと予測される。アニフロルマブは IgG1 モノクローナル抗体であり、標的の IFNAR を介した除去経路、及び FcRn 経路により除去される。これらの除去機構は、CYP 酵素に依存しないものである。

2.6.2.6 考察及び結論

IFNAR1 特異的な完全ヒトモノクローナル抗体は、IFNAR1 を発現する [redacted] 細胞で [redacted] を免疫し、従来の抗体作製法により作製された。IgG1κ 抗体である 9D4 を NS0 細胞にクローニングし、Fc 領域を変異させることにより（L234F、L235E、P331S）、FcγR 及び C1q への結合を低下させ、抗体媒介性のエフェクター機能を持たせないようにしている。この 3 箇所のアミノ酸変異をもつ抗体 9D4 が即ちアニフロルマブ（別称 MEDI-546）であり、これを開発候補として選択し、更なる薬理学的特性評価を行った。

直接飽和結合試験により、ヒト及びカニクイザルの PBMC 上に発現した IFNAR1 とアニフロルマブとの K_D を測定したところ、ヒト IFNAR1 に対するアニフロルマブの K_D は 0.29 ± 0.29 nM、カニクイザル IFNAR1 に対する K_D は 0.65 ± 0.74 nM であり、両者は非常に近いものであった。このエピトープは IFNAR1 のサブドメイン 3 にマッピングされ、アミノ酸残基 276～279（YLLR）がアニフロルマブの結合に重要であることが確認された。ヒト IFNAR1 のこの領域はカニクイザル IFNAR1 と高い相同性を示すが、サブドメイン 3 をマウスのものと交換するとアニフロルマブの結合が抑制された。これらの結果より、アニフロルマブはヒト及びカニクイザル両者の IFNAR1 に高い親和性で結合することが明らかになり、カニクイザルが非臨床安全性評価において薬理学的に毒性評価モデルに適した動物種であることが示された。

アニフロルマブは Daudi 細胞上に発現した IFNAR に対する ^{125}I-IFN-α2a の結合を 0.14 nM の IC_{50} にて競合的に阻害した。I 型 IFN の IFNAR2 との結合親和性は低いため、アニフロルマブはリガンドが結合した機能的な IFNAR1/2 ヘテロダイマーの会合を立体的に阻害すると考えられ

る。またアニフロルマブが IFNAR1 に結合すると抗体-IFNAR1 複合体の速やかな細胞内移行が生じ、これにより機能的な IFNAR 複合体形成に寄与できる細胞表面上の IFNAR1 が制限されることにもなる。したがって、アニフロルマブは 2 つの重要なメカニズムを組み合わせ、I 型 IFN シグナル伝達を強力に阻害すると言える。

リガンド誘導性 IFNAR1/2 複合体形成の遮断と一致して、アニフロルマブは下流の STAT1/2 リン酸化を阻害し、I 型 IFN 誘導性遺伝子のプロモーター上の ISRE に結合する転写活性化複合体の形成を阻害した。アニフロルマブは、12 の IFN-α サブタイプ、IFN-β 及び IFN-ω を含む、試験に用いた全ての 14 種の組換えヒト I 型 IFN によって誘導される ISRE の活性化を強力に阻害した。I 型 IFN を産生するのは主に pDC であり、pDC は核酸に結合した免疫複合体又は CpG-A などの合成オリゴヌクレオチドアゴニストによる刺激で I 型 IFN を産生する。アニフロルマブは、核酸を含む免疫複合体又は CpG-A 刺激 pDC に由来する I 型 IFN や、SLE 患者の血清中に存在する I 型 IFN からの ISRE 活性化を阻害した。また、組織培養プレートにコーティングされたアニフロルマブは IFNAR シグナル伝達経路を活性化しなかったことも注目すべき結果である。これらのデータより、アニフロルマブは刺激する I 型 IFN のサブタイプや細胞種にかかわらず IFNAR の介するシグナル伝達を阻害することができ、アゴニスト活性を示さないことが明らかになった。

