ミチーガ皮下注用60mgシリンジ

第2部（モジュール2）
CTDの概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1　緒言

マルホ株式会社

略号一覧

略号	省略していない表現
IgG	Immunoglobulin G：免疫グロブリンG
IL	Interleukin：インターロイキン
IL-31RA	Interleukin 31 receptor A：インターロイキン31受容体A
MMP	Matrix metalloproteinase：マトリックスメタロプロテアーゼ

目次

頁
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 名称及び分子式 4
2.6.1.2 アミノ酸配列 5
2.6.1.3 薬理作用 5
2.6.1.4 本剤の予定する効能・効果及び用法・用量 6

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

Nemolizumabはヒト化抗ヒトインターロイキン（IL）-31受容体A（IL-31RA）モノクローナル抗体であり、IL-31と競合的にIL-31RAに結合することにより、IL-31の受容体への結合及びそれに続く細胞内へのシグナル伝達を阻害することを作用機序とする。

2.6.1.1 名称及び分子式

Nemolizumabの名称及び分子式は以下のとおりである。

一般名（JAN）　：（日本名）ネモリズマブ（遺伝子組換え）、（英名）Nemolizumab（Genetical Recombination）

構造（本質）　：Nemolizumabは、遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体であり、マウス抗ヒトIL-31受容体モノクローナル抗体の相補性決定部、ヒトフレームワーク部及びヒト免疫グロブリンG（IgG）2の定常部からなる。H鎖の135、137、141、142、223、268、355と419番目のアミノ酸残基はそれぞれSer、Lys、Gly、Gly、Ser、Gln、GlnとGluに置換されており、C末端のGlyとLysは除去されている。Nemolizumabは、チャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される。Nemolizumabは445個のアミノ酸残基からなるH鎖（γ2鎖）2本及び214個のアミノ酸残基からなるL鎖（κ鎖）2本で構成される糖タンパク質（分子量：約147,000）である。

分子式　：$C_{6384}H_{9814}N_{1678}O_{2034}S_{48}$（タンパク質部分、4本鎖）

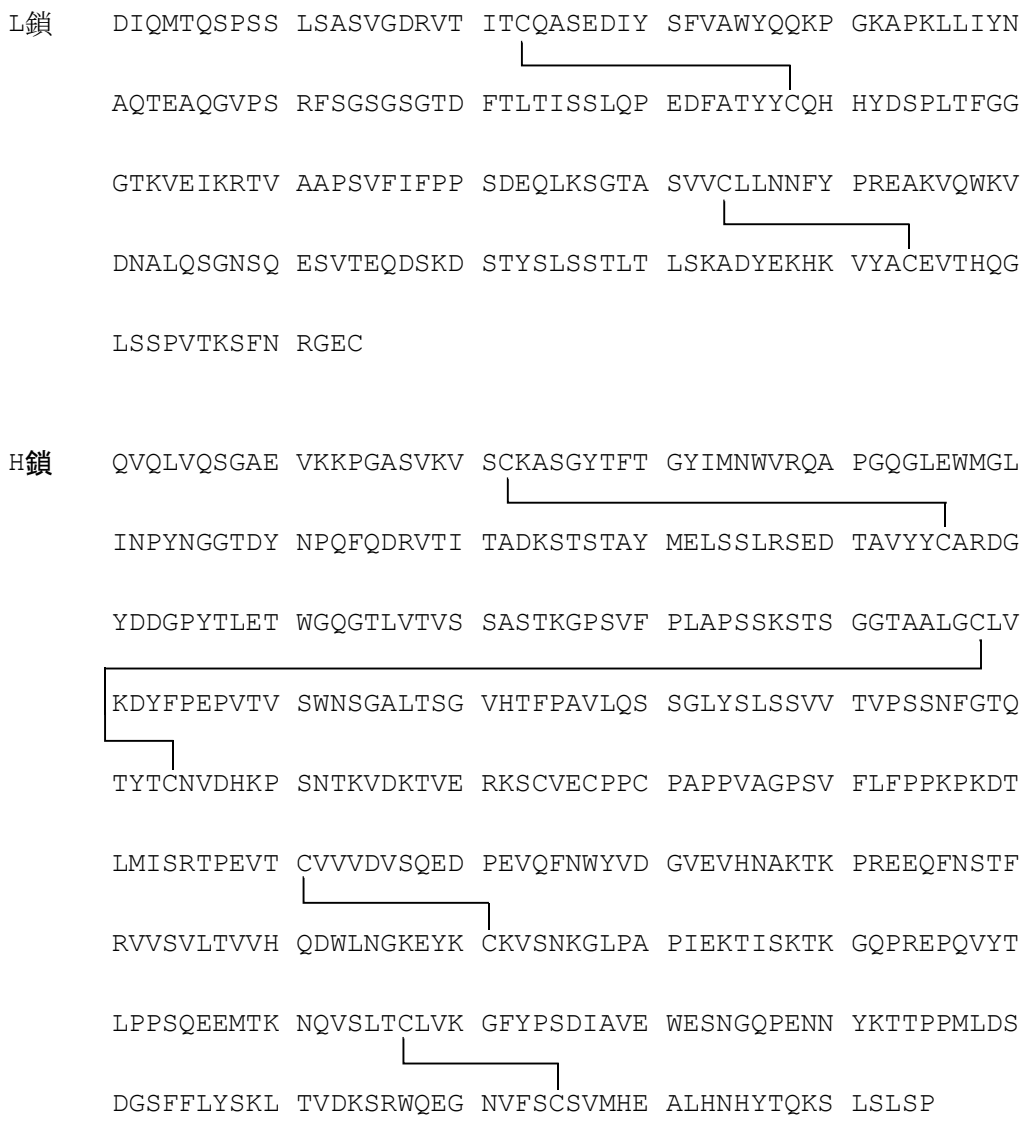
H鎖　$C_{2163}H_{3328}N_{566}O_{679}S_{18}$

L鎖　$C_{1029}H_{1583}N_{273}O_{338}S_{6}$

2.6.1.2 アミノ酸配列

Nemolizumabのアミノ酸配列は以下のとおりである（図 2.6.1.2-1）。

図 2.6.1.2-1 Nemolizumabのアミノ酸配列



H鎖Q1：部分的ピログルタミン酸；H鎖N297：糖鎖結合
L鎖C214 - H鎖C224、H鎖C227 - H鎖C227、H鎖C230 - H鎖C230：ジスルフィド結合

2.6.1.3 薬理作用

Nemolizumabはヒト及びカニクイザルの可溶型IL-31RAに高い親和性をもって結合し、ヒトあるいはカニクイザルのIL-31RAを発現させた組換え細胞へのIL-31の結合を濃度依存的に阻害した。また、nemolizumabはIL-31依存的な細胞増殖及びシグナル伝達性転写因子3のリン酸化を濃度依存的に阻害するとともに、IL-6、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-1、MMP-3産生及びアポトーシスを濃度依存的に抑制した。これらの結果より、nemolizumabはヒト及びカニクイザルのIL-31RAに結合し、IL-31のIL-31RAへの結合を阻害することで、IL-31RAを介したIL-31のシグナル

伝達を阻害することが示された。

なお、nemolizumabはIL-31RAと相同性を有するgp130を利用するサイトカインのシグナル伝達に対して影響を及ぼさず、抗体依存性細胞傷害活性、補体依存性細胞傷害活性及びdirect cell death誘導能はいずれも認められなかった。

Nemolizumab（静脈内投与）はカニクイザルにおけるIL-31誘発そう痒行動に対して段階的に投与量を増加（3、10、40、60及び100 μg/kg）させると、40 μg/kg以上の投与量で明らかな抑制作用を示した。また、nemolizumab（1 mg/kg、皮下投与）は投与28日後においてIL-31誘発そう痒行動をほぼ完全に抑制した。更に、抗マウスIL-31RA中和抗体（BM095）はダニ抗原誘発アトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて、掻き動作の総数を低下させるとともに皮膚炎の悪化を抑制した。

2.6.1.4 本剤の予定する効能・効果及び用法・用量

本剤の予定する効能・効果及び用法・用量を1.8に示す。

ミチーガ皮下注用60mgシリンジ

第2部（モジュール2）
CTDの概要（サマリー）

2.6.2　薬理試験の概要文

マルホ株式会社

略号一覧

略号	省略していない表現
AD	Atopic dermatitis：アトピー性皮膚炎
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害
AUC	Area under the curve：曲線下面積
CDC	Complement-dependent cytotoxicity：補体依存性細胞傷害
CIM331	一般名：Nemolizumab（ネモリズマブ）
EGF	Epidermal growth factor：上皮成長因子
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay：酵素結合免疫吸着測定法
FcγR	Fcγ receptor：Fcγ受容体
IgG	Immunoglobulin G：免疫グロブリンG
IL	Interleukin：インターロイキン
IL-31RA	Interleukin 31 receptor A：インターロイキン31受容体A
JAK	Janus kinase：ヤーヌスキナーゼ
k_a	Association rate constant：結合速度定数
k_d	Dissociation rate constant：解離速度定数
K_D	Dissociation constant：解離定数
LDH	Lactate dehydrogenase：乳酸脱水素酵素
LIF	Leukemia Inhibitory Factor：白血球遊走阻止因子
MMP	Matrix metalloproteinase：マトリックスメタロプロテアーゼ
OSM	Oncostatin M：オンコスタチンM
OSMR	Oncostatin M receptor：オンコスタチンM受容体
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells：末梢血単核細胞
STAT	Signal transducer and activator of transcription：シグナル伝達性転写因子

