

ナノゾラ皮下注 (オゾラリズムブ)

CTD 第 2 部

2.6.1 緒言

大正製薬株式会社

目次

2.6.1 緒言	3
----------------	---

図

図 2.6.1-1 オゾラリズマブの構造模式図（推定）	3
-----------------------------------	---

略号一覧

略号	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
CDR	complementarity determining region	相補性決定領域
Fc	crystallizable fragment	結晶化可能フラグメント
HSA	human serum albumin	ヒト血清アルブミン
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
RA	rheumatoid arthritis	関節リウマチ
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
VH	heavy chain variable region	重鎖可変領域

2.6.1 緒言

オゾラリズマブはアブリリンクス社が創製した新規 TNF 阻害薬であり、ラマ由来重鎖抗体の可変領域から作製した単ドメイン抗体を構成成分とする三量体構造の融合蛋白質である（低分子抗体）。オゾラリズマブは、二つの抗ヒト TNF α ヒト化単ドメイン抗体と一つの抗 HSA ヒト化単ドメイン抗体を 9 アミノ酸からなる 2 本のグリシン-セリンリンカーで連結した構造を有し、分子量は約 38000 である。既存の抗 TNF 抗体も含め、これまでに開発された多くの抗体医薬品は IgG 構造を持つが、オゾラリズマブは三つの CDR を含む一つの結合領域のみで抗原認識ができる、分子量が小さい、Fc 領域を持たないといった IgG 抗体とは異なる特徴を持つ。さらに、オゾラリズマブを構成する単ドメイン抗体は、ヒト免疫グロブリンの VH と高い相同性を有するようにヒト化されており免疫原性が低いことが予想される。オゾラリズマブの推定模式図を図 2.6.1-1 に示す。

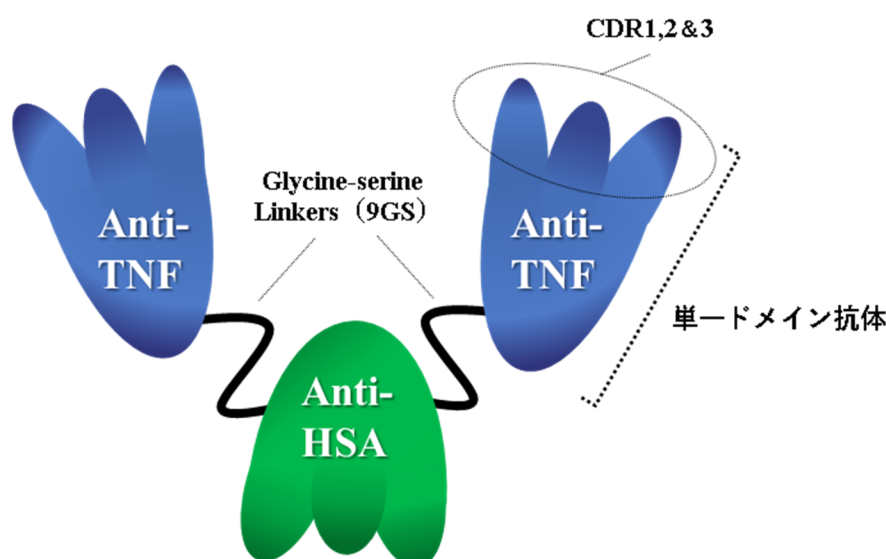


図 2.6.1-1 オゾラリズマブの構造模式図（推定）

オゾラリズマブは TNF α に高い結合親和性を示し、TNF 受容体に対する TNF α の結合を阻害することによりその生理活性を中和する。TNF α は RA の病態に関与することが報告されている炎症性サイトカインの一種であり^{1,2}、抗 TNF 抗体や可溶性 TNF 受容体などの TNF 阻害薬は、TNF の作用を阻害することにより、RA 患者の症状の軽減、関節破壊の進展抑制及び身体機能改善を示すことが報告されている³。

オゾラリズマブは HSA にも高い結合親和性を示す。オゾラリズマブのマウスサロゲート抗体は、アルブミン結合により血中半減期を延長し、さらに炎症部位への集積性を向上させることによりマウス関節炎モデルで優れた薬効を示すことが明らかとなっている⁴。本剤もアルブミン結合による動態改善により、RA 患者に対し優れた薬効を示すことが期待される。

本剤の予定する効能・効果及び用法・用量は以下のとおりである。

[効能・効果]

既存治療で効果不十分な関節リウマチ

[用法・用量]

通常、成人にはオゾラリズマブ（遺伝子組換え）として1回30 mgを4週間の間隔で皮下投与する。

参考文献

- ¹ Fedmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:397-440.
- ² Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today.* 1997;18:487-92.
- ³ Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008;117:244-79.
- ⁴ Coppieters K, Dreier T, Silence K, de Haard H, Lauwereys M, Casteels P, et al. Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:1856-66.

ナノゾラ皮下注 (オゾラリズムブ)

CTD 第 2 部

2.6.2 薬理試験の概要文

大正製薬株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文	4
2.6.2.1 まとめ	4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験	5
2.6.2.3 副次的薬理試験	15
2.6.2.4 安全性薬理試験	15
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験	16
2.6.2.6 考察及び結論	16
2.6.2.7 図表	17
2.6.2.8 参考文献	17

表

表 2.6.2-1 オゾラリズマブのヒト及びアカゲザルの TNF α との結合親和性	6
表 2.6.2-2 オゾラリズマブの各種血清アルブミンとの結合親和性	7
表 2.6.2-3 TNF α 誘発細胞傷害に対する各種 TNF 阻害薬の抑制作用 (IC ₅₀ 値, pmol/L)	9

図

図 2.6.2-1 オゾラリズマブに対するヒト及びアカゲザル TNF α の結合センサーグラム	5
図 2.6.2-2 各種血清アルブミンに対するオゾラリズマブの結合センサーグラム	7
図 2.6.2-3 細胞表面の膜結合型 TNF α に対するオゾラリズマブの結合能	8
図 2.6.2-4 TNF α 誘発細胞傷害に対する各種 TNF 阻害薬の抑制作用	9
図 2.6.2-5 マウス空気嚢モデルにおける TNF α 誘発細胞浸潤 (総細胞数) に対する作用	10
図 2.6.2-6 マウス空気嚢モデルにおける TNF α 誘発細胞浸潤 (好中球数) に対する作用	11
図 2.6.2-7 Tg197 マウスの肉眼的関節炎スコアに対するオゾラリズマブ及び インフリキシマブの影響	12
図 2.6.2-8 Tg197 マウスの病理組織学的関節炎スコアに対するオゾラリズマブ及び インフリキシマブの影響	13
図 2.6.2-9 膜結合型 TNF α 発現 NS0 細胞に対する ADCC 活性誘導作用	14
図 2.6.2-10 膜結合型 TNF α 発現 CHO 細胞に対する CDC 活性誘導作用	15

略号一覧

略号	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
CDC	complement dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester	カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル
C_{5min}	plasma concentration at 5 minutes	投与 5 分後の血漿中濃度
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
Fc	crystallizable fragment	結晶化可能フラグメント
IC ₅₀	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
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
PE	phycoerythrin	フィコエリスリン
QTc	corrected QT interval	QT 間隔の補正值
RA	rheumatoid arthritis	関節リウマチ
RU	resonance unit	-
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