アニフロルマブの結合及びエピトープのマッピングデータから予測されるように、サルの COS 細胞においてアニフロルマブはカニクイザル組換え I 型 IFN 誘導性 ISRE 活性を強力に阻害したが、マウス MLE-12 細胞においてマウス I 型 IFN 誘導性 ISRE 活性を阻害することはできなかった。これらのデータから、非臨床安全性評価において薬理学的に毒性評価モデルに適した動物種として（げっ歯類ではなく）カニクイザルを選択したことは適切と考えられる。

I 型 IFN シグナル伝達は、100 を超える遺伝子の転写活性化及び発現を引き起こす。21 遺伝子のサブセットについては、I 型 IFN によって強力に発現が増加することが示され、IFNAR 遮断の影響を血中でモニターする際に用いられた。末梢血単核細胞（pDC を含む）の CpG-A 刺激は I 型 IFN を誘導して、21 遺伝子の I 型 IFN 誘導性遺伝子発現の顕著な増加（20～100 倍）を引き起こし、これはアニフロルマブによって約 85%抑制された。これらのデータは、アニフロルマブが I 型 IFN を誘導するアゴニストの存在下で I 型 IFN 誘導性遺伝子の発現を阻害し、21 の遺伝子発現をモニターすることはアニフロルマブ活性の薬力学的マーカーとして有用である可能性を示唆している。

活性化 pDC の IFNAR シグナル伝達によっても、I 型 IFN の産生に必要な遺伝子発現が増加し、I 型 IFN が自己増幅する。アニフロルマブによる I 型 IFN シグナル伝達の遮断により、CpG-A 又は DNA-IC 刺激 pDC による I 型 IFN の産生が約 80%抑制された。また、アニフロルマブは共刺激分子のアップレギュレーション及び CpG-A 刺激 pDC の炎症性サイトカイン産生を抑制した。

I 型 IFN は、多くの免疫細胞及び非免疫細胞に影響を与える可能性がある。アニフロルマブは、I 型 IFN を介した単球の分化及び単球によるサイトカイン/ケモカイン産生、並びに B 細胞の形質細胞への分化を阻害した。全体として、これらのデータは、アニフロルマブが I 型 IFN によって誘導される IFNAR が介するシグナル伝達を抑制し、炎症反応及び獲得免疫反応の活性化を抑制することを示すものである。

IFNAR1 は細胞表面に発現するため、アニフロルマブのこれら細胞への結合が FcγR を有する細胞に対し起きた場合には、ADCC などのエフェクター機能の活性化が促進される、或いは C1q の結合により CDC が促進されるなどの恐れがある。抗体を介したエフェクター機能を軽減するために、3 つの変異（L234F、L235E、P331S）をアニフロルマブに導入したところ、FcγR の結合が大幅に減少した。また、IFNAR1 の発現は哺乳類の細胞では低レベルであり、結合するとアニ

フロルマブ IFNAR1 複合体は急速に細胞内移行して、細胞の表面に露出するアニフロルマブの量はさらに制限された。アニフロルマブは ADCC も CDC 活性も示さなかった。

アニフロルマブはマウス IFNAR1 に結合しないため、抗マウス IFNAR サロゲート抗体 5A3 を用いて自己免疫疾患のマウスモデルにおける I 型 IFN の重要性を実証した。NZB/W F1 マウスのループス腎炎加速発症モデルにおいて、I 型 IFNAR1 を遮断することで、I 型 IFN 誘導性遺伝子発現が抑制され、腎障害の発症と重症度の低下をもたらした。強皮症のマウスモデルである GVH-SSc において、5A3 による IFN シグナル伝達の阻害は、皮膚の炎症、血管損傷及び皮膚線維化を抑制した。

