

目 次

2.6.1 緒言 ..... 2

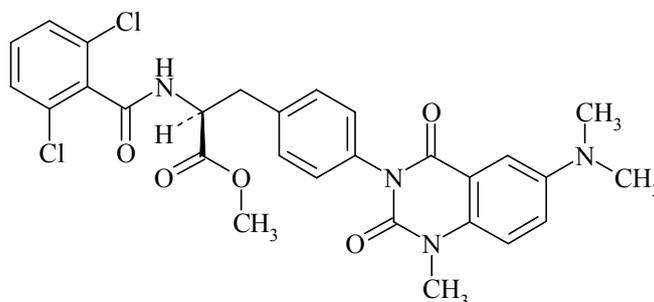
## 2.6.1 緒言

炎症反応では、リンパ球などの炎症性細胞が血液中から血管外遊走し、炎症部位に過剰に集積する。その一連の過程において、炎症性細胞と血管内皮細胞との接着反応が重要な役割を担っており、この細胞間接着にインテグリンと細胞接着分子との結合が関与している。インテグリンは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の2つのサブユニットから成るヘテロダイマーを構成している。中でも、 $\alpha 4$  インテグリンは好中球を除く全ての白血球の表面に発現しており、 $\alpha 4\beta 1$  インテグリンと血管内皮細胞表面に発現している細胞接着分子 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) との結合、そして $\alpha 4\beta 7$  インテグリンと細胞接着分子 Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1 (MAdCAM-1) との結合などが生体内の炎症反応に重要であることが知られている。

潰瘍性大腸炎とクローン病に大別される炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease; IBD) では、患者の消化管粘膜の病変部位で VCAM-1 及び MAdCAM-1 の発現が亢進し、炎症性細胞の過度な浸潤が認められる。近年、このような細胞接着分子を標的とする薬剤が炎症性疾患や自己免疫疾患の治療において有望視されており、現にヒト化抗 $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体製剤 (ナタリズマブ) が多発性硬化症及びクローン病に (後者は米国のみ承認)、またヒト化抗 $\alpha 4\beta 7$  インテグリンモノクローナル抗体製剤 (ベドリズマブ) が潰瘍性大腸炎及びクローン病に対する治療薬として臨床使用されている。しかし、経口投与可能な $\alpha 4$  インテグリン阻害薬として臨床使用可能なものは国内外ともに存在しない。

カロテグラストメチルは、 $\alpha 4$  インテグリン阻害活性を有する新規低分子化合物である HCA2969 の経口吸収性を向上させる目的で設計されたエステル型プロドラッグである。カロテグラストメチルが生体内で代謝されて生成される HCA2969 が、活性代謝物として $\alpha 4\beta 1$  インテグリン及び $\alpha 4\beta 7$  インテグリンの両機能を阻害することにより、炎症性細胞の血管外遊走に先立つ血管内皮細胞への接着反応を抑制し、抗炎症作用を発揮することが示唆されている。

一般名：	カロテグラストメチル (Carotegrast Methyl)
化学名：	Methyl (2S)-2-(2,6-dichlorobenzamido)-3-{4-[6-(dimethylamino)-1-methyl-2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2H)-yl]phenyl}propanoate
分子式：	$C_{28}H_{26}Cl_2N_4O_5$
分子量：	569.44
構造式：	



目 次

2.6.2	薬理試験の概要文.....	5
2.6.2.1	まとめ.....	5
2.6.2.2	効力を裏付ける試験.....	8
2.6.2.3	副次的薬理試験.....	24
2.6.2.4	安全性薬理試験.....	27
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	28
2.6.2.6	考察及び結論.....	29
2.6.2.7	図表.....	31

## 2.6.2 薬理試験の概要文

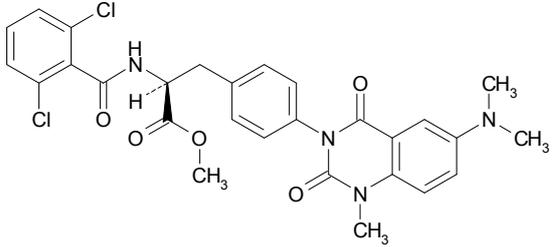
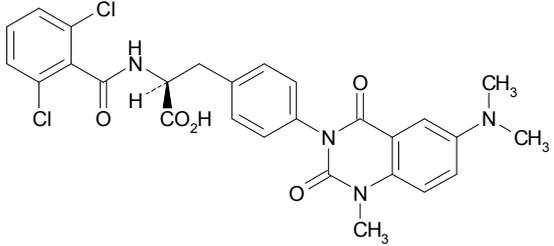
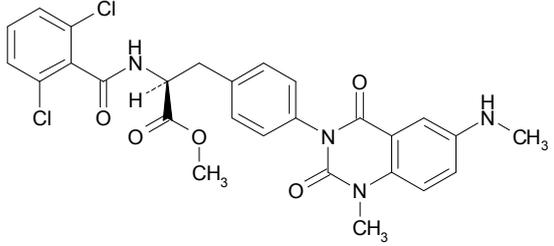
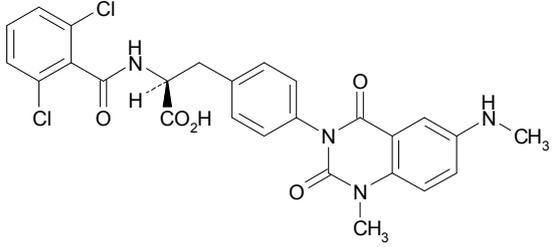
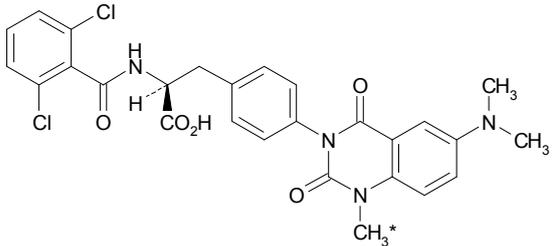
## 略号一覧

略号	内容
APD	活動電位持続時間
AUC	Area under concentration-time curve、血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC <sub>0-24h</sub>	0 時間から 24 時間後までの血漿中濃度－時間曲線下面積
B <sub>2</sub>	Bradykinin B <sub>2</sub>
BZD	Benzodiazepine
C <sub>max</sub>	Maximum concentration、最高血漿中濃度
CCR	C-C chemokine receptor
ConA	Concanavalin A
CRF-1	チャールス・リバー フォーミュラ、実験動物用飼料
D <sub>2</sub>	Dopamin D <sub>2</sub>
DMSO	ジメチルスルホキシド
DTH	Delayed-type hypersensitivity、遅延型過敏
E <sub>max</sub>	Maximum efficacy、最大薬理効果
ED <sub>50</sub>	Dose required for 50% efficacy、50%有効用量
ET <sub>A</sub>	Endothelin-A
GABA	Gamma-aminobutyric acid
H <sub>1</sub>	Histamine H <sub>1</sub>
<sup>3</sup> H	質量数 3 の水素放射性同位元素
HEK293	ヒト胎児腎臓細胞
hERG	ヒト <i>ether-a-go-go</i> 関連遺伝子
HEV	High endothelial venule、高内皮細静脈
5-HT <sub>1A</sub>	Serotonin 5-HT <sub>1A</sub>
IBD	Inflammatory bowel disease、炎症性腸疾患
IC <sub>50</sub>	Concentration required for 50% inhibition、50%阻害濃度
ICAM-1	Inter-cellular adhesion molecule 1
IL	Interleukin、インターロイキン
INF-γ	Interferon-gamma
JC	John Cunningham
K <sub>D</sub>	Dissociation constant、解離定数
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LC-MS/MS	Liquid chromatography with tandem mass spectrometry、液体クロマトグラフィー／タンデムマススペクトロメトリー
LPS	Lipopolysaccharide
LTB <sub>4</sub>	Leukotriene B <sub>4</sub>
M	Muscarinic acetylcholine
MA <sub>2</sub> CAM-1	Mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule-1
MAO-A	Monoamine oxydase-A
MMP	Matrix metalloproteinase
N	Nicotinic acetylcholine
NE	Norepinephrine
NK	Natural killer、ナチュラルキラー
NK	Neurokinin
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NOS	Nitric oxide synthase
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell、末梢血由来単核球
PHA-L	Phytohemagglutinin-L
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate

## 2.6.2 薬理試験の概要文

略号	内容
PML	Progressive multifocal leukoencephalopathy、進行性多巣性白質脳症
SCID	Severe combined immunodeficiency
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	Very late antigen-4、 $\alpha 4\beta 1$ インテグリンと同義語
TNF	Tumor necrosis factor、腫瘍壊死因子
Y	Neuropeptide Y

## 化合物一覧

化合物名	由来	構造式
AJM300	原薬	
HCA2969	活性代謝物 (AJM300 のエステル加水分解体)	
HCA3053、M-I	代謝物 (AJM300 の N-脱メチル体)	
HCA3047、M-II	代謝物 (HCA3053 のエステル加水分解体)	
<sup>3</sup> H-HCA2969	活性代謝物の <sup>3</sup> H 標識体	 <p data-bbox="834 1675 997 1704">* : <sup>3</sup>H 標識位置</p>

## 2.6.2 薬理試験の概要文

### 2.6.2.1 まとめ

AJM300 は低分子  $\alpha 4$  インテグリン拮抗型のエステル型プロドラッグであり、経口投与可能であることを特徴とする。AJM300 はエステルの加水分解によって活性代謝物である HCA2969 に代謝される。

効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験の *In vitro* 試験には被験物質として AJM300、HCA2969、AJM300 の *N*-脱メチル体である HCA3053 及び HCA3053 のエステル加水分解体である HCA3047 を用いた。*In vivo* 試験には AJM300M1 製剤を用いた。

$\alpha 4$  インテグリンは生体内で  $\beta 1$  インテグリン又は  $\beta 7$  インテグリンと二量体を形成し、主として  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン/Very late antigen-4 (VLA-4) は Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)、 $\alpha 4\beta 7$  インテグリンは Mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) といった接着分子と結合することが知られている<sup>1), 2)</sup>。

効力を裏付ける試験として、まずは *in vitro* 試験において HCA2969 を用いて親和性及び選択性検討を行った。HCA2969 のヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン及びヒト  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンに対する  $K_D$  値はそれぞれ  $0.32 \pm 0.01$  nmol/L 及び  $0.46 \pm 0.07$  nmol/L であり、HCA2969 はヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン及びヒト  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンに対して同程度の親和性を示した。また、HCA2969 はヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン発現細胞と VCAM-1/Fc との結合及びヒト  $\alpha 4\beta 7$  インテグリン発現細胞と MAdCAM-1/Fc との結合に対して、それぞれ濃度依存的かつ同程度の阻害作用を示し、ヒト  $\alpha L\beta 2$  インテグリン発現細胞と ICAM-1/Fc との結合に対して 1000 倍以上の選択性を示した。 $\alpha 4\beta 1$  インテグリンと VCAM-1、 $\alpha 4\beta 7$  インテグリンと MAdCAM-1 との結合に対する阻害活性は、ヒト、ラット及びマウスの間で大きな違いは認められなかった。さらに、その他細胞機能（各種刺激による各種サイトカイン及び炎症性メディエーターの放出）に対する作用は認められず、各種受容体、イオンチャネル、トランスポーター及び酵素に対しても AJM300 及び HCA2969 は 1000 nmol/L の濃度において 50% 以上の阻害作用を示さなかった。

$\alpha 4$  インテグリンの生理的役割としてリンパ球ホーミング現象が知られている<sup>3), 4)</sup>。リンパ球は、リンパ節やパイエル板といったリンパ組織の高内皮細静脈 (HEV) と呼ばれる特殊な血管の内皮細胞の間隙を通り抜けることにより、白血球で唯一血管系とリンパ管系の 2 つの循環系を行き来している。腸間膜リンパ節細胞の小腸パイエル板へのホーミングにはリンパ球上の  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンと MAdCAM-1 との結合が関与することが報告されている<sup>3)</sup>。この現象を利用し、AJM300 の *in vivo* でのリンパ球ホーミング阻害作用について検討した。AJM300 はマウス及びラットへの経口投与において、リンパ球ホーミングを用量依存的に阻害した。また、別試験において、そのホーミング阻害を示す用量範囲において、末梢血中のリンパ球数の増加が確認された。

また、炎症性腸疾患 (IBD) における  $\alpha 4$  インテグリンの病態生理学的な役割として、消化管炎症部位へのリンパ球を含む炎症性細胞の浸潤に  $\alpha 4$  インテグリンを介した接着分子への結合が関与していることが示唆されている<sup>5), 6), 7), 8), 9)</sup>。そこで、腸炎を自然発症したインターロイキン-10 (IL-10) ノックアウトマウスの脾臓及び腸間膜リンパ節の  $CD4^+$  T 細胞を免疫不全 Severe combined immunodeficiency (SCID) マウスに移入することで発症する実験的腸炎モデル<sup>10)</sup> を用いて、AJM300

## 2.6.2 薬理試験の概要文

の薬効評価を実施し、腸管組織への T 細胞浸潤阻害作用も併せて検討した。本検討では AJM300 投与後の血中 HCA2969 濃度を一定濃度以上に維持させるため混餌で経口摂取させた。細胞移入の前日から AJM300 を混餌で経口摂取させることにより、AJM300 は用量依存的に腸管重量の増加、便性状スコア及び T 細胞浸潤を抑制した。さらに、AJM300 による有意な T 細胞浸潤面積率の低下が認められた用量（AJM300M1 製剤として混餌 1%）における腸管重量増加抑制効果は、 $\alpha 4$  インテグリン占有率飽和を試験期間中維持させた用法用量における抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体（PS/2）による効果と同程度であった。

一方、AJM300 と標的分子が同じである抗  $\alpha 4$  インテグリン抗体ナタリズマブを投与されていた患者に致死性の希少疾患である進行性多巣性白質脳症（PML）の発症が報告された<sup>11),12)</sup>。PML の発症には JC ウイルスに対する細胞性免疫能の低下が何らかの関連を持っていると考えられている<sup>13)</sup> ことから、副次的薬理試験として細胞性免疫機能に対する作用を検討した。ヒト末梢血由来単核球（PBMC）のナチュラルキラー（NK）活性及び Phytohemagglutinin-L（PHA-L）刺激によるヒト末梢血由来単核球の増殖能に対し HCA2969 は阻害作用を示さなかった。また AJM300 は 300 mg/kg の 1 日 2 回、8 日間の反復経口投与においても Keyhole limpet hemocyanin（KLH）で誘導される遅延型過敏（DTH）反応に対し影響を及ぼさなかった。以上の点から、AJM300 の細胞性免疫機能に及ぼす影響は小さい可能性が示された。