オゾラリズマブはラマ由来重鎖抗体の可変領域を結合させた新規抗ヒト TNF α モノクローナル抗体であり、TNF 受容体に対する TNF α の結合を阻害することによりその活性を中和する。オゾラリズマブは二つのヒト TNF α と一つのヒト血清アルブミンにそれぞれ特異的かつ高親和性に結合する単ドメイン抗体から構成される三量体構造を有する（低分子抗体）。

効力を裏付ける *in vitro* 試験として、表面プラズモン共鳴法を用いてオゾラリズマブの結合親和性を解析した結果、オゾラリズマブはヒト及びアカゲザルの TNF α と高い結合親和性を示したが、マウス、ラット及びウサギの TNF α との結合親和性は非常に低かった。さらにオゾラリズマブは、ヒト及びアカゲザルの血清アルブミンに対しマウス及びラットの血清アルブミンより高い結合親和性を示した。フローサイトメトリー法を用いて膜結合型 TNF α に対する結合活性を検討した結果、オゾラリズマブは膜結合型 TNF α に結合した。TNF α 誘発細胞傷害試験においてオゾラリズマブは TNF α で誘導される細胞死を抑制した。効力を裏付ける *in vivo* 試験としてマウス空気嚢モデルを用いてヒト TNF α 誘発細胞浸潤に対する抑制作用を検討した結果、オゾラリズマブは細胞浸潤を抑制した。また、ヒト TNF 遺伝子導入マウスを用いて関節炎抑制作用を検討した結果、オゾラリズマブは関節炎スコアを抑制した。膜結合型 TNF α 発現細胞を用いて ADCC 活性並びに CDC 活性を検討した結果、オゾラリズマブは、ADCC 活性及び CDC 活性を誘導しなかった。

安全性薬理試験として、中枢神経系、呼吸系及び心血管系に対するオゾラリズマブの影響を検討した。中枢神経系及び呼吸系については、カニクイザルの 5 週間皮下及び静脈内反復投与毒性試験の中で評価した。心血管系への影響については、カニクイザルを用いた心血管安全性薬理試験で評価した。中枢神経系及び呼吸系では、オゾラリズマブをカニクイザルに最高 150 mg/kg/週の用量で 5 週間皮下及び静脈内に投与した結果、オゾラリズマブ投与に関連した影響は認められなかった。心血管系では、テレメトリー送信器を埋め込んだカニクイザルにオゾラリズマブを 150 mg/kg の用量で単回静脈内投与した結果、心拍数、血圧及び心電図にオゾラリズマブ投与に関連した影響は認められなかった。

副次的薬理試験及び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 結合親和性

2.6.2.2.1.1 TNF α に対する結合親和性

資料番号 4.2.1.1-1

各種TNF α に対するオゾラリズマブの結合親和性を、表面プラズモン共鳴法を用いて解析した。オゾラリズマブをセンサーチップ表面に 20~50 RU の密度で固相化し、流路系には 0.195~100 nmol/L のヒト又はアカゲザル TNF α を注入した。TNF α のオゾラリズマブに対する結合は各 TNF α 濃度に依存的であり、飽和に達した。また、最高濃度では平衡状態に達した (図 2.6.2-1)。オゾラリズマブはヒト及びアカゲザル TNF α に対して近似した k_a 及び k_d を示し、ヒト TNF α に対する K_d 値は 20.2 pmol/L、アカゲザル TNF α に対する K_d 値は 16.1 pmol/L であり、同程度の結合親和性を示した (表 2.6.2-1)。

一方、マウス、ラット及びウサギの TNF α は低密度のオゾラリズマブ (20~50 RU) に結合しなかった。高密度のオゾラリズマブ (250~400 RU) では弱い反応シグナルがみられ平衡状態に達したが、飽和には達しなかった

以上から、オゾラリズマブはヒト及びアカゲザル TNF α に対して高い結合親和性を示した。一方、オゾラリズマブは、マウス、ラット及びウサギ TNF α に対して非常に低い結合親和性を示した。

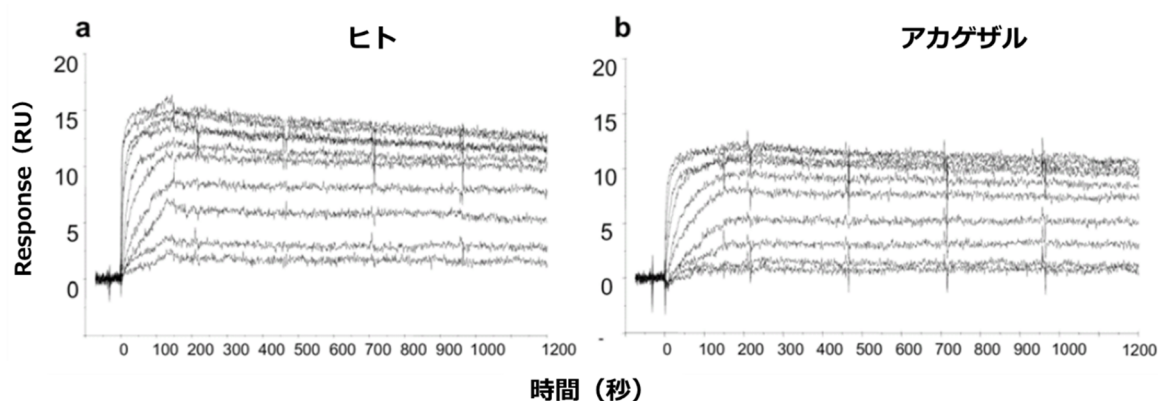


図 2.6.2-1 オゾラリズマブに対するヒト及びアカゲザル TNF α の結合センサーグラム

センサーチップ表面に固相化したオゾラリズマブに対し、(a) ヒトTNF α 又は (b) アカゲザルTNF α を0.195~100 nmol/Lで反応させた。

表 2.6.2-1 オゾラリズマブのヒト及びアカゲザルの TNF α との結合親和性

TNF α	k_a ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d (pmol/L)
ヒト	6.04×10^6	12.4×10^{-5}	20.2
アカゲザル	4.76×10^6	7.68×10^{-5}	16.1

 $K_d = k_d / k_a$

平均値 (n=2 以上)

2.6.2.2.1.2 血清アルブミンに対する結合親和性

資料番号 4.2.1.1-1

各種血清アルブミンに対するオゾラリズマブの結合親和性を、表面プラズモン共鳴法を用いて解析した。ヒト、アカゲザル、マウス又はラットの血清アルブミンをセンサーチップ表面に 200～450 RU の密度で固相化し、流路系には 0.097～16000 nmol/L のオゾラリズマブを注入した。その結果、オゾラリズマブは、いずれの種の血清アルブミンに対しても飽和状態に達するまで結合し、高濃度では平衡状態に達した（図 2.6.2-2）。

オゾラリズマブは、ヒト及びアカゲザルの血清アルブミンに対してほぼ同程度の k_a 及び k_d で結合し、ヒト血清アルブミンに対する K_d 値は 4.28 nmol/L、アカゲザル血清アルブミンに対する K_d 値は 4.46 nmol/L であり、両血清アルブミンに対して同程度の結合親和性を示した（表 2.6.2-2）。オゾラリズマブは、マウス及びラットの血清アルブミンにヒト血清アルブミンと同程度の k_a で結合したが、 k_d はヒト血清アルブミンと比較して大きく、解離が速かった。マウス及びラットの血清アルブミンに対するオゾラリズマブの K_d 値は、それぞれ 92.2 及び 1607 nmol/L であり、ヒト血清アルブミンと比較して、マウス及びラット血清アルブミンに対するオゾラリズマブの親和性は低かった。