目次

頁
2.6.2 薬理試験の概要文 5
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.1.1.1 *In vitro*薬理作用 5
2.6.2.1.1.2 標的組織 6
2.6.2.1.1.3 *In vivo*薬理作用 6
2.6.2.1.2 副次的薬理試験 6
2.6.2.1.3 安全性薬理試験 6
2.6.2.1.4 薬力学的薬物相互作用試験 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.2.1 *in vitro*薬理作用 7
2.6.2.2.1.1 ヒト及びサル可溶型IL-31RAへの結合活性 7
2.6.2.2.1.2 ヒト及びサルIL-31RA発現細胞へのIL-31の結合に対する阻害作用 7
2.6.2.2.1.3 ヒトIL-31RA及びOSMR発現細胞のヒトIL-31依存的増殖に対する阻害作用 8
2.6.2.2.1.4 サルIL-31RA及びOSMR発現細胞のサルIL-31依存的増殖に対する阻害作用 9
2.6.2.2.1.5 ヒト肺胞上皮腺癌細胞株（A549細胞）のIL-31シグナリングに対する阻害作用 9
2.6.2.2.1.6 ヒト表皮角化細胞株（HaCaT細胞）のIL-31依存的反応に対する抑制作用 10
2.6.2.2.1.7 ヒト白血病細胞株（TF-1細胞）の増殖を指標としたIL-6、OSM及びLIFのシグナル伝達に対する影響 11
2.6.2.2.1.8 ヒト及びサルFcγ受容体への結合活性 12
2.6.2.2.1.9 ヒトC1qへの結合活性 13
2.6.2.2.1.10 ADCC活性、CDC活性及びdirect cell death誘導能の評価 14
2.6.2.2.2 標的組織 16
2.6.2.2.2.1 アトピー性皮膚炎（AD）患者の皮膚組織におけるIL-31RA局在 16
2.6.2.2.3 *in vivo*薬理作用 16
2.6.2.2.3.1 サルIL-31誘発そう痒モデルにおける作用（静脈内投与） 16
2.6.2.2.3.2 サルIL-31誘発そう痒モデルにおける作用（皮下投与） 18
2.6.2.2.3.3 ダニ抗原誘発アトピー性皮膚炎（AD）モデルマウスにおける抗マウスIL-31RA抗体（BM095）の作用 19
2.6.2.3 副次的薬理試験 21
2.6.2.4 安全性薬理試験 21
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 21
2.6.2.6 考察及び結論 21
2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験に関する考察 21

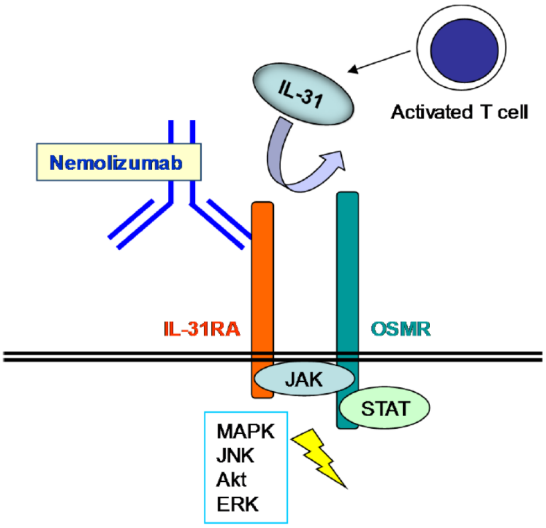
2.6.2.7 図表 22
2.6.2.8 参考文献 22

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

Nemolizumabはヒト化抗ヒトインターロイキン（IL）-31受容体A（IL-31RA）モノクローナル抗体である。IL-31は主に活性化したT細胞から産生されるサイトカインであり、IL-31がその受容体であるIL-31RAに結合すると、IL-31RAはオンコスタチンM受容体（OSMR）とヘテロダイマーを形成して下流のヤーヌスキナーゼ（JAK）／シグナル伝達性転写因子（STAT）を活性化し、細胞内へシグナルを伝達する[1)2)]。NemolizumabはIL-31RAに結合することにより、IL-31の受容体への結合及びそれに続く細胞内へのシグナル伝達を阻害する（図 2.6.2-1）。

図 2.6.2-1 Nemolizumabの作用機序



効力を裏付ける試験の概要を以下に示す。なお、nemolizumabはマウス、ラット及びウサギに交差反応性を示さない[3)]ことから、nemolizumabの*in vivo*試験においては交差反応性を示す動物種であるサルを評価動物として使用し、アトピー性皮膚炎（AD）モデルマウスにおける効果はマウスIL-31RAに対する中和抗体であるBM095を用いて検討した。

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

2.6.2.1.1.1 *In vitro*薬理作用

Nemolizumabはヒト及びカニクイザルの可溶型IL-31RAに高い親和性をもって結合し、その解離定数（K_D）はそれぞれ0.374 nmol/L及び0.191 nmol/Lであった。Nemolizumabはヒトあるいはカニクイザルの IL-31RAを発現させた組換え細胞へのヒトIL-31（hIL-31）あるいはカニクイザルIL-31（cyIL-31）の結合を濃度依存的に阻害した。また、nemolizumabはヒト及びカニクイザルのIL-31RAとOSMRを発現させた組換え細胞におけるIL-31依存的な細胞増殖を濃度依存的に阻害した。更に、IL-31RAを発現するヒト細胞株においてIL-31刺激により誘導されるSTAT3のリン酸化を濃度依存的に阻害するとともに、ヒト表皮角化細胞株においてIL-31刺激により誘導されるIL-6、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-1、MMP-3産生及びアポトーシスを濃度依存的に抑制した。

NemolizumabはIL-31RAと相同性を有するgp130を利用するサイトカイン（IL-6及びオンコスタチ

ンM（OSM））のシグナル伝達に対して影響を及ぼさなかったが、白血球遊走阻止因子（LIF）に関しては明確な結論が得られなかった。また、nemolizumabは、定常領域が免疫グロブリンG（IgG）1であるrituximabに比べて、ヒトFcγ受容体（FcγR）並びにヒト補体C1qに対する結合性は弱かった。更に、ヒトIL-31RAを発現させた組換え細胞に対するnemolizumabの抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性、補体依存性細胞傷害（CDC）活性及びdirect cell death誘導能はいずれも認められなかった。

2.6.2.1.1.2 標的組織

免疫組織化学的染色でAD患者皮膚組織の3例中3例のミラー標本にてPGP9.5陽性の神経終末と考えられる部位と同等部にIL-31RA陽性反応が認められ、免疫組織蛍光染色においても同様であった。

2.6.2.1.1.3 *In vivo*薬理作用

同一個体のカニクイザルにおいて、nemolizumab（静脈内投与）はIL-31誘発そう痒行動に対して段階的に投与量を増加（3、10、40、60及び100 μg/kg）させると、40 μg/kg以上の投与量で明らかな抑制作用を示した。また、nemolizumab（1 mg/kg、皮下投与）は投与28日後においてIL-31誘発そう痒行動を有意に抑制した。投与56日後においては、抗nemolizumab抗体価が陽性となった個体を含む全例解析ではIL-31誘発そう痒行動に対する有意な抑制作用は認められなかったが、抗nemolizumab抗体価が陽性で血漿中nemolizumab濃度が定量下限未満となった個体を除いた解析では、投与56日後においてもIL-31誘発そう痒行動を有意に抑制した。

また、抗マウスIL-31RA中和抗体（BM095、20 mg/kg）はダニ抗原誘発ADモデルマウスにおいて、掻き動作の総数を低下させるとともに皮膚炎の悪化を抑制した。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

Nemolizumabの定常領域を介した作用は効力を裏付ける試験の項（2.6.2.1.1 ）にまとめて記載した。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

Nemolizumabの安全性薬理試験は実施しなかったが、カニクイザルを用いた26週間反復皮下投与毒性試験の中で評価した。評価項目は、中枢神経系（神経行動学的機能観察）、心血管系（心電図及び血圧測定）及び呼吸系（呼吸数測定）とした。その結果、反復皮下投与による25 mg/kgまでの用量で、いずれの安全性薬理学的パラメータにも、nemolizumabに関連した異常は認められず、更に病理組織学的検査においても、nemolizumabに関連した異常は認められなかった。

2.6.2.1.4 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なかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *in vitro*薬理作用

2.6.2.2.1.1 ヒト及びサル可溶型IL-31RAへの結合活性

報告書番号 PHM[redacted]-5109〔4.2.1.1-1〕（評価資料）

(1) 試験方法

可溶型ヒトIL-31RA（shIL-31RA）及び可溶型カニクイザルIL-31RA（scyIL-31RA）に対するnemolizumabの解離定数（K_D）を表面プラズモン共鳴により測定した。

(2) 試験結果

Nemolizumabはヒト及びカニクイザルの可溶型IL-31RAに高い親和性をもって結合し、shIL-31RAに対するK_Dは0.374 nmol/L、scyIL-31RAに対するK_Dは0.191 nmol/Lであった（表 2.6.2-1）。

表 2.6.2-1 ヒト及びサル可溶型IL-31RAに対するnemolizumab（CIM331）のk_a値、k_d値及びK_D値

		k_a		k_d		K_D	
		geometric mean ($(mol/L)^{-1}・s^{-1}$)	geometric SD	geometric mean (s^{-1})	geometric SD	geometric mean (mol/L)	geometric SD
CIM331	shIL-31RA	8.71×10^{5}	1.02	3.26×10^{-4}	1.01	0.374×10^{-9}	1.02
	scyIL-31RA	1.16×10^{6}	1.01	2.21×10^{-4}	1.01	0.191×10^{-9}	1.02

幾何平均（geometric mean）及び幾何標準偏差（geometric SD）を示す（n=3）。
k_aは結合速度定数、k_dは解離速度定数を示す。

2.6.2.2.1.2 ヒト及びサルIL-31RA発現細胞へのIL-31の結合に対する阻害作用

報告書番号 PHM[redacted]-0208S〔4.2.1.1-2〕（参考資料）

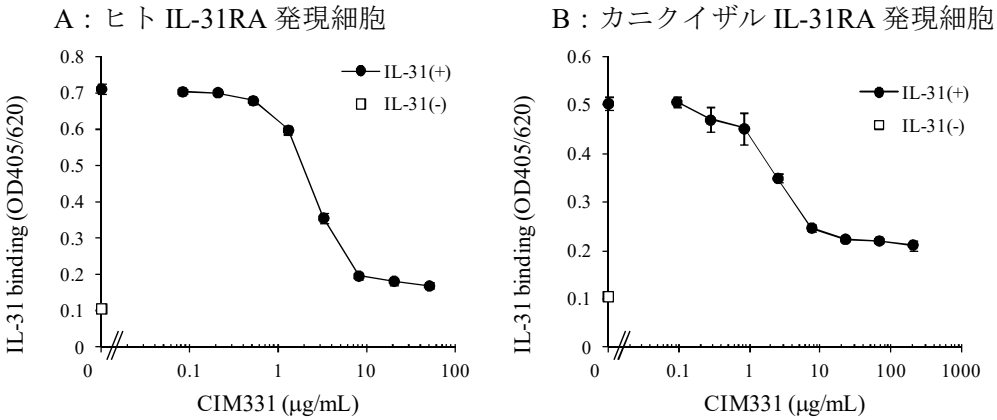
(1) 試験方法

Nemolizumab及びhIL-31（100 ng/mL）又はcyIL-31（500 ng/mL）存在下で、ヒト又はカニクイザルIL-31RA（細胞内領域欠失）を発現させた組換え細胞を2時間培養した後、IL-31RA発現細胞へのIL-31の結合に対するnemolizumabの阻害作用をCell ELISA法により評価した。

(2) 試験結果

NemolizumabはIL-31RA発現細胞へのhIL-31又はcyIL-31の結合を濃度依存的に阻害した（図2.6.2-2）。

図 2.6.2-2 ヒト又はサルIL-31RA発現細胞へのIL-31の結合に対するnemolizumab（CIM331）の阻害作用



データは平均値 ± 標準偏差（n=3）を示す。

2.6.2.2.1.3 ヒトIL-31RA及びOSMR発現細胞のヒトIL-31依存的増殖に対する阻害作用

報告書番号 PHM[redacted]-5133〔4.2.1.1-3〕（評価資料）

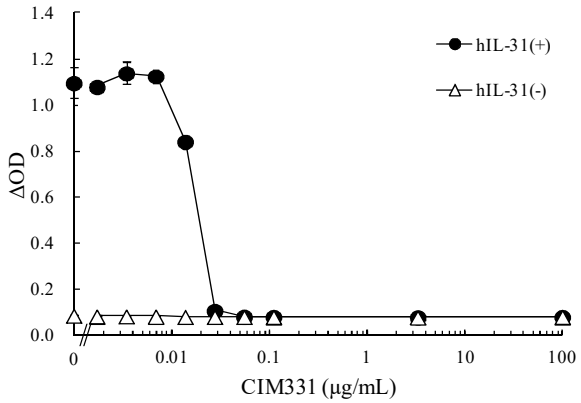
(1) 試験方法

Nemolizumab及びhIL-31（0.3 ng/mL）存在下で、ヒトIL-31RA及びヒトOSMRを遺伝子導入した組換え細胞（BaF/2C6/16）を2日間培養し、IL-31依存的な細胞増殖に対するnemolizumabの阻害作用を評価した。

(2) 試験結果

NemolizumabはhIL-31刺激によるBaF/2C6/16の細胞増殖を濃度依存的に阻害した。一方、hIL-31非存在下におけるBaF/2C6/16の細胞増殖に対して、nemolizumabは影響を及ぼさなかった（図 2.6.2-3）。

図 2.6.2-3 ヒトIL-31RA及びOSMR発現細胞（BaF/2C6/16）のヒトIL-31依存的増殖に対するnemolizumab（CIM331）の阻害作用



縦軸は細胞増殖（ΔOD）を、データは平均値 ± 標準偏差（n=3）を示す。

2.6.2.2.1.4 サルIL-31RA及びOSMR発現細胞のサルIL-31依存的増殖に対する阻害作用

報告書番号 PHM[redacted]-0208S〔4.2.1.1-2〕（参考資料）

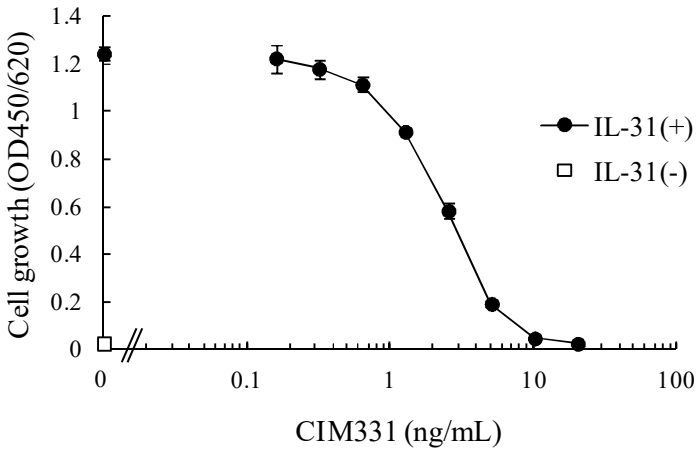
(1) 試験方法

Nemolizumab及びcyIL-31（1 ng/mL）存在下で、カニクイザルIL-31RA及びカニクイザルOSMRを遺伝子導入した組換え細胞（BaF/cyNR10cyOSMR-401）を2日間培養し、IL-31依存的な細胞増殖に対するnemolizumabの阻害作用を評価した。

(2) 試験結果

NemolizumabはcyIL-31刺激によるBaF/cyNR10cyOSMR-401の細胞増殖を濃度依存的に阻害した（図 2.6.2-4）。

図 2.6.2-4 サルIL-31RA及びOSMR発現細胞（BaF/cyNR10cyOSMR-401）のサルIL-31依存的増殖に対するnemolizumab（CIM331）の阻害作用



データは平均値 ± 標準偏差（n=3）を示す。

2.6.2.2.1.5 ヒト肺胞上皮腺癌細胞株（A549細胞）のIL-31シグナリングに対する阻害作用

報告書番号 PHM[redacted]-0004S〔4.2.1.1-4〕（参考資料）

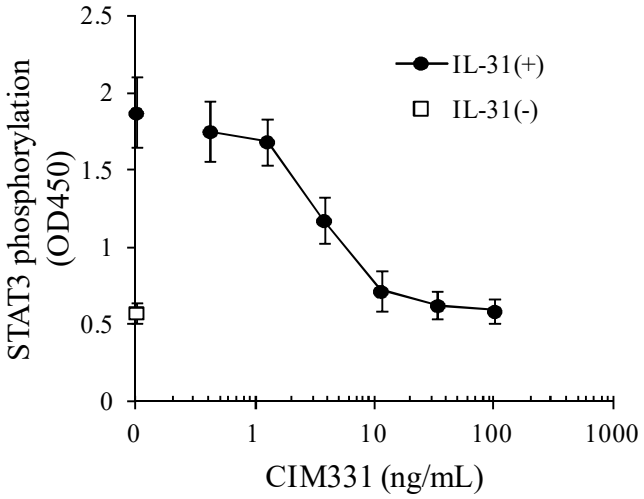
(1) 試験方法

IL-31によりSTAT3のリン酸化が起こることが報告されているA549細胞をnemolizumab存在下で2時間培養した後、hIL-31（終濃度：30 ng/mL）を添加し、更に20分間培養した。培養終了後に細胞ライセートを調製し、リン酸化したSTAT3量をELISA法で測定した。

(2) 試験結果

Nemolizumab は hIL-31刺激により誘導される A549細胞における STAT3のリン酸化を濃度依存的に阻害した（図 2.6.2-5）。

図 2.6.2-5 ヒト肺胞上皮腺癌細胞株（A549細胞）のIL-31シグナリングに対するnemolizumab（CIM331）の阻害作用



データは平均値 ± 標準偏差（n=3）を示す。

2.6.2.2.1.6 ヒト表皮角化細胞株（HaCaT細胞）のIL-31依存的反応に対する抑制作用

報告書番号 PHM[redacted]-5117〔4.2.1.1-5〕（参考資料）

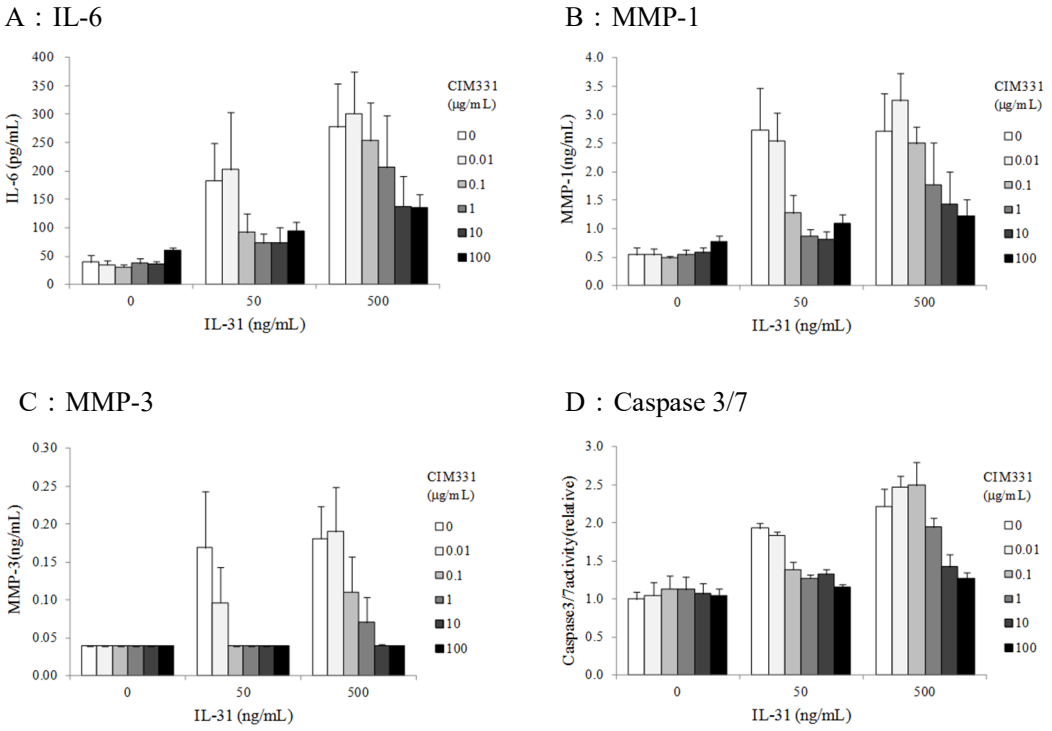
(1) 試験方法

Nemolizumab、IFN-γ（30又は100 ng/mL）及びhIL-31（0、50及び500 ng/mL）存在下で、HaCaT細胞を3日間培養した後、培養上清中のIL-6、MMP-1及びMMP-3量をELISA法で測定した。また、3日間培養後の細胞におけるcaspase 3/7活性をアポトーシスの指標として測定した。

(2) 試験結果

HaCaT細胞においてhIL-31刺激によりIL-6、MMP-1、MMP-3産生及びcaspase 3/7活性が誘導され、nemolizumabはhIL-31刺激で誘導されるこれらの反応を濃度依存的に抑制した（図 2.6.2-6）。