さらに、安全性薬理試験として、平成 13 年 6 月 21 日付医薬審発第 902 号「安全性薬理試験ガイドラインについて」に準拠したコアバッテリー試験を GLP 適合試験として実施した。

AJM300 及びその活性代謝物である HCA2969 の安全性薬理試験として、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす作用を検討した。

イヌ覚醒下循環器に対する作用検討では、被験物質として AJM300M1 製剤を用いた。その他の安全性薬理試験では、被験物質として AJM300 を用い、さらに *in vitro* 試験では、被験物質として HCA2969 を用いた。実施した AJM300 の安全性薬理試験の一覧を表 2.6.2-1 に、HCA2969 の安全性薬理試験の一覧を表 2.6.2-2 にそれぞれ示した。

表 2.6.2-1 AJM300 の安全性薬理試験一覧

試験項目	動物種等	投与経路	被験物質
中枢神経系に及ぼす影響	ラット	経口	AJM300
心血管系に及ぼす影響	イヌ	経口	AJM300M1 製剤
	hERG 導入 HEK293 細胞	<i>in vitro</i>	AJM300
	モルモット 摘出乳頭筋	<i>in vitro</i>	AJM300
呼吸系に及ぼす影響	ラット	経口	AJM300

## 2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2-2 HCA2969 の安全性薬理試験一覧

試験項目		動物種等	投与経路	被験物質
心血管系に及ぼす影響	hERG 電流に及ぼす影響 (パッチクランプ法)	hERG 導入 HEK293 細胞	<i>in vitro</i>	HCA2969
	静止膜電位、活動電位振幅、活動電位持続時間 (APD <sub>50</sub> 及び APD <sub>90</sub> ) 及び最大立ち上がり速度に及ぼす影響	モルモット 摘出乳頭筋	<i>in vitro</i>	HCA2969

中枢神経系に及ぼす影響では、AJM300 のラットへの経口投与において、300 及び 1000 mg/kg で軽度な縮瞳が認められた。縮瞳の原因は不明であるが、縮瞳以外の症状が見られなかったこと、及び用量に関連して程度が増強する傾向は認められなかったことから、作用はきわめて弱いものと考えられた。

心血管系に及ぼす影響では、AJM300 はモルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する影響は認められなかったが、 $10^{-5}$  mol/L の濃度で hERG 電流を抑制した (抑制率は 32.4%)。hERG 電流を抑制した AJM300 の濃度である  $10^{-5}$  mol/L は、臨床投与量である 960 mg/回 (1 日 3 回) を投与した際のヒトにおける遊離型最高血漿中濃度と比較し、800 倍以上高い濃度であった。一方、HCA2969 は  $10^{-5}$  mol/L の濃度まで hERG 電流及びモルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する影響は認められなかった。また、AJM300M1 製剤の覚醒イヌへの経口投与において、心血管系に対して 1000 mg/kg (AJM300 換算) まで影響は認められなかった。

呼吸系に及ぼす影響では、AJM300 のラットへの経口投与において、1000 mg/kg まで影響は認められなかった。

## 2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1  $\alpha 4$  インテグリンに対する親和性及び選択性2.6.2.2.1.1  $\alpha 4$  インテグリンに対する親和性

[第4部資料番号：4.2.1.1-1、4.2.1.1-2、4.2.1.1-3]

ヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン発現細胞 (Jurkat)、ヒト  $\alpha 4\beta 7$  インテグリン発現細胞 (RPMI-8866) 及びマウス  $\alpha 4\beta 7$  インテグリン発現細胞 (TK-1) を用いて  $^3\text{H}$ -HCA2969 の受容体結合実験を行い、HCA2969 の親和性を検討した。インテグリンには活性化状態と非活性化状態が存在し、 $\text{Mn}^{2+}$  添加により活性化状態を維持できることが知られている<sup>14)</sup>。本試験では 2 mmol/L の  $\text{Mn}^{2+}$  存在下での各インテグリン発現細胞に対する  $^3\text{H}$ -HCA2969 の解離定数 ( $K_D$ ) を求めた。

ヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン発現細胞、ヒト  $\alpha 4\beta 7$  インテグリン発現細胞及びマウス  $\alpha 4\beta 7$  インテグリン発現細胞に対する  $^3\text{H}$ -HCA2969 の結合は、それぞれ濃度依存性かつ飽和性を示し、 $K_D$  値はそれぞれ  $0.32 \pm 0.01$  nmol/L、 $0.46 \pm 0.07$  nmol/L 及び  $0.20 \pm 0.03$  nmol/L であった (表 2.6.2-3) (データは3回の実験の平均値±標準誤差)。 $^3\text{H}$ -HCA2969 はヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン、ヒト  $\alpha 4\beta 7$  インテグリン及びマウス  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンに対し、ほぼ同等の親和性を示した。

表 2.6.2-3  $\alpha 4$  インテグリンに対する HCA2969 の親和性

動物種	評価系 (Integrin)	細胞系	$K_D$ (nmol/L)
ヒト	$\alpha 4\beta 1$	Jurkat	$0.32 \pm 0.01$
	$\alpha 4\beta 7$	RPMI-8866	$0.46 \pm 0.07$
マウス	$\alpha 4\beta 7$	TK-1	$0.20 \pm 0.03$

各データは3回の実験の平均値±標準誤差で示した。

## 2.6.2 薬理試験の概要文

### 2.6.2.2.1.2 各種受容体、イオンチャネル、トランスポーター及び酵素に対する親和性

[第4部資料番号：4.2.1.1-4、4.2.1.1-5]

表 2.6.2-4 に示す受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する親和性、並びに表 2.6.2-5 に示す酵素に対する作用を、各種特異的リガンドを用いて検討した。AJM300 及び HCA2969 は 1000 nmol/L においても 50%以上の阻害作用を示さなかった。

表 2.6.2-4 AJM300 及び HCA2969 の親和性を評価した分子種の一覧

分子種	由来
BZD (central)	ラット脳皮質
B <sub>2</sub> (h)	ヒト遺伝子組み換え (CHO cells)
D2	ラット線条体
ET <sub>A</sub>	細胞株 (A-10)
GABA (non-selective)	ラット脳皮質
NMDA	ラット脳皮質
CCR1 (h)	ヒト遺伝子組み換え (HEK293 cells)
CCR3 (h)	ヒト遺伝子組み換え (K562 cells)
H <sub>1</sub> (central)	モルモット小脳
LTB <sub>4</sub> (h)	細胞株 (U-937)
MAO-A	ラット脳
M (non-selective)	ラット脳皮質
NK <sub>1</sub>	ラット脳皮質
NK <sub>1</sub> (h)	細胞株 (U-373MG)
NK <sub>2</sub> (h)	ヒト遺伝子組み換え (CHO cells)
NK <sub>3</sub> (h)	ヒト遺伝子組み換え (CHO cells)
Y (non-selective)	ラット脳皮質
N (neuronal) (α-BGTX-insensitive)	ラット脳皮質
Opiate (non-selective)	ラット脳皮質
5-HT <sub>1A</sub>	ラット脳皮質
Ca <sup>2+</sup> channel (L, DHP site)	ラット脳皮質
K <sup>+</sup> <sub>v</sub> channel	ラット脳皮質
Na <sup>+</sup> channel (site 2)	ラット脳皮質
NE transporter	ラット脳皮質
5-HT transporter	ラット脳皮質

表 2.6.2-5 AJM300 及び HCA2969 の親和性を評価した酵素の一覧

酵素	由来
Inducible NOS	細胞株 (RAW 264-7 cells)
MMP-1 (h)	ヒト Rheumatoid synovial fibroblasts
MMP-3 (h)	ヒト遺伝子組み換え (SF9 cells)
MMP-9 (h)	ヒト遺伝子組み換え (mammalian cells)
Tryptase (h)	ヒト肺

2.6.2.2.2  $\alpha 4$  インテグリンと接着分子との結合に対する阻害作用2.6.2.2.2.1  $\alpha 4$  インテグリン発現細胞と接着分子との結合に対する阻害作用及び選択性

[第4部資料番号：4.2.1.1-6、4.2.1.1-7、4.2.1.1-8、4.2.1.1-9、4.2.1.1-10、4.2.1.1-11、4.2.1.1-12]

$\alpha 4$  インテグリンは生体内で  $\beta 1$  インテグリン又は  $\beta 7$  インテグリンと二量体を形成し、主として  $\alpha 4\beta 1$  インテグリンは VCAM-1、 $\alpha 4\beta 7$  インテグリンは MAdCAM-1 といった接着分子と結合することが知られている<sup>1) 2)</sup>。そこで、各インテグリン発現細胞と対応する接着分子のキメラたん白質との固相結合アッセイを用いて、HCA2969 及び ████████ の阻害作用を検討した。なお、██████ は  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン及び  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンを阻害する低分子化合物として報告されている<sup>15)</sup>。

HCA2969 はヒト、ラット及びマウスの  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン発現細胞と VCAM-1/Fc との結合を濃度依存的に阻害し、それぞれに対する 50%阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) は、 $5.8 \pm 1.6$  nmol/L (3 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差)、 $8.5 \pm 1.8$  nmol/L (3 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差) 及び  $0.94 \pm 0.33$  nmol/L (3 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差) であった。また、HCA2969 はヒト、ラット及びマウス  $\alpha 4\beta 7$  インテグリン発現細胞と MAdCAM-1/Fc との結合も濃度依存的に阻害し、それぞれに対する  $IC_{50}$  は  $1.4 \pm 0.3$  nmol/L (3 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差)、 $4.1 \pm 1.2$  nmol/L (4 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差) 及び  $26 \pm 1$  nmol/L (3 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差) であった。一方、ヒト  $\alpha L\beta 2$  インテグリン発現細胞と ICAM-1/Fc との結合に対する  $IC_{50}$  値は  $54000 \pm 11000$  nmol/L (3 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差) であった (表 2.6.2-6)。

表 2.6.2-6  $\alpha 4$  インテグリン発現細胞と接着分子との結合に対する HCA2969 の阻害作用

動物種	評価系 (インテグリン vs リガンド)	細胞系	$IC_{50}$ (nmol/L)	
			HCA2969	██████
ヒト	$\alpha 4\beta 1$ vs VCAM-1	Jurkat	$5.8 \pm 1.6$ (3)	$28 \pm 3$ (3)
	$\alpha 4\beta 7$ vs MAdCAM-1	RPMI-8866	$1.4 \pm 0.3$ (3)	$11 \pm 2$ (3)
	$\alpha L\beta 2$ vs ICAM-1	Jurkat	$54000 \pm 11000$ (3)	-
ラット	$\alpha 4\beta 1$ vs VCAM-1	RBL-2H3	$8.5 \pm 1.8$ (3)	$75 \pm 28$ (3)
	$\alpha 4\beta 7$ vs MAdCAM-1	RBL-1	$4.1 \pm 1.2$ (4)	$35 \pm 9$ (4)
マウス	$\alpha 4\beta 1$ vs VCAM-1	L1-2	$0.94 \pm 0.33$ (3)	$4.5 \pm 1.1$ (3)
	$\alpha 4\beta 7$ vs MAdCAM-1	TK-1	$26 \pm 1$ (3)	$450 \pm 80$ (3)

各データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した (括弧内の数字は実験回数)。

2.6.2.2.2  $\alpha$ 4 インテグリン阻害作用に及ぼす血清の影響

〔第4部資料番号：4.2.1.1-13〕

ヒト血清が50%存在する条件下において、ヒト  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 インテグリン発現細胞 (Jurkat) と VCAM-1/Fc キメラたん白質との固相結合アッセイを用いて、HCA2969 の阻害活性を測定した。HCA2969 の阻害活性は、血清非存在下での IC<sub>50</sub> 値が 6.7±1.2 nmol/L であったのに対し、血清存在下では 310±60 nmol/L と約 50 倍の低下が認められた(データは3回の実験の平均値±標準誤差)。

## 2.6.2.2.3 その他細胞機能に対する作用

〔第4部資料番号：4.2.1.1-5〕

表 2.6.2-7 に示す、各種刺激による各種サイトカイン及び炎症性メディエーターの放出に対する作用を検討した。AJM300 及び HCA2969 は 1000 nmol/L においても 50%以上の阻害作用を示さなかった。

表 2.6.2-7 AJM300 及び HCA2969 の作用を評価した細胞機能の一覧

細胞機能	由来	刺激
IFN- $\gamma$ 放出 (h)	ヒト PBMC	PHA
TNF- $\alpha$ 放出 (h)	ヒト PBMC	LPS
IL-1 $\beta$ 放出 (h)	ヒト PBMC	LPS
IL-2 放出 (h)	ヒト PBMC	PHA
IL-4 放出 (h)	ヒト PBMC	ConA
IL-5 放出 (h)	ヒト PBMC	ConA
IL-6 放出 (h)	ヒト PBMC	LPS
IL-8 放出 (h)	ヒト PBMC	LPS
Superoxide O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 放出 (h)	細胞株 (分化した HL-60 cells)	PMA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 放出 (h)	細胞株 (分化した HL-60 cells)	PMA

### 2.6.2.2.3 $\alpha 4$ インテグリンの生物活性に対する作用

$\alpha 4$  インテグリンはリンパ球が血管系とリンパ系の2つの循環系を行き来する、いわゆるホーミング現象に重要な働きをすることが知られている<sup>3) 4)</sup>。特に消化管粘膜系リンパ球のホーミング現象は、パイエル板や腸間膜リンパ節といった二次リンパ組織中の血管内皮細胞上に発現する接着分子である MAdCAM-1 にリンパ球表面上に発現している  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンが結合し、血管内皮細胞間隙を通り抜けることにより行われることが報告されている<sup>3)</sup>。また、 $\alpha 4$  インテグリンに対するヒト化抗  $\alpha 4$  インテグリン抗体ナタリズマブのクローン病患者及び潰瘍性大腸炎患者への投与により、末梢血中リンパ球数が増加することが報告されている<sup>4)</sup>。さらに、マウス、ラットを始め、数種の動物種で  $\alpha 4$  インテグリンに対する抗体を投与した場合、末梢血中の白血球数<sup>16)</sup>、主にリンパ球数が増加することが報告されている<sup>17)</sup>。この現象は、 $\alpha 4$  インテグリンに対する抗体が前述のホーミング現象を阻害することにより、末梢血リンパ球のリンパ組織系への移行が抑制されるため、結果として末梢血中のリンパ球数が増加するものと想定されている<sup>4)</sup>。*In vivo* における、これら  $\alpha 4$  インテグリンの生物活性に対する AJM300 の作用を検討するため、マウス及びラットにおけるパイエル板へのリンパ球のホーミング阻害活性及び末梢血中リンパ球数に及ぼす作用について検討を行った。