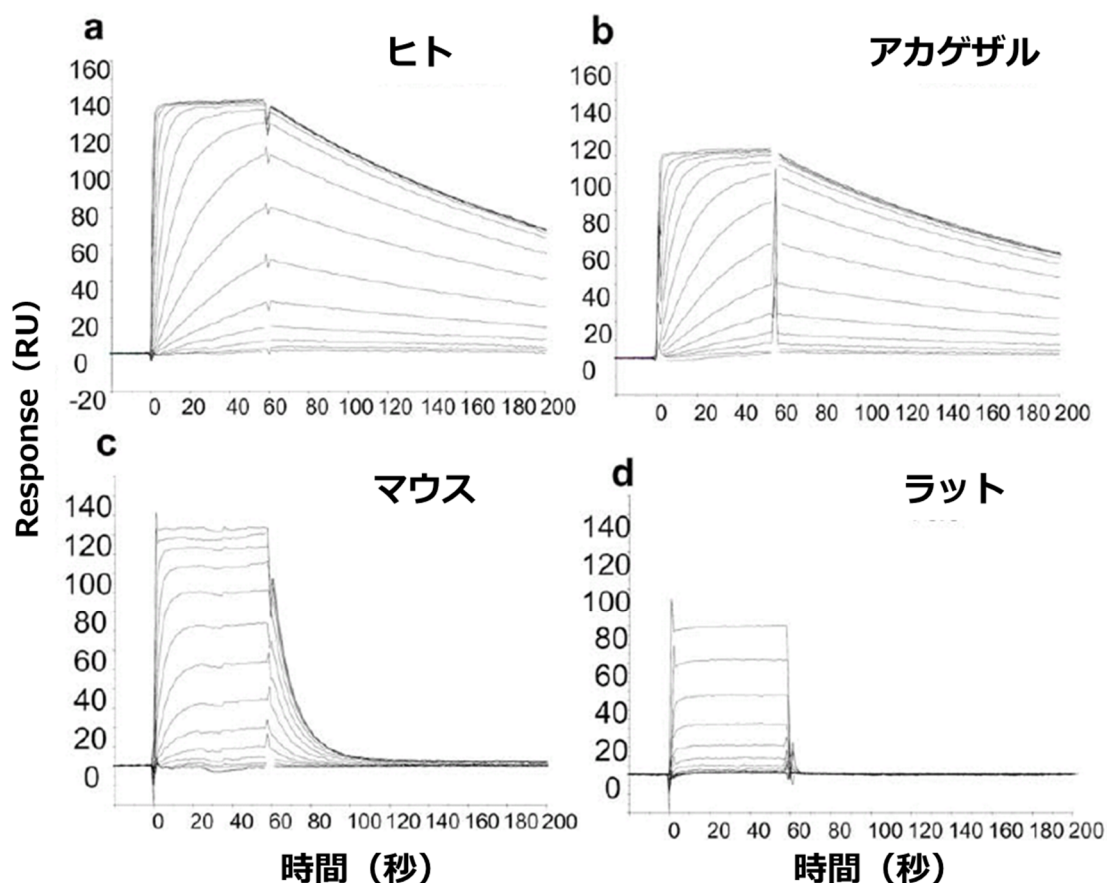


図 2.6.2-2 各種血清アルブミンに対するオゾラリズマブの結合センサーグラム

センサーチップ表面に固相化した (a) ヒト、(b) アカゲザル、(c) マウス及び (d) ラットの血清アルブミンに対し、オゾラリズマブを0.097～16000 nmol/Lの濃度で反応させた。

表 2.6.2-2 オゾラリズマブの各種血清アルブミンとの結合親和性

血清アルブミン	k_a ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d (nmol/L)
ヒト	$10.6 \pm 1.13 \times 10^5$	$0.451 \pm 0.013 \times 10^{-2}$	4.28 ± 0.46
アカゲザル	$10.1 \pm 1.05 \times 10^5$	$0.447 \pm 0.01 \times 10^{-2}$	4.46 ± 0.51
マウス	$8.72 \pm 1.95 \times 10^5$	$7.78 \pm 0.289 \times 10^{-2}$	92.2 ± 19.6
ラット	$4.32 \pm 1.31 \times 10^5$	$66.3 \pm 13.8 \times 10^{-2}$	1607 ± 487

$$K_d = k_d / k_a$$

平均値±標準偏差 (n=3 以上)

2.6.2.2.1.3 膜結合型 TNF α に対する結合活性

資料番号 4.2.1.1-2

膜結合型ヒト TNF α を発現させた CHO 細胞 (TNF α 発現 CHO 細胞) とビオチン標識オゾラリズマブを用いて、フローサイトメトリー法により膜結合型 TNF α に対するオゾラリズマブの結合活性を解析した。なお、CHO 細胞に発現させた膜結合型 TNF α には K87E 変異を導入し、プロテアーゼのペプチド結合切断による TNF α の遊離を防止した。

PE 標識抗ヒト TNF α 抗体を用いた検討により、TNF α 発現 CHO 細胞における膜結合型 TNF α 発現が確認された (図 2.6.2-3、A 列)。TNF α 発現 CHO 細胞株にビオチン標識オゾラリズマブを添加すると、細胞表面にオゾラリズマブの結合が確認された一方、親株 CHO 細胞ではオゾラリズマブの結合は確認されなかった (図 2.6.2-3、B 列)。