図 2.6.2-6 ヒト表皮角化細胞株（HaCaT細胞）のIL-31依存的反応に対するnemolizumab（CIM331）の抑制作用



データは平均値 ± 標準偏差（n=3）を示す。

2.6.2.2.1.7 ヒト白血病細胞株（TF-1細胞）の増殖を指標としたIL-6、OSM及びLIFのシグナル伝達に対する影響

報告書番号 PHM[redacted]-5131〔4.2.1.1-6〕（評価資料）

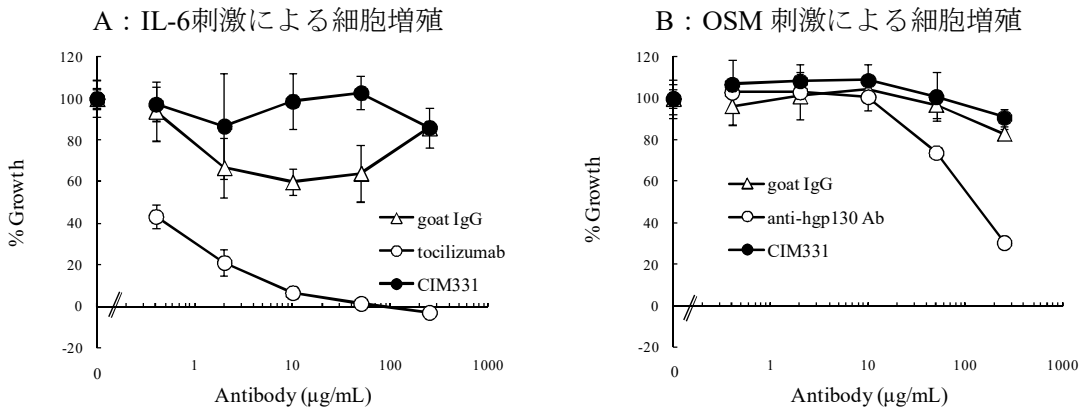
(1) 試験方法

IL-31RAと相同性を有するgp130を利用するサイトカインであるIL-6、OSM及びLIFのシグナル伝達に対するnemolizumabの影響を検討するために、nemolizumab（0.4～250 μg/mL）及びヒトIL-6（10 ng/mL）、ヒトOSM（10 ng/mL）又はヒトLIF（10 ng/mL）存在下で、TF-1細胞を3日間培養し、^{3}H-thymidineの取り込み量を指標に細胞増殖を評価した。陰性対照としてgoat IgGを、陽性対照薬として抗ヒトIL-6受容体抗体であるtocilizumab、抗ヒトgp130抗体であるanti-hgp130 Ab及び抗ヒトLIF受容体抗体であるanti-hLIFRα Abを使用した。

(2) 試験結果

TocilizumabはIL-6刺激による細胞増殖を、anti-hgp130 AbはOSM刺激による細胞増殖を濃度依存的に抑制した。一方、nemolizumabはIL-6及びOSM刺激による細胞増殖に影響を及ぼさなかった（図2.6.2-7）。LIF刺激による細胞増殖に対して、nemolizumabの増殖抑制作用は認められなかったものの、LIF刺激に依存した細胞増殖が明確でなかったこと、陽性対照薬であるanti-hLIFRα Abの増殖抑制作用が弱かったことから、明確な結論を得ることができなかった（データ省略）。

図 2.6.2-7 ヒトTF-1細胞増殖を指標としたIL-6及びOSMのシグナル伝達に対するnemolizumab（CIM331）の影響



縦軸は細胞増殖の相対値を、データは平均値 ± 標準偏差（n=3）を示す。

2.6.2.2.1.8 ヒト及びサルFcγ受容体への結合活性

報告書番号 PHM[redacted]-5105〔4.2.1.1-7〕（評価資料）

(1) 試験方法

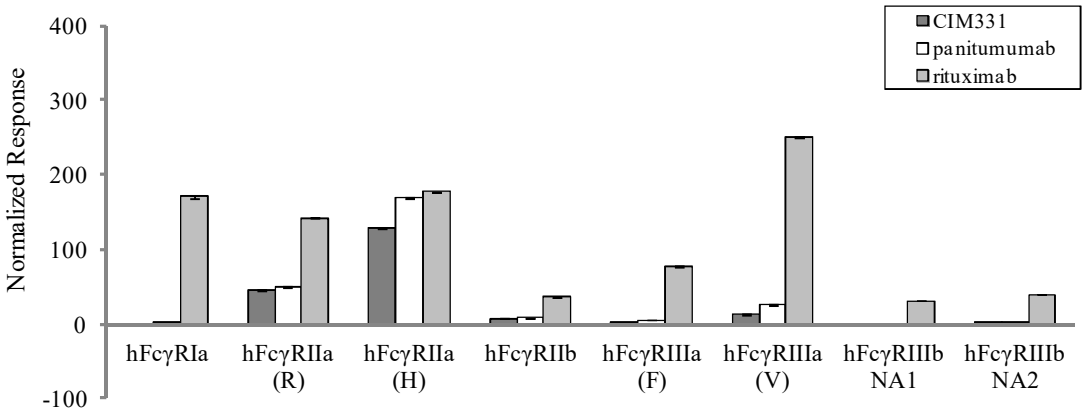
1塩基多型を含む8種類のヒトFcγ受容体（hFcγR）及び7種類のカニクイザルFcγ受容体（cyFcγR）に対するnemolizumab、panitumumab（定常領域がヒトIgG2）及びrituximab（定常領域がヒトIgG1）の結合を表面プラズモン共鳴法により測定した。

(2) 試験結果

8種類のhFcγR（Ia、IIa、IIb、IIIa、IIIb）に対するnemolizumabの結合は、いずれもpanitumumabの結合に比べてほぼ同等又は弱く、rituximabの結合に比べても弱かった（図 2.6.2-8）。

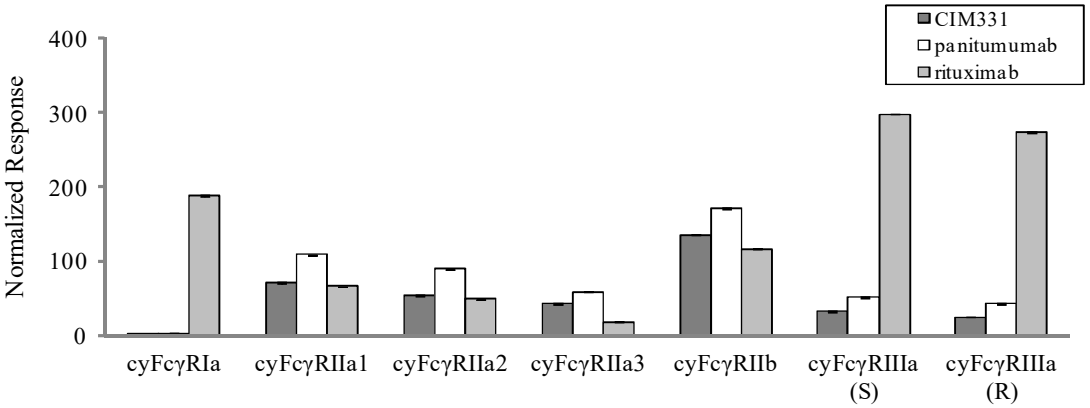
7種類の cyFcγR（Ia、IIa、IIb、IIIa）に対する nemolizumab の結合は、いずれも panitumumab の結合に比べて同等又は弱かった。また、cyFcγR Ia、IIIa（S）、IIIa（R）に対する nemolizumab の結合は rituximab の結合に比べて非常に弱かったが、cyFcγR IIa1、IIa2、IIa3、IIb に対する nemolizumab の結合は、rituximab の結合に比べて同等又は若干強かった（図 2.6.2-9）。

図 2.6.2-8 ヒトFcγRに対するnemolizumab（CIM331）、panitumumab及びrituximabの結合



縦軸は FcγR との結合量を、データは平均値 ± 標準偏差（n=3）を示す。

図 2.6.2-9 サルFcγRに対するnemolizumab（CIM331）、panitumumab及びrituximabの結合



縦軸は FcγR との結合量を、データは平均値 ± 標準偏差（n=3）を示す。

2.6.2.2.1.9 ヒトC1qへの結合活性

報告書番号 PHM[redacted]-5138〔4.2.1.1-8〕（評価資料）

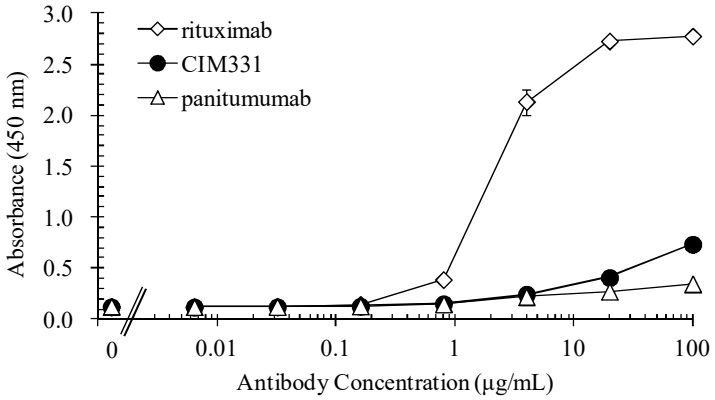
(1) 試験方法

補体C1構成タンパク質の一種であるC1qに対するnemolizumabの結合活性をELISA法により測定した。比較対照薬として、panitumumab（定常領域がヒトIgG2）及びrituximab（定常領域がヒトIgG1）を使用した。

(2) 試験結果

Nemolizumab のヒト C1q に対する結合活性は、panitumumab と同程度であり、rituximab に比べて弱かった（図 2.6.2-10）。

図 2.6.2-10　nemolizumab（CIM331）、panitumumab及びrituximabのヒトC1qに対する結合



縦軸は各抗体に対するC1qの結合量を、データは平均値 ± 標準偏差（n=4）を示す。

2.6.2.2.1.10 ADCC活性、CDC活性及びdirect cell death誘導能の評価

報告書番号 PHM[redacted]-0162〔4.2.1.1-9〕（評価資料）

(1) 試験方法

NemolizumabのADCC活性及びdirect cell death誘導能を評価するために、末梢血単核細胞（PBMC）の存在下又は非存在下でnemolizumab（0.2～200 μg/mL）とともにヒトIL-31RAを過剰発現させたA549（A549 IL-31RA #31）細胞を4時間培養した。培養終了後に細胞死の指標として培養上清中の乳酸脱水素酵素（LDH）活性を測定した。

NemolizumabのCDC活性を評価するために、ヒト血清の存在下又は非存在下でnemolizumab（0.2～200 μg/mL）とともにA549 IL-31RA #31細胞を4時間培養した後、培養上清中のLDH活性を測定した。

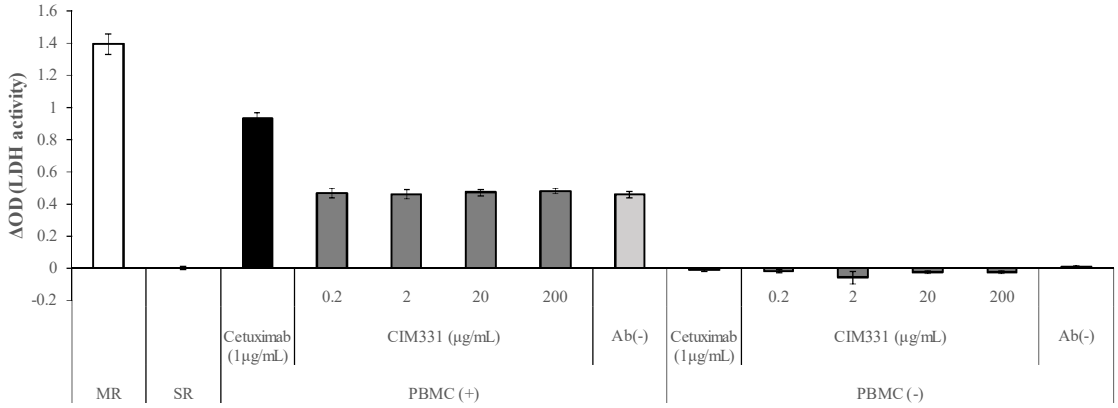
陽性対照として、cetuximabの標的分子である上皮成長因子（EGF）受容体を発現するA549 IL-31RA #31細胞に対するcetuximabのADCC活性と、rituximabの標的分子であるCD20を発現するBALL-1細胞に対するrituximabのCDC活性を評価した。

(2) 試験結果

Cetuximab（1 μg/mL）はPBMC存在下でA549 IL-31RA #31細胞に対するADCC活性を示した。一方、nemolizumabのADCC活性は認められなかった。また、cetuximab又はnemolizumabの単独処理ではA549 IL-31RA #31細胞に対するdirect cell death誘導能は認められなかった（図 2.6.2-11）。

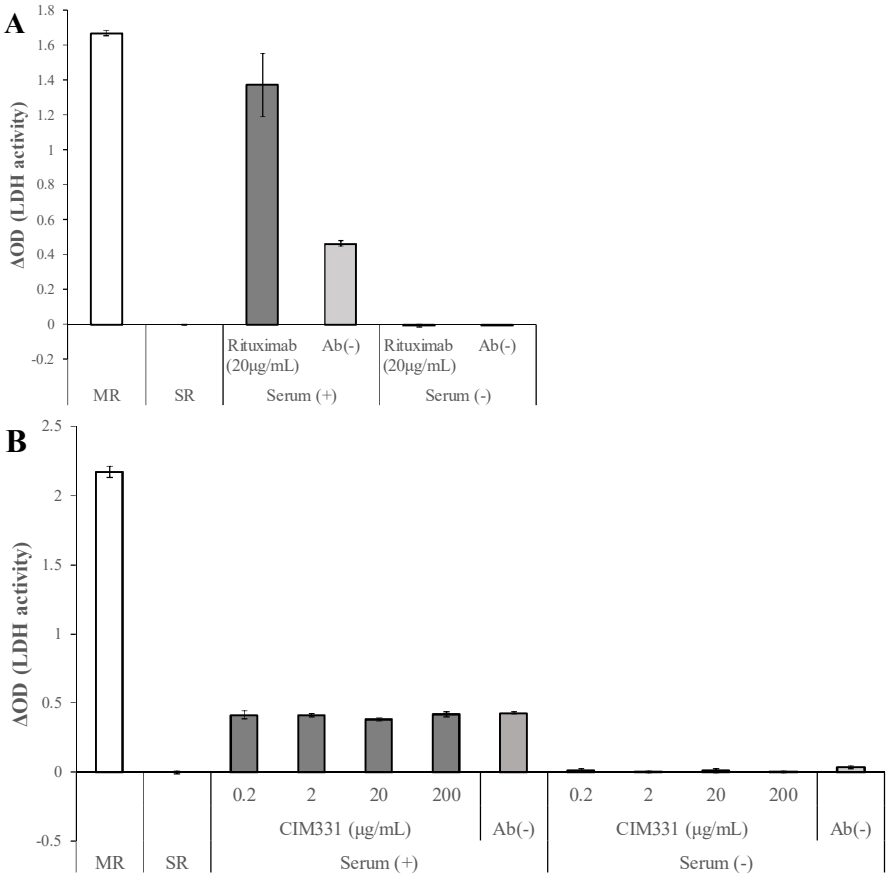
Rituximab（20 μg/mL）はBALL-1細胞に対するCDC活性を示したが、nemolizumabのA549 IL-31RA #31細胞に対するCDC活性は認められなかった（図 2.6.2-12）。

図 2.6.2-11 エフェクター細胞として末梢血単核球（PBMC）を用いたnemolizumab（CIM331）及びcetuximabのADCC活性及びdirect cell death誘導能



縦軸は LDH 活性を示し、MR 及び SR はそれぞれ maximum release 及び spontaneous release を示す。ΔOD は各値から SR の平均値を減算することで算出した。データは平均値 ± 標準偏差（n=3）を示す。

図 2.6.2-12 ヒト血清を用いたnemolizumab（CIM331）及びrituximabのCDC活性



（A）Rituximab の BALL-1細胞に対する CDC 活性
（B）Nemolizumab（CIM331）の A549 IL-31RA #31細胞に対する CDC 活性
縦軸は LDH 活性を示し、MR 及び SR はそれぞれ maximum release 及び spontaneous release を

示す。ΔOD は各値から SR の平均値を減算することで算出した。データは平均値 ± 標準偏差（n=3）を示す。

2.6.2.2.2 標的組織

2.6.2.2.2.1 アトピー性皮膚炎（AD）患者の皮膚組織におけるIL-31RA局在

報告書番号 PHM[redacted]-5130〔4.2.1.1-10〕（参考資料）

(1) 試験方法

AD患者3症例の皮膚新鮮凍結ブロックより薄切ミラー切片を作製し、免疫組織化学的に染色を行い、IL-31RAとPGP9.5あるいはIL-31RAとCD68の陽性部位を観察した。また、AD患者1症例の皮膚切片については免疫組織蛍光染色を行い、IL-31RAとPGP9.5の発現部位を観察した。

(2) 試験結果

AD皮膚組織の3例中3例のミラー標本にてPGP9.5陽性の神経終末と考えられる部位と同等部にIL-31RA陽性反応が認められ、免疫組織蛍光染色においても同様であった（表 2.6.2-2、図 2.6.2-13）。一方、CD68陽性のマクロファージと考えられる部位と同等部にはIL-31RA陽性反応が認められなかった（表 2.6.2-2）。

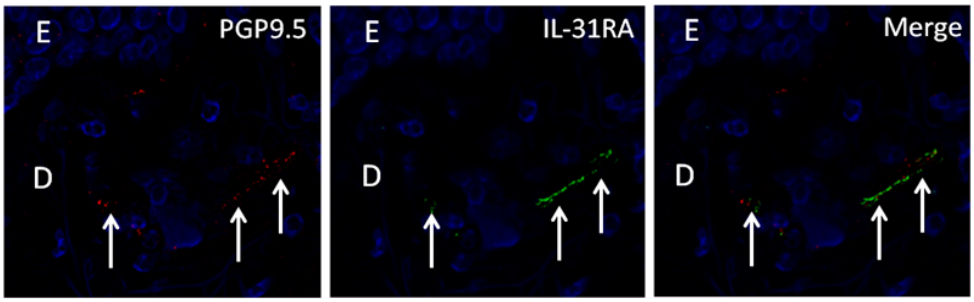
表 2.6.2-2 ヒトAD皮膚組織ミラー標本におけるPGP9.5あるいはCD68とIL-31RA陽性部位の組織内分布

	Antigen			
	PGP9.5	IL-31RA	CD68	IL-31RA
Sample ID	Nerve endings	Colocalization[a]	Macrophage	Colocalization[b]
NGY262	+	+	+	—
NGY263	+	+	+	—
NGY269	+	+	+	—

+：陽性所見、－：陰性所見

a：PGP9.5で同定される神経終末での局在、b：CD68で同定されるマクロファージでの局在

図 2.6.2-13 ヒトAD皮膚組織標本におけるPGP9.5とIL-31RA陽性部位の共発現（免疫組織蛍光染色）



赤：PGP9.5、緑：IL-31RA、矢印：陽性部位

E：表皮、D：真皮

2.6.2.2.3 *in vivo*薬理作用

2.6.2.2.3.1 サルIL-31誘発そう痒モデルにおける作用（静脈内投与）

報告書番号 PHM[redacted]-0208〔4.2.1.1-11〕（評価資料）

(1) 試験方法

同一個体のカニクイザルに投与用量として3 μg/kgから100 μg/kgまでのnemolizumabを段階的に静脈内投与した。各用量でのnemolizumab投与前及び投与翌日に血漿中nemolizumab濃度を測定するために採血した。そう痒行動は、cyIL-31（1 μg/kg）を静脈内投与し、cyIL-31投与後2時間をビデオ撮影することで計測した。また、day 0にcyIL-31非投与時の2時間のそう痒行動をビデオ撮影した。そう痒行動回数は、ビデオカメラで記録したカニクイザルの行動を目視で観察し、前肢又は後肢で体の一部を引っ掻く動作を1回のそう痒行動として計測した（表 2.6.2-3）。

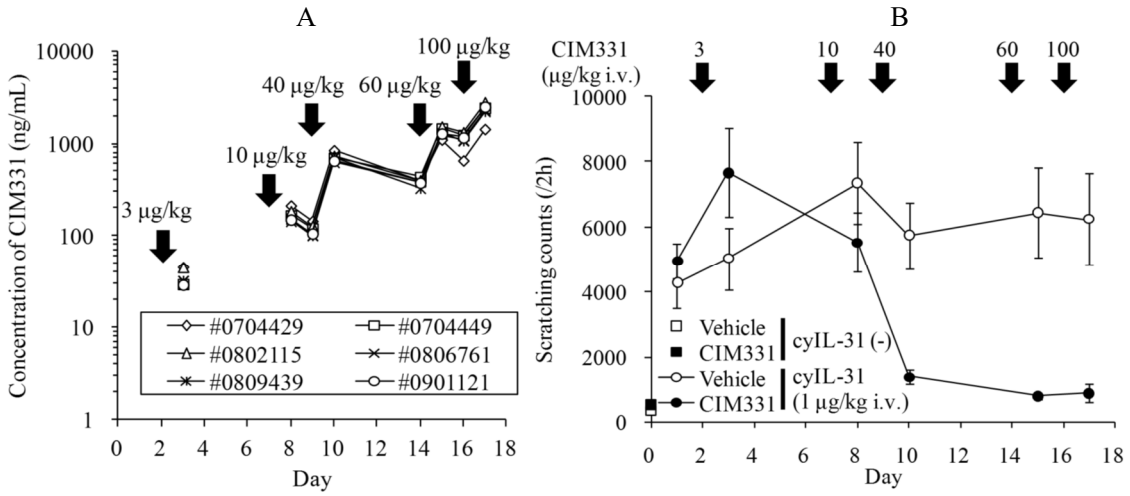
表 2.6.2-3 試験プロトコール（サルIL-31誘発そう痒モデルにおける作用（静脈内投与））の概要