すべての *in vivo* 試験には毒性試験で用いた AJM300M1 製剤を用い、AJM300 量に換算して投与した。

## 2.6.2.2.3.1 マウスにおけるリンパ球のホーミングに対する作用

〔第4部資料番号：4.2.1.1-14〕

マウス (BALB/c) における小腸パイエル板へのリンパ球 (腸間膜リンパ節細胞) のホーミング阻害活性を検討した。PKH26 蛍光色素で標識した腸間膜リンパ節細胞を尾静脈より移入、その1時間後に小腸パイエル板に存在する生細胞中の蛍光標識細胞 (移入細胞) の割合を測定した。AJM300 は移入の0.5時間前に経口投与し、抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (PS/2) を移入細胞に前処理した群を陽性対照群とした。

マウスにおいて、小腸パイエル板へホーミングする移入細胞数の割合は、AJM300 の用量増加に従って低下した。Vehicle 群に対するホーミング細胞数の割合の有意な抑制は3、10及び30 mg/kg 群において認められた ( $p < 0.05$ )。

次に、Vehicle 群のホーミング阻害活性を0%、抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (PS/2) 前処理群のホーミング阻害活性を100%として、ホーミング阻害率として解析した結果、AJM300 の用量依存的なリンパ球のホーミング阻害活性が認められた (図 2.6.2-1)。マウスにおいてリンパ球のホーミング阻害における AJM300 の50%有効用量 ( $ED_{50}$ ) は2.5 mg/kg であった。

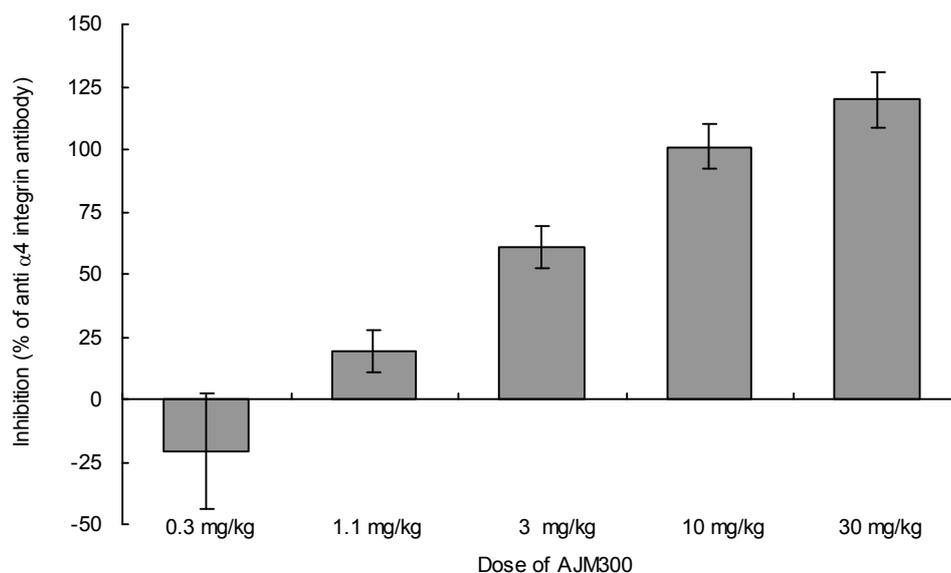


図 2.6.2-1 マウス腸間膜リンパ節細胞の小腸パイエル板へのホーミングに対する AJM300 の作用

Vehicle 群でのホーミング阻害活性を0%、抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (PS/2) を前処理した群の阻害活性を100%として換算したホーミング阻害率として表し、各データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n=4$ ) で示した。

## 2.6.2.2.3.2 ラットにおけるリンパ球のホーミングに対する作用

[第4部資料番号：4.2.1.1-15、4.2.1.1-16]

ラット (SD) における小腸パイエル板へのリンパ球 (腸間膜リンパ節細胞) のホーミング阻害活性を検討した。PKH26 蛍光色素で標識した腸間膜リンパ節細胞を尾静脈より移入、その1時間後に小腸パイエル板に存在する生細胞中の蛍光標識細胞 (移入細胞) の割合を測定した。AJM300 は移入の0.5時間前に経口投与し、抗ラット  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (TA-2) を移入細胞に前処理した群を陽性対照群とした。

ラットにおいて、小腸パイエル板へホーミングする移入細胞数の割合は、AJM300 の用量増加に従って低下した。AJM300 の 0.3、3 及び 30 mg/kg の用量で検討した結果、Vehicle 群に対するホーミング細胞数の割合の有意な抑制は AJM300 の 3 及び 30 mg/kg 群において認められた ( $p < 0.05$ )。そこで、AJM300 の 1、3 及び 10 mg/kg の用量で検討した結果、Vehicle 群に対するホーミング細胞数の割合の有意な抑制は AJM300 の 3 及び 10 mg/kg 群において認められた ( $p < 0.05$ )。

次に、Vehicle 群のホーミング阻害活性を 0%、抗ラット  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体前処理群のホーミング阻害活性を 100%として、ホーミング阻害率として解析した結果、AJM300 の用量依存的なリンパ球のホーミング阻害活性が認められた (図 2.6.2-2)。ラットにおいてリンパ球のホーミング阻害における AJM300 の 50%有効用量 ( $ED_{50}$ ) は 2.6 mg/kg であった。

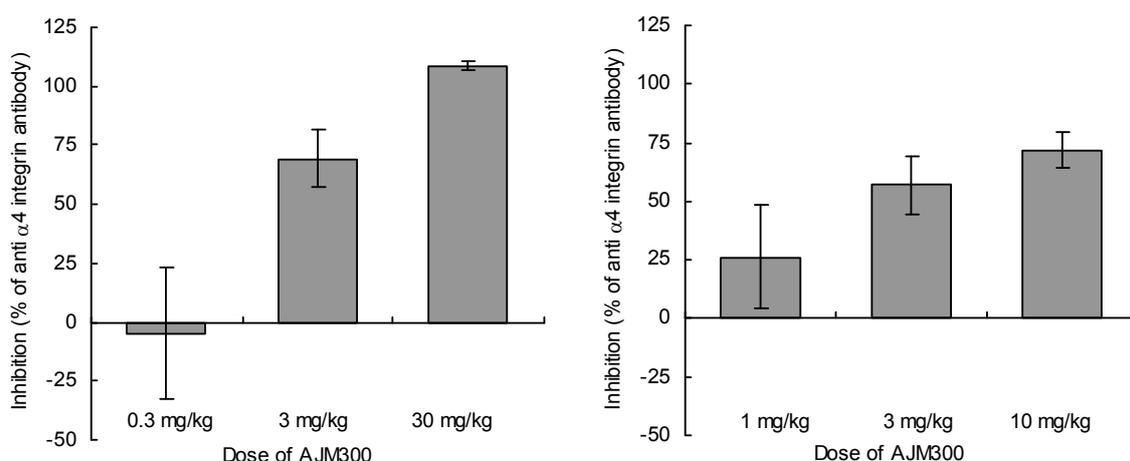


図 2.6.2-2 ラット腸間膜リンパ節細胞の小腸パイエル板へのホーミングに対する AJM300 の作用

Vehicle 群でのホーミング阻害活性を 0%、抗ラット  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (TA-2) を前処理した群の阻害活性を 100%として換算したホーミング阻害率として表し、左図のデータは平均値±標準誤差 (n=4、3 mg/kg 投与群は n=5) で示した。右図のデータは平均値±標準誤差 (n=5) で示した。

## 2.6.2.2.3.3 マウスにおける末梢血中リンパ球数に対する作用

[第4部資料番号：4.2.1.1-17]

AJM300 をマウス (BALB/c) に経口投与したときの末梢血中リンパ球数に対する作用を検討した。マウスに AJM300 を 0.3~300 mg/kg の用量で経口投与し、1.5 時間後に採血を行い末梢血中のリンパ球数を測定した。

AJM300 の用量の増加に従って末梢血中のリンパ球数が増加し、いずれもプラセボ投与群に対して統計学的に有意なリンパ球数の増加が認められた (図 2.6.2-3)。

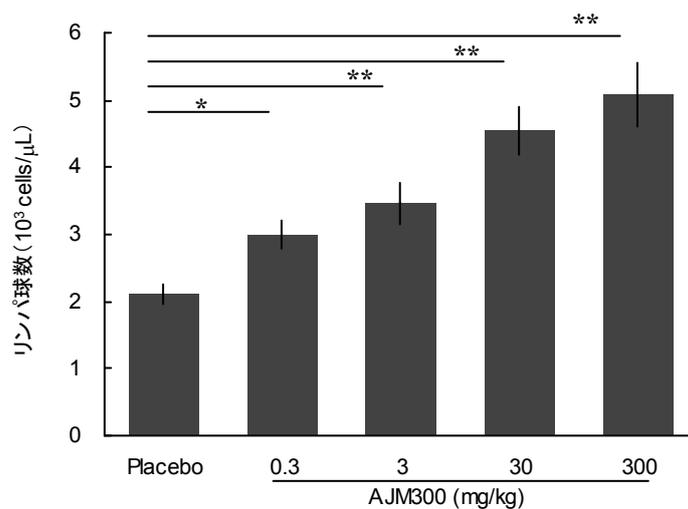


図 2.6.2-3 マウスにおける末梢血中リンパ球数に及ぼす AJM300 の作用

データは平均値±標準誤差で示した (n=8)。マウスに AJM300 を経口投与し、1.5 時間後に採血を行い末梢血中のリンパ球数を測定した。\* : p<0.05、\*\* : p<0.01 vs Placebo 群 (Steel test)

## 2.6.2.2.3.4 ラットにおける末梢血中リンパ球数に対する作用

〔第4部資料番号：4.2.1.1-18〕

AJM300 をラット (SD) に経口投与したときの末梢血中リンパ球数に対する作用を検討した。ラットに AJM300 を 1~300 mg/kg の用量で経口投与し、1、2、4 及び 8 時間後に採血を行い、末梢血中のリンパ球数を測定した。AJM300 の投与 1、2、4 及び 8 時間後の各時点において用量増加に従って、末梢血中リンパ球数の増加が認められた。また、AJM300 の用量の増加に従って、リンパ球数増加の持続時間が延長し、増加のピークは投与 2 時間後であることが示唆された (図 2.6.2-4)。

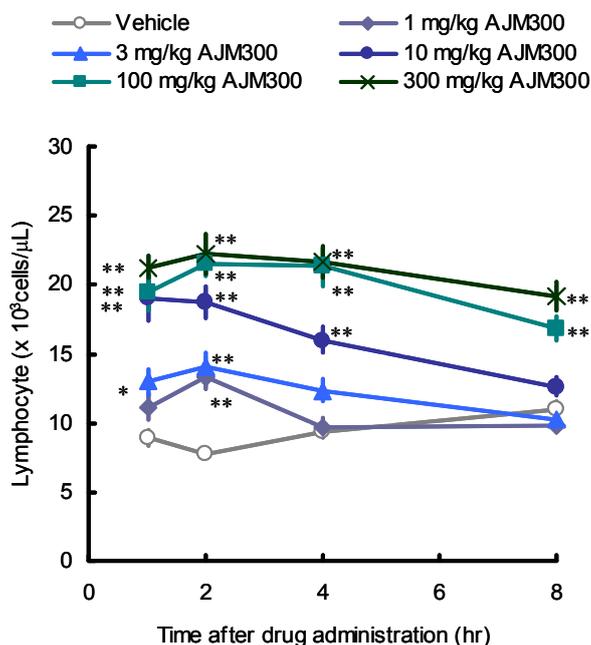


図 2.6.2-4 ラットにおける末梢血中リンパ球数に及ぼす AJM300 の作用

各プロットは平均値±標準誤差で示した (AJM300 1 mg/kg 投与 1 時間後及び 2 時間後採血用の試験群は n=11、その他は全て n=12)。  
\* : p<0.05、\*\* : p<0.01 vs Vehicle 群 (Dunnett's test)

#### 2.6.2.2.4 実験的腸炎に対する作用

腸炎を自然発症した IL-10 ノックアウトマウスの脾臓及び腸間膜リンパ節の CD4<sup>+</sup> T 細胞を免疫不全 SCID マウス (C.B-17/Icr-scid) に移入することで、実験的腸炎モデル (IL-10 ノックアウト CD4<sup>+</sup> T 細胞移入マウス腸炎モデル) を作製した<sup>10)</sup>。細胞移入は一匹あたり  $1 \times 10^6$  cells / 200  $\mu$ L で腹腔内投与により実施した。便性状スコアリング (0 ; 正常、1 ; 軟便、2 ; 下痢) は細胞移入から 5 日後 (Day 5) に開始し、15 日後 (Day 15) に剖検するまで毎日実施した。剖検日には大腸 (肛門から盲腸手前まで) を採取し、本モデルにおける主要評価項目として、腸管重量を測定した。採取した大腸の一部から凍結未染色標本を作製し、抗 CD3 抗体を用いた蛍光免疫組織染色により腸管に浸潤した T 細胞を染色後、腸管組織への T 細胞浸潤面積率を算出した。

##### 2.6.2.2.4.1 実験的マウス腸炎に対する AJM300 の作用

[第 4 部資料番号 : 4.2.1.1-19]

0.03%、0.1%、0.3%及び1% (AJM300M1 製剤としての重量パーセント濃度) の AJM300M1 製剤混合飼料を調製し、移入前日 (Day -1) から AJM300 を自由摂取によって経口投与を開始した。なお、病態コントロール群には 1%AJM300M1 製剤と同等量のプラセボ製剤 (AJM300M1 製剤の           であるメチルセルロース及びクロスカルメロースナトリウムを ■ : ■ の比率で混合したもの) を含む混合飼料を自由摂取させた。また、参考群としてプラセボ製剤を含まない実験動物用飼料 (チャールス・リバー フォーミュラ、CRF-1) を供与した病態群を設けた。本モデルにおける腸管重量増加、便性状スコア及び腸管組織への T 細胞浸潤に対する AJM300 の作用について検討した。結果を図 2.6.2-5 に示す。