以上から、オゾラリズマブは膜結合型 TNF α に結合することが確認された。

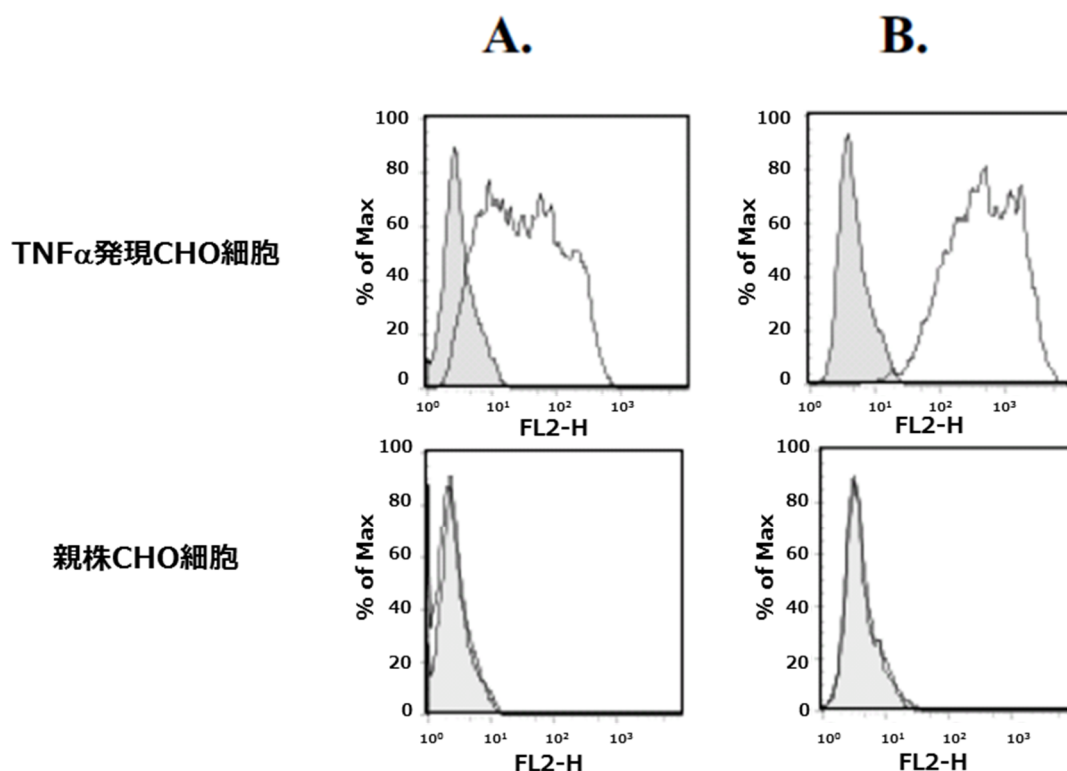


図 2.6.2-3 細胞表面の膜結合型 TNF α に対するオゾラリズマブの結合能

- (A) PE標識抗ヒトTNF α 抗体 (白色部分) 又はPE標識アイソタイプコントロールIgG1 (灰色部分) のヒストグラム
- (B) ビオチン標識オゾラリズマブ添加 (白色部分) と非添加 (灰色部分) にて、ストレプトアビジン-PEを添加後のヒストグラム

2.6.2.2.2 TNF α 誘発細胞傷害抑制作用

資料番号 4.2.1.1-3

TNF α は標的細胞表面の TNF 受容体に結合してその生理活性を示す。L929 マウス線維芽細胞（L929 細胞）は TNF α に感受性が高く、濃度依存的に細胞死が誘導される。そこで L929 細胞を用いて TNF α 誘発細胞死に対するオゾラリズマブの作用を TNF 阻害薬エタネルセプト、アダリムマブ及びインフリキシマブと比較した。

培養プレート中の L929 細胞にヒト又はアカゲザル TNF α 及びオゾラリズマブ、エタネルセプト、アダリムマブ又はインフリキシマブを添加し、培養液中 37℃、5%CO₂ で 24 時間培養した。培養液を除去した後、生細胞を WST-1 試薬で染色し、マイクロプレートリーダーで吸光度（405 nm）を測定して生細胞率を求めた。なお、TNF α はヒト又はアカゲザル TNF α （0.5 ng/mL）を用いた。

オゾラリズマブはヒト及びアカゲザル TNF α で誘導される細胞死を濃度依存的に抑制し（図 2.6.2-4）、その IC₅₀ 値はヒト TNF α に対して 22.5 pmol/L、アカゲザルの TNF α に対して 9.6 pmol/L と、他の TNF 阻害薬の IC₅₀ 値よりも低値であった（表 2.6.2-3）。

以上から、オゾラリズマブは TNF α と結合し、TNF α の生理活性を中和することが確認された。

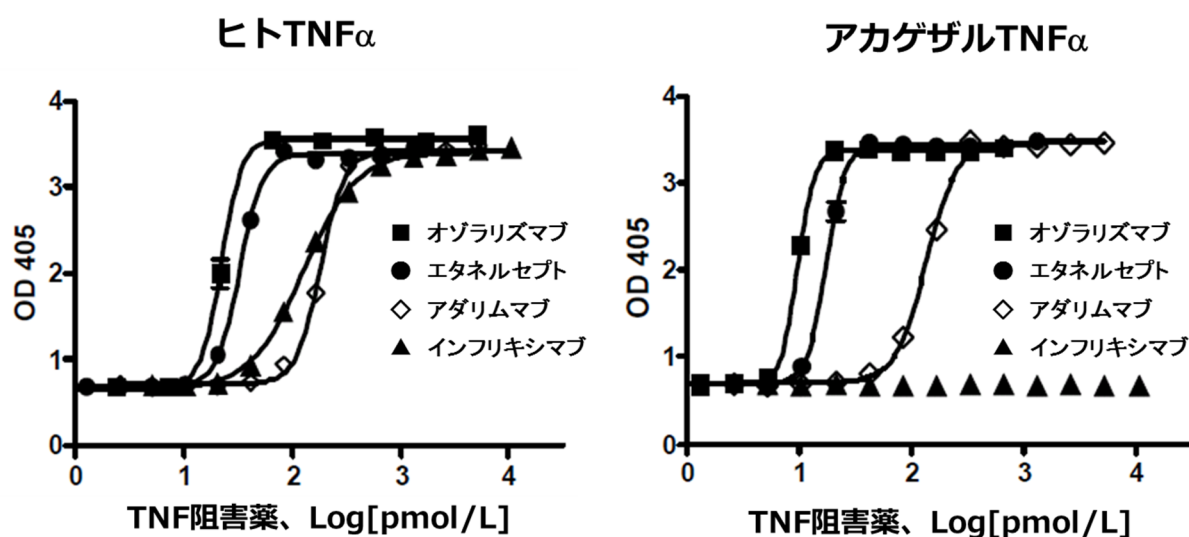


図 2.6.2-4 TNF α 誘発細胞傷害に対する各種 TNF 阻害薬の抑制作用

表 2.6.2-3 TNF α 誘発細胞傷害に対する各種 TNF 阻害薬の抑制作用（IC₅₀ 値, pmol/L）

TNF α	オゾラリズマブ (標準偏差)	エタネルセプト (標準偏差)	アダリムマブ (標準偏差)	インフリキシマブ (標準偏差)
ヒト	22.5 (0.8)	33.3 (1.1)	184 (6.3)	128.5 (5.5)
アカゲザル	9.6	17.3	135	反応せず