Day	0	1	2	3	7	8	9	10	14	15	16	17
Nemolizumab 投与（μg/kg）	0		3		10		40		60		100	
cyIL-31投与（1 μg/kg）		○		○		○		○		○		○
ビデオ撮影	○	○		○		○		○		○		○
採血（1 mL）			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

(2) 試験結果

Nemolizumab投与開始前において、IL-31の静脈内投与によりそう痒行動回数の著しい増加が認められた。その後、nemolizumabの静脈内投与用量を段階的に増加することにより、nemolizumab投与翌日の平均血漿中nemolizumab濃度は投与用量に依存して増加した。NemolizumabはこのIL-31誘発そう痒行動に対して、10 μg/kg投与（投与翌日の平均血漿中nemolizumab濃度：169 ng/mL）では抑制作用を示さなかったが、40 μg/kg（投与翌日の平均血漿中濃度：710 ng/mL）、60 μg/kg及び100 μg/kg投与で明らかな抑制作用を示した（図 2.6.2-14及び図 2.6.2-15）。

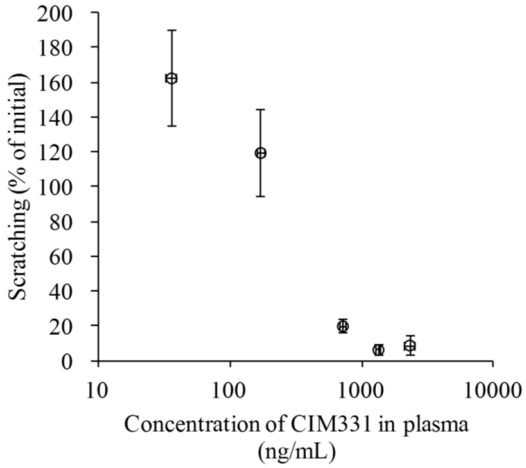
図 2.6.2-14 サルIL-31誘発そう痒モデルにおけるnemolizumab（CIM331）の血漿中濃度とそう痒行動回数の推移



A：サルそう痒モデルにおける nemolizumab（CIM331）の血漿中濃度推移
図中凡例に示されている番号は個体番号を示す。
B：サルそう痒モデルにおけるそう痒行動回数の推移

データは平均値 ± 標準誤差（n=6）を示す。

図 2.6.2-15 サルIL-31誘発そう痒モデルにおけるnemolizumab（CIM331）の血漿中濃度とそう痒の関係



Nemolizumab（CIM331）の投与翌日の血漿中濃度とそう痒をプロットした。
縦軸は nemolizumab（CIM331）投与開始前のそう痒行動回数を100%とした時の相対値を、データは平均値 ± 標準誤差（n=6）を示す。

2.6.2.2.3.2 サルIL-31誘発そう痒モデルにおける作用（皮下投与）

報告書番号 PHM[redacted]-5004〔4.2.1.1-12〕（評価資料）

(1) 試験方法

Nemolizumab投与2日前（day −2）にカニクイザルのcyIL-31非投与時のそう痒行動回数を計測し、続いてnemolizumab投与1日前（day −1）にcyIL-31（1 μg/kg）の静脈内投与で誘発されるそう痒行動回数を計測した。その翌日（day 0）、各群6匹のカニクイザルにnemolizumab（1 mg/kg）又はそのvehicleを皮下投与した。投与28日後（day 28）及び56日後（day 56）に、cyIL-31を静脈内投与（1 μg/kg）することにより誘発されるそう痒行動回数を計測した。そう痒行動回数は、ビデオカメラにて記録したカニクイザルの行動（2時間）を目視で観察し、前肢又は後肢で体の一部を引っ掻く動作を1回のそう痒行動として計測した。また、day 2、day 4、day 28及びday 56に採血を行い、血漿中nemolizumab濃度（day 2、day 4、day 28及びday 56）及び血漿中抗nemolizumab抗体価（day 28及びday 56）を測定した。

(2) 試験結果

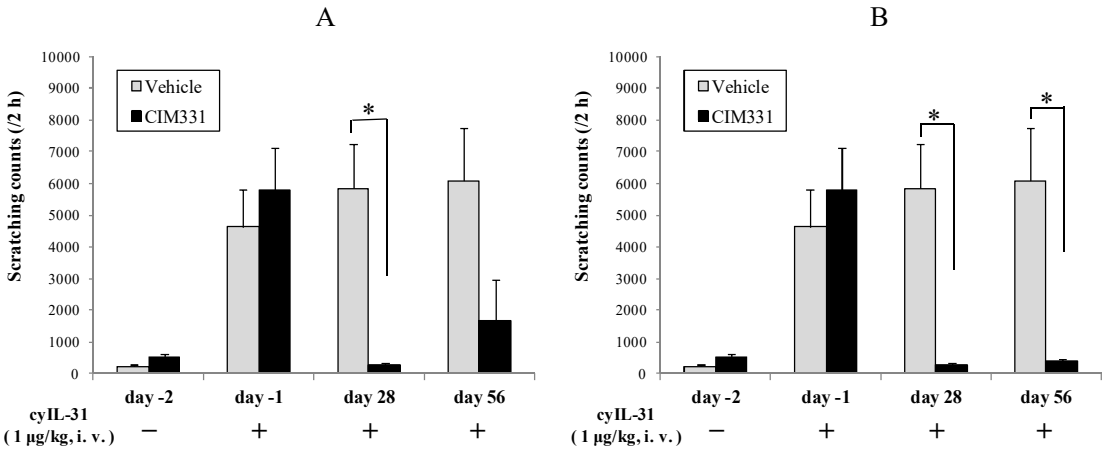
Nemolizumab投与前（day −1）ではIL-31静脈内投与によりそう痒行動回数の明らかな増加が認められたが、day 28ではnemolizumab投与群においてIL-31で誘発されるそう痒行動回数が有意に低下した。一方、day 56ではそう痒行動回数の有意な低下は認められなかった（図 2.6.2-16A）。

血漿中nemolizumab濃度（平均値 ± 標準誤差）は、day 2、day 4、day 28及びday 56でそれぞれ11700 ± 500、10800 ± 300、3960 ± 710、1240 ± 450 ng/mLであった。血漿中抗nemolizumab抗体価は、day 28では全例陰性であったが、day 56において6例中1例で陽性となり、本陽性個体のday 56での血漿中nemolizumab濃度は定量下限（8.00 ng/mL）未満だった。

Day 56で抗nemolizumab抗体価が陽性になった個体を除いて副次解析を行った結果、day 56にお

いてもnemolizumab群でそう痒行動回数の有意な低下が認められた（図 2.6.2-16B）。

図 2.6.2-16 サルIL-31誘発そう痒モデルにおけるnemolizumab（CIM331）の効果（皮下投与）



A：主要解析（全例を用いて解析）

B：副次解析（day 56に抗 nemolizumab（CIM331）抗体価が陽性で、血漿中 nemolizumab（CIM331）濃度が定量下限未満になった個体を除いて解析）

データは平均値 ± 標準誤差（n=6）を示す（副次解析の nemolizumab（CIM331）投与群 day 56 のみ n=5）。

*：P<0.05、対 vehicle 群（*t* test）

2.6.2.2.3.3 ダニ抗原誘発アトピー性皮膚炎（AD）モデルマウスにおける抗マウスIL-31RA抗体（BM095）の作用

報告書番号 PHM[redacted]-0248S〔4.2.1.1-13〕（参考資料）

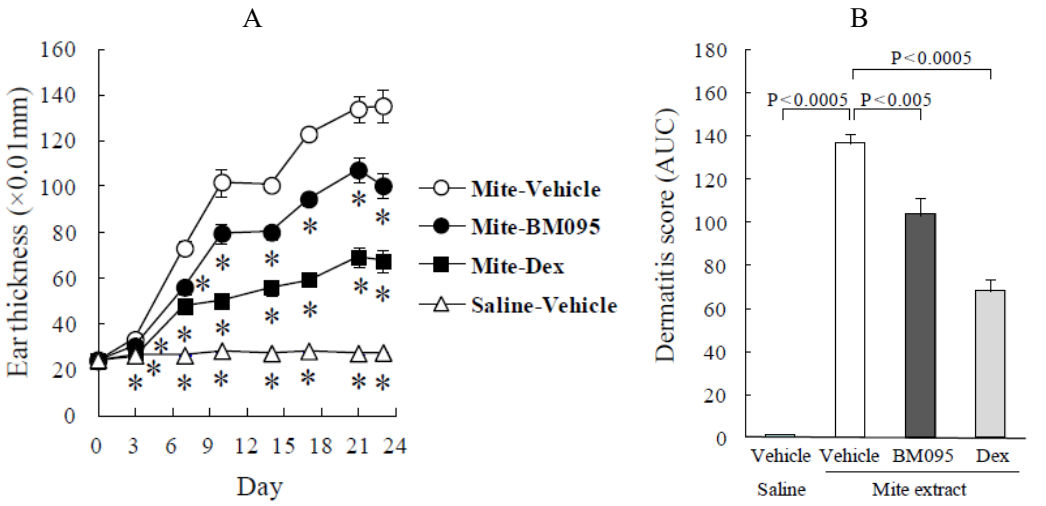
(1) 試験方法

NC/Nga マウスの右耳介にダニ抗原（5 μg/5 μL）を週3回、3週間皮内投与して皮膚炎を誘発した。抗原感作開始と同時に20 mg/kg の BM095（マウス IL-31RA に対する中和抗体）を週2回の頻度で計7回静脈内投与した。また、陽性対照群として、抗原感作開始と同時に1 mg/kg のデキサメサゾン（Dex）を週5回の頻度で計17回経口投与した。耳介厚及び皮膚炎スコアは抗原感作開始日から週2回の頻度で評価した。掻き動作に関しては、マウスの右側後肢に測定用磁石を埋め込み、自動そう痒測定システムを用いて抗原感作開始日から週1回の頻度で、12時間（19:00～7:00）の掻き行動を計測した。

(2) 試験結果

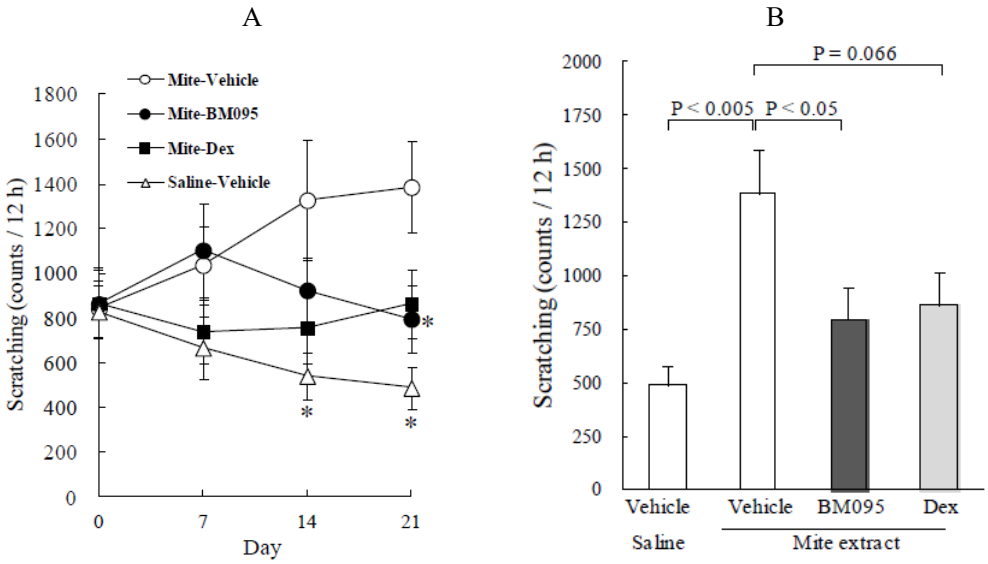
BM095投与群では耳介厚、皮膚炎スコア、掻き動作の総数のいずれのパラメータにおいてもvehicle投与群と比較して有意な低下が認められた。Dex投与群においては、耳介厚及び皮膚炎スコアの有意な低下、掻き動作の総数の低下傾向が認められた。一方で、掻き動作の頻度については、BM095投与群では改善傾向を示すものの統計学的な有意差は認められなかったが、Dex投与群では掻き動作の頻度でも有意な改善が認められた（データ省略）（図 2.6.2-17及び図 2.6.2-18）。

図 2.6.2-17 ダニ抗原誘発ADモデルの耳介厚及び皮膚炎スコアに対する作用



A：耳介厚の推移、データは平均値 ± 標準誤差（n=8）を示す。
*：P<0.05、対 Mite-Vehicle 群（*t* test）
B：皮膚炎スコアの area under the curve（AUC）、データは平均値 ± 標準誤差（n=8）を示す。
P：対 Mite-Vehicle 群（Wilcoxon rank sum test）
Mite：ダニ抗原、Saline：生理的食塩液

図 2.6.2-18 ダニ抗原誘発ADモデルの掻き動作に対する作用



A：掻き動作の総数の推移、データは平均値 ± 標準誤差（n=7-8）を示す。
*：P<0.05、対 Mite-Vehicle 群（*t* test）
B：Day 21における掻き動作の総数、データは平均値 ± 標準誤差（n=7-8）を示す。
P：対 Mite-Vehicle 群（*t* test）
Mite：ダニ抗原、Saline：生理的食塩液

2.6.2.3 副次的薬理試験

Nemolizumabの定常領域を介した作用は効力を裏付ける試験の項にまとめて記載した。

2.6.2.4 安全性薬理試験

Nemolizumabの安全性薬理試験は実施しなかったが、カニクイザルを用いた26週間反復皮下投与毒性試験の中で評価した。評価項目は、中枢神経系（神経行動学的機能観察）、心血管系（心電図及び血圧測定）及び呼吸系（呼吸数測定）とした。その結果、反復皮下投与による25 mg/kgまでの用量で、いずれの安全性薬理学的パラメータにも、nemolizumabに関連した異常は認められず、更に病理組織学的検査においても、nemolizumabに関連した異常は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用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に関する考察

Nemolizumabはヒト及びカニクイザルの可溶型IL-31RAに高い親和性をもって結合し、ヒトあるいはカニクイザルIL-31RAを発現させた組換え細胞へのIL-31の結合を濃度依存的に阻害した。また、nemolizumabはヒト及びカニクイザルのIL-31RAとOSMRを発現させた組換え細胞のIL-31依存的な細胞増殖を濃度依存的に阻害した。更に、IL-31RAを発現するヒト細胞株においてIL-31刺激により誘導されるSTAT3のリン酸化、並びにヒト表皮角化細胞株においてIL-31刺激により誘導されるIL-6、MMP-1、MMP-3産生及びアポトーシスを濃度依存的に抑制した。これらの結果より、nemolizumabはヒト及びカニクイザルのIL-31RAに結合し、IL-31のIL-31RAへの結合を阻害することで、IL-31RAを介したIL-31のシグナル伝達を阻害することが示された。

NemolizumabはIL-31RAと相同性を有するgp130を利用するサイトカイン（IL-6及びOSM）のシグナル伝達に対して影響を及ぼさなかったが、LIFに関しては明確な結論が得られなかった。

Nemolizumabは、定常領域がIgG1であるrituximabに比べて、ヒトFcγR及びヒト補体C1qとの結合が弱かったことから、ヒトFcγR及びヒト補体との結合の観点において、定常領域を介したエフェクター作用を発現するリスクが低いことが示された。更に、ヒトIL-31RAを過剰発現させたA549細胞に対するnemolizumabのADCC活性、CDC活性及びdirect cell death誘導能はいずれも認められなかった。

また、AD患者の皮膚組織の神経終末にIL-31RAの発現が認められたことから、皮膚の神経終末がnemolizumabの標的組織であることが示された。

同一個体のカニクイザルに対してnemolizumab（静脈内投与）の投与用量を段階的に増加させたところ、nemolizumabは40 μg/kg以上の投与量でIL-31誘発そう痒行動に対して明らかな抑制作用を示した。また、nemolizumabは臨床投与経路である皮下投与により、投与28日後においてIL-31誘発そう痒行動を有意に抑制した。投与56日後においては、抗nemolizumab抗体価が陽性となった個体を含む全例解析ではIL-31誘発そう痒行動に対する有意な抑制作用は認められなかったが、抗nemolizumab抗体価が陽性で血漿中nemolizumab濃度が定量下限未満となった個体を除いた解析では、投与56日後においてもIL-31誘発そう痒行動を有意に抑制した。

また、抗マウスIL-31RA中和抗体（BM095）はダニ抗原誘発ADモデルマウスにおいて、掻き動

作の総数を低下させるとともに皮膚炎の悪化を抑制した。

以上より、nemolizumabはIL-31RAに結合し、IL-31のIL-31RAへの結合を阻害してIL-31RAを介したIL-31のシグナル伝達を阻害することで、IL-31シグナルによって誘発されるそう痒と皮膚炎の悪化を改善すると考える。

2.6.2.7 図表

本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1) Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. Nat Immunol. 2004; 5(7): 752-760.
2) Diveu C, Lak-Hal AH, Froger J, Ravon E, Grimaud L, Barbier F, et al. Predominant expression of the long isoform of GP130-like (GPL) receptor is required for interleukin-31 signaling. Eur Cytokine Netw. 2004; 15(4): 291-302.
3) [redacted]. Cross-reactivity of CH5427227 with NR10 (IL-31RA) from mice, rats and rabbits. Final Report. Fuji Gotemba Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. 20[redacted]. TOX[redacted]-0198S.

ミチーガ皮下注用60mgシリンジ

第2部（モジュール2）
CTDの概要（サマリー）

2.6.3　薬理試験概要表

マルホ株式会社

略号一覧

略号	省略していない表現
AD	Atopic dermatitis：アトピー性皮膚炎
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害
CDC	Complement-dependent cytotoxicity：補体依存性細胞傷害
CIM331	一般名：Nemolizumab（ネモリズマブ）、別名：CH5427227
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay：酵素結合免疫吸着測定法
FcγR	Fcγ receptor：Fcγ受容体
IL	Interleukin：インターロイキン
IL-31RA	Interleukin 31 receptor A：インターロイキン31受容体A
K_D	Dissociation constant：解離定数
LIF	Leukemia Inhibitory Factor：白血球遊走阻止因子
MMP	Matrix metalloproteinase：マトリックスメタロプロテアーゼ
OSM	Oncostatin M：オンコスタチンM
OSMR	Oncostatin M receptor：オンコスタチンM受容体
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells：末梢血単核細胞
STAT	Signal transducer and activator of transcription：シグナル伝達性転写因子

目次

頁
2.6.3 薬理試験概要表 4
2.6.3.1 薬理試験 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.3.2.1 *In vitro*薬理作用 6
2.6.3.2.2 標的組織 8
2.6.3.2.3 *In vivo*薬理作用 9
2.6.3.3 副次的薬理試験 10
2.6.3.4 安全性薬理試験 10
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 10

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験

一覧表　被験物質：Nemolizumab又はBM095

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTDにおける記載箇所
効力を裏付ける試験					
*In vitro*薬理作用					
表面プラズモン共鳴によるCIM331の解離定数測定	表面プラズモン共鳴	*In vitro*	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-5109	4.2.1.1-1
BaF/cyNR10cyOSMR-401, HNT15, CNT13のIL-31反応性確認	BaF/cyNR10cyOSMR-401細胞 HNT15細胞、CNT13細胞	*In vitro*	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-0208S	4.2.1.1-2
BaF/2C6/16のIL-31依存性細胞増殖に対するCIM331の中和活性の評価	BaF/2C6/16細胞	*In vitro*	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-5133	4.2.1.1-3
A549細胞におけるIL-31シグナリングに対するCH5427227の中和活性評価	A549細胞	*In vitro*	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-0004S	4.2.1.1-4
ケラチノサイトにおけるIL-31誘導性反応に対するCIM331の効果	HaCaT細胞	*In vitro*	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-5117	4.2.1.1-5
OSM, IL-6, LIF により誘導されるヒトTF-1細胞増殖に対するCIM331の交差反応性の検討	TF-1細胞	*In vitro*	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-5131	4.2.1.1-6
表面プラズモン共鳴によるFcγレセプターに対するCIM331の結合活性	表面プラズモン共鳴	*In vitro*	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-5105	4.2.1.1-7
CIM331に対するC1qの結合活性の評価	酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）	*In vitro*	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-5138	4.2.1.1-8
Evaluation of the ability of CIM331 to induce ADCC, CDC and direct cell death	A549 IL-31RA #31細胞 BALL-1細胞	*In vitro*	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-0162	4.2.1.1-9
標的組織					
ヒトアトピー性皮膚炎組織におけるIL-31RA局在の解析	アトピー性皮膚炎（AD）患者皮膚組織	*In vitro*	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-5130	4.2.1.1-10
*In vivo*薬理作用					

一覧表 被験物質：Nemolizumab又はBM095

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTDにおける記載箇所
効力を裏付ける試験					
Effect of intravenous administration of CIM331 on cynomolgus IL-31-induced pruritus in cynomolgus monkey	カニクイザル	静脈内	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-0208	4.2.1.1-11
カニクイザルにおけるIL-31 誘導性そう痒に及ぼすCH5427227皮下投与の影響	カニクイザル	皮下	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-5004	4.2.1.1-12
ダニ抗原誘発アトピー性皮膚炎モデルに及ぼすBM095の影響	マウス	静脈内	中外製薬株式会社	PHM[redacted]-0248S	4.2.1.1-13
副次的薬理試験					
Nemolizumabの定常領域を介した作用は効力を裏付ける試験の項にまとめて記載した。					
安全性薬理試験					
安全性薬理試験は実施しなかったが、カニクイザルを用いた26週間反復皮下投与毒性試験の中で、安全性薬理パラメータ（中枢神経系（神経行動学的機能観察）、心血管系（心電図及び血圧測定）及び呼吸系（呼吸数測定））の評価を行った。					
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なかった。					

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 *In vitro*薬理作用

試験項目	試験方法	試験結果	試験番号	CTDにおける記載箇所
表面プラズモン共鳴によるCIM331の解離定数測定	ヒト及びカニクイザル可溶型インターロイキン（IL）-31受容体A（IL-31RA）に対するnemolizumabの解離定数（K_D）を表面プラズモン共鳴法により測定した。	Nemolizumabはヒト及びカニクイザルの可溶型IL-31RAに高い親和性をもって結合し、ヒト及びカニクイザル可溶型IL-31RAに対するK_Dはそれぞれ0.374 nmol/L及び0.191 nmol/Lであった。	PHM[redacted]-5109	4.2.1.1-1
BaF/cyNR10cyOSMR-401, HNT15, CNT13のIL-31反応性確認	ヒト又はカニクイザルIL-31RAを発現させた組換え細胞を用いて、これらの細胞へのIL-31の結合に対するnemolizumabの作用をCell ELISA法により評価した。また、カニクイザルIL-31RA及びカニクイザルオンコスタチンM受容体（OSMR）を発現させた組換え細胞を用いて、カニクイザルIL-31依存的な細胞増殖に対するnemolizumabの作用を評価した。	NemolizumabはIL-31RA発現細胞へのヒトIL-31又はカニクイザルIL-31の結合を濃度依存的に阻害した。また、nemolizumabはカニクイザルIL-31RA及びOSMR発現組換え細胞のカニクイザルIL-31依存的な細胞増殖を濃度依存的に阻害した。	PHM[redacted]-0208S	4.2.1.1-2
BaF/2C6/16のIL-31依存性細胞増殖に対するCIM331の中和活性の評価	ヒトIL-31RA及びヒトOSMRを発現させた組換え細胞を用いて、ヒトIL-31依存的な細胞増殖に対するnemolizumabの作用を評価した。	NemolizumabはヒトIL-31RA及びOSMR発現組換え細胞のヒトIL-31依存的な細胞増殖を濃度依存的に阻害した。	PHM[redacted]-5133	4.2.1.1-3
A549細胞におけるIL-31シグナリングに対するCH5427227の中和活性評価	A549細胞を用いて、ヒトIL-31刺激により誘導されるシグナル伝達性転写因子（STAT）3のリン酸化に対するnemolizumabの作用を評価した。	NemolizumabはヒトIL-31刺激により誘導されるSTAT3のリン酸化を濃度依存的に阻害した。	PHM[redacted]-0004S	4.2.1.1-4

試験項目	試験方法	試験結果	試験番号	CTDにおける記載箇所
ケラチノサイトにおけるIL-31誘導性反応に対するCIM331の効果	HaCaT細胞を用いて、IFN-γ存在下でIL-31刺激により誘導されるIL-6、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-1、MMP-3産生及びアポトーシスに対するnemolizumabの作用を評価した。培養上清中のIL-6、MMP-1、MMP-3量はELISA法で、アポトーシスは細胞のcaspase 3/7活性を測定することで評価した。	NemolizumabはIL-31刺激により誘導されるIL-6、MMP-1、MMP-3産生及びアポトーシスを濃度依存的に抑制した。	PHM[redacted]-5117	4.2.1.1-5
OSM, IL-6, LIF により誘導されるヒトTF-1細胞増殖に対するCIM331の交差反応性の検討	IL-6、オンコスタチンM（OSM）及び白血球遊走阻止因子（LIF）依存的なTF-1細胞の増殖に対するnemolizumabの作用を評価した。	NemolizumabはIL-6及びOSM依存的なTF-1細胞の増殖に対して影響を及ぼさなかった。LIF依存的なTF-1細胞の増殖に対する影響に関しては、明確な結論が得られなかった。	PHM[redacted]-5131	4.2.1.1-6
表面プラズモン共鳴によるFcγレセプターに対するCIM331の結合活性	ヒト及びカニクイザルFcγ受容体（FcγR）に対するnemolizumab、panitumumab及びrituximabの結合を表面プラズモン共鳴法により測定した。	ヒトFcγRに対するnemolizumabの結合はpanitumumabに比べてほぼ同等又は弱く、rituximabに比べても弱かった。カニクイザルFcγRに対するnemolizumabの結合はpanitumumabに比べて同等又は弱かったが、rituximabと比べた場合、FcγR Ia、IIIa (S)、IIIa (R)では弱かったものの、FcγR IIa1、IIa2、IIa3、IIbでは同等又は若干強かった。	PHM[redacted]-5105	4.2.1.1-7
CIM331に対するC1qの結合活性の評価	Nemolizumab、panitumumab及びrituximabのヒトC1qに対する結合活性をELISA法により測定した。	NemolizumabのC1qに対する結合はpanitumumabと同程度であり、rituximabに比べて弱かった。	PHM[redacted]-5138	4.2.1.1-8

試験項目	試験方法	試験結果	試験番号	CTDにおける記載箇所
Evaluation of the ability of CIM331 to induce ADCC, CDC and direct cell death	ヒトIL-31RAを過剰発現させたA549細胞を用いて、末梢血単核細胞（PBMC）存在下又は非存在下におけるnemolizumab又はcetuximabの抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性及びdirect cell death誘導能を評価した。また、ヒトIL-31RA過剰発現A549細胞又はBALL-1細胞を用いて、ヒト血清存在下におけるnemolizumab又はrituximabの補体依存性細胞傷害（CDC）活性を評価した。細胞死の指標として培養上清中の乳酸脱水素酵素活性を測定した。	CetuximabはPBMC存在下でIL-31RA過剰発現A549細胞に対するADCC活性を示した。一方、nemolizumabのADCC活性は認められなかった。RituximabはBALL-1細胞に対するCDC活性を示したが、nemolizumabのIL-31RA過剰発現A549細胞に対するCDC活性は認められなかった。Cetuximab又はnemolizumabの単独処理ではIL-31RA過剰発現A549細胞に対するdirect cell death誘導能は認められなかった。	PHM[redacted]-0162	4.2.1.1-9

2.6.3.2.2 標的組織

試験項目	試験方法	試験結果	試験番号	CTDにおける記載箇所
ヒトアトピー性皮膚炎組織におけるIL-31RA局在の解析	AD患者の病変部局所組織のIL-31RAの局在を免疫組織化学的染色により評価した。	AD患者の病変部局所組織の神経終末においてIL-31RAに対する陽性反応が認められた。	PHM[redacted]-5130	4.2.1.1-10

2.6.3.2.3 *In vivo*薬理作用

試験項目	試験方法	試験結果	試験番号	CTDにおける記載箇所
Effect of intravenous administration of CIM331 on cynomolgus IL-31-induced pruritus in cynomolgus monkey	同一個体のカニクイザルに3、10、40、60及び100 μg/kgのnemolizumabを段階的に静脈内投与し、血漿中濃度を増加させた。各用量でのnemolizumab投与の翌日に1 μg/kgのIL-31を静脈内投与し、IL-31誘発によるそう痒行動回数を計測した。	IL-31の静脈内投与によりそう痒行動回数の著しい増加が認められた。NemolizumabはこのIL-31誘発そう痒行動に対して40 μg/kg（投与翌日の平均血漿中濃度は710 ng/mL）及びそれ以上の投与量で明らかな抑制作用を示した。	PHM[redacted]-0208	4.2.1.1-11
カニクイザルにおけるIL-31誘導性そう痒に及ぼすCH5427227皮下投与の影響	カニクイザルに1 mg/kgのnemolizumabを皮下投与し（day 0）、血漿中nemolizumab濃度（day 2、4、28及び56）及び血漿中抗nemolizumab抗体価（day 28及びday 56）を測定した。Day 28及び56に1 μg/kgのIL-31を静脈内投与し、IL-31誘発によるそう痒行動回数を計測した。	NemolizumabはDay 28においてIL-31誘発そう痒行動を有意に抑制した。Day 56においては、抗nemolizumab抗体価が陽性となった個体を含む全例解析ではIL-31誘発そう痒行動に対する有意な抑制作用は認められなかったが、抗nemolizumab抗体価が陽性で血漿中nemolizumab濃度が定量下限未満となった個体を除いた解析では、day 56においてもIL-31誘発そう痒行動を有意に抑制した。	PHM[redacted]-5004	4.2.1.1-12
ダニ抗原誘発アトピー性皮膚炎モデルに及ぼすBM095の影響	NC/Ngaマウスの右耳介にダニ抗原を週3回、3週間皮内投与して皮膚炎を誘発した。抗原感作開始と同時に20 mg/kgの抗マウスIL-31RAモノクローナル抗体（BM095）を週2回の頻度で計7回静脈内投与した。経日的に耳介厚、皮膚炎スコア、掻き動作の総数を測定した。	BM095はダニ抗原誘発ADモデルマウスにおいて、掻き動作総数を低下させるとともに、皮膚炎の悪化を抑制した。	PHM[redacted]-0248S	4.2.1.1-13

2.6.3.3 副次的薬理試験

Nemolizumabの定常領域を介した作用は効力を裏付ける試験の項にまとめて記載した。

2.6.3.4 安全性薬理試験

独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、カニクイザルを用いた26週間反復皮下投与毒性試験の中で、安全性薬理学的パラメータ（中枢神経系（神経行動学的機能観察）、心血管系（心電図及び血圧測定）及び呼吸系（呼吸数測定））の評価を行った。その結果、反復皮下投与による25 mg/kgまでの用量で、いずれの安全性薬理学的パラメータにも、nemolizumabに関連した異常は認められず、更に病理組織学的検査においても、nemolizumabに関連した異常は認められなかった。

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は実施しなかった。