結論として、アニフロルマブは IFNAR1 に対して高い結合親和性を示し、I 型 IFN シグナル伝達及び下流の免疫応答を強力に阻害する。アニフロルマブはアゴニスト活性を示さず、FcγR への結合活性が減弱されているため、ADCC 及び CDC のいずれも引き起こさない。アニフロルマブはカニクイザルの IFNAR1 に対して強力な結合親和性を示し、I 型 IFN 誘導性のシグナル伝達を阻害することから、カニクイザルは非臨床安全性評価に用いる種として適切と考えられた。I 型 IFN が SLE、ループス腎炎、強皮症、筋炎及びシェーグレン症候群等の自己免疫疾患において重要な役割を果たしているというエビデンスが増えつつある。アニフロルマブの I 型 IFN 生物活性に対する阻害作用は、I 型 IFN に起因する自己免疫疾患及び I 型 IFN シグナル伝達の機能障害を伴う他の疾患の治療に対し貢献するものと考えられる。

2.6.2.7 参考文献

Akilesh et al 2007

Akilesh S, Christianson GJ, Roopenian DC, Shaw AS. Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. J Immunol 2007;179(7):4580-8.

Andrews et al 1978

Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. J Exp Med 1978;148(5):1198-215.

Asselin et al 2001

Asselin E, Johnson GA, Spencer TE, Bazer FW. Monocyte chemotactic protein-1 and -2 messenger ribonucleic acids in the ovine uterus: regulation by pregnancy, progesterone, and interferon-tau. Biol Reprod 2001;64(3):992-1000.

Blanco et al 2001

Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. Science 2001;294(5546):1540-3.

Bussfeld et al 2000

Bussfeld D, Nain M, Hofmann P, Gemsa D, Sprenger H. Selective induction of the monocyte-attracting chemokines MCP-1 and IP-10 in vesicular stomatitis virus-infected human monocytes. J Interferon Cytokine Res 2000;20(7):615-21.

Cajean-Feroldi et al 2004

Cajean-Feroldi C, Nosal F, Nardeux PC, Gallet X, Guymarho J, Baychelier F et al. Identification of residues of the IFNAR1 chain of the type I human interferon receptor critical for ligand binding and biological activity. Biochemistry 2004;43(39):12498-512.

Canfield and Morrison 1991

Canfield SM, Morrison SL. The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region. J Exp Med 1991;173:1483-91.

Chappel et al 1991

Chappel MS, Isenman DE, Everett M, Xu YY, Dorrington KJ, Klein MH. Identification of the Fc gamma receptor class I binding site in human IgG through the use of recombinant IgG1/IgG2 hybrid and point-mutated antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88(20):9036-40.

Delaney et al 2016

Delaney TA, Morehouse C, Brohawn PZ, Groves C, Colonna M, Yao Y et al. Type I IFNs Regulate Inflammation, Vasculopathy, and Fibrosis in Chronic Cutaneous Graft-versus-Host Disease. J Immunol 2016;197(1):42-50.

Geppert and Lipsky 1987

Geppert TD and Lipsky PE, Accessory cell independent proliferation of human T4 cells stimulated by immobilized monoclonal antibodies to CD3. J Immunol. 1987 Mar 15;138(6):1660-6.

Hall and Rosen 2010

Hall JC, Rosen A. Type I interferons: crucial participants in disease amplification in autoimmunity. Rheumatology 2010;6:40-49.

Hezareh et al 2001

Hezareh MA, Hessell J, Jensen RC, van de Winkel JG, Parren PW, Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. J Virol 2001;75(24):12161-68.

Idusogie et al 2000

Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PY, Ultsch M et al. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. J Immunol 2000;164(8):4178-84.

Leptin 1985

Leptin M. Monoclonal antibodies specific for murine IgM. II. Activation of B lymphocytes by monoclonal antibodies specific for the four constant domains of IgM. Eur J Immunol 1985;15(2):131-7.

Liao et al 2010

Liao AP, Salajegheh M, Morehouse C, Nazareno R, Jubin RG, Jallal B et al. Human plasmacytoid dendritic cell accumulation amplifies their type 1 interferon production. Clin Immunol 2010;136(1):130-8.

Mathian et al 2005

Mathian A, Weinberg A, Gallegos M, Banchereau J, Koutouzov S. IFN-α induces early lethal lupus in preautoimmune (New Zealand Black × New Zealand White) F1 but not in BALB/c mice. Journal of Immunology 2005;174:2499-506.