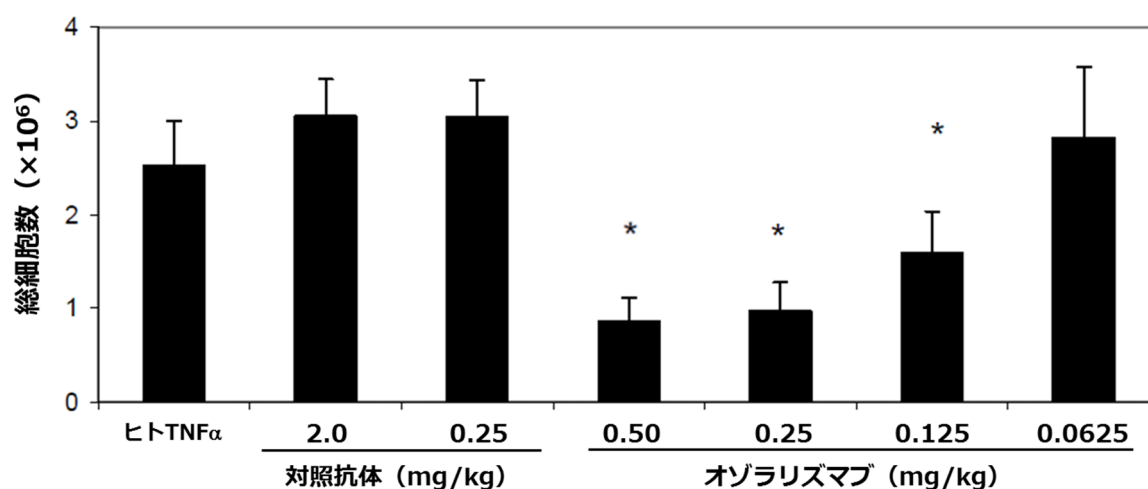
代表値 ヒト TNF α : n=3、アカゲザル TNF α : n=2

2.6.2.2.3 マウス空気嚢モデル細胞浸潤に対する抑制作用

資料番号 4.2.1.1-4

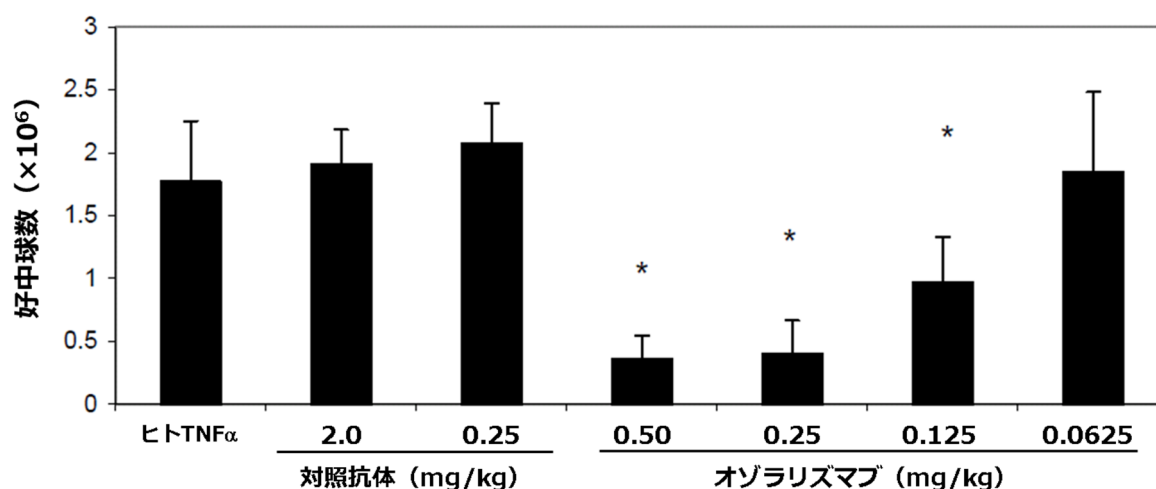
in vivo におけるオゾラリズマブの抗 $\text{TNF}\alpha$ 作用についてマウス空気嚢モデルを用いて検討した。8～10 週齢の雌 BALB/c マウスの背部皮下に空気を注入することにより空気嚢を作製し、5 日後にオゾラリズマブ (0.0625、0.125、0.25 及び 0.5 mg/kg) 又は等モル濃度で調製した対照抗体 (0.25、0.5、1 及び 2 mg/kg 抗破傷風トキソイド IgG1) を腹腔内投与した。投与翌日にヒト $\text{TNF}\alpha$ を空気嚢に注入し、6 時間後にマウスを解剖して、空気嚢から回収された総細胞数及び好中球数を計測した。

オゾラリズマブは、0.125 mg/kg 以上で対照抗体投与群に対しヒト $\text{TNF}\alpha$ 注入後の総細胞数及び好中球数の増加を有意に抑制したことから、ヒト $\text{TNF}\alpha$ で誘発される細胞浸潤を抑制することが確認された (図 2.6.2-5、図 2.6.2-6)。



* : $p < 0.05$ 、対照抗体投与群との比較 (Student の t 検定) $n=8$

図 2.6.2-5 マウス空気嚢モデルにおける $\text{TNF}\alpha$ 誘発細胞浸潤 (総細胞数) に対する作用



* : $p < 0.05$ 、対照抗体投与群との比較 (Student の t 検定) $n=8$

図 2.6.2-6 マウス空気嚢モデルにおける TNF α 誘発細胞浸潤 (好中球数) に対する作用

2.6.2.2.4 ヒト TNF 遺伝子導入マウスの関節炎に対する抑制作用

資料番号 4.2.1.1-5

オゾラリズマブはヒト TNF α に特異的であること (2.6.2.2.1.1) 及びヒト TNF α はマウス TNF 受容体に結合可能であることから、ヒト TNF 遺伝子を導入したマウス (以下 Tg197 マウス) で認められる RA 病態に対するオゾラリズマブの作用を検討した。Tg197 マウスでは関節軟骨を含む様々な組織でヒト TNF α が発現し、4~7 週齢で慢性の多発性関節炎を発症する。

6 週齢の雌雄 Tg197 マウスにオゾラリズマブ (0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10 mg/kg) 又はインフリキシマブ (3 及び 10 mg/kg) を週 2 回、7 週間腹腔内投与した。対照として対照抗体 (抗破傷風トキソイド IgG1、10 mg/kg) 及び溶媒 (リン酸緩衝生理食塩水) 投与群を設けた。各投与群の例数は 8 匹、試験開始時群のみ 4 匹とした。投与開始後、各週の肉眼的関節炎スコアを評価した。肉眼的関節炎スコアは、肉眼所見による両後肢関節の腫脹、歪み、変形及び屈曲の程度に応じて 0、0.5、1、1.5、2、2.5 又は 3 点で評価した。投与 7 週後に両後肢関節から得られた切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、病理組織学的関節炎スコアを評価した。病理組織学的関節炎スコアは、病理組織学的所見により、滑膜過形成、好中球浸潤、パンヌス形成、線維化、軟骨破壊又は骨びらの程度に応じて 0、1、2、3 又は 4 点で評価した。

オゾラリズマブは、0.3 mg/kg 以上で対照抗体群に対し最終評価時の肉眼的関節炎スコアを有意に抑制した。一方、インフリキシマブは、3 mg/kg 以上で対照抗体群に対し最終評価時の肉眼的関節炎スコアを有意に抑制した (図 2.6.2-7)。また、オゾラリズマブは、0.3 mg/kg 以上で対照抗体群に対し病理組織学的関節炎スコアを有意に抑制した。一方、インフリキシマブは 10 mg/kg で対照抗体投与群に対し病理組織学的関節炎スコアを有意に抑制した (図 2.6.2-8)。