病態コントロール群 (1%プラセボ投与群) では未移入群に比べ、腸管重量の有意な増加が認められた。その腸管重量に対して、AJM300 の用量依存的な抑制効果が認められ、0.1%以上の AJM300M1 製剤投与群では 1%プラセボ投与群に対して統計学的に有意な抑制効果が認められた。また、便性状スコアに対する AJM300 の用量依存的な抑制効果が認められ、0.03%以上の AJM300M1 製剤投与群では 1%プラセボ投与群に対して統計学的に有意な抑制効果が認められた。さらに、1%AJM300M1 製剤投与群では 1%プラセボ投与群に対して統計学的に有意な T 細胞浸潤面積率の低下が認められた。

以上の結果より、T 細胞浸潤抑制を伴う腸管重量増加に対する抑制効果は 1%AJM300M1 製剤投与群で認められた。

## 2.6.2 薬理試験の概要文

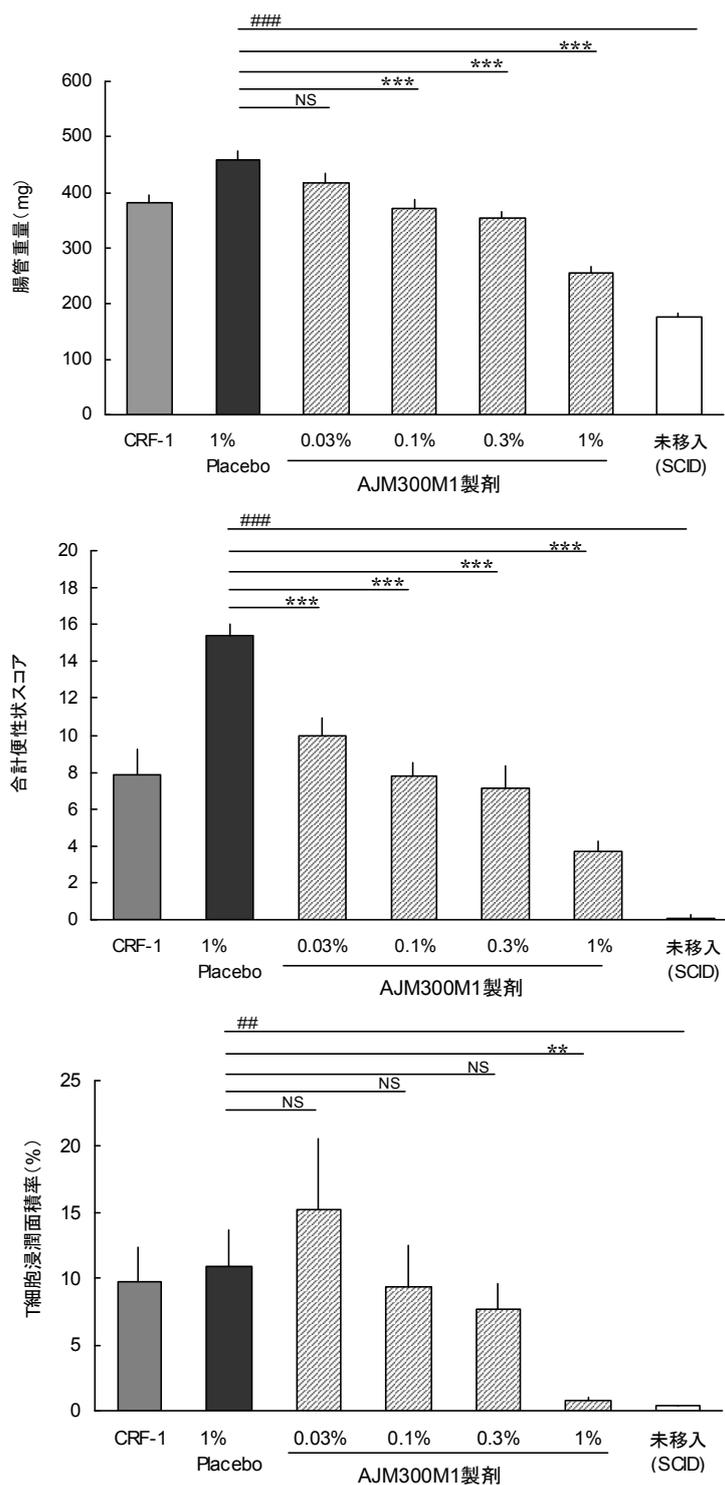


図 2.6.2-5 IL-10 ノックアウト CD4<sup>+</sup> T 細胞移入マウス腸炎モデルにおける (上段) 腸管重量増加、(中段) 便性状スコア及び (下段) 腸管組織への T 細胞浸潤に対する AJM300 の抑制作用

(上段) 細胞移入から 15 日後の大腸の腸管重量を示した。### : p<0.001 vs 未移入群 (Welch's test)、NS : Not significant、\*\*\* : p<0.001 vs 1% Placebo control group (Dunnett's test)。(中段) 細胞移入の 5 日後以降、剖検日 (Day 15) まで毎日、全試験個体の便性状スコア (0 ; 正常、1 ; 軟便、2 ; 下痢) を記録し、その合計を示した。### : p<0.001 vs 未移入群 (Welch's test)、\*\*\* : p<0.001 vs 1% Placebo control group (Dunnett's test)。(下段) 腸管組織への T 細胞浸潤面積率を示した。## : p<0.01 vs 未移入群 (Welch's test)、NS : Not significant、\*\* : p<0.01 vs 1% Placebo control group (Steel test)。各データは平均値±標準誤差 (n=8) で示した。

### 2.6.2.2.4.2 実験的マウス腸炎における AJM300 投与後の血中濃度推移

〔第4部資料番号：4.2.1.1-20〕

0.1%、0.3%及び1% (AJM300M1 製剤としての重量パーセント濃度) の AJM300M1 製剤混合飼料を調製し、移入前日 (Day -1) から AJM300 を自由摂取によって経口投与を開始した。本モデルにおける AJM300 自由摂取後の血漿中 AJM300 濃度及び HCA2969 濃度を検討した。細胞移入日 (Day 0) から 14 日後 (Day 14) の 10、14、20 及び 24 時と 15 日後 (Day 15) の 6 及び 10 時に各群 4 匹ずつエーテル麻酔下にて採血し、血漿中濃度を測定した。0.1%、0.3%及び1%

(AJM300M1 製剤としての重量パーセント) の用量で AJM300 を投与した際の AJM300 の血漿中濃度推移は表 2.6.2-8 のとおりであった (15.0 ng/mL 未満を定量下限未満 (N.D.) とし、4 例中 3 例以上の測定値が N.D. の場合、平均値は算出不可能と判断し N.C. (Not Calculated) とした)。AJM300 の最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ ) はそれぞれ N.C.、24.1 及び 49.5 ng/mL であり、24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_{0-24h}$ ) はそれぞれ N.C.、N.C. 及び 777 ng·h/mL (各時点の各群 4 匹の平均値の  $AUC_{0-24h}$ ) であった (表 2.6.2-9)。また、HCA2969 の血漿中濃度推移は表 2.6.2-10 のとおりであった。HCA2969 の  $C_{max}$  はそれぞれ 549、2360 及び 4830 ng/mL であり、 $AUC_{0-24h}$  はそれぞれ 7920、36900 及び 78900 ng·h/mL (各時点の各群 4 匹の平均値の  $AUC_{0-24h}$ ) であった (表 2.6.2-11)。AJM300 の用量の増加に従って、血漿中 HCA2969 濃度の  $C_{max}$  及び  $AUC_{0-24h}$  の増加が認められた。

## 2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2-8 AJM300 の血漿中濃度 (ng/mL)

群	採血タイミング					
	Day 14				Day 15	
	10 時	14 時	20 時	24 時	6 時	10 時
0.1% AJM300M1 製剤	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
0.3% AJM300M1 製剤	N.C.	N.C.	14.4±18.8	24.1±16.3	12.1±14.1	15.6±18.7
1% AJM300M1 製剤	18.6±13.4	11.5±14.2	43.2±13.8	35.2±14.8	49.5±25.3	21.3±15.5

15.0 ng/mL 未満を定量下限未満 (N.D.) とし、4 例中 3 例以上の測定値が N.D. の場合、平均値は算出不可能と判断し N.C. (Not Calculated) とした。

各データは平均値±標準偏差で示した。

表 2.6.2-9 AJM300 の最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ ) 及び 24 時間の血漿中濃度—時間曲線下面積 ( $AUC_{0-24h}$ )

群	$C_{max}$ (ng/mL)	$AUC_{0-24h}$ (ng·h/mL)
0.1% AJM300M1 製剤	N.C.	N.C.
0.3% AJM300M1 製剤	24.1	N.C.
1% AJM300M1 製剤	49.5	777

15.0 ng/mL 未満を定量下限未満 (N.D.) とし、4 例中 3 例以上の測定値が N.D. の場合、平均値は算出不可能と判断し N.C. (Not Calculated) とした。

$AUC_{0-24h}$  は各時点の平均値を用いて台形法により算出した。

表 2.6.2-10 HCA2969 の血漿中濃度 (ng/mL)

群	採血タイミング					
	Day 14				Day 15	
	10 時	14 時	20 時	24 時	6 時	10 時
0.1% AJM300M1 製剤	444±289	191±117	398±84	549±132	119±46	371±229
0.3% AJM300M1 製剤	1520±1240	768±359	1430±890	2360±750	1460±780	1930±1020
1% AJM300M1 製剤	2880±860	1980±840	3860±540	4830±1220	2690±810	3180±1110

各データは平均値±標準偏差で示した。

表 2.6.2-11 HCA2969 の最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ ) 及び 24 時間の血漿中濃度—時間曲線下面積 ( $AUC_{0-24h}$ )

群	$C_{max}$ (ng/mL)	$AUC_{0-24h}$ (ng·h/mL)
0.1% AJM300M1 製剤	549	7920
0.3% AJM300M1 製剤	2360	36900
1% AJM300M1 製剤	4830	78900

$AUC_{0-24h}$  は各時点の平均値を用いて台形法により算出した。

### 2.6.2.2.4.3 実験的マウス腸炎における抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体との薬効比較

〔第4部資料番号：4.2.1.1-21〕

1% (AJM300M1 製剤としての重量パーセント濃度) の AJM300M1 製剤混合飼料を調製し、移入前日 (Day -1) から AJM300 を自由摂取によって経口投与を開始した。抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (PS/2) は週に2回 (3又は4日毎に1回) 腹腔内投与を実施した。抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (PS/2) の本用法用量で、 $\alpha 4$  インテグリン占有率飽和が4日間維持されることが確認されている。本モデルにおける腸管重量増加、便性状スコア及び腸管組織へのT細胞浸潤に対するAJM300及び抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (PS/2) の作用について検討した。結果を図2.6.2-6に示す。

腸管重量増加について、1%AJM300M1 製剤投与群及び抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (PS/2) 投与群とプラセボ投与群間には、それぞれ統計学的に有意な抑制効果が認められ、1%AJM300M1 製剤投与群と抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (PS/2) 投与群間には統計学的有意差が認められなかった。便性状スコア及び腸管組織へのT細胞浸潤面積率についても、1%AJM300M1 製剤投与群及び抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (PS/2) 投与群とプラセボ投与群間には、それぞれ統計学的に有意な抑制効果が認められ、1%AJM300M1 製剤投与群と抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (PS/2) 投与群間には統計学的有意差は認められなかった。

本モデルにおいて腸管重量増加、便性状スコア及び腸管組織へのT細胞浸潤に対する抑制作用は、1%AJM300M1 製剤投与群と抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (PS/2) で差は認められなかった。

## 2.6.2 薬理試験の概要文

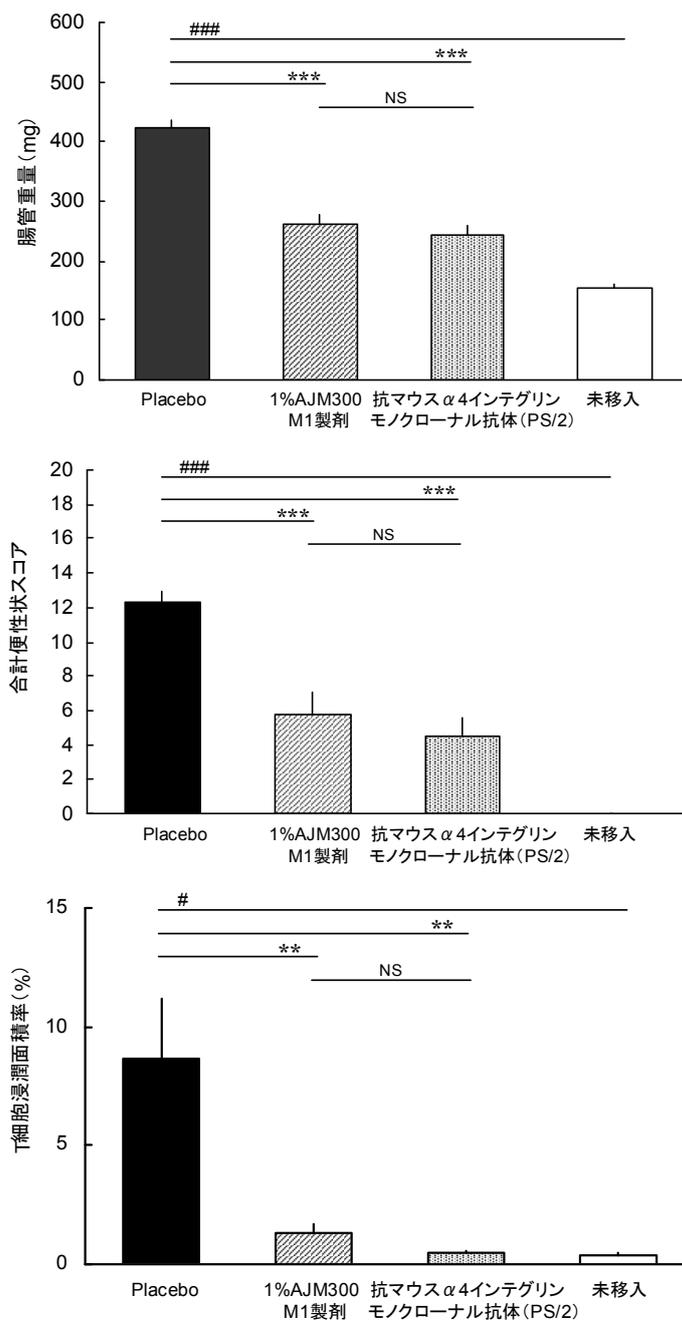


図2.6.2-6 IL-10ノックアウトCD4<sup>+</sup>T細胞移入マウス腸炎モデルにおける(上段)腸管重量増加、(中段)便性状スコア及び(下段)腸管組織へのT細胞浸潤に対するAJM300と抗α4インテグリン抗体の抑制作用の比較