Mogensen et al 1999

Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uze G, The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. J Interferon Cytokine Res 1999;19(10):1069-98.

Oganesyan et al 2008a

Oganesyan V, Damschroder MM, Leach W, Wu H, Dall'Acqua WF. Structural characterization of a mutated, ADCC-enhanced human Fc fragment. Mol Immunol 2008;45(7):1872-82.

Oganesyan et al 2008b

Oganesyan V, Gao C, Shirinian L, Wu H, Dall'Acqua WF. Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. Acta Crystallog D Biol Crystallog 2008;64(Pt 6):700-4.

Peng et al 2015

Peng L, Oganesyan V, Wu H, Dall'Acqua WF, Damschroder MM. Molecular basis for antagonistic activity of anifrolumab, an anti-interferon-α receptor 1 antibody. MAbs 2015;7(2):428-39.

Platanias 2005

Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. Nat Rev Immunol 2005;5(5):375-86.

Pogue et al 2004

Pogue SL, Preston BT, Stalder J, Bebbington CR, Cardarelli PM. The receptor for type I IFNs is highly expressed on peripheral blood B cells and monocytes and mediates a distinct profile of differentiation and activation of these cells. J Interferon Cytokine Res 2004;24(2):131-9.

Quadt-Akabayov et al 2006

Quadt-Akabayov SR, Chill JH, Levy R, Kessler N, Anglister J, Determination of the human type I interferon receptor binding site on human interferon-alpha2 by cross saturation and an NMR-based model of the complex. Protein Sci 2006;15(11):2656-68.

Reff et al 1994

Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood 1994;83(2):435-45.

Riggs et al 2018

Riggs JM, Hanna RN, Rajan B, Zerrouki K, Karnell JL, Sagar D et al. Characterisation of anifrolumab, a fully human anti-interferon receptor antagonist antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus. Lupus Science & Medicine 2018;5:1-11.

Rodero et al 2017

Rodero MP, Decalf J, Bondet V, Hunt D, Rice G, Werneke S et al. Detection of interferon alpha protein reveals differential levels and cellular sources in disease. J Exp Med 2017;214(5):1547-55.

Salazar-Mather et al 2003

Salazar-Mather TP and Hokeness KL. Calling in the troops: regulation of inflammatory cell trafficking through innate cytokine/chemokine networks. Viral Immunol 2003;16(3):291-306.

Sheehan et al 2006

Sheehan KC, Lai KS, Dunn GP, Bruce AT, Diamond MS, Heutel JD et al. Blocking monoclonal antibodies specific for mouse IFN-alpha/beta receptor subunit 1 (IFNAR-1) from mice immunized by in vivo hydrodynamic transfection. J Interferon Cytokine Res 2006;26(11):804-19.

Suzuki et al 1995

Suzuki G, Nomura M, Uzawa A, Akashi M, Nakata Y. Impaired CD28-mediated co-stimulation in anergic T cells. Int Immunol 1995;7(1):37-43.

Takayama et al 1987

Takayama H, Trenn G, Humphrey WJr, Bluestone JA, Henkart PA, Sitkovsky MV. Antigen receptor-triggered secretion of a trypsin-type esterase from cytotoxic T lymphocytes. J Immunol 1987;138(2):566-9.

van Boxel-Dezaire et al 2006

van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. Immunity 2006;25(3):361-72.

Vilcek 2006

Vilcek J. Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. Immunity 2006;25(3):343-8.

Wang et al 2013

Wang B, Higgs BW, Chang L, Vainshtein I, Liu Z, Streicher K, et al. Pharmacogenomics and translational simulations to bridge indications for an anti-interferon-alpha receptor antibody. Clin Pharmacol Ther 2013;93(6):483-92.

Yao et al 2009

Yao Y, Richman L, Higgs BW, Morehouse CA, de los Reyes M, Brohawn P et al. Neutralization of interferon-alpha/beta-inducible genes and downstream effect in a phase I trial of an anti-interferon-alpha monoclonal antibody in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2009;60(6):1785-96.

第 2 部　CTD の概要

一般名：アニフロルマブ（遺伝子組換え）

版番号：[redacted]

2.6.3　薬理試験概要表
アニフロルマブ（遺伝子組換え）

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

目次 2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.1.1 効力を裏付ける試験 4
2.6.3.2 副次的薬理試験 8
2.6.3.3 安全性薬理試験 8
2.6.3.4 薬力学的薬物相互作用試験 8

表目次

表 1 アニフロルマブの薬理試験 3
表 2 アニフロルマブの *in vitro* 薬理試験 4
表 3 アニフロルマブの *in vivo* 薬理試験 8

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表

表 1　　アニフロルマブの薬理試験

Study Number	Type of Study	Species/ROA	Study Title	Testing Facility Location	GLP (Yes/No)	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics						
RIA546-0001	*In Vitro*	NA	Absence of Binding of MEDI-546 to Fc Gamma Receptors I and IIIA	[redacted], USA	No	4.2.1.1
RIA546-0002	*In Vitro*	NA	Determination of the Equilibrium Dissociation Constants (K_D) of MEDI-546 in Human and Cynomolgus Monkey PBMCs	[redacted], USA	No	4.2.1.1
RIA546-0004	*In Vitro*	NA	Mapping of the MEDI-546 Binding Epitope	[redacted], USA	No	4.2.1.1
RIA546-0003	*In Vitro*	NA	MEDI-546 Antagonizes the Binding of IFN-α2a to IFNAR Expressing Cells and Induces the Internalization of IFNAR1	[redacted] /	No	4.2.1.1
RIA546-0006	*In Vitro*	NA	Inhibition of Type-1 IFN Induced Activation of the Interferon Stimulated Response Element by MEDI-546	[redacted], USA	No	4.2.1.1
RIA546-0008	*In Vitro*	NA	Effect of Immobilized MEDI-546 on Activation of The Interferon Stimulated Response Element	[redacted], USA	No	4.2.1.1
RIA546-0010	*In Vitro*	NA	Anti-IFNAR1 Monoclonal Antibody (MEDI-546) Binds Fc Gamma Neonatal Receptor (FcRn) but not Fc Gamma Receptors IIA and IIB	[redacted], USA	No	4.2.1.1
RIA546-0012	*In Vitro*	NA	Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity Assays with MEDI-546	[redacted], USA	No	4.2.1.1
RIA546-0009	*In Vitro*	NA	MEDI-546 Does Not Exhibit Complement-Dependent Cytotoxicity In vitro	[redacted], USA	No	4.2.1.1

表 1　　アニフロルマブの薬理試験

Study Number	Type of Study	Species/ROA	Study Title	Testing Facility Location	GLP (Yes/No)	Location in CTD
RIA546-0011	*In Vivo*	Murine/IP	Protection by Anti-mouse IFNAR1 mAb 5A3 in an Accelerated NZB/W F1 mouse model of lupus	[redacted], USA	No	4.2.1.1
RIA546-0007	*In Vivo*	Murine/IP	Efficacy of a Mouse Surrogate Anti-Interferon Alpha Receptor 1 Monoclonal Antibody in a Murine Model of Systemic Sclerosis	[redacted], USA	No	4.2.1.1
Secondary Pharmacodynamics						
No formal secondary pharmacodynamic studies have been conducted with anifrolumab						
Safety Pharmacology						
Safety pharmacology studies were not conducted, but safety pharmacology parameters were assessed as components of the nonclinical safety studies.						

Fc = fragment crystallisable; FcRn = neonatal Fc receptor; KD = equilibrium dissociation constants; IFN = interferon; IFNAR = interferon alpha receptor; IP = intraperitoneal; mAb = monoclonal antibody; MEDI-546 = anifrolumab; NA = not applicable; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; ROA = route of administration.

2.6.3.1.1　　効力を裏付ける試験

表 2　　アニフロルマブの *in vitro* 薬理試験

Study Number	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings
RIA546-0001	Immobilized anifrolumab antibodies 293F target cells and PBMCs or KC1333 effectors	BIAcore and ELISA were used to assess binding of Flag-tagged rFcγRI and rFcγRIIIA proteins to immobilized MEDI-546. Cellular cytotoxicity using 293F target cells and PBMCs or KC1333 effectors in the presence or absence of anifrolumab and R3-47 antibodies	• ELISA and Plasmon resonance analysis based binding experiments indicate that MEDI-546 has minimal binding to rFcγRI and rFcγRIIIA proteins • MEDI-546 does not induce ADCC in IFNAR-expressing 293F target cells

表 2　　アニフロルマブの *in vitro* 薬理試験

Study Number	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings
RIA546-0002	Human and cynomolgus monkey PBMCs	Direct saturation binding analysis using increasing concentrations of Europium (Eu^{3+})-labeled MEDI-546 antibodies in the absence or presence of 100-fold of unlabeled MEDI-546 antibodies.	• The K_D of MEDI-546 with human PBMCs yielded an average value of 0.29±0.29 nM. Additionally, results indicate that the values of K_D of MEDI-546 with IFNAR1 expressed in human and cynomolgus monkey PBMCs are similar
RIA546-0004	Recombinant human IFNAR1	MEDI-546 Binding Epitope mapping using limited proteolytic digestion of IFNAR1 followed by detection with MEDI-546; Protein constructs encoding variants of recombinant human IFNAR1, domain swap and deletion mutants of the extracellular portion of the antigen, followed by detection with MEDI-546; Phage peptide library panning with MEDI-546.	• The binding epitope of MEDI-546 has been identified to approximately 43 amino acids of the C-terminal portion of the third sub-domain of human IFNAR1 (265-307), with residues 276- 279 identified as being critical for binding • The primary sequences of both human and cynomolgus monkey IFNAR1 binding epitope are identical within this 4 amino acids region
RIA546-0003	IFNAR-bearing Daudi B cells. IFNAR1- bearing THP-1 cells	Competitive binding of radio-iodinated IFN-α2a and MEDI-546 or unlabeled IFN-α2a to IFNAR expressed on Daudi B cells. The rate of internalization of Alexa647-labeled MEDI-546 on THP-1 cells was recorded over time by imaging the fluorescence present in the cytoplasm of cells.	• MEDI-546 competitively inhibits radio-iodinated IFN-α2a binding to receptor-bearing Daudi B cells with an EC_{50} of 0.14 nM. In contrast, the EC_{50} value of unlabeled IFN-α2a is 1.16 nM • MEDI-546 blocked ligand-receptor binding with more than 10-fold greater potency than unlabeled IFN-α2a • The internalization of Alexa647-MEDI-546 from cell surface to punctuated spots located in the cytoplasm yielded a half-life of 25-35 minutes. No internalization of the Alexa647-R3-47 negative control antibody was observed

表 2　　アニフロルマブの *in vitro* 薬理試験

Study Number	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings
RIA546-0006	Human, cynomologus monkey or murine recombinant type I IFNs, IFNs secreted from activated (pDCs), or by type I IFNs present in sera of patients with SLE Monocytes Stimulated with Leukocyte-IFN	Activation of the ISRE induced by human, cynomolgus monkey or murine recombinant type I IFNs and/or by type I IFNs present in sera of patients with SLE, in the presence or absence of MEDI-546, using human, nonhuman primates or murine ISRE-luciferase reporter bioassays. The Effect of MEDI-546 on the Expression of CD38 and CD123 in monocytes stimulated with leukocyte-IFN was measured by FACS. The Effect of MEDI-546 on the secretion of cytokines and chemokines following stimulation with leukocyte-IFN was measured by SearchLight multiplexed sandwich ELISAs.	• MEDI-546 potently inhibits ISRE activation induced by all recombinant IFN subtypes. MEDI-546 also inhibits STAT-1 phosphorylation induced by pDC derived type-I IFN. Importantly, ISRE activation induced by type-I IFN in sera of patients with SLE was inhibited by MEDI-546 • MEDI-546 does not inhibit ISRE activation induced by murine recombinant IFN-α, suggesting that the mouse would not be a pharmacologically relevant model • MEDI-546 inhibits cynomolgus type-I IFNs when tested on transiently-transfected COS7 cell. Cynomolgus monkey was therefore selected as a pharmacologically relevant toxicology model for nonclinical safety assessment • MEDI-546 inhibited Leukocyte-IFN induced upregulation of CD38 and CD123, and MEDI-546 inhibited Leukocyte- IFN induced secretion of IL-6, IP-10, MCP-1 and MCP-2
RIA546-0008	293HEK ISRE-luciferase cell line	A 293HEK ISRE-luciferase cell line was used to detect luciferase reporter activity in the presence of immobilized MEDI-546 antibodies.	• Incubation of 293H ISRE-luciferase cells in the presence of immobilized MEDI-546 antibodies does not result in ISRE activation, suggesting that MEDI-546 does not exhibit IFNAR1 specific agonistic properties

表 2　　アニフロルマブの *in vitro* 薬理試験

Study Number	Test System	Test Methods	Noteworthy Findings
RIA546-0010	Recombinant FcγRIIA, FcγRIIB, or FcRn	BIAcore was used to assess binding of MEDI-546 to FcRn and FcγRIIA and FcγRIIB	• MEDI-546 binds FcRn with affinity similar to that of the parent antibody • MEDI-546 has minimal binding to FcγRIIA and FcγRIIB
RIA546-0012	HEK293F target cells expressing human IFNAR1	ADCC was evaluated using parental 9D4-Wt, MEDI-546 (9D4-TM) and anti- αvβ3 (Vitaxin) antibodies.	• Neither MEDI-546 nor 9D4-Wt antibodies induce cytotoxicity of IFNAR expressing 293F target cells above levels observed with the negative control antibody R3-47
RIA546-0009	Human CD20+ IFNAR1+ target Daudi B cells	CDC activity was assessed using Daudi target B cells and human serum as a source of complement in the presence or absence of MEDI-546 and R3-47 antibodies.	• MEDI-546 does not exhibit CDC activity above levels observed with the negative control antibody R3-47

ADCC = Antibody-dependent cell cytotoxicity; CDC = Complement-dependent cytotoxicity; EC_{50} = half-maximal effective concentration; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; FcRn = Neonatal Fc receptor; IFN = interferon; IFNAR = interferon alpha receptor; ISRE = interferon stimulated response element; MEDI-546 = anifrolumab; pDC = plasmacytoid dendritic cells; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells.

表 3　　アニフロルマブの *in vivo* 薬理試験

Study Number	Strain	ROA	Dose(s)	Gender and Number per Group	Noteworthy Findings
RIA546-0011	Murine	IP	0.3 mg twice weekly for 3 weeks	Female n=10/group	• Adenoviral induced expression of IFNα accelerates pathogenesis in NZB/W F1 murine model of lupus • The mouse surrogate IFNAR1 specific 5A3 antibody suppressed induction of type I IFN inducible proteins and delayed the onset and severity of proteinuria
RIA546-0007	Murine	IP	200 µg twice weekly until Study Day 28	Female n=20/group	• The mouse surrogate IFNAR1 specific 5A3 antibody reduces the severity of dermal lesions, collagen deposition, inflammation and epithelial remodelling, C1q deposition in the dermis and Ig deposition of the vascular endothelium of the deep dermis in a murine scleroderma model • 5A3 antibody inhibits SSc skin type-I IFN gene signature

IFN = interferon; IFNAR = interferon alpha receptor; IP = intraperitoneal; ROA = route of administration; SSc = systemic sclerosis

2.6.3.2　　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

2.6.3.3　　安全性薬理試験

アニフロルマブを用いた正式な安全性薬理試験は実施していないが、単回及び反復投与毒性試験において安全性薬理を評価した（2.6.7 項を参照）。

2.6.3.4　　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。