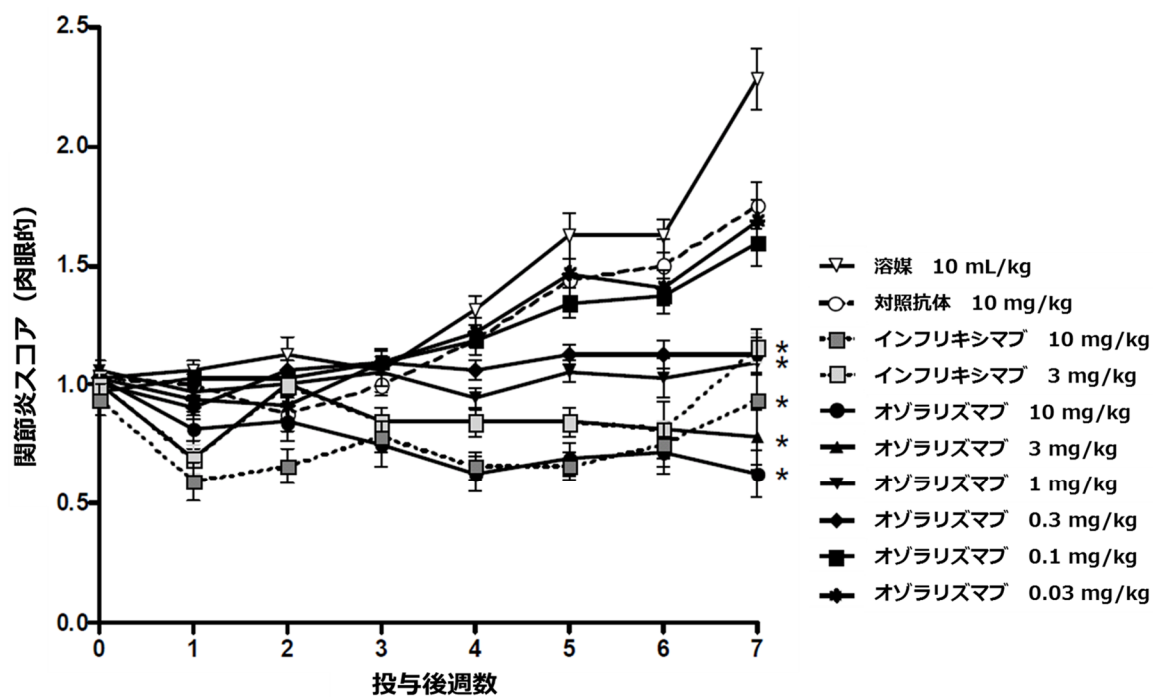
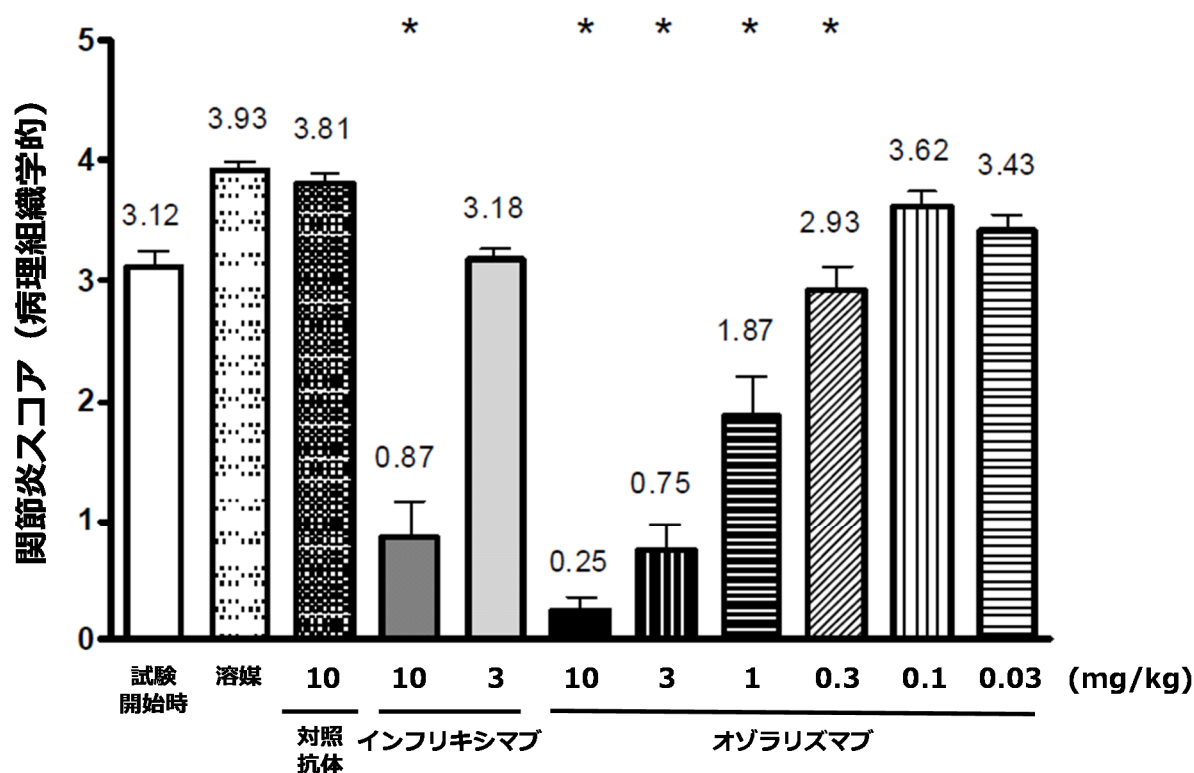


図 2.6.2-7 Tg197 マウスの肉眼的関節炎スコアに対するオゾラリズマブ及び
インフリキシマブの影響



平均値＋標準誤差

* : $p < 0.05$ 、対照抗体投与群との比較 (Tukey の多重比較検定)

図 2.6.2-8 Tg197 マウスの病理組織学的関節炎スコアに対するオゾラリズマブ及びインフリキシマブの影響

2.6.2.2.5 ADCC 活性及び CDC 活性

ADCC 活性及び CDC 活性は、細胞表面抗原に結合した抗体の Fc 領域がエフェクター細胞の Fcγ 受容体や補体と結合することで誘導される標的細胞傷害活性である。オゾラリズマブはその構造に Fc 領域を含まないことから、ADCC 活性及び CDC 活性を誘導しないと考えられる。そこでオゾラリズマブの ADCC 活性及び CDC 活性を検討し、Fc 領域を含む他の TNF 阻害薬と比較した。

2.6.2.2.5.1 膜結合型 TNFα 発現 NS0 細胞に対する ADCC 活性

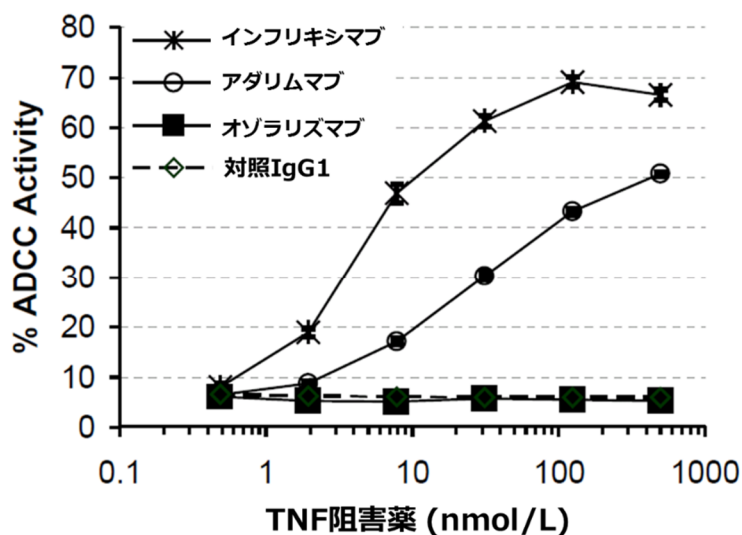
資料番号 4.2.1.1-6

オゾラリズマブの ADCC 活性の有無について膜結合型 TNFα 発現 NS0 マウス骨髄腫由来細胞 (TNFα 発現 NS0 細胞) を用いて検討し、Fcγ 受容体結合能を有するヒト IgG Fc 領域を含むインフリキシマブ及びアダリムマブと比較した。

オゾラリズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ又は対照 IgG1 抗体 (抗 HIV 抗体) 存在下で、CFSE 標識 TNFα 発現 NS0 細胞とエフェクター細胞 (ヒト NK 細胞) を 37℃ で 4 時間共培養

した。ADCC 活性は、各 TNF 阻害薬処理で惹起された死細胞を 7-Aminoactinomycin D 染色で検出し、CFSE 標識 TNF α 発現 NS0 細胞全体に対する死細胞の割合 (%) を求めて算出した。

オゾラリズマブは、膜結合型 TNF α 発現 NS0 細胞に対して ADCC 活性を誘導しなかったが、インフリキシマブ及びアダリムマブは ADCC 活性を誘導した (図 2.6.2-9)。



代表値

図 2.6.2-9 膜結合型 TNF α 発現 NS0 細胞に対する ADCC 活性誘導作用

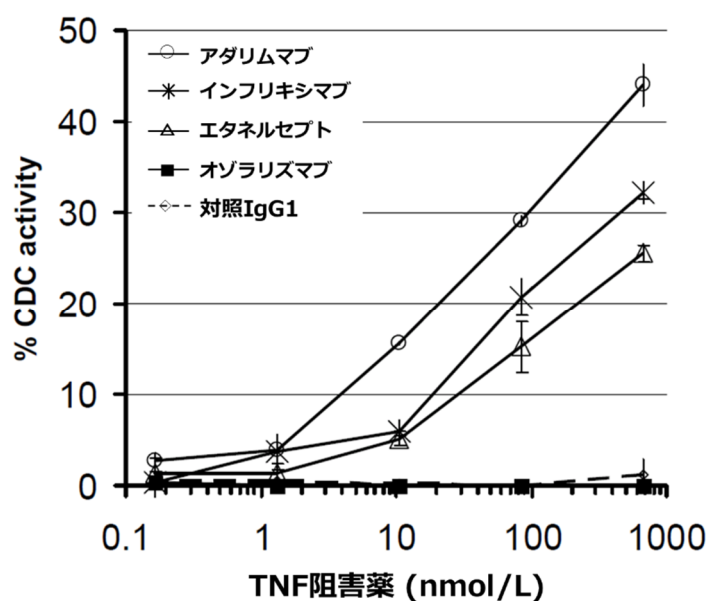
2.6.2.2.5.2 膜結合型 TNF α 発現 CHO 細胞に対する CDC 活性

資料番号 4.2.1.1-7

オゾラリズマブの CDC 活性の有無について膜結合型 TNF α 発現 CHO 細胞を用いて検討し、補体結合能を有するヒト IgG1 Fc 領域を含むアダリムマブ、インフリキシマブ及びエタネルセプトと比較した。

オゾラリズマブ、アダリムマブ、インフリキシマブ、エタネルセプト又は対照 IgG1 抗体 (抗 HIV 抗体) 存在下で、幼齢ウサギ由来補体を TNF α 発現 CHO 細胞に添加し、37℃で 3.5 時間共培養した。CDC 活性は、死細胞をヨウ素プロピジウム染色で検出し、各 TNF 阻害薬処理で惹起された死細胞数の割合を補体単独で誘発される死細胞の割合 (%) で補正して算出した。

オゾラリズマブは膜結合型 TNF α 発現 CHO 細胞に対して CDC 活性を誘導しなかったが、アダリムマブ、インフリキシマブ及びエタネルセプトはいずれも CDC 活性を誘導した (図 2.6.2-10)。



代表値

図 2.6.2-10 膜結合型 TNF α 発現 CHO 細胞に対する CDC 活性誘導作用

2.6.2.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

中枢神経系及び呼吸系に対する影響は、カニクイザルの 5 週間皮下及び静脈内反復投与毒性試験の中で評価した。心血管系に対する影響は、カニクイザルを用いた心血管安全性薬理試験で評価した。

2.6.2.4.1 中枢神経系及び呼吸系

資料番号 4.2.3.2-2

雌雄カニクイザル（各群 3～6 例）に週 1 回 5 週間、オゾラリズマブを 15 及び 150 mg/kg/週の用量で皮下投与、又は 15、50 及び 150 mg/kg/週の用量で静脈内投与した。対照群には、溶媒である $\blacksquare$ mmol/L L-ヒスチジン及び $\blacksquare$ %ショ糖を含む $\blacksquare$ %ポリソルベート 80 水溶液 (pH 約 $\blacksquare$) を皮下及び静脈内の両経路で投与した。中枢神経系及び呼吸系の評価は、試験前、試験 1 週及び 5 週、回復期間の 8 週（雄）又は 7 週（雌）に獣医学的評価にて実施した。

中枢神経系及び呼吸系に対して、150 mg/kg/週の用量までオゾラリズマブの皮下及び静脈内投与に関連した影響は認められなかった。

2.6.2.4.2 心血管系

資料番号 4.2.1.3-1

テレメトリー送信器を腹腔内に埋め込んだ無麻酔下の雌雄各 3 匹のカニクイザルにオゾラリズマブを 0 (対照群) 及び 150 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。試験 1 日目は溶媒を投与し、試験 8 日目にオゾラリズマブ (150 mg/kg) を投与した。対照群には、溶媒である $\blacksquare$ mmol/L L-ヒスチジン及び $\blacksquare$ %ショ糖を含む $\blacksquare$ %ポリソルベート 80 水溶液 (pH $\blacksquare$) を投与した。心拍数、血圧 (収縮期、拡張期及び平均) 及び心電図 (PR 間隔、QRS 及び QT 間隔) を投与 25 時間前から投与 48 時間後まで 5 分ごとに 60 秒間ずつ測定した。心拍数及び血圧に対する影響は、1 時間ごと (12 ポイントの平均値) に投与 1~48 時間後まで評価した。心電図パラメータに対する影響は、投与 2 時間後までは 30 分間隔で、その後は 6、8、23 及び 47 時間後の時点で評価した。QTc は試験別補正式を用いて算出した。なお、生死及び一般状態の観察は、溶媒投与の前日からオゾラリズマブ投与後の測定が終了するまで毎日行った。

オゾラリズマブの投与により、オゾラリズマブ投与前及び対照群に対して心拍数の有意な低下が認められたが、この変化は投与前に心拍数の高値を示した個体が認められたこと、かつ、対照群で投与後に増加が認められたことによるものであり、オゾラリズマブの投与による影響ではないと考えられた。なお、溶媒投与前後及びオゾラリズマブ投与前後の心拍数は、いずれも生物学的変動の範囲内であった。

血圧 (収縮期、拡張期及び平均) 及び心電図 (PR 間隔、QRS、QT 間隔及び QTc) に対してはオゾラリズマブ投与による影響は認められず、心房性又は心室性不整脈等の異常波形も認められなかった。また、オゾラリズマブ投与に関連した死亡及び一般状態の変化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