(上段)細胞移入から15日後の大腸の腸管重量を示した。###:  $P < 0.001$  vs 未移入群 (Student's t test)、\*\*\*:  $p < 0.001$  vs 1% Placebo control group、NS: Not significant (Tukey-Kramer's test)。(中段)細胞移入の5日後以降、剖検日 (Day 15) まで毎日、全試験個体の便性状スコア (0; 正常、1; 軟便、2; 下痢) を記録し、その合計を示した。###:  $p < 0.001$  vs 未移入群 (Welch's test)、\*\*\*:  $p < 0.001$  vs 1% Placebo control group、NS: Not significant (Tukey-Kramer's test)。(下段)腸管組織へのT細胞浸潤面積率を示した。#:  $p < 0.05$  vs 未移入群 (Welch's test)、\*\*:  $p < 0.01$  vs 1% Placebo control group、NS: Not significant (Steel-Dwass' test)。各データは平均値+標準誤差 (n=8) で示した。

### 2.6.2.2.5 代謝物の $\alpha 4$ インテグリンと接着分子との結合に対する阻害作用

AJM300 の主要代謝物として、活性代謝物である HCA2969 以外に AJM300 の *N*-脱メチル体である HCA3053、HCA3053 のエステル加水分解体である HCA3047 及び HCA2969 グルクロン酸抱合体が同定されている。これら代謝物の薬理作用を明らかにするため、*in vitro* 試験を実施した。なお、HCA2969 グルクロン酸抱合体は HCA2969 の  $\alpha 4$  インテグリン阻害活性に重要な部位がグルクロン酸抱合されているため、薬理作用が低下すると考えられたことから、検討対象から外した。

#### 2.6.2.2.5.1 $\alpha 4$ インテグリン発現細胞と接着分子との結合に対する阻害作用

〔第 4 部資料番号：4.2.1.1-22〕

ヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン発現細胞 (Jurkat) と VCAM-1/Fc キメラたん白質との固相結合アッセイを用いて、AJM300、HCA2969、HCA3053 及び HCA3047 の阻害活性を測定した。ヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン発現細胞と VCAM-1/Fc との結合に対する AJM300、HCA2969、HCA3053 及び HCA3047 の 50%阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) はそれぞれ  $470 \pm 150$  nmol/L、 $6.4 \pm 2.7$  nmol/L、 $560 \pm 220$  nmol/L 及び  $5.0 \pm 2.1$  nmol/L であった (データは 3 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差)。

## 2.6.2.3 副次的薬理試験

米国において、AJM300 と標的分子が同じである抗  $\alpha 4$  インテグリン抗体ナタリズマブとインターフェロン  $\beta 1a$  を 2 年以上併用した多発性硬化症の患者に致死性の希少疾患である進行性多巣性白質脳症 (PML) の発症が報告された<sup>11), 12)</sup>。さらに、ナタリズマブのクローン病を対象とした臨床試験においても、PML 発症が 1 件発生していたことが報告された<sup>18)</sup>。PML の発症には JC ウイルスに対する細胞性免疫能の低下が何らかの関連を持っていると考えられている<sup>13)</sup>ことから、副次的薬理試験として細胞性免疫機能に対する AJM300 及び HCA2969 の作用を検討した。

## 2.6.2.3.1 細胞性免疫に及ぼす作用

## 2.6.2.3.1.1 ヒト末梢血由来単核球のナチュラルキラー細胞媒介性細胞傷害活性に対する作用

[第 4 部資料番号 : 4.2.1.2-1]

ヒト末梢血由来単核球 (PBMC) のナチュラルキラー細胞媒介性細胞傷害活性 (NK 活性) に対する HCA2969 の作用を検討した。3 回の独立した実験において、NK 活性感受性のターゲット細胞 (K562) に対してのみエフェクター細胞数 (ヒト PBMC) の比率に応じた細胞傷害活性が認められたため、各 HCA2969 濃度における細胞傷害活性 (% Specific lysis) を算出した。

HCA2969 の NK 活性の阻害作用は、ヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン発現細胞 (Jurkat) とヒト VCAM-1/Fc との結合に対する  $IC_{50}$  値の約 1000 倍である  $10 \mu\text{mol/L}$  においても認められなかった (図 2.6.2-7)。よって、ヒト末梢血由来単核球の NK 活性に対し HCA2969 は影響を与えない可能性が示された。

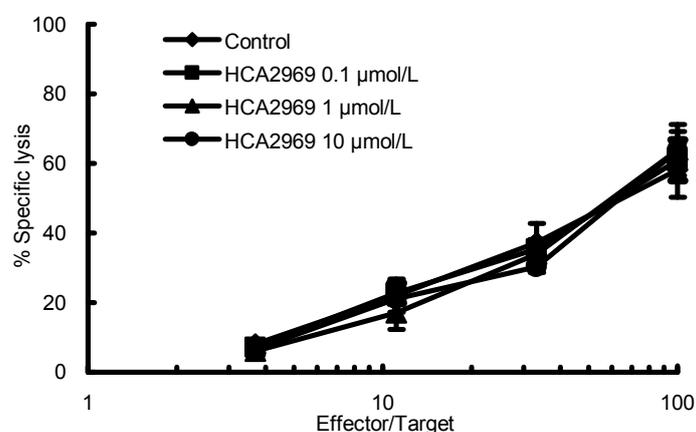


図 2.6.2-7 ヒト末梢血由来単核球の K562 細胞に及ぼす細胞傷害活性に対する HCA2969 の作用

Effector 細胞としてヒト末梢血由来単核球 (PBMC)、Target 細胞として NK 活性感受性であることが知られている K562 細胞を使用した。データは、血液ドナー、細胞調製及び被験物質の調製から独立した 3 回の実験の平均値  $\pm$  標準誤差 (n=3) で示した。

### 2.6.2.3.1.2 Phytohemagglutinin-L 刺激によるヒト末梢血由来単核球の増殖能に対する作用

〔第4部資料番号：4.2.1.2-2〕

Phytohemagglutinin-L (PHA-L、リンパ球の表面受容体に対して高親和性を持ち、細胞凝集及び増殖活性を有する活性化因子) 刺激によるヒト末梢血由来単核球の増殖能に対する HCA2969 の作用を検討した。

ヒト末梢血由来単核球に PHA-L を添加し、48 時間培養した後の BrdU 取り込み量を測定した。コントロールの増殖細胞数を 100% とした時、陽性対照であるマイトマイシン C (MMC) は 2.7 ± 1.5% まで低下させたのに対し、HCA2969 の阻害作用はヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン発現細胞 (Jurkat) とヒト VCAM-1/Fc との結合に対する IC<sub>50</sub> 値の約 1000 倍である 10  $\mu\text{mol/L}$  においても認められなかった (図 2.6.2-8)。よって、PHA-L 刺激によるヒト末梢血由来単核球の増殖能に対し HCA2969 は影響を与えない可能性が示された。

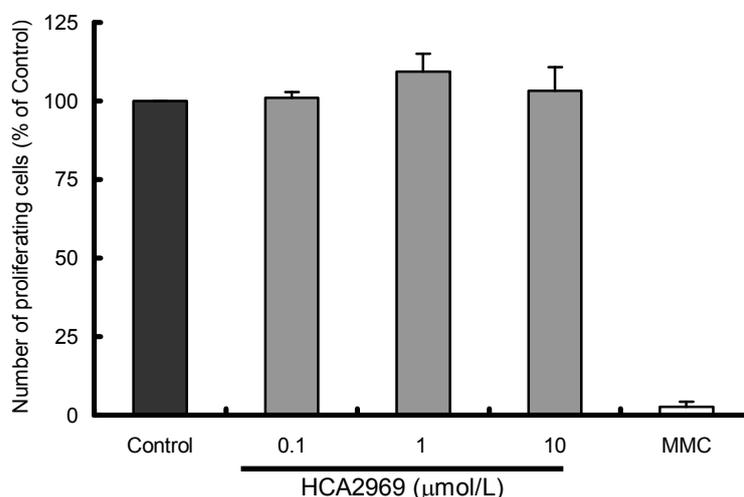


図 2.6.2-8 PHA-L 刺激によるヒト末梢血由来単核球の増殖能に対する HCA2969 の作用

データは、3 回の独立した試験の平均値 + 標準誤差 (n=3) で示した。

### 2.6.2.3.1.3 ラット遅延型過敏反応に対する作用

〔第4部資料番号：4.2.1.2-3〕

ラット (SD) における遅延型過敏 (DTH) 反応に対する AJM300 の作用を検討した。

AJM300 を 10、30、100 及び 300 mg/kg の用量で 1 日 2 回、計 8 日間、経口投与した。プラセボ投与群及び陽性対照であるシクロフォスファミド (Cy) 投与群にも同様なスケジュールでプラセボ投与液 (300 mg/kg AJM300 投与液中のプラセボ量に相当) の経口投与を行った。シクロフォスファミド投与群にはシクロフォスファミド 1 水和物 (50 mg/kg) を、免疫 3 及び 7 日後に各 1 回腹腔内投与し、プラセボ投与群及び AJM300 投与群には生理食塩液の腹腔内投与を同スケジュールにて行った。初回の経口投与終了後、Keyhole limpet hemocyanin (KLH) エマルジョンをラット

## 2.6.2 薬理試験の概要文

の尾根部皮下へ 50  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$  ずつ左右 2 箇所に入して免疫を行った。免疫 7 日後に左足蹠皮下には 0.5% Heat-aggregated (HA) -KLH 懸濁液、右足蹠皮下には生理食塩液を 75  $\mu\text{L}$  ずつ注入し、DTH 反応を誘導した。誘導開始から 24 時間後 ( $\pm 10$  分以内) に、両足の足蹠から足背の厚みをノギスで測定し、その差を足蹠膨化とした。

プラセボ投与群における足蹠膨化は  $1.00 \pm 0.07 \text{ mm}$  であったのに対し、陽性対照であるシクロフォスファミド投与群では  $0.20 \pm 0.07 \text{ mm}$  となり、有意な抑制効果が認められた。一方、AJM300 の 10、30、100 及び 300 mg/kg の 1 日 2 回投与群における足蹠の膨化はそれぞれ  $1.02 \pm 0.08$ 、 $1.05 \pm 0.09$ 、 $0.97 \pm 0.12$  及び  $0.88 \pm 0.05 \text{ mm}$  であり、有意な抑制効果は認められなかった (図 2.6.2-9)。

以上の結果より、ラットにおいて 300 mg/kg の 1 日 2 回、8 日間の反復経口投与においても、KLH で誘導される DTH 反応に対し影響を及ぼさなかった。

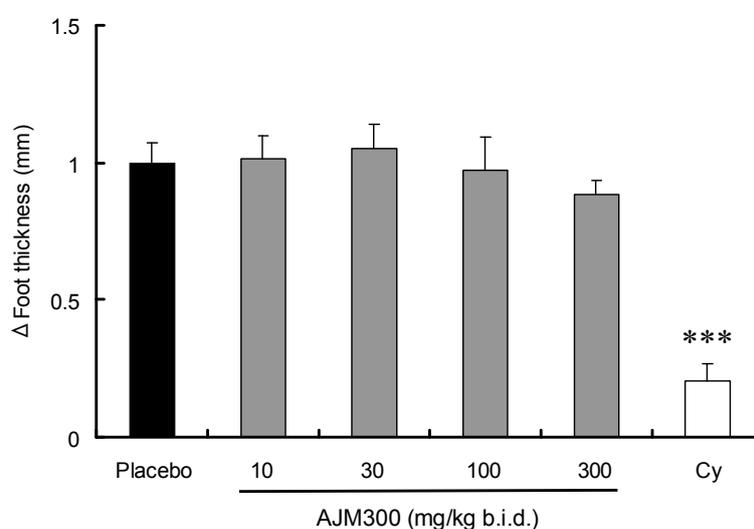


図 2.6.2-9 ラット遅延型過敏反応に対する AJM300 の作用

データは足蹠の膨化の平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=8) で示した。Placebo 投与群と AJM300 投与群の統計学的解析は一元配置分散分析を行った ( $p > 0.05$ )。\*\*\*:  $p < 0.001$  vs Placebo (対応のない t 検定)

### 2.6.2.4 安全性薬理試験

AJM300 及びその活性代謝物である HCA2969 の安全性薬理試験として、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した。

イヌ覚醒下循環器に対する作用検討では、被験物質として、AJM300、メチルセルロース及びクロスカルメロースナトリウムを 1 : 1 : 1 の割合で混合した製剤 (AJM300M1 製剤) を用いた。その他の安全性薬理試験では、被験物質として AJM300 を用い、さらに *in vitro* 試験では、被験物質として HCA2969 を用いた。この時、*in vivo* 試験の投与液の媒体にはポリエチレングリコール (PEG) 400 とプロピレングリコール (PG) の等容量混合液に AJM300 の 1 mol/L に対して 2.5 mol/L となるように塩酸を添加した AJM300 の可溶化液 (PEG/PG・塩酸液) を、*in vitro* 試験の媒体には DMSO を用いた。

#### 2.6.2.4.1 AJM300 の安全性薬理試験

##### 2.6.2.4.1.1 中枢神経系に及ぼす影響

###### (1) ラット一般症状に対する作用検討

[第 4 部資料番号 : 4.2.1.3-1]

雄の SD 系ラットに AJM300 を経口投与し、一般症状を投与前、投与後 0.5、1、2、4、6 及び 24 時間に Irwin の多次元観察法に準じて評価した。投与量は投与可能な最大量である 1000 mg/kg を最高用量として、以下 300、100 及び 30 mg/kg を設定した。

300 mg/kg では投与後 0.5 から 1 時間に、1000 mg/kg では投与後 0.5 から 4 時間に、それぞれ 6 例中 2 例で軽度な縮瞳が認められた。縮瞳の原因は不明であるが、縮瞳以外の症状が見られなかったこと、及び用量に関連して程度が増強する傾向は認められなかったことから、作用はきわめて弱いものと考えられた。なお、30 及び 100 mg/kg では一般症状に影響は認められなかった。

##### 2.6.2.4.1.2 心血管系に及ぼす影響

###### (1) イヌ覚醒下循環器に対する作用検討

[第 4 部資料番号 : 4.2.1.3-2]

雄のビーグル犬にゼラチンカプセルに充填した AJM300M1 製剤を経口投与し、無麻酔、非拘束で血圧 (収縮期血圧、拡張期血圧及び平均血圧)、心拍数及び心電図 (RR 間隔、PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び QTc) を投与前、投与後 0.5、1、2、4、6 及び 24 時間に測定した。投与量は投与可能な最大量である 1000 mg/kg を最高用量とし、以下 300、100 及び 30 mg/kg を設定した (投与量は AJM300 換算)。

AJM300 は 1000 mg/kg まで血圧、心拍数及び心電図に対して影響を及ぼさなかった。

###### (2) hERG 発現細胞を用いた hERG 電流に対する作用検討

[第 4 部資料番号 : 4.2.1.3-3]

hERG 遺伝子を導入した HEK293 細胞を用いて、AJM300 (0、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  及び  $10^{-5}$  mol/L) を適用してパッチクランプ法により hERG 電流を測定した。

AJM300 は  $10^{-5}$  mol/L の濃度で hERG 電流を抑制し、媒体対照群に対する抑制率は 32.4%であった。 $10^{-7}$  及び  $10^{-6}$  mol/L では hERG 電流の抑制は認められなかった。

### (3) モルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する作用検討

〔第4部資料番号：4.2.1.3-4〕

AJM300 (0、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 及び $10^{-5}$  mol/L) をモルモット摘出乳頭筋に適用し、静止膜電位、活動電位振幅、活動電位持続時間 (APD<sub>50</sub>及びAPD<sub>90</sub>) 及び最大立ち上がり速度への影響を、1 Hz 及び0.2 Hz の2つの刺激条件下で検討した。

AJM300 は、1 Hz 及び0.2 Hz のいずれの頻度でも、 $10^{-5}$  mol/L の濃度まで静止膜電位、活動電位振幅、活動電位持続時間 (APD<sub>50</sub>及びAPD<sub>90</sub>) 及び最大立ち上がり速度に影響を及ぼさなかった。

#### 2.6.2.4.1.3 呼吸系に及ぼす影響

### (1) ラット呼吸器系に対する作用検討

〔第4部資料番号：4.2.1.3-5〕

雄のSD系ラットにAJM300を覚醒下で経口投与し、呼吸機能測定装置を用いて、whole body plethysmograph法で呼吸機能を測定した。呼吸機能は1分間の呼吸回数並びに1回及び1分間の換気量を評価し、解析は投与前並びに投与後0.5、1、2、4及び6時間の測定に対して行った。投与量は投与可能な最大量である1000 mg/kgを最高用量として、以下300、100及び30 mg/kgを設定した。

AJM300は1000 mg/kgまで、1分間の呼吸回数、1回及び1分間の換気量に影響を及ぼさなかった。

#### 2.6.2.4.2 HCA2969の安全性薬理試験

##### 2.6.2.4.2.1 心血管系に及ぼす影響

### (1) hERG発現細胞を用いたhERG電流に対する作用検討

〔第4部資料番号：4.2.1.3-6〕

hERG遺伝子を導入したHEK293細胞を用いてHCA2969 (0、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 及び $10^{-5}$  mol/L) を適用してパッチクランプ法によりhERG電流を測定した。

HCA2969は $10^{-5}$  mol/Lの濃度までhERG電流に対して影響を及ぼさなかった。

### (2) モルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する作用検討

〔第4部資料番号：4.2.1.3-7〕

HCA2969 (0、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 及び $10^{-5}$  mol/L) をモルモット摘出乳頭筋に適用し、静止膜電位、活動電位振幅、活動電位持続時間 (APD<sub>50</sub>及びAPD<sub>90</sub>) 及び最大立ち上がり速度への影響を、1 Hz 及び0.2 Hz の2つの刺激条件下で検討した。

HCA2969は1 Hz 及び0.2 Hz のいずれの頻度でも、 $10^{-5}$  mol/L の濃度まで静止膜電位、活動電位振幅、活動電位持続時間 (APD<sub>50</sub>及びAPD<sub>90</sub>) 及び最大立ち上がり速度に影響を及ぼさなかった。

#### 2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験に該当する試験は実施しなかった。

## 2.6.2.6 考察及び結論

## 2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

AJM300 は低分子  $\alpha 4$  インテグリン拮抗型のエステル型プロドラッグであり、経口投与可能であることを特徴とする。AJM300 はエステルの加水分解によって活性代謝物である HCA2969 に代謝される。

$\alpha 4$  インテグリンは生体内で  $\beta 1$  インテグリン又は  $\beta 7$  インテグリンと二量体を形成し、主として  $\alpha 4\beta 1$  インテグリンは VCAM-1 と、 $\alpha 4\beta 7$  インテグリンは MAdCAM-1 といった接着分子と結合することが知られている<sup>1), 2)</sup>。HCA2969 のヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン及びヒト  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンに対する  $K_D$  値はそれぞれ  $0.32 \pm 0.01$  nmol/L 及び  $0.46 \pm 0.07$  nmol/L であり、同程度の親和性を示した。また、HCA2969 はヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン発現細胞と VCAM-1/Fc との結合及びヒト  $\alpha 4\beta 7$  インテグリン発現細胞と MAdCAM-1/Fc との結合に対して、それぞれ濃度依存的かつ同程度の阻害作用を示し ( $IC_{50}$  値はそれぞれ、 $5.8 \pm 1.6$  nmol/L と  $1.4 \pm 0.3$  nmol/L)、ヒト  $\alpha L\beta 2$  インテグリン発現細胞と ICAM-1/Fc との結合に対して 1000 倍以上の選択性を示した。 $\alpha 4\beta 1$  インテグリンと VCAM-1、 $\alpha 4\beta 7$  インテグリンと MAdCAM-1 との結合に対する阻害活性は、ヒト、ラット及びマウスの間で大きな違いは認められなかった。また、AJM300 及び HCA2969 の  $\alpha 4$  インテグリン以外の受容体やイオンチャネル、トランスポーター及び酵素に対する親和性は低かった。さらに、その他細胞機能 (各種刺激による各種サイトカイン及び炎症性メディエーターの放出) に対する作用は認められなかった。上記のように、ヒト  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン発現細胞と VCAM-1/Fc との結合に対して HCA2969 は高い阻害活性を示すものの (血清非存在下での  $IC_{50}$  値は  $6.7 \pm 1.2$  nmol/L)、ヒト血清存在下では  $310 \pm 60$  nmol/L と約 50 倍の低下が認められた。その理由として、HCA2969 のヒトの血漿たん白結合率が 99.6%~99.7% [2.6.4.4.2 参照] と高いことが考えられた。

$\alpha 4$  インテグリンの生理的役割としてリンパ球ホーミング現象が知られている<sup>3), 4)</sup>。リンパ球は、リンパ節やパイエル板といったリンパ組織の高内皮細静脈 (HEV) と呼ばれる特殊な血管の内皮細胞の間隙を通り抜けることにより、白血球で唯一血管系とリンパ管系の 2 つの循環系を行き来している。腸間膜リンパ節細胞の小腸パイエル板へのホーミングにはリンパ球上の  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンと MAdCAM-1 との結合が関与することが報告されている<sup>3)</sup>。この現象を利用し、AJM300 の *in vivo* でのリンパ球ホーミング阻害作用について検討した。AJM300 はマウス及びラットへの経口投与において、リンパ球ホーミングを用量依存的に阻害した。また、別試験において、そのホーミング阻害を示す用量範囲において、末梢血中のリンパ球数の増加が確認された。 $\alpha 4$  インテグリンに対する抗体を投与した場合、数種の動物種で末梢血中の白血球数<sup>16)</sup>、主にリンパ球数が増加することが報告されている<sup>17)</sup>。この現象は、 $\alpha 4$  インテグリンに対する抗体が前述のホーミング現象を阻害することにより、末梢血リンパ球のリンパ組織系への移行が抑制されるため、結果として末梢血中のリンパ球数が増加するものと想定されている<sup>4)</sup> ことから、AJM300 の臨床試験においては薬力学的パラメータとして扱っている。

なお、健康成人男性志願者を対象とした 2 つの国内第 I 相試験 AJM300/CP3 [5.3.3.1-3 参照] 及び AJM300/CP4 [5.3.3.1-4 参照] にて、血漿中 HCA2969 濃度の個別の実測値と末梢血中リンパ球数の変化量及び変化率との関係における  $IC_{50}$  はそれぞれ  $65.8 \sim 99.8$  ng/mL 及び  $215.0 \sim 574.4$  ng/mL

と推定されており、血清存在下での IC<sub>50</sub> 値 310 nmol/L (172 ng/mL、HCA2969 の分子量 555.41) と概ね近似した値を示している。

IBD の病態には消化管炎症部位へのリンパ球を含む炎症性細胞の浸潤が関与していることが知られており、そこではリンパ球ホーミングと同様に  $\alpha 4$  インテグリンを介した接着分子への結合が寄与していることが示唆されている<sup>5) .6) .7) .8) .9)</sup>。そこで、実験的腸炎モデルを用いて AJM300 の薬効評価を実施し、腸管組織への T 細胞浸潤阻害作用も併せて検討した。本検討では AJM300 投与後の血中 HCA2969 濃度を一定濃度以上に維持させるため混餌で自由摂取させた。

IL-10 ノックアウトマウスは成長する過程で腸炎を自然発症することが報告されている<sup>10)</sup>。腸炎を発症した IL-10 ノックアウトマウス由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞を単離・精製し、生来リンパ球を生体内に有していない免疫不全 SCID マウスに移入することによって、個体差が小さく、均一な腸炎を再現できることが知られている<sup>10)</sup>。細胞移入の前日から混餌で経口摂取させることにより、AJM300 は用量依存的に腸管重量増加、便性状スコア及び T 細胞浸潤を抑制した。さらに、有意な T 細胞浸潤面積率の低下が認められた用量 (AJM300M1 製剤として混餌 1%) における腸管重量増加抑制効果は、 $\alpha 4$  インテグリン占有率飽和を試験期間中維持させた用法用量における抗マウス  $\alpha 4$  インテグリンモノクローナル抗体 (PS/2) による効果と同程度であった。

なお、AJM300 の代謝物には HCA2969 の他に HCA3053、HCA3047 及び HCA2969 グルクロン酸抱合体が存在し、評価した代謝物の中で HCA3047 のみが HCA2969 と同等の  $\alpha 4\beta 1$  インテグリンと VCAM-1 との結合に対する阻害活性を示した。しかし、ラットに AJM300M1 製剤 (AJM300 として 300 mg/kg) を経口投与したときの各代謝物の薬物動態パラメータで比較すると、C<sub>max</sub> では HCA2969 が 9520 ± 6350 ng/mL に対し、HCA3047 は 1200 ± 770 ng/mL、AUC では HCA2969 が 74000 ± 52900 ng・h/mL に対し、HCA3047 は 10600 ± 8300 ng・h/mL であり、HCA3047 は HCA2969 に対して 1 割程度の存在比率であった [2.6.4.5.3.1 参照]。よって、AJM300 投与における薬効への HCA3047 の寄与はほとんどないと考えられる。

以上より、AJM300 は生体内で活性代謝物 HCA2969 となり、 $\alpha 4\beta 1$  インテグリンと VCAM-1 との結合及び  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンと MAdCAM-1 との結合を同時に同程度に阻害することによって、T 細胞を含む炎症性細胞の血管内皮細胞への接着、引き続く炎症部位への浸潤を阻害することで抗炎症作用を発揮していると推定された。AJM300 は潰瘍性大腸炎患者において抗炎症作用を発揮し、その症状を緩和させることが期待される。

#### 2.6.2.6.2 副次的薬理試験

臨床において既に米国で臨床使用されている抗  $\alpha 4$  インテグリン抗体ナタリズマブの PML 発症リスクが報告されている<sup>11) .12) .18)</sup>。PML 発症は JC ウイルスに対する細胞性免疫能の低下が何らかの関連性を持っていると考えられている<sup>13)</sup> ことから、副次的薬理試験として細胞性免疫機能に対する作用検討を実施した。ヒト末梢血由来単核球の NK 活性及び PHA-L 刺激によるヒト末梢血由来単核球の増殖能に対し HCA2969 は  $\alpha 4\beta 1$  インテグリン発現細胞 (Jurkat) とヒト VCAM-1/Fc との結合に対する IC<sub>50</sub> 値の約 1000 倍である 10  $\mu$ mol/L の濃度において阻害作用を示さなかった。また AJM300 はラットにおいて 300 mg/kg の 1 日 2 回、8 日間の反復経口投与においても KLH で誘導される DTH 反応に対し影響を及ぼさなかった。以上の点から、AJM300 の細胞性免疫機能に及ぼす影響は小さい可能性が示された。

### 2.6.2.6.3 安全性薬理試験

#### 2.6.2.6.3.1 中枢神経系に及ぼす影響

AJM300 のラットへの経口投与において、300 及び 1000 mg/kg で軽度な縮瞳が認められた。縮瞳の原因は不明であるが、縮瞳以外の症状が見られなかったこと、及び用量に関連して程度が増強する傾向は認められなかったことから、作用はきわめて弱いものと考えられた。

#### 2.6.2.6.3.2 心血管系に及ぼす影響

AJM300 は  $10^{-5}$  mol/L の濃度で hERG 電流を抑制したが（抑制率は 32.4%）、モルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する影響は認められなかった。一方で HCA2969 は  $10^{-5}$  mol/L の濃度まで hERG 電流及びモルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する影響は認められなかった。また、AJM300M1 製剤の覚醒イヌへの経口投与において、心血管系に対して 1000 mg/kg（AJM300 換算）まで影響は認められなかった。

AJM300 の薬物相互作用試験（AJM300/CP7）の 960 mg/回（1 日 3 回）、14 日間反復投与時における血漿中 AJM300 の  $C_{max}$  は 841.4 ng/mL である〔2.7.6.8 参照〕。hERG 電流を抑制した AJM300 の濃度である  $10^{-5}$  mol/L（5694.4 ng/mL、AJM300 の分子量 569.44）は、この  $C_{max}$  と AJM300 のヒト血漿たん白結合率（99.2%～99.3%）〔2.6.4.4.2 参照〕より算出されるヒトにおける遊離型最高血漿中濃度より 800 倍以上高い濃度であった。

#### 2.6.2.6.3.3 呼吸系に及ぼす影響

AJM300 のラットへの経口投与において、1000 mg/kg まで影響は認められなかった。

### 2.6.2.7 図表

図表は、各項目の本文中の適切な場所に挿入した。

## 参考文献

- 1) Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*. 1990;60:577-84.
- 2) Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, et al.  $\alpha 4\beta 7$  integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*. 1993;74:185-95.
- 3) Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, Holzmann B, Butcher EC. Role of  $\alpha 4$ -integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol*. 1994;152:3282-93.
- 4) Gordon FH, Lai CW, Hamilton MI, Allison MC, Srivastava ED, Fouweather MG, et al. A randomized placebo-controlled trial of a humanized monoclonal antibody to alpha4 integrin in active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2001;121(2):268-74.
- 5) Kato S, Hokari R, Matsuzaki K, Iwai A, Kawaguchi A, Nagao S, et al. Amelioration of murine experimental colitis by inhibition of mucosal addressin cell adhesion molecule-1. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;295:183-89.
- 6) Picarella D, Hurlbut P, Rottman J, Shi X, Butcher E, Ringler DJ. Monoclonal antibodies specific for  $\beta 7$  integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RB<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*. 1997;158:2099-106.
- 7) Hesterberg PE, Winsor-Hines D, Briskin MJ, Soler-Ferran D, Merrill C, Mackay CR, et al. Rapid resolution of chronic colitis in the cotton-top tamarin with an antibody to a gut-homing integrin  $\alpha 4\beta 7$ . *Gastroenterology*. 1996;111:1373-80.
- 8) Podolsky DK, Lobb R, King N, Benjamin CD, Pepinsky B, Sehgal P, et al. Attenuation of colitis in the cotton-top tamarin by anti- $\alpha 4$  integrin monoclonal antibody. *J Clin Invest*. 1993;92:372-80.
- 9) Burns RC, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Matsumoto S, Cominelli F, Ley K. Antibody blockade of ICAM-1 and VCAM-1 ameliorates inflammation in the SAMP-1/Yit adoptive transfer model of Crohn's disease in mice. *Gastroenterology*. 2001;121:1428-36.
- 10) Ikenoue Y, Tagami T, Murata M. Development and validation of a novel IL-10 deficient cell transfer model for colitis. *Int Immunopharmacol*. 2005;5:993-1006.
- 11) Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2005;353:369-74.
- 12) Langer-Gould A, Atlas SW, Green AJ, Bollen AW, Pelletier D. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N Engl J Med*. 2005;353:375-81.
- 13) Koranik IJ. Overview of the cellular immunity against JC virus in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirology*. 2002;8:59-65.

- 14) Chen LL, Whitty A, Lobb RR, Adams SP, Pepinsky RB. Multiple activation states of integrin  $\alpha 4\beta 1$  detected through their different affinities for a small molecule ligand. *J Biol Chem.* 1999;274:13167-75.
- 15) Egger LA, Kidambi U, Cao J, Van Riper G, McCauley E, Mumford RA, et al.  $\alpha 4\beta 7/\alpha 4\beta 1$  dual integrin antagonists block  $\alpha 4\beta 7$ -dependent adhesion under shear flow. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302:153-62.
- 16) Chisholm PL, Williams CA, Lobb RR. Monoclonal antibodies to the integrin  $\alpha$ -4 subunit inhibit the murine contact hypersensitivity response. *Eur J Immunol.* 1993;23:682-88.
- 17) Issekutz TB. Inhibition of in vivo lymphocyte migration to inflammation and homing to lymphoid tissues by the TA-2 monoclonal antibody. A likely role for VLA-4 in vivo. *J Immunol.* 1991;147:4178-84.
- 18) Van Assche G, Van Ranst M, Sciot R, Dubois B, Vermeire S, Noman M, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2005;353:362-68.

目 次

2.6.3	薬理試験概要表.....	3
2.6.3.1	薬理試験一覧表.....	3
2.6.3.2	効力を裏付ける試験.....	7
2.6.3.3	副次的薬理試験.....	14
2.6.3.4	安全性薬理試験.....	15
2.6.3.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	19

## 2.6.3 薬理試験概要表

## 略号一覧

略号	内容
APD	活動電位持続時間
DMSO	ジメチルスルホキシド
B <sub>2</sub>	Bradykinin B <sub>2</sub>
BZD	Benzodiazepine
CCR	C-C chemokine receptor
D <sub>2</sub>	Dopamin D <sub>2</sub>
ED <sub>50</sub>	Dose required for 50% efficacy、50%有効用量
ET <sub>A</sub>	Endothelin-A
GABA	Gamma-aminobutyric acid
H <sub>1</sub>	Histamine H <sub>1</sub>
HEK293	ヒト胎児腎臓細胞
hERG	ヒト <i>ether-a-go-go</i> 関連遺伝子
5-HT <sub>1A</sub>	Serotonin 5-HT <sub>1A</sub>
IC <sub>50</sub>	Concentration required for 50% inhibition、50%阻害濃度
ICAM-1	Inter-cellular adhesion molecule-1
IL	Interleukin、インターロイキン
INF- $\gamma$	Interferon-gamma
K <sub>D</sub>	Dissociation constant、解離定数
KO	Knock out、ノックアウト
LPS	Lipopolysaccharide
LTB <sub>4</sub>	Leukotriene B <sub>4</sub>
M	Muscarinic acetylcholine
MAdCAM-1	Mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule-1
MAO-A	Monoamine oxydase-A
MMP	Matrix metalloproteinase
N	Nicotinic acetylcholine
NE	Norepinephrine
NK	Natural killer、ナチュラルキラー
NK	Neurokinin
NMDA	N-methyl-D-aspartate
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell、末梢血由来単核球
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
TNF	Tumor necrosis factor、腫瘍壊死因子
Y	Neuropeptide Y

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

2.6.3.1.1 効力を裏付ける試験

被験物質：HCA2969 及び AJM300

試験の種類	試験系（動物種）	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
<b>α4 インテグリンに対する親和性及び選択性</b>					
ヒト α4β1 インテグリンに対する親和性	ヒト α4β1 インテグリン発現細胞 (Jurkat)	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-1]
ヒト α4β7 インテグリンに対する親和性	ヒト α4β7 インテグリン発現細胞 (RPMI-8866)	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-2]
マウス α4β7 インテグリンに対する親和性	マウス α4β7 インテグリン発現細胞 (TK-1)	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-3]
各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する親和性	各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーター	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-4]
酵素に対する親和性	各種酵素	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-5]
<b>α4 インテグリンと接着分子との結合に対する阻害作用</b>					
ヒト α4β1 インテグリンと VCAM-1 の結合に対する阻害作用	ヒト α4β1 インテグリン発現細胞 (Jurkat)	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-6]
ヒト α4β7 インテグリンと MAdCAM-1 の結合に対する阻害作用	ヒト α4β7 インテグリン発現細胞 (RPMI-8866)	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-7]
ヒト αLβ2 インテグリンと ICAM-1 の結合に対する阻害作用	ヒト αLβ2 インテグリン発現細胞 (Jurkat)	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-8]
ラット α4β1 インテグリンと VCAM-1 の結合に対する阻害作用	ラット α4β1 インテグリン発現細胞 (RBL-2H3)	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-9]
ラット α4β7 インテグリンと MAdCAM-1 の結合に対する阻害作用	ラット α4β7 インテグリン発現細胞 (RBL-1)	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-10]
マウス α4β1 インテグリンと VCAM-1 の結合に対する阻害作用	マウス α4β1 インテグリン発現細胞 (L1-2)	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-11]

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1.1 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：HCA2969 及び AJM300

試験の種類	試験系（動物種）	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
マウス $\alpha 4\beta 7$ インテグリンと MAdCAM-1 の結合に対する阻害作用	マウス $\alpha 4\beta 7$ インテグリン発現細胞 (TK-1)	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-12]
血清存在下におけるヒト $\alpha 4\beta 1$ インテグリンと VCAM-1 の結合に対する阻害作用	ヒト $\alpha 4\beta 1$ インテグリン発現細胞 (Jurkat)	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-13]
その他細胞機能に対する作用	各種細胞	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-5]

a：味の素株式会社

被験物質：AJM300M1 製剤

試験の種類	試験系（動物種）	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
<b><math>\alpha 4</math> インテグリンの生物活性に対する作用</b>					
マウスリンパ球のホーミングに対する作用	マウス (BALB/c)	経口投与	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-14]
ラットリンパ球のホーミングに対する作用	ラット (SD)	経口投与	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-15] [4.2.1.1-16]
マウス末梢血中のリンパ球数に対する作用	マウス (BALB/c)	経口投与	味の素製薬 <sup>b</sup>	1007-■■■■ P-0011	[4.2.1.1-17]
ラット末梢血中のリンパ球数に対する作用	ラット (SD)	経口投与	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-18]
<b>実験的腸炎に対する作用</b>					
腸炎発症に対する作用	マウス (C.B-17/Icr-scid)	経口投与 (混餌)	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-19]
血漿中の AJM300 及び HCA2969 濃度測定	マウス (C.B-17/Icr-scid)	経口投与 (混餌)	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-20]
抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体との薬効比較	マウス (C.B-17/Icr-scid)	経口投与 (混餌)	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-21]

■■■■■、b：味の素製薬株式会社（現、EA ファーマ株式会社）

## 2.6.3 薬理試験概要表

### 2.6.3.1.1 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：HCA2969、HCA3053、HCA3047 及び AJM300

試験の種類	試験系（動物種）	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
代謝物の $\alpha 4$ インテグリンと接着分子との結合に対する阻害作用 ヒト $\alpha 4\beta 1$ インテグリンと VCAM-1 の結合に対する阻害作用	ヒト $\alpha 4\beta 1$ インテグリン発現細胞 (Jurkat)	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.1-22]

### 2.6.3.1.2 副次的薬理試験

被験物質：HCA2969 及び AJM300M1 製剤

試験の種類	試験系（動物種）	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
細胞性免疫に及ぼす作用 NK 活性に対する作用	ヒト PBMC	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.2-1]
ヒト PBMC 増殖能に対する作用	ヒト PBMC	<i>in vitro</i>	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.2-2]
ラット遅延型過敏反応に対する作用	ラット (SD)	経口投与	■■■■■	■■■■■	[4.2.1.2-3]

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1.3 安全性薬理試験

2.6.3.1.3.1 AJM300 の安全性薬理試験

被験物質：AJM300 及び AJM300M1 製剤

試験の種類	試験系（動物種）	投与方法	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載箇所
中枢神経系に及ぼす影響 ラット一般症状に対する作用検討	ラット（SD）	経口投与	適	■	■	[4.2.1.3-1]
心血管系に及ぼす影響 イヌ覚醒下循環器に対する作用検討	ビーグル犬	経口投与	適	■	■	[4.2.1.3-2]
hERG 発現細胞を用いた hERG 電流に対する作用検討	hERG 導入 HEK293 細胞	<i>in vitro</i>	適	■	■	[4.2.1.3-3]
モルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する作用検討	モルモット摘出乳頭筋	<i>in vitro</i>	適	■	■	[4.2.1.3-4]
呼吸器系に及ぼす影響 ラット呼吸器系に対する作用検討	ラット（SD）	経口投与	適	■	■	[4.2.1.3-5]

2.6.3.1.3.2 HCA2969 の安全性薬理試験

被験物質：HCA2969

試験の種類	試験系（動物種）	投与方法	GLP 適用	実施施設	試験番号	記載箇所
心血管系に及ぼす影響 hERG 発現細胞を用いた hERG 電流に対する作用検討	hERG 導入 HEK293 細胞	<i>in vitro</i>	適	■	■	[4.2.1.3-6]
モルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する作用検討	モルモット摘出乳頭筋	<i>in vitro</i>	適	■	■	[4.2.1.3-7]

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1  $\alpha 4$  インテグリンに対する親和性及び選択性

被験物質：HCA2969 及び AJM300

試験項目	動物/標本 (実験回数)	投与経路	試験成績				記載箇所
			HCA2969		AJM300		
			濃度/用量	結果	濃度/用量	結果	
$\alpha 4$ インテグリンに対する親和性	ヒト $\alpha 4\beta 1$ インテグリン発現細胞/Jurkat (3)	<i>in vitro</i>	0.03~4.00 nmol/L	$K_D$ 値 (nmol/L) : $0.32 \pm 0.01^a$			[4.2.1.1-1]
	ヒト $\alpha 4\beta 7$ インテグリン発現細胞/RPMI-8866 (3)	<i>in vitro</i>	0.03~4.00 nmol/L	$K_D$ 値 (nmol/L) : $0.46 \pm 0.07^a$			[4.2.1.1-2]
	マウス $\alpha 4\beta 7$ インテグリン発現細胞/TK-1 (3)	<i>in vitro</i>	0.03~4.00 nmol/L	$K_D$ 値 (nmol/L) : $0.20 \pm 0.03^a$			[4.2.1.1-3]

a : 平均値±標準誤差

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.2.1  $\alpha 4$  インテグリンに対する親和性及び選択性（続き）

被験物質：HCA2969 及び AJM300

試験項目	動物/標本（実験回数）	投与経路	試験成績				記載箇所
			HCA2969		AJM300		
			濃度/用量	結果	濃度/用量	結果	
各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する親和性	各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーター（1） <u>受容体</u> BZD (central) /ラット脳皮質 B <sub>2</sub> (h) /ヒト遺伝子組み換え (CHO cells) D <sub>2</sub> /ラット線条体 ET <sub>A</sub> /細胞株 (A-10) GABA (non-selective) /ラット脳皮質 NMDA/ラット脳皮質 CCR1 (h) /ヒト遺伝子組み換え (HEK293 cells) CCR3 (h) /ヒト遺伝子組み換え (K562 cells) H <sub>1</sub> (central) /モルモット小脳 LTB <sub>4</sub> (h) /細胞株 (U-937) MAO-A/ラット脳 M (non-selective) /ラット脳皮質 NK <sub>1</sub> /ラット脳皮質 NK <sub>1</sub> (h) /細胞株 (U-373MG) NK <sub>2</sub> (h) /ヒト遺伝子組み換え (CHO cells) NK <sub>3</sub> (h) /ヒト遺伝子組み換え (CHO cells) Y (non-selective) /ラット脳皮質 N (neuronal) ( $\alpha$ -BGTX-insensitive) /ラット脳皮質 Opiate (non-selective) /ラット脳皮質 5-HT <sub>1A</sub> /ラット脳皮質 <u>イオンチャネル</u> Ca <sup>2+</sup> channel (L, DHP site) /ラット脳皮質 K <sup>+</sup> <sub>v</sub> channel/ラット脳皮質 Na <sup>+</sup> channel (site 2) /ラット脳皮質 <u>トランスポーター</u> NE transporter/ラット脳皮質 5-HT transporter/ラット脳皮質	in vitro	1000 nmol/L	いずれに対しても50%以上の阻害を示さず	1000 nmol/L	いずれに対しても50%以上の阻害を示さず	[4.2.1.1-4]

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.2.1  $\alpha$ 4 インテグリンに対する親和性及び選択性（続き）

被験物質：HCA2969 及び AJM300

試験項目	動物／標本（実験回数）	投与経路	試験成績				記載箇所
			HCA2969		AJM300		
			濃度／用量	結果	濃度／用量	結果	
酵素に対する親和性	各種酵素（1） Inducible NOS／細胞株（RAW 264-7 cells） MMP-1（h）／ヒト Rheumatoid synovial fibroblasts MMP-3（h）／ヒト遺伝子組み換え（Sf9 cells） MMP-9（h）／ヒト遺伝子組み換え（mammalian cells） Tryptase（h）／ヒト肺	<i>in vitro</i>	1000 nmol/L	いずれに対しても50%以上の阻害を示さず	1000 nmol/L	いずれに対しても50%以上の阻害を示さず	[4.2.1.1-5]

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.2.2 α4 インテグリンと接着分子との結合に対する阻害作用

被験物質：HCA2969 及び AJM300

試験項目	動物/標本 (実験回数)	投与経路	試験成績				記載箇所
			HCA2969		AJM300		
			濃度/用量	結果	濃度/用量	結果	
α4 インテグリンと 接着分子との結合 に対する阻害作用	ヒト α4β1 インテグリン 発現細胞/Jurkat と VCAM-1 の結合 (3)	<i>in vitro</i>	0.0839~2000 nmol/L	IC <sub>50</sub> 値 (nmol/L) : 5.8±1.6 <sup>a</sup>			[4.2.1.1-6]
	ヒト α4β7 インテグリン 発現細胞/RPMI-8866 と MAdCAM-1 の結合 (3)	<i>in vitro</i>	0.0839~2000 nmol/L	IC <sub>50</sub> 値 (nmol/L) : 1.4±0.3 <sup>a</sup>			[4.2.1.1-7]
	ヒト αLβ2 インテグリン 発現細胞/Jurkat と ICAM-1 の結合 (3)	<i>in vitro</i>	0.01~100 μmol/L	IC <sub>50</sub> 値 (nmol/L) : 54000±11000 <sup>a</sup>			[4.2.1.1-8]
	ラット α4β1 インテグリン 発現細胞/RBL-2H3 と VCAM-1 の結合 (3)	<i>in vitro</i>	0.0839~2000 nmol/L	IC <sub>50</sub> 値 (nmol/L) : 8.5±1.8 <sup>a</sup>			[4.2.1.1-9]
	ラット α4β7 インテグリン 発現細胞/RBL-1 と MAdCAM-1 の結合 (4)	<i>in vitro</i>	0.0839~2000 nmol/L	IC <sub>50</sub> 値 (nmol/L) : 4.1±1.2 <sup>a</sup>			[4.2.1.1-10]
	マウス α4β1 インテグリン 発現細胞/L1-2 と VCAM-1 の結合 (3)	<i>in vitro</i>	0.0839~2000 nmol/L	IC <sub>50</sub> 値 (nmol/L) : 0.94±0.33 <sup>a</sup>			[4.2.1.1-11]
	マウス α4β7 インテグリン 発現細胞/TK-1 と MAdCAM-1 の結合 (3)	<i>in vitro</i>	0.524~12500 nmol/L	IC <sub>50</sub> 値 (nmol/L) : 26±1 <sup>a</sup>			[4.2.1.1-12]
血清存在下におけ る α4 インテグリン と接着分子との結 合に対する阻害作 用	ヒト α4β1 インテグリン 発現細胞/Jurkat と VCAM-1 の結合 (3)	<i>in vitro</i>	0.01~10000 nmol/L	IC <sub>50</sub> 値 (nmol/L) : 310±60 <sup>a</sup>			[4.2.1.1-13]

a : 平均値±標準誤差

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.2.2 α4 インテグリンと接着分子との結合に対する阻害作用（続き）

被験物質：HCA2969 及び AJM300

試験項目	動物／標本（実験回数）	投与経路	試験成績				記載箇所
			HCA2969		AJM300		
			濃度／用量	結果	濃度／用量	結果	
その他細胞機能に対する作用	各種細胞（1） 細胞及び細胞機能 ヒト PBMC IFN-γ 放出（h） TNF-α 放出（h） IL-1β 放出（h） IL-2 放出（h） IL-4 放出（h） IL-5 放出（h） IL-6 放出（h） IL-8 放出（h） 細胞株（分化した HL-60 cells） Superoxide O <sub>2</sub> 放出（h） H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 放出（h）	<i>in vitro</i>	1000 nmol/L	いずれに対しても 50%以上の阻害を示さず	1000 nmol/L	いずれに対しても 50%以上の阻害を示さず	[4.2.1.1-5]

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.2.3 α4 インテグリンの生物活性に対する作用

被験物質：AJM300M1 製剤

試験項目	動物/標本 (例数)	投与経路	試験成績				記載箇所
			HCA2969		AJM300		
			濃度/用量	結果	濃度/用量	結果	
リンパ球のホーミングに対する作用	非絶食マウス (4)	経口投与 (単回)			0.3、1.1、3、10、30 mg/kg	用量に応じてリンパ球ホーミングを抑制し3、10及び30 mg/kgにおいて有意に抑制 ED <sub>50</sub> 値: 2.5 mg/kg	[4.2.1.1-14]
	非絶食ラット (4-5)	経口投与 (単回)			0.3、3、30 mg/kg	用量に応じてリンパ球ホーミングを抑制し3及び30 mg/kgにおいて有意に抑制	[4.2.1.1-15]
	非絶食ラット (5)	経口投与 (単回)			1、3、10 mg/kg	用量に応じてリンパ球ホーミングを抑制し3及び10 mg/kgにおいて有意に抑制 ED <sub>50</sub> 値: 2.6 mg/kg	[4.2.1.1-16]
末梢血中のリンパ球数に対する作用	非絶食マウス (8)	経口投与 (単回)			0.3、3、30、300 mg/kg	用量に応じてリンパ球数を上昇させ、いずれの用量でも有意に上昇	[4.2.1.1-17]
	非絶食ラット (11-12)	経口投与 (単回)			1、3、10、100、300 mg/kg	投与後2時間で、いずれの用量でもリンパ球数を有意に上昇	[4.2.1.1-18]

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.2.4 実験的腸炎に対する作用

被験物質：AJM300M1 製剤

試験項目	動物／標本（例数）	投与経路	試験成績				記載箇所
			HCA2969		AJM300		
			濃度／用量	結果	濃度／用量	結果	
IL-10 KO CD4 <sup>+</sup> T 細胞移入マウス 腸炎	非絶食マウス（8）	経口投与 （混餌）			0.03、0.1、0.3、1% 混餌	1%混餌でT細胞浸潤 と腸管重量増加に対し て有意に抑制	[4.2.1.1-19]
	非絶食マウス（4）	経口投与 （混餌）			0.1、0.3、1%混餌	用量増加に従って血漿 中 HCA2969 濃度の C <sub>max</sub> 及び AUC <sub>0-24h</sub> が増 加	[4.2.1.1-20]
	非絶食マウス（8）	経口投与 （混餌）			1%混餌	抗 α4 インテグリン抗 体（PS/2）と同等な腸 管重量増加抑制作用	[4.2.1.1-21]

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.2.5  $\alpha$ 4 インテグリンと接着分子との結合に対する阻害作用（代謝物）

被験物質：AJM300、HCA2969、HCA3053 及び HCA3047

試験項目	動物／標本 (実験回数)	投与経路	試験成績								記載箇所
			AJM300		HCA2969		HCA3053 (M-I)		HCA3047 (M-II)		
			濃度／用量	結果	濃度／用量	結果	濃度／用量	結果	濃度／用量	結果	
$\alpha$ 4 インテグリンと接着分子との結合に対する阻害作用	ヒト $\alpha$ 4 $\beta$ 1 インテグリン発現細胞/Jurkat と VCAM-1 の結合 (3)	<i>in vitro</i>	0.01~10000 nmol/L	IC <sub>50</sub> 値: 470±150 nmol/L <sup>a</sup>	0.01~10000 nmol/L	IC <sub>50</sub> 値: 6.4±2.7 nmol/L <sup>a</sup>	0.01~10000 nmol/L	IC <sub>50</sub> 値: 560±220 nmol/L <sup>a</sup>	0.01~10000 nmol/L	IC <sub>50</sub> 値: 5.0±2.1 nmol/L <sup>a</sup>	[4.2.1.1-22]

a : 平均値±標準誤差

2.6.3.3 副次的薬理試験

2.6.3.3.1 細胞性免疫に及ぼす作用

被験物質：HCA2969 及び AJM300M1 製剤

試験項目	動物／標本 (実験回数及び例数)	投与経路	試験成績				記載箇所
			HCA2969		AJM300		
			濃度／用量	結果	濃度／用量	結果	
NK 活性に対する作用	ヒト PBMC (3)	<i>in vitro</i>	0.1、1、10 $\mu$ mol/L	いずれの濃度においても 50%以上の阻害を示さず	/	/	[4.2.1.2-1]
ヒト PBMC 増殖能に対する作用	ヒト PBMC (3)	<i>in vitro</i>	0.1、1、10 $\mu$ mol/L	いずれの濃度においても 50%以上の阻害を示さず	/	/	[4.2.1.2-2]
ラット遅延型過敏反応に対する作用	非絶食ラット (8)	経口投与 (1日2回、8日間)	/	/	10、30、100、300 mg/kg	いずれの用量においても有意な作用を示さず	[4.2.1.2-3]

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.4 安全性薬理試験

2.6.3.4.1 AJM300 の安全性薬理試験

(1) 中枢神経系に及ぼす影響

被験物質：AJM300

評価対象となる組織	動物種及び系統	投与方法 (媒体/投与形態)	投与量 (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
ラット一般症状に対する作用検討	SD ラット	経口投与 (PEG/PG・塩酸 <sup>a</sup> )	30、 100、 300、 1000	雄 各 6 例/群	300 mg/kg 群： 投与 0.5 から 1 時間後に、軽 度な縮瞳 (2/6 例)  1000 mg/kg 群： 投与 0.5 から 4 時間後に、軽 度な縮瞳 (2/6 例)  30 及び 100 mg/kg 群： 一般症状に影響なし。	適	■	[4.2.1.3-1]

a：ポリエチレングリコール (PEG) 400 とプロピレングリコール (PG) の等容量混合液に AJM300 の 1 mol/L に対して 2.5 mol/L となるように塩酸を添加した AJM300 の可溶化液

2.6.3 薬理試験概要表

(2) 心血管系に及ぼす影響

被験物質：AJM300M1 製剤

評価対象となる組織	動物種及び系統	投与方法 (媒体/投与形態)	投与量 <sup>a</sup> (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
イヌ覚醒下循環器に対する作用検討	ビーグル犬	経口投与 (カプセル投与)	30、 100、 300、 1000	雄 各4例/群	1000 mg/kg まで血圧、心拍数及び心電図に対して影響なし。	適	■	[4.2.1.3-2]

a : AJM300 換算

被験物質：AJM300

評価対象となる組織	動物種及び系統	投与方法 (媒体/投与形態)	適用量 (mol/L)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
hERG 発現細胞を用いた hERG 電流に対する作用検討	hERG 導入 HEK293 細胞	<i>in vitro</i>	10 <sup>-7</sup> 、 10 <sup>-6</sup> 、 10 <sup>-5</sup>	n=5	10 <sup>-5</sup> mol/L : hERG 電流抑制 (抑制率は 32.4%)  10 <sup>-7</sup> 及び 10 <sup>-6</sup> mol/L : hERG 電流の抑制なし。	適	■	[4.2.1.3-3]
モルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する作用検討	モルモット 摘出乳頭筋	<i>in vitro</i>	10 <sup>-7</sup> 、 10 <sup>-6</sup> 、 10 <sup>-5</sup>	n=6	10 <sup>-5</sup> mol/L の濃度まで静止膜電位、活動電位振幅、活動電位持続時間 (APD <sub>50</sub> 及び APD <sub>90</sub> ) 及び最大立ち上がり速度に影響なし。	適	■	[4.2.1.3-4]

2.6.3 薬理試験概要表

(3) 呼吸器系に及ぼす影響

被験物質：AJM300

評価対象となる組織	動物種及び系統	投与方法 (媒体/投与形態)	投与量 (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
ラット呼吸器系に対する作用検討	SD ラット	経口投与 (PEG/PG・塩酸 <sup>a</sup> )	30、 100、 300、 1000	雄 各6例/群	1000 mg/kg まで、1 分間の呼吸回数、1 回及び 1 分間の換気量に影響なし。	適	■	[4.2.1.3-5]

a : ポリエチレングリコール (PEG) 400 とプロピレングリコール (PG) の等容量混合液に AJM300 の 1 mol/L に対して 2.5 mol/L となるように塩酸を添加した AJM300 の可溶化液

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.4.2 HCA2969 の安全性薬理試験

(1) 心血管系に及ぼす影響

被験物質：HCA2969

評価対象となる組織	動物種及び系統	投与方法 (媒体/投与形態)	適用量 (mol/L)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
hERG 発現細胞を用いた hERG 電流に対する作用検討	hERG 導入 HEK293 細胞	<i>in vitro</i>	10 <sup>-7</sup> 、 10 <sup>-6</sup> 、 10 <sup>-5</sup>	n=5	10 <sup>-5</sup> mol/L の濃度まで hERG 電流に対して影 響なし。	適	■	[4.2.1.3-6]
モルモット摘出乳頭筋の活 動電位に対する作用検討	モルモット 摘出乳頭筋	<i>in vitro</i>	10 <sup>-7</sup> 、 10 <sup>-6</sup> 、 10 <sup>-5</sup>	n=6	10 <sup>-5</sup> mol/L の濃度まで静 止膜電位、活動電位振 幅、活動電位持続時間 (APD <sub>50</sub> 及び APD <sub>90</sub> ) 及 び最大立ち上がり速度 に影響なし。	適	■	[4.2.1.3-7]

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験に該当する試験は実施しなかった。