オゾラリズマブは、ヒト及びアカゲサルの TNF α に高い結合親和性を示した。さらに、オゾラリズマブは TNF α で誘導される細胞死を濃度依存的に抑制し、その IC₅₀ 値は、エタネルセプト、アダリムマブ及びインフリキシマブより低値であった。また、オゾラリズマブはヒト及びアカゲザル血清アルブミンに高い結合親和性を示した。薬物と血中アルブミンの結合は、血中安定性や炎症部位への組織移行性を向上することが報告されており¹、オゾラリズマブも同様の効果が期待される。

オゾラリズマブはヒト TNF α に特異的に結合することから、ヒト TNF α 又はヒト TNF α 発現マウスを用いてオゾラリズマブの作用を検討した。マウス空気嚢モデルにおいて、オゾラリズマブ

はヒト TNF α で誘発される細胞浸潤を有意に抑制した。また、オゾラリズマブはヒト TNF α を発現する Tg197 マウスの関節炎病態を有意に抑制した。

オゾラリズマブは膜結合型 TNF α と結合するが、その構造に Fc 領域を含まないことから、Fc 領域を介する ADCC 活性及び CDC 活性を誘導しないことが考えられた。そこで、オゾラリズマブの ADCC 活性及び CDC 活性を検討し、Fc 領域を含む他の TNF 阻害薬と比較した。その結果、アダリムマブ、インフリキシマブは ADCC 活性を誘導したが、オゾラリズマブは ADCC 活性を誘導しなかった。また、アダリムマブ、インフリキシマブ及びエタネルセプトは CDC 活性を誘導したが、オゾラリズマブは CDC 活性を誘導しなかった。

以上の結果から、オゾラリズマブは ADCC 活性及び CDC 活性を介した細胞傷害を生じることなく、ヒト TNF α に特異的かつ高い親和性で結合し、その中和作用により炎症及び関節炎病態を抑制できることが確認された。

2.6.2.6.2 安全性薬理試験

オゾラリズマブは中枢神経系、呼吸系及び心血管系に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に挿入した。

2.6.2.8 参考文献

- ¹ Kratz F, Elsadek B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. J Control Release. 2012;161:429-45.

ナノゾラ皮下注 (オゾラリズムブ)

CTD 第 2 部

2.6.3 薬理試験概要表

大正製薬株式会社

目次

2.6.3	薬理試験概要表	4
2.6.3.1	薬理試験：一覧表	4
2.6.3.2	効力を裏付ける試験	5
2.6.3.3	副次的薬理試験	6
2.6.3.4	安全性薬理試験	6
2.6.3.5	薬力学的薬物相互作用試験	6

略号一覧

略号	略していない表現又は説明（英語）	略していない表現又は説明（日本語）
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
CDC	complement dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
K_d	dissociation constant	解離定数
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子

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：オゾラリズマブ

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設 ^a	試験番号	資料番号
TNF α に対する結合親和性	表面プラズモン共鳴	<i>in vitro</i>	■	■-73993	4.2.1.1-1
血清アルブミンに対する結合親和性	表面プラズモン共鳴	<i>in vitro</i>	■	■-73993	4.2.1.1-1
膜結合型 TNF α に対する結合活性	TNF α 発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i>	■	■-73311	4.2.1.1-2
TNF α 誘発細胞傷害抑制作用	L929 細胞	<i>in vitro</i>	■	■-73216	4.2.1.1-3
マウス空気嚢モデル細胞浸潤に対する抑制作用	マウス	腹腔内	■	■-73291	4.2.1.1-4
ヒト TNF 遺伝子導入マウスの関節炎に対する抑制作用	Tg197 マウス	腹腔内	■	■-73208	4.2.1.1-5
膜結合型 TNF α 発現 NS0 細胞に対する ADCC 活性	TNF α 発現 NS0 細胞	<i>in vitro</i>	■	■-78972	4.2.1.1-6
膜結合型 TNF α 発現 CHO 細胞に対する CDC 活性	TNF α 発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i>	■	■-74025	4.2.1.1-7

a. 実施施設

■：現■

2.6.3.1.2 安全性薬理試験

被験物質：オゾラリズマブ

試験の種類	試験系	投与方法	GLP 適用	実施施設 ^a	試験番号	資料番号
心血管系に対する影響						
血圧、心拍数及び心電図（テレメトリー法）	カニクイザル	静脈内	適	■	■-74355	4.2.1.3-1

a. 実施施設

■：現■

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：オゾラリズマブ

試験の種類	試験系	投与方法・用量	結果	資料番号
TNF α に対する結合親和性	表面プラズモン共鳴	<i>in vitro</i>	ヒト TNF α に対する K _d 値：20.2 pmol/L アカゲザル TNF α に対する K _d 値：16.1 pmol/L オゾラリズマブは、ヒトやアカゲザルの TNF α に対して高い結合親和性を示した。	4.2.1.1-1
血清アルブミンに対する結合親和性	表面プラズモン共鳴	<i>in vitro</i>	ヒト血清アルブミンに対する K _d 値：4.28 nmol/L アカゲザル血清アルブミンに対する K _d 値：4.46 nmol/L マウス血清アルブミンに対する K _d 値：92.2 nmol/L ラット血清アルブミンに対する K _d 値：1607 nmol/L オゾラリズマブは、ヒト及びアカゲザル血清アルブミンに対してマウス及びラット血清アルブミンより高い結合親和性を示した。	4.2.1.1-1
膜結合型 TNF α に対する結合活性	TNF α 発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i>	オゾラリズマブは膜結合型 TNF α に結合した。	4.2.1.1-2
TNF α 誘発細胞傷害抑制作用	L929 細胞	<i>in vitro</i>	ヒト TNF α に対する IC ₅₀ 値：22.5 pmol/L アカゲザル TNF α に対する IC ₅₀ 値：9.6 pmol/L オゾラリズマブは TNF α による細胞死を抑制した。	4.2.1.1-3
マウス空気嚢モデル細胞浸潤に対する抑制作用	マウス	腹腔内 0.0625、0.125、 0.25、0.5 mg/kg	オゾラリズマブは 0.125 mg/kg 以上の用量でヒト TNF α で誘発される総細胞数及び好中球数の増加を有意に抑制した。	4.2.1.1-4
ヒト TNF 遺伝子導入マウスの関節炎に対する抑制作用	Tg197 マウス	腹腔内 0.03、0.1、0.3、1、 3、10 mg/kg	オゾラリズマブは 0.3 mg/kg 以上の用量で最終評価時の肉眼的関節炎スコア及び病理組織学的関節炎スコアを抑制した。	4.2.1.1-5
膜結合型 TNF α 発現 NS0 細胞に対する ADCC 活性	TNF α 発現 NS0 細胞	<i>in vitro</i>	オゾラリズマブは ADCC 活性を誘導しなかった。	4.2.1.1-6
膜結合型 TNF α 発現 CHO 細胞に対する CDC 活性	TNF α 発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i>	オゾラリズマブは CDC 活性を誘導しなかった。	4.2.1.1-7

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当なし

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：オゾラリズマブ

試験の種類	試験系	試験成績			資料番号
		投与経路 (投与期間)	濃度／用量	結果	
心血管系に対する影響					
血圧、心拍数及び心電図（テレメトリー法）	雌雄カニクイザル	静脈内投与 (単回)	0、150 mg/kg	影響なし	4.2.1.3-1

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし