トラロキヌマブ（遺伝子組換え）

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

2.6.1　緒言

レオ　ファーマ株式会社

目次

1　医薬品の構造及び薬理学的特性に関する簡潔な情報 3

2　申請された臨床適応、用量及び投与期間に関する情報 3

3　引用文献 3

1　医薬品の構造及び薬理学的特性に関する簡潔な情報

トラロキヌマブ（開発番号：CAT-354）は免疫グロブリン（Ig）G4（ラムダ軽鎖）のヒトモノクローナル抗体で，オリゴ糖鎖を含む分子量は約 147,000 ダルトン（Da）である。トラロキヌマブは、それぞれ約 49,500 Da の相同の重鎖 2 本とそれぞれ約 22,500 Da の相同の軽鎖 2 本から成る。トラロキヌマブは、各重鎖 Fc 領域の Asn-299 に 1 つの N-結合型糖鎖付加部位を有している。トラロキヌマブの糖鎖は，主にフコシル化 2 分枝複合体である。

トラロキヌマブは、ヒトインターロイキン（IL）-13 に特異的に結合し，IL-13 と IL-13 受容体（IL-13R）α1 及び IL-13Rα2 との相互作用を抑制する。したがって、IL-13Rα1/IL-4Rα受容体複合体を介する IL-13 の薬理作用は、IL-13Rα2 受容体を介する作用と共にトラロキヌマブにより抑制される（Hershey, 2003）。

トラロキヌマブは、Cambridge Antibody Technology により創成された後、MedImmune（アストラゼネカ社の支社）が喘息及びアトピー性皮膚炎（AD）に関して開発を開始し、その後 AD に関する開発をレオ ファーマが引き継いだ。

AD では 2 型免疫反応が優勢である。IL-13 は，2 型免疫反応における主要なサイトカインであり，AD の病態で重要な役割を果たす。IL-13 は，主に 2 型ヘルパーT 細胞及び 2 型自然リンパ球により産生される（Hijnen et al, 2013; Salimi et al, 2013; Mashiko et al, 2017）。IL-13 受容体は多くの非免疫細胞及び免疫細胞で発現しているが，T 細胞では発現していない。標的細胞における IL-13 の作用により，AD の原因となる表皮バリアの破壊，アレルギー反応及び炎症が引き起こされる。

2　申請された臨床適応、用量及び投与期間に関する情報

（1）予定する効能又は効果

既存治療で効果不十分なアトピー性皮膚炎

（2）予定する用法及び用量

通常、成人にはトラロキヌマブ（遺伝子組換え）として初回に 600mg を皮下投与し、その後は 1 回 300mg を 2 週間隔で皮下投与する。

3　引用文献

Hershey GKK et al. IL-13 receptors and signaling pathways: An evolving web. J Allergy Clin Immunol. 2003; 111: 677-90

Hijnen D et al. CD8+ T Cells in the Lesional Skin of Atopic Dermatitis and Psoriasis Patients Are an Important Source of IFN-gamma, IL-13, IL-17, and IL-22. J Invest Dermatol 2013; 133: 973-979

Mashiko S et al. Increased frequencies of basophils, type 2 innate lymphoid cells and Th2 cells in skin of patients with atopic dermatitis but not psoriasis. J Dermatol Sci 2017;88:167-174

Salimi M et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. J Exp Med 2013;210 (13):2939-2950

トラロキヌマブ（遺伝子組換え）

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

レオ　ファーマ株式会社

目次

1　まとめ 7
2　効力を裏付ける試験 11
2.1　背景 11
2.1.1　アトピー性皮膚炎と IL-13 の機能 11
2.1.2　皮膚バリアに対する影響 11
2.1.3　皮膚の炎症及びリモデリングの制御 12
2.1.4　IgE 産生及び受容体発現 12
2.1.5　In vivo 動物モデルにおける検討 13
2.1.6　ヒトにおける知見 13
2.2　トラロキヌマブの薬理試験 14
2.2.1　In vitro 試験 14
2.2.2　In vivo 試験 22
3　副次的薬理試験 31
3.1　ヒト気管支平滑筋細胞におけるカルシウム動員 31
3.2　感染リスク 32
3.3　Fc エフェクター機能 32
4　安全性薬理試験 34
5　薬力学的薬物相互作用 35
6　考察及び結論 36
7　引用文献 37

表目次

表 2.6.2 - 1　トラロキヌマブの薬理試験の概要 8

表 2.6.2 - 2　ヒト，カニクイザル及びマウス IL-13 による TF-1 細胞の増殖に対する
トラロキヌマブの作用 22

表 2.6.2 - 3　トラロキヌマブの効力を裏付ける in vivo 試験の概要 24

図目次

図 2.6.2 - 1　IL-13 によるシグナル伝達 7

図 2.6.2 - 2　アトピー性皮膚炎発症に関与する IL-13 の標的細胞 11

図 2.6.2 - 3　IL-13 による CCL-2 及び NTRK1 遺伝子発現に対するトラロキヌマブの作用 16

図 2.6.2 - 4　IL-13 による ELOVL3 及び FLG 遺伝子の発現減少に対するトラロキヌマブの作用 17

図 2.6.2 - 5　IL-13 による CCL-2 及び POSTN 遺伝子発現に対するトラロキヌマブの作用 18

図 2.6.2 - 6　IL-13 による CD23 発現に対するトラロキヌマブの作用 18

図 2.6.2 - 7　IL-13 による VCAM-1 発現に対するトラロキヌマブの作用 19

図 2.6.2 - 8　IL-13 によるエオタキシン-1 遊離に対するトラロキヌマブの作用 20

図 2.6.2 - 9　好酸球の形態変化に対するトラロキヌマブの作用 21

図 2.6.2 - 10　IL-13 による IgE 産生に対するトラロキヌマブの作用 22

図 2.6.2 - 11　IL-13 によるマウス空気嚢における好酸球炎症に対するトラロキヌマブの作用 26

図 2.6.2 - 12　ヒト IL-13 により誘発される AHR 及び肺への好酸球動員に対するトラロキヌマブの作用 27

図 2.6.2 - 13　カニクイザルアレルギーモデルにおける血清 IgE 値に対するトラロキヌマブの作用 28

図 2.6.2 - 14　試験デザイン 29

図 2.6.2 - 15　カニクイザルアレルギーモデルにおける肺機能及び炎症に対するトラロキヌマブの作用 30

図 2.6.2 - 16　BSMC における Ca^{2+}動員の IL-13 による増強に対するトラロキヌマブ の作用 31

略号一覧

記号	日本語	英語
AD	アトピー性皮膚炎	Atopic dermatitis
ADCC	抗体依存性細胞傷害	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
AHR	気道過敏	Airway Hyperresponsiveness
AMP	抗菌ペプチド	Antimicrobial peptide
AUC	曲線下面積	Area under the curve
BAL	気管支肺胞洗浄	Bronchoalveolar lavage
BSMC	気管支平滑筋細胞	Bronchial smooth muscle cell
CAT-001	アイソタイプコントロール抗体	Isotype control antibody
CAT-251	アイソタイプコントロール抗体	Isotype control antibody
CAT-354	トラロキヌマブ	Tralokinumab
CCL	CC ケモカインリガンド	CC chemokine ligand
CCR	CC ケモカイン受容体	CC chemokine receptor
CDC	補体依存性細胞傷害	Complement-dependent cytotoxicity
CI	信頼区間	Confidence interval
CRTH2	プロスタグランジン D2 受容体	Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cell
DEFB	β-ディフェンシン	Beta-defensin
ELISA	酵素免疫測定	Enzyme linked immunosorbent assay
Fc	Fc	Fragment, crystalizable
FcγR	Fc ガンマ受容体	Fc gamma receptor
ELOVL	極長鎖脂肪酸延長酵素	Elongation of very long chain fatty acids protein
FLG	フィラグリン	Filaggrin
HDLM-2	ホジキンリンパ腫由来細胞株	Hodgkin’s lymphoma derived cell line
HUVEC	ヒト臍帯静脈内皮細胞	Human umbilical vein endothelial cell
IC_{50}	50%抑制濃度	Half-maximal inhibitory concentration
Ig	免疫グロブリン	Immunoglobulin
IL	インターロイキン	Interleukin
IL-4R	IL-4 受容体	IL-4 receptor
IL-13R	IL-13 受容体	IL-13 receptor
LOR	ロリクリン	Loricrin
MCP-1	CCL-2 とも呼ばれる	Monocyte chemotactic
MDC	CCL-22 とも呼ばれる	Macrophage derived chemokine
NHLF	正常ヒト肺線維芽細胞	Normal human lung fibroblast
NTRK1	TrkA をコードする遺伝子	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1

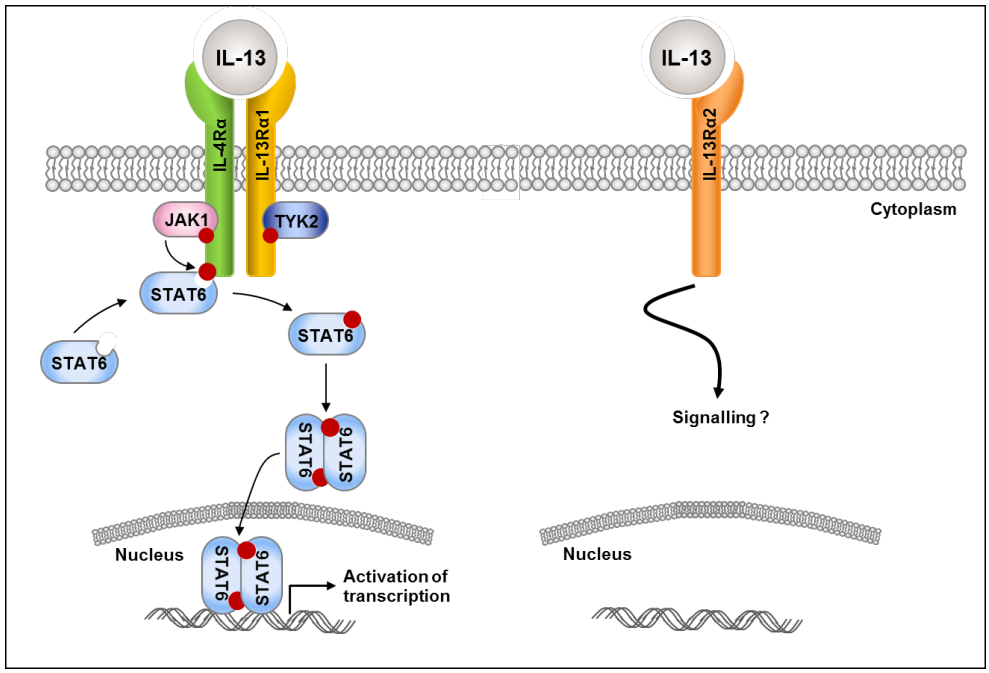
略号一覧（続き）

記号	日本語	英語
PBMC	末梢血単核細胞	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	リン酸緩衝生理食塩水	Phosphate buffered saline
PC_{30}	肺抵抗をベースラインから 30%増加させるのに必要なヒスタミンの用量	The histamine dose required to generate a 30% increase in lung resistance above baseline
POSTN	ペリオスチン	Periostin
RANTES	CCL-5 とも呼ばれる	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
R_L	肺抵抗	Lung resistance
SNP	一塩基多型	Single nucleotide polymorphism
STAT	シグナル伝達性転写因子	Signal transducer and activator of transcription
TARC	CCL-17 とも呼ばれる	Thymus and activation-regulated chemokine
TF-1	ヒト赤白血病細胞株	Human erythroleukemic cell line
TGF	腫瘍増殖因子	Tumor growth factor
Th2 細胞	2 型ヘルパーT 細胞	T helper 2 cells
TNF	腫瘍壊死因子	Tumor necrosis factor
TrkA	神経成長因子受容体	Tropomyosin-receptor kinase A
TSLP	胸腺間質性リンパ球新生因子	Thymic stromal lymphopoietin
VCAM	血管細胞接着分子	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	血管内皮増殖因子	Vascular endothelial growth factor

1　まとめ

トラロキヌマブ（開発番号：CAT-354）は免疫グロブリン（Ig）G4 のヒトモノクローナル抗体で，ヒトインターロイキン（IL）-13 に特異的に結合し，IL-13 と IL-13 受容体（IL-13R）α1 及び IL-13Rα2 との相互作用を抑制する。

IL-13 は IL-13Rα1 に結合した後，IL-4 受容体α（IL-4Rα）とヘテロ二量体となり受容体複合体を形成し，ヤヌスキナーゼ／シグナル伝達性転写因子（JAK/STAT）経路を介してシグナルを伝達する（Hershey, 2003）（図 2.6.2 - 1）。また IL-13 は，細胞内シグナル伝達モチーフが欠失しデコイ受容体と考えられている IL-13Rα2 と結合する（Donaldson et al, 1998; Wood et al, 2003; Zheng et al, 2008; Sivaprasad et al, 2010）。しかし一部の研究では，IL-13Rα2 が炎症誘発性シグナルを伝達する受容体である可能性が示唆されている（Fichtner-Feigl et al, 2006; Chen et al, 2013; He et al. 2013; Tripp et al, 2017）。



Binding of IL-13 to IL-13Rα1 induces heterodimerization with IL-4Rα. This dimerization activates JAK1 and TYK2 that are responsible for phosphorylation of STAT-6. Phosphorylated STAT-6 dimerizes and migrates from the cytosol to the nucleus, where it activates gene transcription. IL-13 can also bind to the IL-13Rα2 chain. **Abbreviations**: IL, interleukin; JAK, Janus kinase; STAT6, signal transducer and activator of transcription 6; TYK2, tyrosine kinase 2.

図 2.6.2 - 1　IL-13 によるシグナル伝達

アトピー性皮膚炎（AD）に対しトラロキヌマブを用いる薬理学的妥当性は，in vitro 及び in vivo 試験並びに公表されている知見（2.1 項）で裏付けられる。トラロキヌマブは，先に喘息を対象疾患として開発され，in vitro 及び in vivo 非臨床試験でその作用が検討された。喘息と AD は，疾患メカニズムや関与する細胞の一部が共通しているため，これらの試験から作用機序，特異性及び薬理活性に関する情報が得られるため本項でその概要をまとめた。加えて，本申請効能が AD であることを考慮し，ヒト表皮由来の細胞を用いトラロキヌマブの作用を検討した。

その結果，In vitro 試験でトラロキヌマブの高い親和性，特異性及び効力が明らかとなり，アトピー性皮膚炎に関与している細胞種やそれらによる作用をトラロキヌマブが調節する可能性が示された。in vivo 試験でマウス及びカニクイザルの病態モデルを用い，トラロキヌマブの抗炎症作用が示された。以上の結果は，トラロキヌマブの AD 治療薬としての有効性及び安全性を裏付けるものと考える。

トラロキヌマブの主な薬理試験を表 2.6.2 - 1 にまとめた。

表 2.6.2 - 1　トラロキヌマブの薬理試験の概要

Study Number	Description of Study	GLP	Location
In vitro Studies			
CAT354Rp006	Isolation and biological properties of CAT-354	No	M4.2.1.1-1
RIA354-049	Structural Characterisation Reveals Mechanism of IL-13-Neutralising Monoclonal Antibody Tralokinumab as Inhibition of Binding to IL-13Rα1 and IL-13Rα2	No	M4.2.1.1-9
REP-HND-2019-02	Effect of tralokinumab on IL-13 induced inflammatory mediators in human epidermal keratinocytes	No	M4.2.1.1-10
REP-HND-2019-03	Effect of tralokinumab on IL-13 driven modulation of skin barrier markers in human epidermal keratinocytes	No	M4.2.1.1-11
REP-HND-2019-04	Effect of tralokinumab on IL-13 induced inflammatory mediators in human dermal fibroblasts	No	M4.2.1.1-12
CAT354Rp029	Effect of CAT-354 on IgE class switching	No	M4.2.1.1-2
CAT354Rp039	Effect of CAT-354 on IL-13 induced upregulation of CD23 expression on the surface of human PBMCs	No	M4.2.1.1-6
CAT354Rp042	Effect of CAT-354 on induction of eosinophil shape change	No	M4.2.1.1-7
CAT354Rp025	Effect of CAT-354 on the potentiation of histamine-induced Ca^{2+} Signaling in bronchial smooth muscle.	No	M4.2.1.2
In vivo Studies			
CAT354Rp037	Effect of CAT-354 on human IL-13-induced inflammation in the mouse air pouch model	No	M4.2.1.1-4
CAT354Rp043	Effect of CAT-354 on the development of AHR induced by intratracheal administration of human IL-13 to the mouse lung	No	M4.2.1.1-8
CAT354Rp034	Effect of CAT-354 on serum IgE levels in allergic cynomolgus monkey	No	M4.2.1.1-3
CAT354Rp038	Effect of CAT-354 on the development of AHR in the cynomolgus monkey antigen challenge model	No	M4.2.1.1-5

CAT-354 = tralokinumab; PBMC = Peripheral blood mononuclear cell; AHR = Airway hyperresponsiveness

主な非臨床薬理試験で得られた結果の概要を以下に示す。

- IL-13 に対するトラロキヌマブの親和性（解離定数）を表面プラズモン共鳴法で測定したところ当初 165 pmol/L であった（試験番号：CAT354Rp006）。最適な条件では 58 pmol/L であった（試験番号：RIA354-049）。
- トラロキヌマブは，IL-13 と IL-13Rα1 及び IL-13Rα2 との結合を濃度依存的に抑制し，そのときの 50%抑制濃度（IC_{50}）は，それぞれ 660 pmol/L 及び 716 pmol/L であった（試験番号：RIA354-049）。
- トラロキヌマブは，細菌由来組換えヒト IL-13 によるヒト赤白血病細胞株（TF-1）の増殖を濃度依存的に抑制したが（IC_{50} = 366 pmol/L），細菌由来組換えマウス IL-13 による増殖を抑制しなかった（試験番号：CAT354Rp006）。
- トラロキヌマブは，バキュロウイルス発現系を用いて得た組換えヒト IL-13 及びヒト IL-13 の Q130R 変異体による TF-1 の増殖を濃度依存的に抑制し（それぞれの IC_{50} は 1.1 及び 1.6 nmol/L），これらと同程度の効力でバキュロウイルス発現系を用いて得たカニクイザル IL-13 による増殖を抑制した（IC_{50} = 1.7 nmol/L）（試験番号：CAT354Rp006）。
- トラロキヌマブは，内因性ヒト IL-13 によるホジキンリンパ腫由来細胞株（HDLM-2）の増殖を濃度依存的に抑制した（IC_{50} = 4.4 nmol/L）（試験番号：CAT354Rp006）。
- トラロキヌマブは，ヒト表皮角化細胞において IL-13 による CC ケモカインリガンド（CCL）-2，CCL-26，神経成長因子受容体（TrkA）をコードする遺伝子（NTRK1）及び IL-13Rα2 の遺伝子発現を濃度依存的に抑制し（それぞれの IC_{50} は，201，189，268 及び 367 pmol/L），CCL-2 の遊離を濃度依存的に抑制した（IC_{50} = 217 pmol/L）。一方，IL-4 によるこれらの遺伝子発現及びケモカイン遊離を抑制しなかった（試験番号：REP-HND-2019-02）。
- トラロキヌマブは，分化させたヒト表皮角化細胞において IL-13 によるフィラグリン（FLG），FLG2，ロリクリン（LOR），極長鎖脂肪酸延長酵素（ELOVL）3 及びβ−ディフェンシン（DEFB）4A 遺伝子の発現減少を濃度依存的に抑制した（それぞれの IC_{50} は，19.1，16.4，16.0/13.3，16.2 及び 13.0 nmol/L）。一方，IL-4 によるこれらの発現減少を抑制しなかった（試験番号：REP-HND-2019-03）。
- トラロキヌマブは，ヒト皮膚線維芽細胞において IL-13 による CCL-2，CCL-11 及びペリオスチン（POSTN）の遺伝子発現を濃度依存的に抑制し（それぞれの IC_{50} は，315，112 及び 241 pmol/L），CCL-2 の遊離を抑制した（IC_{50} = 336 pmol/L）。一方，IL-4 によるこれらの遺伝子発現及びケモカイン遊離を抑制しなかった（試験番号：REP-HND-2019-04）。
- トラロキヌマブは，ヒト末梢血単核細胞（PBMC）において IL-13 による CD23 発現を濃度依存的に抑制した（IC_{50} = 120 pmol/L）。一方，IL-4 による CD23 の発現は抑制しなかった（試験番号：CAT354Rp039）。
- トラロキヌマブは，ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）において IL-13 による血管細胞接着分子（VCAM）-1 の発現増加を濃度依存的に抑制した（IC_{50} = 368 pmol/L）。一方，IL-4 又は IL-1β による発現増加を抑制しなかった（試験番号：CAT354Rp006）。
- トラロキヌマブは，正常ヒト肺線維芽細胞（NHLF）において IL-13 によるエオタキシン-1 遊離を濃度依存的に抑制した（IC_{50} = 267 pmol/L）（試験番号：CAT354Rp006）。

- トラロキヌマブは，NHLF において IL-13，腫瘍壊死因子（TNF）-α及び腫瘍増殖因子（TGF）-β1 の共刺激による，培養液中へのエオタキシン-1 遊離を濃度依存的に抑制した（IC_{50} = 32.4 nmol/L）。トラロキヌマブは，この培養液による好酸球の形態変化も濃度依存的に抑制した（IC_{50} = 14.0 nmol/L）（試験番号：CAT354Rp042）。
- トラロキヌマブは，ヒト末梢血 B 細胞において IL-13 による IgE 産生を濃度依存的に抑制した（IC_{50} = 1.8 nmol/L）。一方，IL-4 による IgE 産生を抑制しなかった（試験番号：CAT354Rp029）。
- 組換えヒト IL-13 をマウス空気嚢内に注入すると，注入後 24 時間で総白血球及び好酸球の浸潤が対照マウスに比べ有意に増加した。トラロキヌマブは，局所（空気嚢内）又は全身（静脈内）投与により，マウス空気嚢において IL-13 による白血球及び好酸球の浸潤を用量依存的に抑制した（試験番号：CAT354Rp037）。
- 組換えヒト IL-13 をマウス気管内に投与すると，気道過敏（AHR），肺炎症及び杯細胞化生が発生した。トラロキヌマブの前投与は，AHR 及び気管支肺胞洗浄（BAL）液中の好酸球数を有意に抑制した（試験番号：CAT354Rp043）。
- トラロキヌマブは，カニクイザルのアレルギーモデルにおいてベースライン IgE が高値の雌（1209 及び 449 ng/mL）で投与後 7 日までに総血清 IgE 値を抑制したが，ベースライン IgE が低値の雄（60 及び 67 ng/mL）では抑制しなかった（試験番号：CAT354Rp034）。
- トラロキヌマブは，カニクイザルのアレルギーモデルにおいて，肺抵抗をベースラインより 30%増加させるのに必要なヒスタミン量により評価した AHR に対して抑制傾向を示し，肺抵抗値により評価した AHR，抗原プライミング，BAL 液内への好酸球及び全細胞の流入を有意に抑制した（試験番号：CAT354Rp038）。
- 初代培養ヒト気管支平滑筋細胞（BSMC）に IL-13 又は IL-4 を適用すると，収縮性アゴニストのヒスタミンにより Ca^{2+}シグナルが有意に増強した。トラロキヌマブは，IL-13 による Ca^{2+}シグナルの増強を有意に抑制したが，IL-4 によるものは抑制しなかった（試験番号：CAT354Rp025）。
- トラロキヌマブは Fc エフェクター機能をほとんど持たない（3.3 項）。
- 安全性薬理試験の評価項目（心血管系，呼吸器系及び神経行動）は，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験並びに出生前及び出生後試験の中で評価し，その結果トラロキヌマブの影響は認められなかった（4 項）。

2　効力を裏付ける試験

2.1　背景

2.1.1　　アトピー性皮膚炎と IL-13 の機能

AD（アトピー性皮膚炎）では 2 型免疫反応が優勢である。IL-13（インターロイキン-13）は，2 型免疫反応における主要なサイトカインであり，AD の発症で重要な役割を果たす各種細胞種に対して作用する（図 2.6.2 - 2）。IL-13 は，主に 2 型ヘルパーT 細胞（Th2 細胞）及び 2 型自然リンパ球により産生されるが，その他の免疫細胞でも産生される（Hijnen et al, 2013; Salimi et al, 2013; Mashiko et al, 2017）。IL-13 受容体は多くの非免疫細胞及び免疫細胞で発現しているが，T 細胞では発現していない。標的細胞における IL-13 の作用により，AD を発症させる表皮バリアの破壊，アレルギー反応及び炎症が引き起こされる。

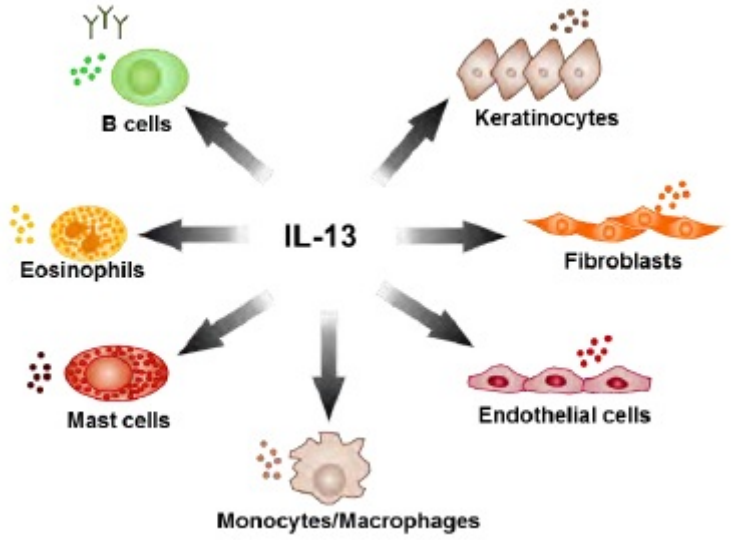


図 2.6.2 - 2　アトピー性皮膚炎発症に関与する IL-13 の標的細胞

2.1.2　　皮膚バリアに対する影響

皮膚保護バリアは，アレルゲン及び病原体侵入に対する防御の最前線として機能する。AD 患者の皮膚バリアは著しく損なわれており，経表皮水分蒸散量の増加，IgE（免疫グロブリン E）感作を促すアレルゲンの侵入及び微生物の侵入を引き起こす（Kim et al, 2018）。皮膚バリアが欠損すると，AD 病変部のみならず非病変部においても，正常な角質層形成及びバリアの統合に必要な表皮バリア蛋白質（フィラグリン，フィラグリン 2，hornerin，インボルクリン及びロリクリン）の発現が低下する（Howell et al, 2007; Kim et al, 2008; Pellerin et al, 2013）。初代培養ヒト角化細胞又は皮膚同等物において，IL-13 が表皮バリア蛋白質の発現を低下させることが示された（Howell et al, 2007; Kim et al, 2008; Pellerin et al, 2013; Danso et al, 2014; Hönzke et al, 2016）。さらに，最終分化及び細胞シートの統合を阻害したヒト及びマウスの培養角化細胞において，IL-13 は構造蛋白質（ケラチン 1，ケラチン 10，デスモグレイン 1 及びデスモコリン 1）の発現を低下させることが示された（Omori-Miyake et al, 2014）。

角質層の脂質組成はAD患者の皮膚で変化することが知られており，このことも皮膚バリア損傷の原因となる。AD患者の皮膚病変でみられたのと同様の脂質組成の変化が，IL-13トランスジェニック（K5-tTA-IL-13 Tg）マウスモデル並びにIL-4及びIL-13を適用した培養ヒト角化細胞でも認められ，脂質代謝におけるIL-13の役割が示唆された（Berdyshev et al, 2018）。抗菌ペプチド（AMP）は皮膚の自然免疫系で重要な役割を果たす。AD患者の皮膚ではAMP（ヒトβ-デフェンシン2，ヒトβ-デフェンシン3及びカテリシジン/LL-37）が適切に産生されないことが報告されており，それが皮膚感染への感受性を高め皮膚バリア不全をより助長する（Ong et al, 2002; Nomura et al, 2003）。IL-4及びIL-13を適用した初代培養ヒト角化細胞では，AMPの発現が低下した（Nomura et al, 2003; Albanesi et al, 2007）。以上のように，IL-13が皮膚バリアの主要な部分を調節する役割を果たすことが示された。

2.1.3 皮膚の炎症及びリモデリングの制御

ADでは，2型免疫反応に関する免疫細胞の浸潤及びケモカイン産生の増加が認められる。角化細胞及び皮膚線維芽細胞は，Th2細胞（2型ヘルパーT細胞）や好酸球などの免疫細胞を皮膚に集めるケモカインを産生する。角化細胞をIL-13で刺激すると，CCケモカイン受容体4（CCR4）とそのリガンドであるCCL-22/MDCの発現を誘導し，$CD4^+CRTH2^+CCR4^+$ Th2細胞を集めることが報告された（Purwar et al, 2006）。さらにIL-13は角化細胞及び皮膚線維芽細胞におけるCCL- 26/エオタキシン-3産生を誘発するため，皮膚への好酸球動員が促進される（Hoeck et al, 2001; Kagami et al, 2005）。また，IL-13は角化細胞や線維芽細胞において，他の炎症メディエーターとの相乗作用でCCL-2/MCP-1，CCL-5/RANTES，CCL-17/TARC及びCCL-11/エオタキシン-1などのケモカインの発現を増強する（Terada 2000; Wenzel 2002; Fukuda et al, 2003; Purwar et al, 2006）。

IL-13は，白血球の血管外への浸潤に先立ち，血管内皮細胞表面のVCAM-1（血管細胞接着分子-1）をアップレギュレートし細胞接着も促進するため，さらに免疫細胞を浸潤させる（Bochner et al, 1995; Kotowicz et al, 1996）。また，IL-13は，線維芽細胞においてPOSTN（ペリオスチン）の産生を誘発し，これが角化細胞上のαvインテグリンと相互作用し炎症性サイトカインを発現させ，Th2型免疫反応を増強する（Masuoka et al, 2012）。さらにIL-13は，ヒト角化細胞においてマトリックスメタロプロテアーゼ-9（MMP-9）の発現を誘導し，これが基底膜のコラーゲンIVへ作用し細胞の移動や組織のリモデリングを仲介する（Purwar et al, 2008; Shin et al, 2015）。加えてIL-13は，ヒト皮膚線維芽細胞におけるMMP-13発現をダウンレギュレートすることが知られているため，慢性的に苔癬化したADの皮膚病変の肥厚した真皮で見られるように，コラーゲン分解が抑制されることにより過剰なコラーゲン沈着を伴う線維化を引き起こす可能性がある（Moriya et al, 2011）。以上のように，IL-13が皮膚の炎症及びリモデリングを仲介することが示されている。

2.1.4 IgE産生及び受容体発現

IgEによるアレルギー反応は，ADの主要なリスク要因と考えられている。約80%のAD患者において血清IgE値及びアレルゲン特異的IgE値の上昇が報告されている（Tokura, 2010）。IL-13

は，B 細胞の増殖と免疫グロブリン産生細胞への分化を促進し，B 細胞が産生する抗体アイソタイプを IgE 及び IgG4 にスイッチすることもできる（Punnonen et al, 1993）。さらに，AD 患者皮膚由来の Th2 様細胞株をアレルゲンで刺激したときの培養上清に，抗 IL-13 モノクローナル抗体を適用することにより，この培養上清により B 細胞で誘導される IgE 合成が有意に抑制された（Punnonen et al, 1997）。また，IL-13 は，B 細胞及び単球における低親和性 IgE 受容体 CD23 の発現を誘導する（McKenzie et al, 1993; Punnonen J et al, 1993）。IL-13 は，それ自身で肥満細胞の増殖を促進するだけでなく，肥満細胞における高親和性 IgE 受容体（Fc ε RI）の発現を増加して，Fc ε RI 架橋時のヒスタミン遊離を間接的に上昇させる（Kaur et al, 2006）。

2.1.5　In vivo 動物モデルにおける検討

AD において IL-13 が重要な役割を果たすことは，IL-13 を皮膚に発現させたトランスジェニックマウスモデルでも示されている（Zheng et al, 2009）。皮膚に IL-13 を発現させたモデルマウスでは，ヒトの AD に類似した特徴を数多く示す慢性の掻痒性皮膚炎が発症した。肉眼的特徴としては乾燥性苔癬化皮膚病変への進行を伴う紅斑，痂皮，擦創及びびらんであった。組織学的には表皮及び皮膚層の肥厚，過角化症，海綿状変化，血管系増加，皮膚線維化を含む皮膚リモデリング，免疫細胞（$CD4^+$細胞，肥満細胞，好酸球，マクロファージ及び樹状細胞）の顕著な浸潤が認められた。このトランスジェニックマウスの皮膚病変では，ケモカイン（CCL-2/MCP-1，CCL-5/RANTES，CCL-11/エオタキシン-1，CCL-17/TARC，CCL-22/MDC 及び CCL-27/CTACK），TSLP 及び VEGF の発現がアップレギュレートされていた。さらに，IL-13 に起因する表現型は皮膚に限らず，血清 IgE 及び IgG1 値の上昇及び抗 CD3/CD28 抗体刺激によるリンパ球による IL-13 産生の増加が示すように，全身性に Th2 優位となっていた。

別のマウスモデルでも AD 様疾患における IL-13 の重要性が示されている。IL-4，IL-13 及び IL-5 を過剰発現するトランスジェニックマウスは，IgE 値の上昇，炎症及び皮膚病変の増加を伴う AD を自然発症した（Lee et al, 2004）。IL-13 は，ヘテロ二量化受容体を介し STAT6（シグナル伝達性転写因子 6）を活性化する。構成的活性化型 STAT6（STAT6VT）を T 細胞に過剰発現させると皮膚炎が生じる（Sehra et al, 2010）。この STAT6VT マウスでは皮膚肥厚及び炎症に加え，皮膚バリア機能に関与する遺伝子（フィラグリン， インボルクリン及びロリクリン）発現の低下を伴い IL-13 及び IL-4 が高レベルに発現した。また，モノクローナル抗体を用いて IL-13 を中和するとフィラグリン及びインボルクリンの発現が上昇した。

2.1.6　ヒトにおける知見

AD 患者の病変がない皮膚及び健康人の皮膚と比較し，急性及び慢性いずれの AD でも患者の皮膚病変で IL-13 の発現が上昇している（Tsoi et al, 2019; Hamid et al, 1996; Tazawa et al, 2004; Gittler et al, 2012）。AD 患者では皮膚に加え，血清及び血漿でも IL-13 レベルが上昇している（Lee et al, 2016; Brunner et al, 2017）。さらに，IL-13 を産生する $CD4^+$及び $CD8^+$T 細胞は，健康人と比較して AD 患者の末梢血で増加し，疾患の重症度と相関している（La Grutta et al, 2005; Teraki et al, 2013）。また，内因性（IgE 非感作）又は外因性（IgE 感作）を問わず AD 患者の

PBMC（末梢血単核細胞），血清及び皮膚病変における IL-13 レベルの上昇が示されている（Simon et al, 2003; Novak et al, 2002; Suarez-Farinas et al, 2013）。

AD を含むアレルギー疾患の発症には遺伝的要因が重要な役割を果たす。全ゲノムスキャンにより，AD に関連する複数の遺伝子座が特定されている（Barnes et al, 2009; Weidinger et al, 2013; Paternoster et al, 2015）。これらの領域は，主に表皮バリア機能及び免疫系の調節に関与する。IL-13 には遺伝子多型があり，AD との関連が報告されている。Arg130Gln 又は G4257A とも呼ばれる Arg110Gln 変異は，気管支喘息，血清 IgE 値及び AD に関与することが報告されている（Graves et al, 2000; Heinzmann et al, 2000; Liu et al, 2000; He et al, 2003）。この一塩基多型（SNP）は 110（130）番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミンに置換したことで生じる。アルギニン型とグルタミン型には以下のような機能的差異が示されている：(1) グルタミン型はアルギニン型よりも IL-13R（IL-13 受容体）α2 に対する親和性が低い；(2) グルタミン型はアルギニン型よりも安定性が高い；(3) グルタミン型はアルギニン型よりも，IL-13Rα1 を介した強いシグナルを伝達する（Arima et al, 2002; Chen et al, 2004; Vladich et al, 2005）。気管支喘息及び皮膚試験の陽性結果に関与するものとして- 1111C/T 又は 1024C/T とも呼ばれる- 1055C/T 変異が見い出された（van der Pouw Kraan et al, 1999; Howard et al, 2001）。この SNP は，活性化 T 細胞核内因子の結合部位に隣接しているため，転写因子の複合体形成に影響する可能性がある。この SNP と血清総 IgE 値，特異的抗アレルゲン IgE 又は AD には再現性のある遺伝的関連性が認められている（Hummelshoj et al, 2003; Liu et al, 2003; Liu et al, 2004; Zitnik et al, 2009）。

2.2　トラロキヌマブの薬理試験

2.2.1　In vitro 試験

In vitro 試験でトラロキヌマブの親和性，効力及び特異性を評価した。細胞を用いたアッセイでは，角化細胞，線維芽細胞，内皮細胞，PBMC，B 細胞及び好酸球など AD に関与する細胞の初代培養ヒト細胞を主に用いた。

2.2.1.1　親和性

試験番号：CAT354Rp006，RIA354-049

IL-13 に対するトラロキヌマブの親和性（解離定数）は当初 165 pmol/L と判定された。その後最適な設定でより正確に測定した結果，58 pmol/L という結果が得られた。

トラロキヌマブは，10 nmol/L の IL-13Rα1 と 600 pmol/L の IL-13 の相互作用を濃度依存的に抑制し，そのときの IC_{50}（50%抑制濃度）は 660 pmol/L（95%信頼区間［CI］: 402～1086 pmol/L）であった。またトラロキヌマブは，2.5 nmol/L の IL-13Rα2 と 50 pmol/L の IL-13 の相互作用を濃度依存的に抑制し，そのときの IC_{50} は 716 pmol/L（95%CI: 464～1107 pmol/L）であった。これらのデータからトラロキヌマブと IL-13 の結合により，IL-13Rα1 又は IL-13Rα2 と IL-13 の相互作用が濃度依存的に抑制されることが確認された。

2.2.1.2　ヒト赤白血病細胞株の増殖に対する作用

試験番号：CAT354Rp006

IL-13 による TF-1（ヒト赤白血病細胞株）の増殖に対するトラロキヌマブの作用を検討した。使用した IL-13 濃度は，最大反応の約 80%を生じるものとした。トラロキヌマブは，細菌由来組換えヒト IL-13（2 nmol/L）による増殖を濃度依存的に抑制し，そのときの IC_{50} は 0.37 nmol/L（95% CI: 0.26～0.51 nmol/L, n=5）であった。またトラロキヌマブは，バキュロウイルス発現系を用いて得た組換えヒト IL-13（2 nmol/L）による増殖を濃度依存的に抑制し，そのときの IC_{50} は 1.1 nmol/L（95% CI: 0.7～1.6 nmol/L, n=5）であった。さらにバキュロウイルス発現系を用いて得た組換えヒト IL-13 の Q130R 変異体（130 番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミンに置換していることを表す）（2 nmol/L）による増殖を濃度依存的に抑制し，そのときの IC_{50} は 1.6 nmol/L（95% CI: 1.3～2.0 nmol/L, n=6）であった。アイソタイプコントロール抗体（CAT-001）の作用は認められなかった。

2.2.1.3　ホジキンリンパ腫由来細胞株の増殖に対する作用

試験番号：CAT354Rp006

内因性 IL-13 による HDLM-2（ホジキンリンパ腫由来細胞株）の増殖に対するトラロキヌマブの作用を検討した。トラロキヌマブは，内因性 IL-13 による HDLM-2 細胞株の増殖を濃度依存的に抑制し，そのときの IC_{50} は 4.4 nmol/L（n=3 で 2 回実施）であった。CAT-001 の作用は認められなかった。

2.2.1.4　ヒト表皮角化細胞における炎症メディエーターに対する作用

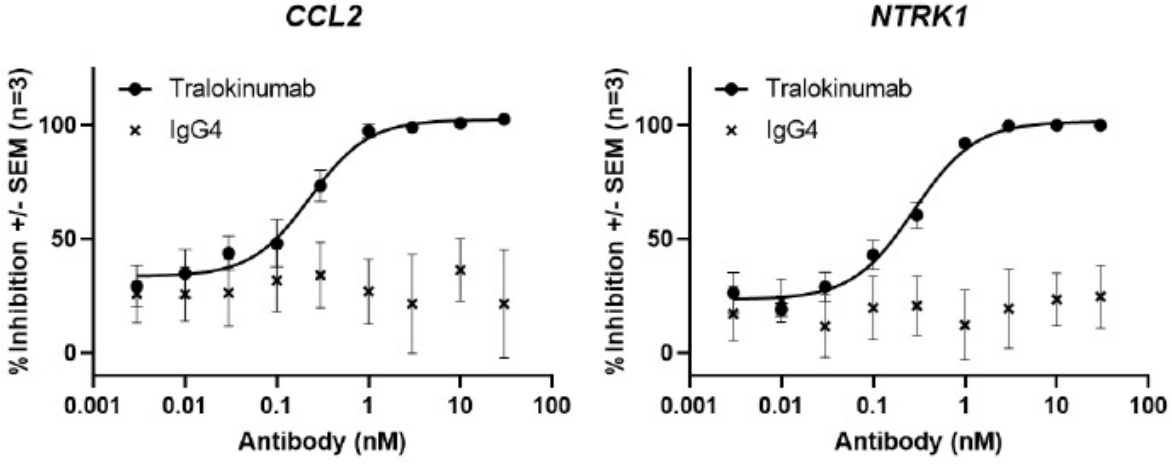
試験番号：REP-HND-2019-02

ヒト表皮角化細胞において IL-13 により誘発される炎症を仲介する因子に対するトラロキヌマブの作用を検討した。主な測定項目は，CCL-2，CCL-26，NTRK1（そう痒及び角化細胞の過剰増殖反応を仲介するとされている神経成長因子受容体［TrkA］をコードする遺伝子），IL-13Rα1，IL13-Rα2 及び IL-4R（IL-4 受容体）αの遺伝子発現とした。

3 例のドナーの正常皮膚から採取した細胞を，0.003～30 nmol/L のトラロキヌマブ又は IgG4 アイソタイプコントロール抗体存在下で，0.8 nmol/L（10 ng/mL）の IL-13 に 24 時間曝露した。使用した IL-13 濃度は，最大反応の約 80%を生じるものとした。

トラロキヌマブは，IL-13 による各遺伝子発現を濃度依存的に抑制した。CCL-2 と NTRK1 の結果を（図 2.6.2 - 3）に示す。CCL-2，CCL-26，NTRK1 及び IL-13Rα2 の遺伝子発現に対するトラロキヌマブによる抑制作用の IC_{50}（95%CI; 例数）は，それぞれ 201 pmol/L（69, 590; n=3），189 pmol/L（26, 1378; n=3），268 pmol/L（198, 364; n=3）及び 367 pmol/L（156,860; n=3）であった。IgG4 アイソタイプコントロール抗体は，これらの遺伝子発現に影響を与えなかった。トラロキヌマブは，IL-4 による CCL-2，CCL-26，NTRK1 及び IL13-Rα2 の遺伝子発現には影響を与えなかった。IL-13 は，IL-4Rα及び IL-13Rα1 の遺伝子発現を変化させず，トラロキヌマブ又は IgG4 アイソタイプコントロール抗体の影響も認められなかった。

遺伝子発現レベルでのトラロキヌマブの影響が蛋白質レベルでも認められることを確認するため，細胞培養上清に遊離された CCL-2 を酵素免疫測定法（ELISA）法で測定した。トラロキヌマブは，IL-13 による CCL-2 遊離を濃度依存的に抑制した（IC_{50}=217 pmol/L; n=1）が，IgG4 アイソタイプコントロール抗体はこれを抑制しなかった。トラロキヌマブは，IL-4 による CCL-2 遊離には影響を与えなかった。



Data represent the mean neutralizing potency with standard error bars over 3 experiments.

図 2.6.2 - 3　IL-13 による CCL-2 及び NTRK1 遺伝子発現に対するトラロキヌマブの作用

2.2.1.5　　ヒト表皮角化細胞における皮膚バリアマーカーに対する作用

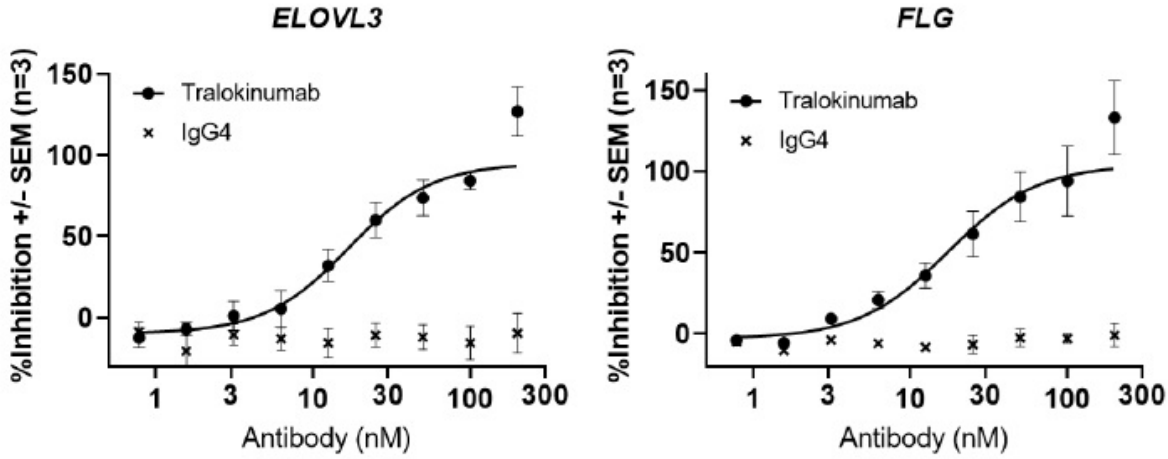
試験番号：REP-HND-2019-03

分化させたヒト表皮角化細胞において IL-13 により誘発される皮膚バリアマーカーに対するトラロキヌマブの作用を検討した。主な測定項目は，表皮分化マーカー（FLG［フィラグリン］，FLG2 及び LOR［ロリクリン］），脂質エロンガーゼ（ELOVL3［極長鎖脂肪酸延長酵素 3］）及び抗菌ペプチド（DEFB4A［β-ディフェンシン 4A］）の遺伝子発現とした。

角化細胞を 1.2 mM $CaCl_2$ 含有培養液で 72 時間培養すると分化し，FLG，FLG2，LOR，ELOVL3 及び DEFB4A 遺伝子の発現レベルが上昇した。その後分化した角化細胞を 4.2 nmol/L（50 ng/mL）の IL-13 に 24 時間曝露した。IL-13 の添加により，FLG，FLG2，LOR，ELOVL3 及び DEFB4A 遺伝子の発現が低下した。3 例のドナーの正常皮膚から採取し分化させた角化細胞を，0.78～200 nmol/L のトラロキヌマブ又は IgG4 アイソタイプコントロール抗体存在下で，4.2 nmol/L の IL-13 に 24 時間曝露した。

トラロキヌマブは，IL-13 による各遺伝子の発現減少を濃度依存的に抑制した。FLG と ELOVL3 の結果を図 2.6.2 - 4 に示す。FLG，FLG2，LOR，ELOVL3 及び DEFB4A 遺伝子の発現減少に対するトラロキヌマブの抑制作用の IC_{50}（95%CI; 例数）は，それぞれ 19.1 nmol/L（8.8, 41.4; n=3），16.4 nmol/L（11.6, 23.1; n=3），16.0 nmol/L 及び 13.3 nmol/L（n=2），16.2 nmol/L（8.3, 31.6; n=3）及び 13.0 nmol/L（4.7, 36.0; n=3）であった。3 例中 1 例のドナー由来の細胞では分化による LOR 遺伝子の発現上昇が低値であったため，IL-13 による LOR 遺伝子の発現減少に対するトラロキヌマブの作用は，2 例で評価した。IgG4 アイソタイプコントロール抗体は，IL-13 による FLG，FLG2，LOR，ELOVL3 及び DEFB4A 遺伝子の発現減少に影響を与えなかった。トラ

ロキヌマブは，IL-4 による FLG，FLG2，LOR，ELOVL3 及び DEFB4A 遺伝子の発現減少には影響を与えなかった。



Data represent the mean neutralizing potency with standard error bars over 3 experiments.

図 2.6.2 - 4　IL-13 による ELOVL3 及び FLG 遺伝子の発現減少に対するトラロキヌマブの作用

2.2.1.6　　ヒト皮膚線維芽細胞における炎症メディエーターに対する作用

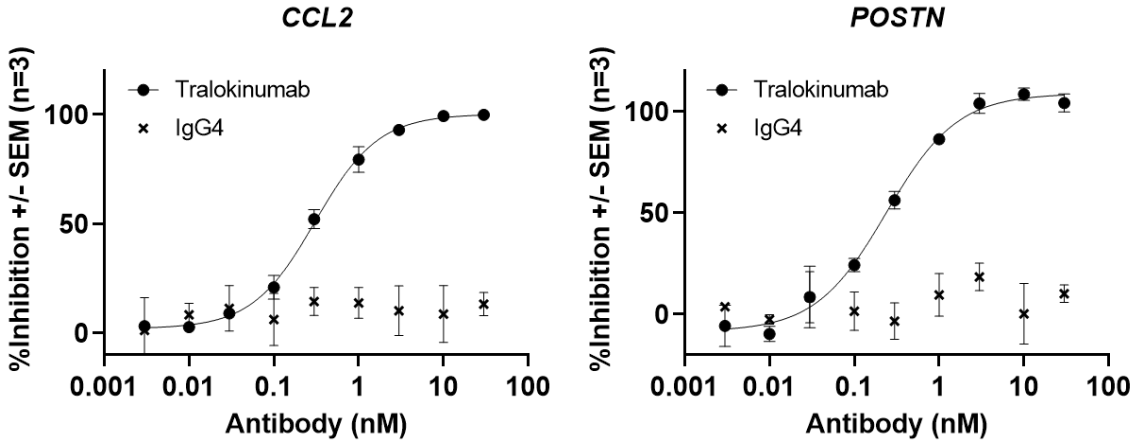
試験番号：REP-HND-2019-04

ヒト皮膚線維芽細胞において IL-13 により誘発される炎症を仲介する因子に対するトラロキヌマブの作用を検討した。主な測定項目は，CCL-2，CCL-11，POSTN 並びに IL-13Rα1，IL-13Rα2 及び IL-4Rα の遺伝子発現とした。

3 例のドナーの正常皮膚から採取した細胞を，0.003～30 nmol/L のトラロキヌマブ又は IgG4 アイソタイプコントロール抗体存在下で，0.16 nmol/L（2 ng/mL）の IL-13 に 24 時間曝露した。使用した IL-13 濃度は，最大反応の約 80%を生じるものとした。

トラロキヌマブは，IL-13 による各遺伝子発現を濃度依存的に抑制した。CCL-2 と POSTN の結果を（図 2.6.2 - 5）に示す。CCL-2，CCL-11 及び POSTN の遺伝子発現に対するトラロキヌマブによる抑制作用の IC_{50}（95%CI; 例数）は，それぞれ 315 pmol/L（129, 765; n=3），112 pmol/L（30, 413; n=3）及び 241 pmol/L（136, 426; n=3）であった。IgG4 アイソタイプコントロール抗体は，これらの遺伝子発現に影響を与えなかった。トラロキヌマブは，IL-4 による CCL-2，CCL-11 及び POSTN 遺伝子の発現には影響を与えなかった。IL-13 は，IL-4Rα，IL-13Rα1 及び IL-13Rα2 の遺伝子発現を変化させず，トラロキヌマブ又は IgG4 アイソタイプコントロール抗体の影響も認められなかった。

遺伝子発現レベルでのトラロキヌマブの影響が蛋白質レベルでも認められることを確認するため，細胞培養上清に遊離された CCL-2 を ELISA 法で測定した。トラロキヌマブは，IL-13 による CCL-2 遊離を濃度依存的に抑制した（IC_{50}=336 pmol/L; n=1）が，IgG4 アイソタイプコントロール抗体はこれを抑制しなかった。トラロキヌマブは，IL-4 による CCL-2 遊離には影響を与えなかった。



Data represent the mean neutralizing potency with standard error bars over 3 experiments.

図 2.6.2 - 5　IL-13 による CCL-2 及び POSTN 遺伝子発現に対するトラロキヌマブの作用

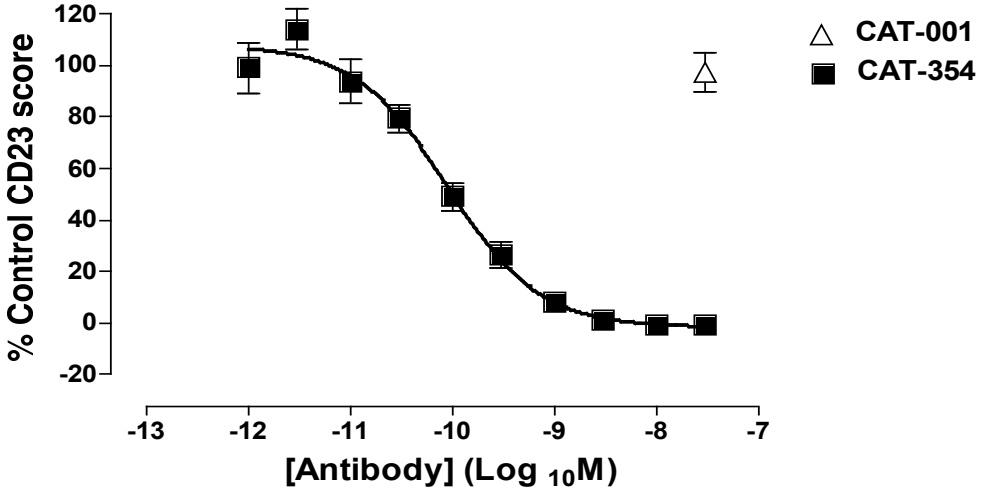
2.2.1.7　　ヒト末梢血単核細胞における CD23 発現に対する作用

試験番号：CAT354Rp039

PBMC において IL-13 により誘発される低親和性 IgE 抗体 CD23 の発現増加に対するトラロキヌマブの作用を検討した。

6 例のドナーのバフィーコートから PBMC を精製し，0.001～30 nmol/L のトラロキヌマブ又は 30 nmol/L の CAT-001 存在下で，80 pmol/L の IL-13 に 48 時間曝露した。CD23 の発現は，フローサイトメトリーを用いて測定した。

トラロキヌマブは，IL-13 による CD23 の発現を濃度依存的に抑制した（図 2.6.2 - 6）。このときの IC_{50} は 120 pmol/L（95% CI, 92.9～155.4 pmol/L; n=6）であった。CAT-001 は，CD23 の発現に影響を与えなかった。トラロキヌマブは，IL-4 による CD23 の発現に影響を与えなかった。



Data represent the mean neutralization potency with standard error bars over 6 experiments
CAT-001 = isotype control antibody; CAT-354 = tralokinumab

図 2.6.2 - 6　IL-13 による CD23 発現に対するトラロキヌマブの作用

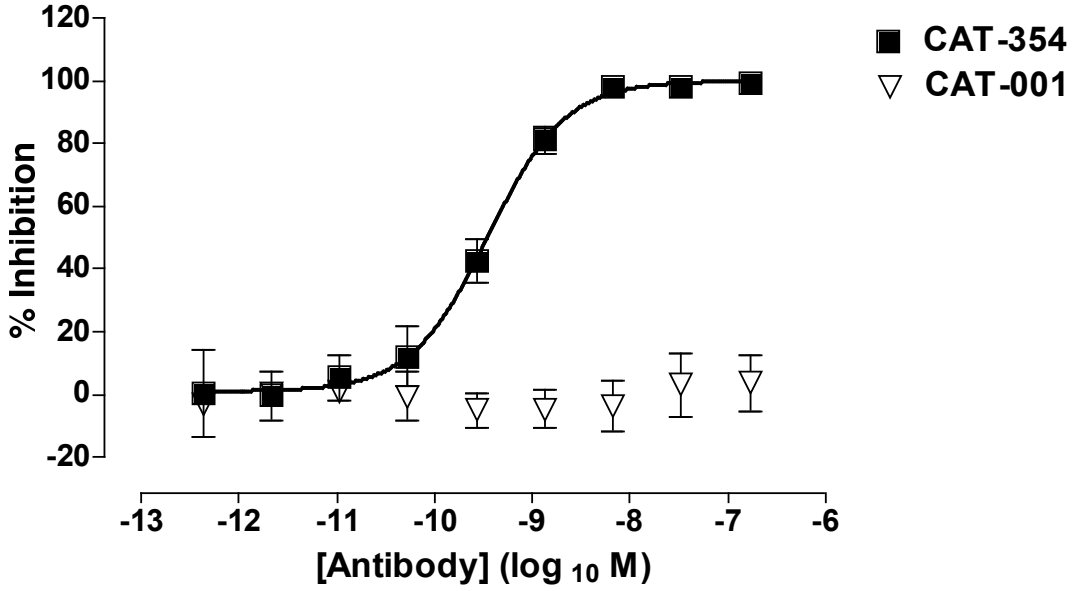
2.2.1.8　ヒト臍帯静脈内皮細胞における血管接着細胞分子-1 発現に対する作用

試験番号：CAT354Rp006

HUVEC（ヒト臍帯静脈内皮細胞）において IL-13 により誘発される VCAM-1 の発現増加に対するトラロキヌマブの作用を検討した。

HUVEC を 0.4 pmol/L～167 nmol/L のトラロキヌマブ又は CAT-001 存在下で，0.8 nmol/L の IL-13 に 16～20 時間曝露した。使用した IL-13 濃度は，最大反応の約 80%を生じるものとした。VCAM-1 の細胞表面での発現を ELISA を用いて測定した。

トラロキヌマブは，細菌由来組換えヒト IL-13 による VCAM-1 の発現を濃度依存的に抑制した（図 2.6.2 - 7）。このときの IC_{50} は 368 pmol/L（95% CI, 204～664 pmol/L; n=5）であった。CAT-001 は，VCAM-1 の発現に影響を与えなかった。



Data represent the mean neutralization potency with standard error bars over 5 experiments.
CAT-001 = isotype control antibody; CAT-354 = tralokinumab

図 2.6.2 - 7　IL-13 による VCAM-1 発現に対するトラロキヌマブの作用

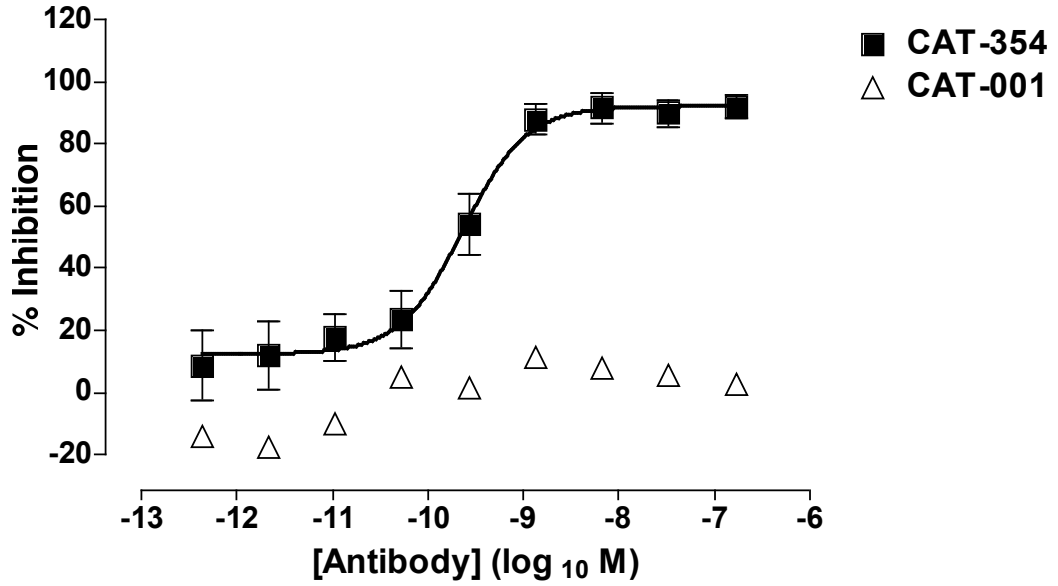
2.2.1.9　ヒト肺線維芽細胞におけるエオタキシン-1 遊離に対する作用

試験番号：CAT354Rp006

NHLF（正常ヒト肺線維芽細胞）から IL-13 により遊離するエオタキシン-1 に対するトラロキヌマブの作用を検討した。

NHLF を 0.4 pmol/L～167 nmol/L トラロキヌマブ又は CAT-001 存在下で，0.8 nmol/L の IL-13 に 16～20 時間曝露した。エオタキシン-1 遊離は ELISA を用いて測定した。

トラロキヌマブは，0.8 nmol/L の細菌由来組換えヒト IL-13 によるエオタキシン-1 遊離を濃度依存的に抑制した（図 2.6.2 - 8）。このときの IC_{50} は 267 pmol/L（95% CI, 155～459 pmol/L; n=4）であった。



Data represent the mean neutralizing potency with standard error bars over 4 experiments.
CAT-001 = isotype control antibody; CAT-354 = tralokinumab

図 2.6.2 - 8　IL-13 によるエオタキシン-1 遊離に対するトラロキヌマブの作用

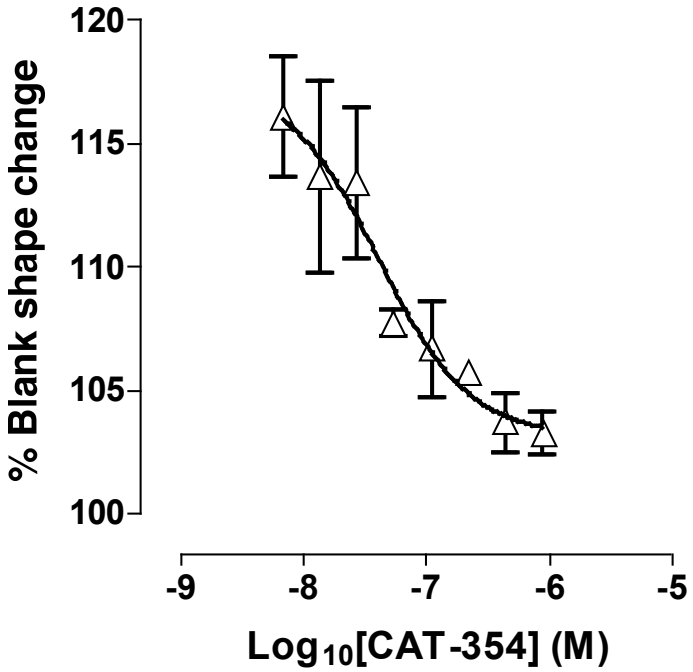
2.2.1.10　好酸球の形態変化に対する作用

試験番号：CAT354Rp042

NHLF から遊離されたエオタキシン-1 による好酸球の形態変化に対するトラロキヌマブの作用を検討した。

NHLF を 9.6 nmol/L の IL-13，285.7 pmol/L の TNF-α（腫瘍壊死因子-α）及び 160 pmol/L の TGF-β1（腫瘍増殖因子-β1）で共刺激し，トラロキヌマブ（6.84～875 nmol/L）非存在下又は存在下で 48 時間培養した。TNF-α及び TGF-β1 はどちらも，エオタキシン-1 産生において IL-13 と相乗作用を示すことが報告されている（Terada et al, 2000; Wenzel et al, 2002）。その後培養液中のエオタキシン-1 を測定し，ヒトバフィーコートから調製した顆粒球を上記培養液で刺激し，8.5 分後（エオタキシンにより好酸球に最大限の形態変化が生じる時間）にフローサイトメトリーにより好酸球の形態変化を測定した。

IL-13/TNF-α/TGF-β1 の共刺激により NHLF の培養液中に 9.6 nmol/L のエオタキシン-1 が遊離した。トラロキヌマブは，この遊離したエオタキシン-1 を濃度依存的に抑制した。共刺激した NHLF の培養液により好酸球の形態変化が生じた。トラロキヌマブは，この形態変化を濃度依存的に抑制した（図 2.6.2 - 9）。このときの IC_{50} は 14.0 nmol/L（95% CI, 1.0～199.5 nmol/L; n = 4）であった。



Data represent the mean neutralizing potency with standard error bars over 4 experiments.
CAT-354 = tralokinumab

図 2.6.2 - 9　好酸球の形態変化に対するトラロキヌマブの作用

2.2.1.11　ヒト末梢血 B 細胞における IgE 産生に対する作用

試験番号：CAT354Rp029

ヒト末梢血 B 細胞において IL-13 による IgE 産生に対するトラロキヌマブの作用を検討した。ヒトバフィーコートから精製した B 細胞をトラロキヌマブ又は CAT-001 存在下で，2.4 nmol/L のヒト IL-13 又は 0.7 nmol/L のヒト IL-4 とともに 14 日間培養した。培養期間中 B 細胞は 1 μg/mL の抗 CD40 抗体 EA5 で共刺激した。その後培養上清に遊離した IgE を ELISA で測定した。

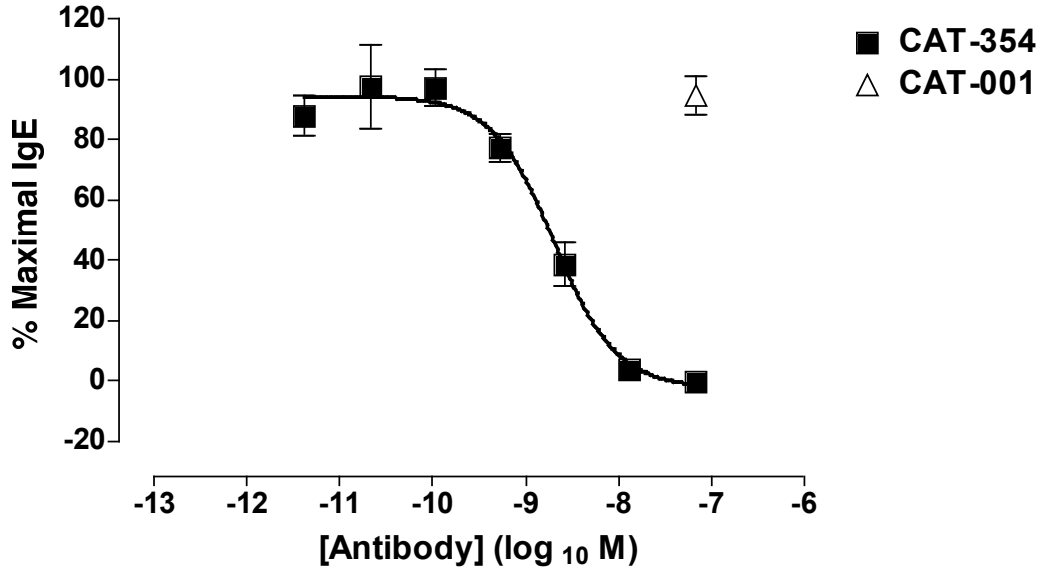
トラロキヌマブは，IL-13 による IgE 産生を濃度依存的に抑制した（図 2.6.2 - 10）。このときの IC_{50} は 1.8 nmol/L（95% CI, 1.4～2.5 nmol/L）であった。トラロキヌマブは，IL-4 による IgE 産生を抑制しなかった。

2.2.1.12　特異性

試験番号：CAT354Rp006，CAT354Rp029，CAT354Rp025，CAT354Rp039

トラロキヌマブの特異性を明らかにするため，HUVEC において IL-4 又は IL-1β による VCAM-1 の発現増加に対するトラロキヌマブの作用を検討した。トラロキヌマブは，IL-4 又は IL-1β の生物活性を中和しなかった。

またトラロキヌマブは，IL-4 によるヒト末梢血 B 細胞からの IgE 産生，ヒト PBMC における CD23 発現及びヒト BSMC（気管支平滑筋細胞）における Ca^{2+}シグナルの増強を抑制しなかった。



Data represent the mean neutralizing potency with standard error bars over 6 experiments.
CAT-001 = isotype control antibody; CAT-354 = tralokinumab

図 2.6.2 - 10　IL-13 による IgE 産生に対するトラロキヌマブの作用

2.2.1.13　トラロキヌマブの種交差反応性

試験番号：CRP354Rp006

ヒトとカニクイザルの IL-13 のアミノ酸配列相同性は高い（94%）が，ヒト IL-13 とげっ歯類 IL-13 では低く，マウス及びラット IL-13 でそれぞれ 60%及び 63%である。TF-1 細胞の増殖抑制を指標にカニクイザル及びマウス IL-13 に対するトラロキヌマブの交差反応性を検討した。トラロキヌマブはバキュロウィルス発現系を用いて得た組換えヒト IL-13 による TF-1 細胞の増殖抑制と同程度の効力でバキュロウィルス発現系を用いて得た組換えカニクイザル IL-13 による TF-1 細胞の増殖を抑制した。しかしトラロキヌマブは，細菌由来組換えマウス IL-13 による TF-1 細胞の増殖を抑制しなかった。IC_{50} を表 2.6.2 - 2 に示す。

表 2.6.2 - 2　ヒト，カニクイザル及びマウス IL-13 による TF-1 細胞の増殖に対するトラロキヌマブの作用

	Geometric Mean IC_{50} (95%CI)
Human IL-13	1.1 (0.7 to 1.6) nmol/L
Mouse IL-13	ND [a]
Nonhuman Primate IL-13	1.7 (1.2 to 2.5) nmol/L

Note: 2 nmol/L of baculovirus-derived human IL-13 and 4 nmol/L of baculovirus-derived cynomolgus monkey IL-13 were used
IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration; ND = not determined
a. IC_{50} not established at > 160 nmol/L tralokinumab

2.2.2　In vivo 試験

マウス及びカニクイザルを用い，トラロキヌマブの薬理作用を in vivo で検討した。トラロキヌマブは，げっ歯類の IL-13 による反応を中和しなかった（2.2.1.13 項）が，ヒト IL-13 はマウス

IL-13 受容体を刺激するため，マウスを用いた試験ではヒト IL-13 による反応を指標にトラロキヌマブの作用を検討した。なお，マウス IL-13 に特異的なマウスホモログ抗体を作成し，マウス空気嚢モデルで検討したが望ましい in vivo 活性は得られなかった。アトピー性皮膚炎の病態動物モデルは複数あるが，ヒトにおける病態を完全に再現するモデルはないと考えられている（Kabashima et al, 2017; Martel et al, 2017; Ewald et al, 2017; Graham et al, 2014）。しかしながら，2.1.5 項に記載した公表されているトランスジェニックマウスの知見に加え，今回提出するマウス及びカニクイザルにおいてヒト IL-13 による反応をトラロキヌマブが抑制した結果から，トラロキヌマブの in vivo での効力が裏付けられていると考える。トラロキヌマブの効力を裏付ける in vivo 試験を表 2.6.2 - 3 にまとめた。

表 2.6.2 - 3　トラロキヌマブの効力を裏付ける in vivo 試験の概要

Study Objective(s)/ Study Number	Tralokinumab Batch Number	Species (Number of Animals)	Treatment Regimen/ROA	Dose	Results
To assess the effect of tralokinumab on human IL-13-induced inflammation in the mouse air pouch model (M4.2.1.1-4 CAT354Rp037)	P030909A	Balb/C female mice (100; 10/group)	A) PBS, tralokinumab, or CAT-251 (null antibody) IPO simultaneously with rhuIL-13 B) PBS, tralokinumab, or CAT-251 (null antibody) IV 30 minutes before rhuIL-13 IPO	A) tralokinumab: 2, 20, or 200 µg CAT-251: 200 µg rhIL-13: 2 µg B) tralokinumab: 1, 10, or 30 mg/kg CAT-251: 30 mg/kg rhuIL-13: 2 µg	rhuIL-13 injected into the air pouch significantly increased infiltration of total leukocytes and eosinophils 24 hours after challenge compared to control animals. Tralokinumab given IPO or IV dose-dependently inhibited IL-13-induced infiltration of total leukocytes and eosinophils in the air pouch. CAT-251 had no effect on air pouch infiltration.
To assess the effect of tralokinumab on AHR and lung inflammation induced by intratracheal administration of rhuIL-13 (M4.2.1.1-8 CAT354Rp043)	20570/2	Balb/C male mice (32; 8/group)	2 groups received tralokinumab or CAT-001 IP 24 hours before intratracheal admini-stration of rhuIL-13 1 group received rhuIL-13 intratracheally 1 group received saline intratracheally	tralokinumab: 1 mg/kg CAT-001: 1 mg/kg rhuIL-13: 25 µg	Intratracheal administration of 25 µg rhuIL-13 induced AHR, lung inflammation, and goblet cell metaplasia. Pretreatment with tralokinumab, but not CAT-001, significantly reduced AHR and BAL eosinophilia.
To assess the single-dose pharmaco-kinetics of tralokinumab in allergic cynomolgus monkeys (M4.2.1.1-3 CAT354Rp034)	P021219A	Ascaris suum-sensitive cynomolgus monkeys (2 males, 2 females)	Single IV bolus infusion of tralokinumab	tralokinumab: 10 mg/kg	Total serum levels of IgE were measured at baseline, 15 minutes, 2 and 8 hours, and 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, and 28 days after dosing. Tralokinumab suppressed total serum IgE levels by 7 days after administration in females with high baseline IgE levels (1209 and 449 ng/mL). Tralokinumab did not reduce serum IgE levels in males with low baseline IgE levels (60 and 67 ng/mL).
To assess the effect of tralokinumab on AHR and lung inflammation in a cynomolgus monkey antigen challenge model (M4.2.1.1-5 CAT354Rp038)	L10357	Ascaris suum-sensitive cynomolgus monkeys (17 males, 5 females)	Phase I: IV histamine challenge on Days 1 and 11; Antigen challenge on Days 9 and 10 Phase II: IV histamine challenge on Days 1 and 11; Antigen challenge on Days 9 and 10; IV CAT-354 on Days 1, 5 and 9	tralokinumab: 30 mg/kg	Tralokinumab: nonsignificantly inhibited AHR measured by PC_{30}; inhibited AHR measured by R_L AUC ($p < 0.05$); inhibited antigen priming ($p < 0.01$); inhibited eosinophil ($p < 0.05$) and total cell ($p < 0.05$) but not macrophage, lymphocyte, or mast cell influx into the BAL.

AHR = airway hyperresponsiveness; BAL = bronchoalveolar lavage; IL-13 = interleukin 13; IPO = intra pouch; IP = intraperitoneal; IV = intravenous; PC_{30} = theoretical dose of IV administered histamine required to increase baseline lung resistance by 30%; R_L AUC = area under the histamine-challenge lung-resistance time curve; rhu = recombinant human; ROA = route of administration

2.2.2.1 マウス空気嚢炎症モデルを用いた検討

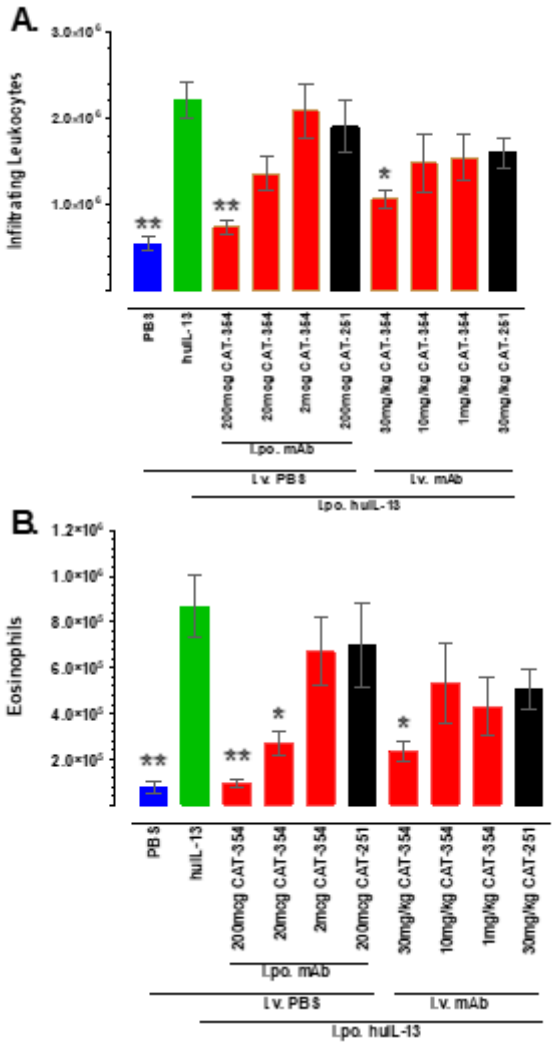
試験番号：CAT354Rp037

本試験の目的は，マウス空気嚢炎症モデルを用い，ヒト IL-13 による炎症に対するトラロキヌマブ局所又は全身投与の影響を検討することであった。雌性 BALB/c マウス（10 例/群）に，組換えヒト IL-13（2 μg）を空気嚢内投与して炎症を惹起し，トラロキヌマブ又はアイソタイプコントロール抗体（CAT-251）を空気嚢内投与の場合は炎症惹起と同時に，静脈内投与の場合は炎症惹起の 30 分前に投与した。他に空気嚢内投与及び静脈内投与いずれにも溶媒を投与する群と溶媒を静脈内投与し組換えヒト IL-13 を空気嚢内投与する群を設けた。トラロキヌマブの用量は，空気嚢内投与の場合 2，20 又は 200 μg，静脈内投与の場合 1，10 又は 30 mg/kg とした。CAT-251 の用量は，空気嚢内投与の場合 200 μg，静脈内投与の場合 30 mg/kg とした。溶媒は，空気嚢内投与の場合 0.75%カルボキシメチルセルロース（CMC）+水+リン酸緩衝生理食塩水（PBS）であり，静脈内投与の場合 PBS であった。

試験 0 日に無菌空気 2.5 mL を各動物の背部皮下に注入して空気嚢を作製し，試験 3 日に再膨張させ，試験 6 日に上記の薬物投与と炎症惹起を行った。24 時間後に動物を安楽死させ，空気嚢を 1 mL のヘパリン含有 PBS で洗浄した。この洗浄液から回収した生存白血球数を測定し，炎症の指標とした。分化細胞数はライトギムザ染色を施したサイトスピンにより計数した。

空気嚢内投与したヒト IL-13 により，投与後 24 時間の総白血球及び好酸球の浸潤が有意に増加した（図 2.6.2 - 11）。空気嚢内投与したトラロキヌマブは，ヒト IL-13 による空気嚢内への総白血球及び好酸球の浸潤を用量依存的に抑制したが，CAT-251 は抑制しなかった。トラロキヌマブは，20 μg 以上で好酸球の浸潤を有意に抑制し，200 μg で総白血球の浸潤を有意に抑制した。静脈内投与したトラロキヌマブもヒト IL-13 による空気嚢内への総白血球及び好酸球の浸潤を用量依存的に抑制したが，CAT-251 は抑制しなかった。トラロキヌマブは，30 mg/kg で好酸球及び総白血球の浸潤を有意に抑制した。

以上のように，局所又は全身投与したトラロキヌマブは，雌性マウス空気嚢においてヒト IL-13 による好酸球炎症を用量依存的に抑制した。



Graph A shows total cell numbers and Graph B shows eosinophil numbers. Data are shown as arithmetic mean ± SEM (n = 9 to10, from 2 experiments) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs rhuIL 13 control; one-way analysis of variance (ANOVA) on log-transformed data, followed by Dunnett's multiple comparisons test to control column (huIL-13).
PBS = phoshate buffered saline, rhuIL-13 = recombinant human IL-13, CAT-251 = isotype control antibody, CAT-354 = tralokinumab, IPO = intrapouch, IV = intravenous

図 2.6.2 - 11　IL-13 によるマウス空気嚢における好酸球炎症に対するトラロキヌマブの作用

2.2.2.2　　マウス肺炎モデルを用いた検討

試験番号：CAT354Rp043

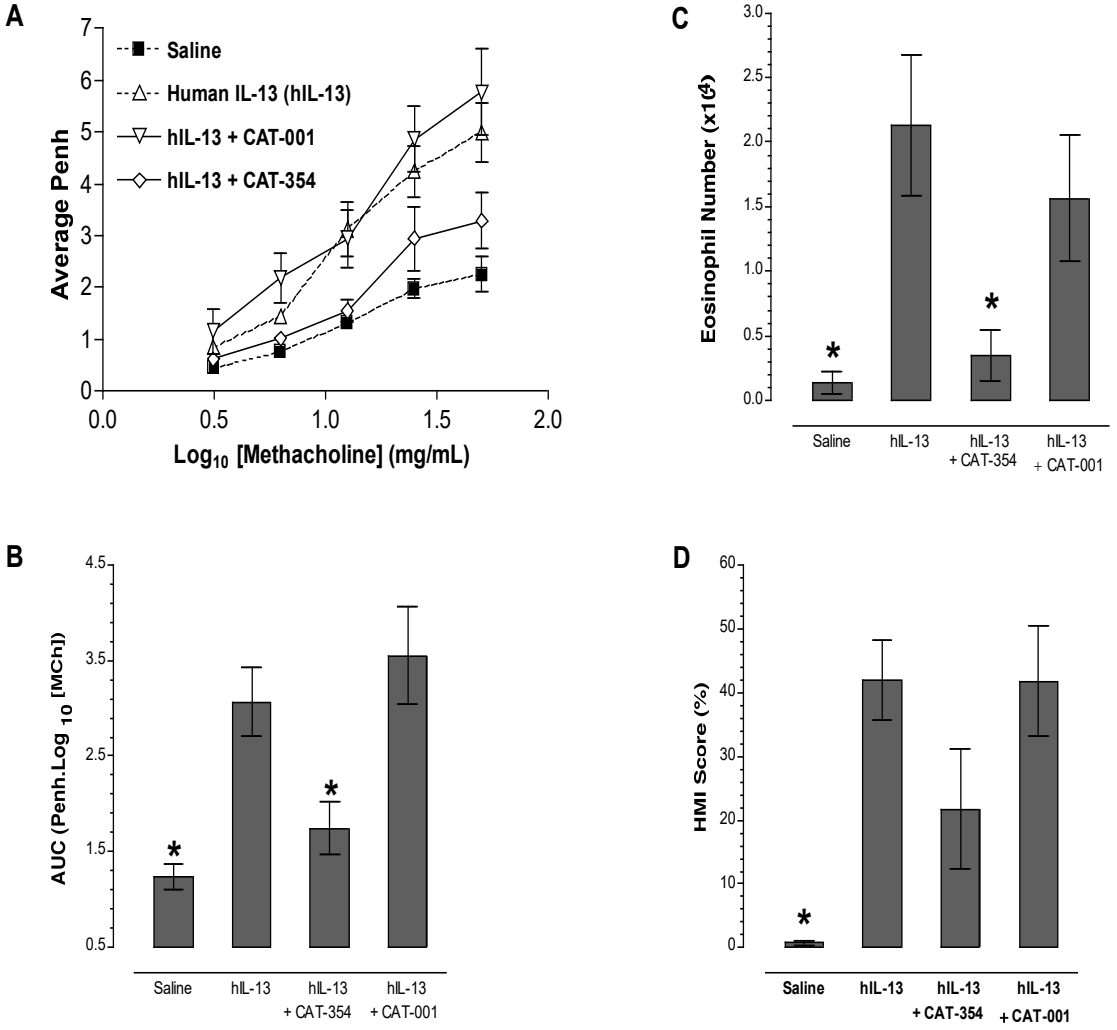
本試験の目的は，マウス肺炎症モデルを用い，ヒト IL-13 による AHR（気道過敏）に対するトラロキヌマブ全身投与の影響を検討することであった。また，炎症細胞の動員及び杯細胞化生に対する影響も検討した。雄性 BALB/c マウス（8 例/群）に，PBS，トラロキヌマブ又は CAT-001 を腹腔内投与し，24 時間後にヒト IL-13 を気管内投与した。抗体の用量はいずれも 1 mg/kg とした。また，PBS を腹腔内投与し，24 時間後に生理食塩液を気管内投与する群も設けた。

試験 1 日及び 3 日に PBS，トラロキヌマブ又は CAT-001 を腹腔内投与し，試験 2 日及び 4 日に 25 μg のヒト IL-13 又は生理食塩液を気管内投与した。試験 5 日にメタコリンに対する気道反応性を気圧プレチスモグラフィーを用い測定し，気道収縮の指標（Penh; enhanced pause）を算出し

た。動物は第 6 日に安楽死させ，BAL（気管支肺胞洗浄）液を採取した後，肺を固定しパラフィン包埋して組織学的解析を行った。

AHR を評価するデータとして，Penh に対してメタコリン濃度をプロットして得られる曲線の曲線下面積（AUC）を台形公式を用いて算出した。生理食塩液を気管内投与した対照群と比較して，AUC が有意に増加した場合にその群を反応過敏とみなした。

BAL 液内の全細胞数を血球計算盤で計測した。分化細胞数をライトギムザで染色されたサイトスピンで計数した。肺切片を過ヨウ素酸シッフ（PAS）で染色し，組織学的粘液係数（HMI）スコア（PAS 陽性上皮細胞の割合）で杯細胞化生を評価した。



Data are shown as arithmetic mean ± SEM (n = 7 to 8 animals). *p < 0.05 vs human IL-13 (hIL-13) control; one way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's multiple comparisons test.
AHR = airway hyperresponsiveness

図 2.6.2 - 12　ヒト IL-13 により誘発される AHR 及び肺への好酸球動員に対するトラロキヌマブの作用

気管内投与したヒト IL-13 により，AHR，好酸球の増加及び杯細胞化生が引き起こされた（図 2.6.2 - 12）。トラロキヌマブ 1 mg/kg の前投与により，AHR 及び好酸球の増加が有意に抑制され

た，CAT-001 では抑制されなかった。トラロキヌマブと CAT-001 いずれも杯細胞化生を抑制しなかった。以上のように，全身投与したトラロキヌマブは，雄性マウス肺においてヒト IL-13 による AHR 及び好酸球の増加を抑制し，杯細胞化生を抑制しなかった。

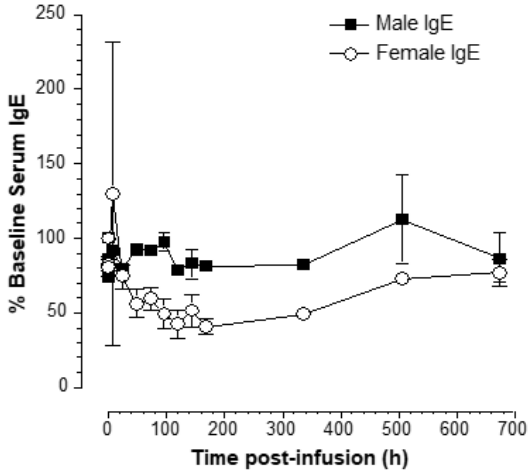
2.2.2.3　　カニクイザルのアレルギーモデルを用いた検討

試験番号：CAT354Rp034

本試験の目的は，カニクイザルのアレルギーモデルを用い，トラロキヌマブ単回投与時の薬物動態を検討し，合わせて血清 IgE 値に対するトラロキヌマブの影響を検討することであった。薬物動態の結果は 2.6.4.3.1 項に示した。ブタ回虫感受性のカニクイザル（2 例/性）に，トラロキヌマブの 10 mg/kg を単回静脈内投与した。

血清 IgE 濃度を，ベースライン，投与後 15 分，2 及び 8 時間並びに 1，2，3，4，5，6，7，14，21 及び 28 日に採取した血清試料より ELISA を用いて測定した。

トラロキヌマブは，ベースライン血清 IgE 高値（1209 及び 449 ng/mL）の雌において，血清 IgE 値を低下させたが，ベースライン血清 IgE 低値（60 及び 67 ng/mL）の雄において，血清 IgE 値を低下させなかった（図 2.6.2 - 13）。雌の血清 IgE 値は，投与 7 日で 60%低下し投与 28 日まで回復しなかった。



Data are shown as the mean ± SEM of the percentage of the baseline serum IgE level (n = 2 animals/sex).
IgE = immunoglobulin E

図 2.6.2 - 13　カニクイザルアレルギーモデルにおける血清 IgE 値に対するトラロキヌマブの作用

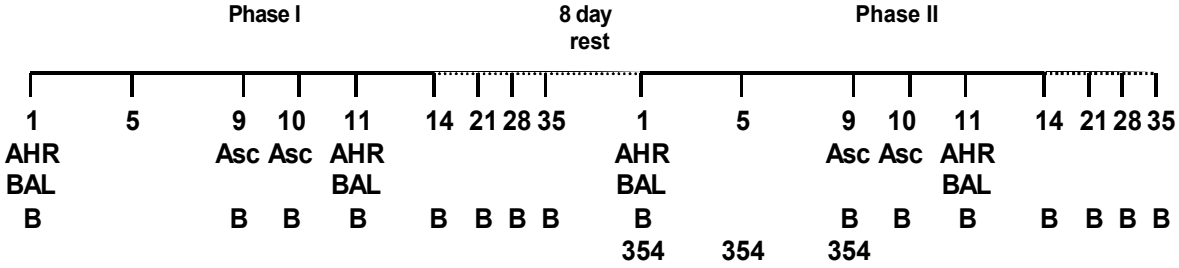
トラロキヌマブは，ベースライン血清 IgE 高値のブタ回虫感受性カニクイザルにおいて，血清 IgE 値を低下させた。この作用は， B 細胞から IL-13 により産生される IgE が抑制された結果と考えられる。実際，トラロキヌマブは，in vitro でヒト末梢血 B 細胞において IL-13 による IgE 産生を抑制した（2.2.1.11 項）。

2.2.2.4　カニクイザルの抗原チャレンジモデルを用いた検討

試験番号：CAT354Rp038

カニクイザルの抗原チャレンジモデルにおいて，トラロキヌマブの AHR 及び肺炎症（特に好酸球の増加）に対する作用を検討した。ブタ回虫感受性カニクイザル 22 例（雄 17 例，雌 5 例）を用い，抗原（ブタ回虫抽出物）チャレンジ後の各パラメータに対するトラロキヌマブ 30mg/kg 静脈内投与の影響を検討した。

試験は 2 相に分けて実施した（図 2.6.2 - 14）。第 1 相では比較対照のためのパラメータを測定した。すなわち，試験 1 日及び 11 日にヒスタミンを静脈内漸増投与して肺抵抗（R_L）を測定し用量反応曲線を作成した。この用量反応曲線に基づきベースラインから R_L を 30%増加させるのに必要なヒスタミンの用量（PC_{30}）を決定した。また，この用量反応曲線の AUC（R_L AUC）を求め，これらを AHR の指標とした。試験 9 及び 10 日に抗原に吸入曝露させ，試験 11 日に AHR を評価し BAL 液を採取した。一般的に知られている抗原プライミング（初回の抗原曝露による肺抵抗の増加より 2 回目の増加の方が大きくなること）が抗原曝露時に測定した R_L により本試験でも認められた。BAL 液中の細胞は染色したサイトスピンで計数した。第 1 相からインターバルをおいた後，第 2 相は，試験 1，5 及び 9 日にトラロキヌマブを 30 mg/kg 静脈内投与した以外は，第 1 相と同様に実施した。トラロキヌマブの影響は，第 1 相と第 2 相でみられた変化を比較して評価した。

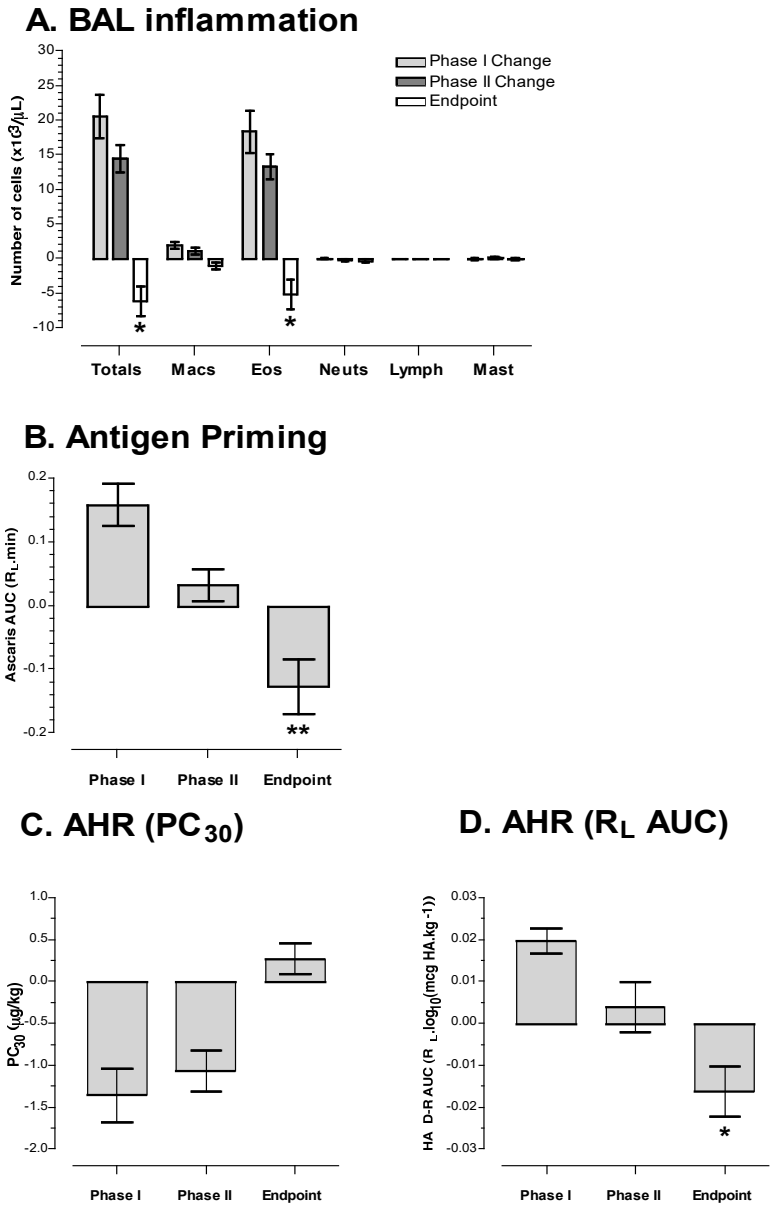


AHR = airways hyperresponsiveness measurement via histamine dose-response curve; BAL = bronchoalveolar lavage; Asc = nebulized ascaris challenge; B = blood sample; 354 = 30 mg/kg tralokinumab infusion

図 2.6.2 - 14　試験デザイン

結果を図 2.6.2 - 15 に示す。トラロキヌマブは，PC_{30} による評価では AHR に対して抑制傾向を示した。一方，R_L AUC による評価では AHR を有意に抑制した。またトラロキヌマブは，抗原プライミングを統計学的有意に抑制した。トラロキヌマブは全細胞及び好酸球の BAL 液への流入を統計的有意に抑制したが，マクロファージ，リンパ球又は肥満細胞は抑制しなかった。

以上のように，トラロキヌマブは，PC_{30} の抗原による変化を抑制する傾向を示し，R_L AUC の抗原による変化を有意に抑制した。またトラロキヌマブは抗原プライミング及び BAL 液における好酸球増加も有意に抑制した。したがってトラロキヌマブは，ブタ回虫感受性カニクイザルにおいて肺機能及び肺炎症をどちらも有意に改善した。



A: BAL inflammation (n = 21); B: Antigen priming (n = 20); C: Histamine AHR by PC_{30} (n = 18); and D: Histamine AHR by R_L AUC (n = 14).
Data are displayed as the arithmetic mean ± SEM of individual animal phase changes, defined as the response at Day 11 compared to Day 1, and the endpoint defined as individual animal change in Phase II minus that in Phase I. Statistical testing was performed only on the endpoint and was a 2-way Student's t-test with the null hypothesis that the endpoint contained the number 0. *p < 0.05, **p < 0.01
Totals = total cells; Macs = macrophages; Eos = eosinophils; Neuts = neutrophils; Lymph = lymphocytes; Mast = mast cells

図 2.6.2 - 15　カニクイザルアレルギーモデルにおける肺機能及び炎症に対する
トラロキヌマブの作用

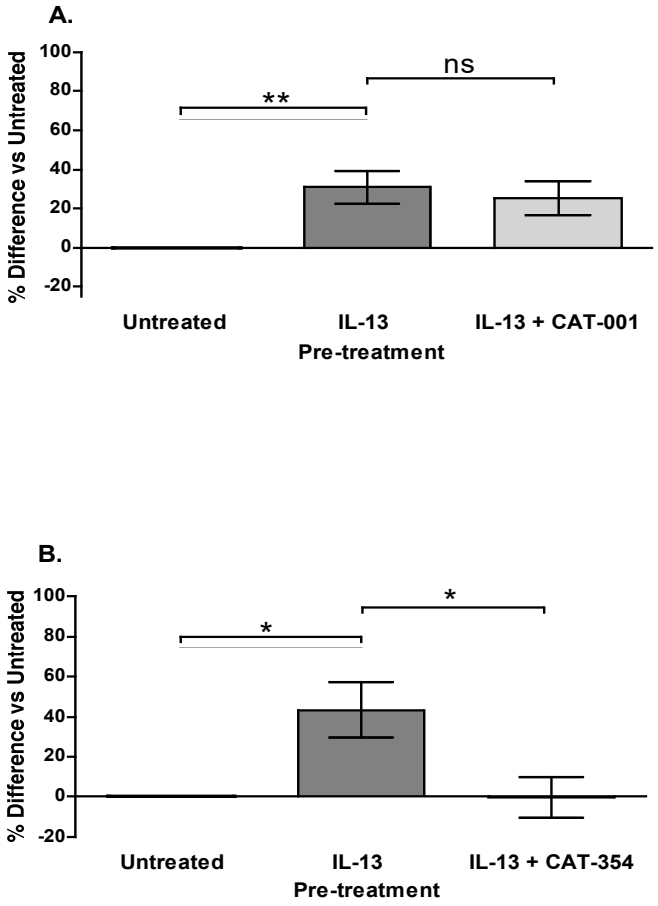
3　副次的薬理試験

本項では，トラロキヌマブの抗喘息作用に関連した in vitro 試験，感染リスクに関する評価並びに Fc エフェクター機能に関する評価を要約した。

3.1　ヒト気管支平滑筋細胞におけるカルシウム動員

試験番号：CAT354Rp025

IL-13 が気道平滑筋の収縮性を直接調節することが明らかとなっている。この作用の少なくとも一部は，平滑筋収縮に必須の，収縮性アゴニストによる細胞内ストアからの Ca^{2+}動員の増強により仲介される。そこで，ヒスタミンによる Ca^{2+}動員を増強する IL-13 の作用に対するトラロキヌマブの影響を検討した。



Data are shown for CAT-001 (A.) and tralokinumab (CAT-354) (B.) as the percentage difference in AUC versus untreated cells of AUC ± SD. Differences in cell responses between treatments were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparisons post-test.
* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; ns = not statistically significant; BSMCs = bronchial smooth muscle cells

図 2.6.2 - 16　BSMC における Ca^{2+}動員の IL-13 による増強に対するトラロキヌマブの作用

初代培養ヒト BSMC をトラロキヌマブ又は CAT-001（いずれも 67 nmol/L）存在下で，4 nmol/L の IL-13 とともに 18～24 時間培養した。ヒスタミンによる Ca^{2+}動員は，蛍光イメージングプレートリーダーを用いた 96-well フォーマットで測定した。ヒスタミン添加後のピーク蛍光の用量反応曲線を作成し，AUC を算出した。

初代培養ヒト BSMC におけるヒスタミンによる Ca^{2+}動員は，IL-13 により有意に増強され，トラロキヌマブ 67 nmol/L は，この増強を有意に抑制したが，CAT 001 は抑制しなかった（図 2.6.2 - 16）。

3.2　感染リスク

トラロキヌマブの投与により，AD で炎症を引き起こす IL-13 のシグナル伝達が抑制される。IL-13 は特定の免疫反応で重要な役割を果たすため，そのシグナル伝達の抑制により予期せぬ影響が生じる可能性もある。本項では感染リスクについて述べる。

IL-13 の抑制による感染リスクを，公表論文のレビューにより評価した（4.2.3.7.7-1 項，報告書番号：eDoc-000739212）。公表されている非臨床試験で IL-13 及び IL-4 の発現減少が寄生生物に対する宿主反応に悪影響を及ぼすとして，ヒトでの蠕虫感染に関する安全性リスクが特定されている。IL-13 及び IL-4 は蠕虫に対する 2 型免疫反応で中心的役割を果たすため，これは想定内であった。一方，文献レビューでは細菌，真菌類又は細胞内寄生体による感染に関連する非臨床の安全性シグナルは特定されなかった。

トラロキヌマブを用いた非臨床安全性試験では，以下のように免疫毒性又は感染リスクを示す結果は得られなかった。

- いずれの試験でも投与による感染は認められなかった。
- 血液学的検査及びリンパ球サブセットに関する免疫表現型検査で投与による変化は認められなかった。
- リンパ器官，骨髄又はその他の組織に毒性学的に意味のある組織学的所見は認められなかった。
- 免疫毒性を検討する手法の一つであるキーホールリンペットヘモシアニン免疫に対する T 細胞依存性抗体反応を検討した結果に基づくと，免疫機能への影響は認められなかった。

以上のように，科学的根拠の重みづけに基づき，IL-13 及び IL-4 を阻害することによる蠕虫感染に対する潜在的な安全性リスクが想定されたが，その他の感染リスク増加を示す知見は認められなかった。

3.3　Fc エフェクター機能

トラロキヌマブの Fc 部位の免疫エフェクター機能に対する影響を評価した。詳細は 3.2.S.3.1 項に示し，以下に要約する。

抗原を発現している標的細胞に結合した抗体の Fc 領域は，エフェクター細胞上の Fc ガンマ受容体（Fcγ R）に結合し，エフェクター細胞が標的細胞を溶解する抗体依存性細胞傷害（ADCC）をもたらす。トラロキヌマブは IgG4 抗体であるため，ADCC 及び補体依存性細胞傷害（CDC）などの Fc エフェクター機能は低いと考えられる（Davies et al; 2015）。

さらに，トラロキヌマブは可溶性 IL-13 サイトカインを標的とする抗 IL-13 モノクローナル抗体であり，受容体に結合した IL-13 には結合しないことから，ADCC 及び CDC 活性を有するとは考えにくい。膜結合型の IL-13 についての報告はない。

トラロキヌマブの Fcγ RI，Fcγ RIIA，Fcγ RIIB 及び Fcγ RIIIA に対する結合能を検討したデータでは，Fcγ R に結合する可能性はほとんどないことが示されている（3.2.S.3.1 項）。

4　安全性薬理試験

トラロキヌマブを用いた独立した安全性薬理試験は実施していないが，心血管系，呼吸器系，行動／中枢神経系の安全性薬理パラメータをカニクイザルを用いた反復投与毒性試験内で評価した（2.6.6.3 項）。トラロキヌマブ 100 mg/kg までの週 1 回静脈内投与で，心血管系（心電図，心拍数及び血圧），呼吸系，行動（一般症状）に影響は認められなかった。また，拡充型出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験で，トラロキヌマブ 100 mg/kg までを週 1 回静脈内投与した母動物からの出生児で神経行動学的評価を実施した。その結果，正向反射，手掌把握反射，握力，視覚的追尾，うつ伏せからの姿勢変化，リップスマッキング行動，口腔反射（探索，吸引，口とがらし反射），眼反射（縮瞳，眼球振盪，眉間叩打反射），モロー反射，背地走性，ビルドアップ（操作に応じた覚醒度の上昇）などにトラロキヌマブによる影響は認められなかった（試験番号：20054081）。

一般に，モノクローナル抗体のような高分子はその大きさから細胞膜を透過しにくく，また，その特異性からヒト ether-a-go-go 関連遺伝子がコードするカリウムチャネルと相互作用するとは考えにくいとされていることから（Vargas HM et al.2008），トラロキヌマブの当該試験は実施しなかった。

5　薬力学的薬物相互作用

トラロキヌマブを用いた薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

6　考察及び結論

本項で示した試験結果は，トラロキヌマブがヒト IL-13 対して特異的で高い親和性を有することを示している。トラロキヌマブは，AD に関連するヒト表皮由来の細胞種をはじめとするさまざまな初代細胞を用いた試験で，ヒト IL-13 の作用を強力に抑制した。トラロキヌマブは，ヒト IL-13 に対するのと同程度の効力でカニクイザル IL-13 の作用を抑制したが，マウス IL-13 と交差反応しなかったことから，カニクイザルを用いて薬物動態試験及び毒性試験を実施した。

トラロキヌマブは，マウスへの局所又は全身投与により，in vivo で抗炎症作用を示し，ヒト IL-13 による総白血球及び好酸球浸潤を抑制した。またトラロキヌマブは，カニクイザルのアレルギーモデルにおいて抗原プライミング及び好酸球浸潤を抑制した。

公表されている非臨床試験から，ヒトで IL-4/IL-13 を抑制した際の蠕虫感染に関する安全性リスクが特定されたが，その他の感染リスクの増加を示す知見は認められなかった。

トラロキヌマブは IgG4 クラスに属しており，可溶性の標的に結合し，また Fc γ R への結合は限られているため，ADCC 又は CDC といった Fc エフェクター機能によるリスクは低いと考えられる。

カニクイザルにトラロキヌマブを 100 mg/kg まで週 1 回最長 26 週間反復静脈内投与した毒性試験で評価した安全性薬理パラメータ（心血管系，呼吸器系，行動／中枢神経系）に有害作用を示す変化はなく，妊娠中に 100 mg/kg まで週 1 回トラロキヌマブを投与した雌カニクイザルの出生児に神経行動学的影響は認められなかった。

以上の結果は，トラロキヌマブの AD 治療薬としての有効性及び安全性を裏付けるものと考える。

7　引用文献

Albanesi C et al. IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha and IFN-gamma- Induced Beta-Defensin Expression through STAT-6, Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. J Immunol 2007; 179:984-992

Arima K et al. Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma. J Allergy Clin Immunol. 2002; 109: 980-7

Barnes KC et al. An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009 J Allergy Clin Immunol 2010;125(1):16-29

Berdyshev E et al. Lipid abnormalities in atopic skin are driven by type 2 cytokines. JCI Insight. 2018;3(4):e980062018

Bochner BS et al. IL-13 Selectively Induces Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Human Endothelial Cells. J immunol. 1995; 154: 799-803

Brunner PM et al. The atopic dermatitis blood signature is characterized by increases in inflammatory and cardiovascular risk proteins. Sci Rep 2017;7:Article number: 8707

Chen W et al. Functional effect of the R110Q IL13 genetic variant alone and in combination with IL4RA genetic variants. J Allergy Clin Immunol. 2004; 114: 553-60

Chen W et al. IL-13 receptor a2 contributes to development of experimental allergic asthma. J Allergy Clin Immunol 2013;132(4):951-958

Danso MO et al. TNF-alpha and Th2 Cytokines Induce Atopic Dermatitis- Like Features on Epidermal Differentiation Proteins and Stratum Corneum Lipids in Human Skin Equivalents. J Invest Dermatol. 2014; 134: 1941-1950

Davies AM et al. Human IgG4: a structural perspective. Immunol Rev 2015;268:139-159

Donaldson DD et al. The Murine IL-13 Receptor alpha2: Molecular Cloning, Characterization, and Comparison with Murine IL-13 Receptor alpha1. J Immunol 1998; 161:2317-2324

Ewald DA et al. Major differences between human atopic dermatitis and murine models, as determined by using global transcriptomic profiling. J Allergy Clin Immunol. 2017; 139: 562-71

Fichtner-Feigl S et al. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis Nat Med 2006;12(1):99-106

Fukuda K et al. Differential expression of thymus- and activation-regulated chemokine (CCL17) and macrophage-derived chemokine (CCL22) by human fibroblasts from cornea, skin, and lung. J Allergy Clin Immunol 2003;111(3):520-526

Gittler JK et al. Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2012; 130: 1344-54

Graham MT et al. Lessons learned from mice and man: Mimicking human allergy through mouse models. Clinical Immunology. 2014; 155: 1-16

Graves PE et al. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. J Allergy Clin Immunol. 2000; 105: 506-13

Hamid Q et al. In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 1996; 98: 225-31

He JQ et al. Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children Genes Immun 2003;4(5):385-9

He CH et al. Chitinase 3-like 1 Regulates Cellular and Tissue Responses via IL-13 Receptor α2. Cell Rep. 2013; 4(4): 830-841

Heinzmann A et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. Human Molecular Genetics. 2000; 9(4): 549-559

Hershey GKK et al. IL-13 receptors and signaling pathways: An evolving web. J Allergy Clin Immunol. 2003; 111: 677-90

Hijnen D et al. CD8+ T Cells in the Lesional Skin of Atopic Dermatitis and Psoriasis Patients Are an Important Source of IFN-gamma, IL-13, IL-17, and IL-22. J Invest Dermatol 2013; 133: 973-979

Hoeck J et al. Activation of Eotaxin-3/CCL26 Gene Expression in Human Dermal Fibroblasts Is Mediated by STAT6. J Immunol 2001; 167:3216-3222

Howard TD et al. Identification and Association of Polymorphisms in the Interleukin- 13Gene with Asthma and Atopy in a Dutch Population. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001; 25: 377-384

Howell MD et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression J Allergy Clin Immunol 2007;120(1):150-5

Hummelshoj T et al. Association between an interleukin-13 promoter polymorphism and atopy. Eur J Immunogenet. 2003; 30: 355-359

Hönzke S et al. Influence of Th2 Cytokines on the Cornified Envelope, Tight Junction Proteins, and Beta-Defensins in Filaggrin-Deficient Skin Equivalents. J Invest Dermatol 2016;136:631-639

Kabashima K et al. Revisiting murine models for atopic dermatitis and psoriasis with multipolar cytokine axes. Current Opinion in Immunology. 2017; 48: 99-107

Kagami S et al. Interleukin-4 and interleukin-13 enhance CCL 26 production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. Clin Exp Immunol. 2005 Sep;141(3):459- 66

Kaur D et al. Mast cells express IL-13Ra1: IL-13 promotes human lung mast cell proliferation and FceRI expression. Allergy. 2006; 61: 1047-1053

Kim BE et al. Significance of Skin Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. Allergy Asthma Immunol Res. 2018; 10(3): 207-215

Kim BE et al. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. Clin Immunol. 2008;126:332-7

Kotowicz K et al. Biological activity of IL-4 and IL-13 on human endothelial cells: functional evidence that both cytokines act through the same receptor. Int immunol. 1996; 8(12): 1915-1925

La Grutta S et al. CD4+IL-13+ cells in peripheral blood well correlates with the severity of atopic dermatitis in children. Allergy. 2005; 60: 391-395

Lee GR et al. Transgenic mice which overproduce Th2 cytokines develop spontaneous atopic dermatitis and asthma Int Immunol 2004;16(8):1155-60

Lee E et al. Atopic dermatitis phenotype with early onset and high serum IL-13 is linked to the new development of bronchial hyperresponsiveness in school children. Allergy 2016; 71: 692-700

Liu X et al. An IL13 coding region variant is associated with a high total serum IgE level and atopic dermatitis in the German Multicenter Atopy Study (MAS-90). J Allergy Clin Immunol. 2000; 106: 167-70

Liu X et al. Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: The German Multicenter Atopy Study. J Allergy Clin Immunol. 2003; 112: 382-8

Liu X et al. Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: The German Multicenter Atopy Study. J Allergy Clin Immunol. 2004; 113: 489-95

McKenzie ANJ et al. Interleukin 13, aT-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 3735-3739

Martel BC et al. Translational Animal Models of Atopic Dermatitis for Preclinical Studies. Yale Journal of Biology and Medicine. 2017; 90: 389-402

Mashiko S et al. Increased frequencies of basophils, type 2 innate lymphoid cells and Th2 cells in skin of patients with atopic dermatitis but not psoriasis. J Dermatol Sci 2017;88:167-174

Masuoka M et al. Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. J Clin Invest 2012;122(7):2590-2600

Moriya C et al. Expression of Matrix Metalloproteinase-13 Is Controlled by IL-13 via PI3K/Akt3 and PKC-d in Normal Human Dermal Fibroblasts. J Invest Dermatol 2011;131:655-661

Nomura et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response Genes J Immunol 2003;171:3262-9

Novak N et al. Dichotomic nature of atopic dermatitis reflected by combined analysis of monocyte immunophenotyping and single nucleotide polymorphisms of the interleukin-4/interleukin-13 receptor gene: the dichotomy of extrinsic and intrinsic atopic dermatitis J Invest Dermatol 2002;119(4):870-5

Omori-Miyake M et al. In vitro assessment of IL-4- or IL-13-mediated changes in the structural components of keratinocytes in mice and humans J Invest Dermatol 2014;134(5):1342-50

Ong PY et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis N Engl J Med 2002;347:1151-60

Paternoster L et al. Multi-ethnic genome-wide association study of 21,000 cases and 95,000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis. Nat Genet. 2015; 47(12): 1449-1456

Pellerin L et al. Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. J Allergy Clin Immunol 2013;131(4):1094-1102

Punnonen J et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 3730-3734

Punnonen J et al. The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4 ÷ or CD8 + T cells. J Allergy Clin Immunol 1997;100:792- 801

Purwar R et al. IL-13-stimulated human keratinocytes preferentially attract CD4+CCR4+ T cells: possible role in atopic dermatitis J Invest Dermatol 2006;126(5):1043-51

Purwar R et al. Modulation of keratinocyte-derived MMP-9 by IL-13: a possible role for the pathogenesis of epidermal inflammation J Invest Dermatol 2008;128(1):59-66

Salimi M et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. J Exp Med 2013;210 (13):2939-2950

Sehra S et al. IL-4 regulates skin homeostasis and the predisposition toward allergic skin inflammation J Immunol 2010;184(6):3186-90

Shin JW et al. Defective basement membrane in atopic dermatitis and possible role of IL-13. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015 29(10):2051-2065

Simon D et al. The Interleukin-13 Production by Peripheral Blood T Cells from Atopic Dermatitis Patients Does Not Require CD2 Costimulation. Int Arch Allergy Immunol 2003;132:148-155

Sivaprasad U et al. IL-13Ralpha2 Has a Protective Role in a Mouse Model of Cutaneous Inflammation. J Immunol 2010; 185:6802-6808

Suarez-Farinas M et al. Intrinsic atopic dermatitis shows similar TH2 and higher TH17 immune activation compared with extrinsic atopic dermatitis J Allergy Clin Immunol. 2013;132(2):361-70

Tazawa T et al. Relative importance of IL-4 and IL-13 in lesional skin of atopic dermatitis Arch Dermatol Res 2004;295(11):459-64

Terada N et al. Interleukin-13 and tumour necrosis factor-α synergistically induce eotaxin production in human nasal fibroblasts. Clin Exp Allergy 2000;30(3):348-55

Teraki Y et al. IL-13/IL-22-coproducing T cells, a novel subset, are increased in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2013; 132(4): 971-974

Tokura Y et al. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. J Dermatol Sci. 2010; 58: 1-7

Tripp CS et al. RPC4046, A Novel Anti-interleukin-13 Antibody, Blocks IL-13 Binding to IL-13 a1 and a2 Receptors: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation First-in-Human Study. Adv Ther 2017;34:1364-1381

Tsoi et al. Atopic dermatitis is an IL-13 dominant disease with greater molecular heterogeneity compared to psoriasis. J Invest Dermatol. 2019 Jan 11; [Epub ahead of print]

Van Der Pouw Kraan TCTM et al. An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. Genes and immunity. 1999; 1: 61-65

Vargas HM et al. Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics. J Pharmacol Toxicol Methods. 2008; 58: 72-76

Vladich FD et al. IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. J Clin Invest. 2005;115:747-54

Weidinger S et al. A genome-wide association study of atopic dermatitis identifies loci with overlapping effects on asthma and psoriasis. Human Molecular Genetics. 2013; 22(23): 4841-4856

Wenzel SE et al. TGF-beta and IL-13 Synergistically Increase Eotaxin-1 Production in Human Airway Fibroblasts. J Immunol 2002;169:4613-4619

Wood N et al. Enhanced Interleukin (IL)-13 Responses in Mice Lacking IL-13 Receptor alpha-2. J exp med. 2003; 197(6): 703-709

Zheng T et al. IL-13 Receptor alpha2 Selectively Inhibits IL-13-Induced Responses in the Murine Lung. J Immunol 2008;180:522-529

Zheng T et al. Transgenic expression of interleukin-13 in the skin induces a pruritic dermatitis and skin remodeling J Invest Dermatol 2009;129(3):742-51

Zitnik SE et al. IL13 variants are associated with total serum IgE and early sensitization to food allergens in children with atopic dermatitis. Pediatr Allergy Immunol. 2009; 20: 551-555

トラロキヌマブ（遺伝子組換え）

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

レオ ファーマ株式会社

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－in vitro 6
2.6.3.3　効力を裏付ける試験－in vivo 10
2.6.3.4　副次的薬理試験 12
2.6.3.5　安全性薬理試験 13

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: Tralokinumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics	BIAcore, TF-1 proliferation assay, HDLM-2 proliferation assay, normal human lung fibroblast assay, and human umbilical vein endothelial cell assay	In vitro	Cambridge Antibody Technology Ltd., Cambridge, UK	CAT354Rp006	4.2.1.1
	BIAcore; HTRF assay; protein crystallization; protein structure solution	In vitro	MedImmune Milstein Building, Granta Park Cambridge, UK	RIA354-049	4.2.1.1
	Primary human epidermal keratinocytes	In vitro	LEO Pharma A/S, Ballerup, DK	REP-HND-2019-02	4.2.1.1
	Primary human epidermal keratinocytes differentiated in vitro	In vitro	LEO Pharma A/S, Ballerup, DK	REP-HND-2019-03	4.2.1.1
	Primary human dermal fibroblasts	In vitro	LEO Pharma A/S, Ballerup, DK	REP-HND-2019-04	4.2.1.1
	Human peripheral blood mononuclear cells	In vitro	Cambridge Antibody Technology Ltd., Cambridge, UK	CAT354Rp039	4.2.1.1
	Granulocytes purified from human buffy coats	In vitro	Cambridge Antibody Technology Ltd., Cambridge, UK	CAT354Rp042	4.2.1.1
	Purified human peripheral B cells	In vitro	Cambridge Antibody Technology Ltd., Cambridge, UK	CAT354Rp029	4.2.1.1

Abbreviations: TF-1 = human erythroleukemic cell line, HDLM-2 = Hodgkin’s lymphoma derived cell line, HTRF = Homogeneous Time Resolved Fluorescence,

2.6.3.1　薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: Tralokinumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics	BALB/C female mice	i.po. or i.v.	Cambridge Antibody Technology Ltd., Cambridge, UK	CAT354Rp037	4.2.1.1
	BALB/C male mice	i.p.	[redacted], USA Cambridge Antibody Technology Ltd., Cambridge, UK	CAT354Rp043	4.2.1.1
	Ascaris suum-sensitive cynomolgus monkeys	i.v.	Cambridge Antibody Technology Ltd., Cambridge, UK [redacted], USA	CAT354Rp034	4.2.1.1
	Ascaris suum-sensitive cynomolgus monkeys	i.v	[redacted], USA	CAT354Rp038	4.2.1.1
Secondary Pharmacodynamics	Primary human bronchial smooth muscle cells	In vitro	Cambridge Antibody Technology Ltd., Cambridge, UK	CAT354Rp025	4.2.1.2

Abbreviations: i.p. = intraperitoneal, i.po. = into the air pouch, i.v. = intravenous

2.6.3.1　薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: Tralokinumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Safety Pharmacology*	Cynomolgus monkey (4 weeks)	i.v.	[redacted] England	1348/053	4.2.3.2
	Cynomolgus monkey (13 weeks)	i.v.	[redacted] England	1348/058	4.2.3.2
	Cynomolgus monkey (26 weeks)	i.v.	[redacted], UK	509615	4.2.3.2
	Male cynomolgus monkey (4 weeks)	s.c.	[redacted], UK	513066	4.2.3.2
	Cynomolgus monkey (13 weeks)	s.c.	[redacted], UK	514981	4.2.3.2
	Infant cynomolgus monkey	i.v. (to maternal animals)	[redacted], US	20054081	4.2.3.5

*No stand-alone safety pharmacology studies were conducted with tralokinumab but relevant safety pharmacological parameters were included in the GLP repeat-dose and enhanced pre- and postnatal development toxicology studies, please see section 2.6.6.3 Repeat-dose toxicity and 2.6.6.6.3 Pre- and Postnatal Development, including Maternal Function.
Abbreviations: i.v. = intravenous, s.c. = subcutaneous

2.6.3.2 効力を裏付ける試験－in vitro

Test Article: Tralokinumab

Study Objective(s)	Test System	Method of administration	Doses	Noteworthy findings	GLP compliance	Study number
Assessment of the biological properties of tralokinumab	BIAcore, TF-1 proliferation assay, HDLM-2 proliferation assay, normal human lung fibroblast assay, and human umbilical vein endothelial cell assay	In vitro	N/A	Tralokinumab: - Bound to IL-13 with high affinity (K_D = 165 pM) - Neutralized the effects of bacterially-derived human IL-13 (IC_{50} = 0.37 nM) but not mouse IL-13 in the TF-1 cell proliferation assay, and neutralized the effects of baculovirus-derived human IL-13 (IC_{50} = 1.1 nM), human IL-13 (Q130R) variant (IC_{50} = 1.6 nM), and cynomolgus monkey IL-13 (IC_{50} = 1.7 nM) with near equal potency - Dose-dependently inhibited endogenous human IL-13-induced proliferation in the HDLM-2 cell line (IC_{50} = 4.4 nM) - Dose-dependently inhibited the release of eotaxin-1 from NHLF in response to human IL-13 (IC_{50} = 0.27 nM) - Dose-dependently inhibited IL-13-induced upregulation of VCAM-1 on HUVEC (IC_{50} = 0.37 nM) - Did not neutralize bioactivity of IL-4 or IL-1β in the VCAM-1 HUVEC assay	No	CAT354Rp006
Structure, mutagenesis, and affinity of tralokinumab	BIAcore; HTRF assay; protein crystallization; protein structure solution	In vitro	N/A	Tralokinumab: - Bound to IL-13 with high affinity (K_D = 58 pM) Inhibits binding of IL-13 to IL-13Rα1 and IL-13Rα2	No	RIA354-049

Abbreviations: HDLM-2 = Hodgkin's lymphoma derived cell line, HTRF = Homogeneous Time Resolved Fluorescence, HUVEC = human umbilical vein endothelial cell, IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration, IL = interleukin, IL-13R = IL-13 receptor, K_D = dissociation constant, N/A = not applicable, NHLF = normal human lung fibroblast, TF-1 = human erythroleukemic cell line, VCAM = vascular cell adhesion molecule

2.6.3.2　効力を裏付ける試験－in vitro（続き）

Test Article: Tralokinumab

Study Objective(s)	Test System	Method of administration	Doses	Noteworthy findings	GLP compliance	Study number
Effect of tralokinumab on IL-13 induced inflammatory mediators in human epidermal keratinocytes	Primary human epidermal keratinocytes	In vitro	≤ 30 nM	Tralokinumab: - Dose-dependently inhibited gene expression of *CCL2* (IC_{50} = 201 pM), *CCL26* (IC_{50} = 189 pM), *NTRK1* (IC_{50} = 268 pM), *IL13RA2* (IC_{50} = 367 pM) induced by IL-13 but not by IL-4 - Dose-dependently inhibited secretion of CCL-2/MCP-1 (IC_{50} = 217 pM) induced by IL-13 but not by IL-4 The IgG4 isotype control antibody had no effect on IL-13 induced gene expression of *CCL2*, *CCL26*, *NTRK1*, *IL13RA2* and secretion of CCL-2/MCP-1.	No	REP-HND-2019-02
Effect of tralokinumab on IL-13 driven modulation of skin barrier markers in human epidermal keratinocytes	Primary human epidermal keratinocytes differentiated in vitro	In vitro	≤ 200 nM	Tralokinumab: - Dose-dependently inhibited downregulation of *FLG* (IC_{50} = 19.1 nM), *FLG2* (IC_{50} = 16.4 nM), *LOR* (IC_{50} = 16.0 nM and 13.3 nM), *ELOVL3* (IC_{50}= 16.2 nM) and *DEFB4A* (IC_{50} = 13.0 nM) mediated by IL-13 but not by IL-4 The IgG4 isotype control antibody had no effect on IL-13 mediated gene expression of *FLG*, *FLG2*, *LOR*, *ELOVL3*, and *DEFB4A*.	No	REP-HND-2019-03

Abbreviations: CCL = C-C motif chemokine, DEFB4A = beta-defensin 4A, ELOVL3 = elongation of very long chain fatty acids protein, FLG = filaggrin, IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration, Ig = immunoglobulin, IL = interleukin, IL13RA2 = IL-13 receptor alpha 2, LOR = loricrin, MCP-1 = monocyte chemotactic, NTRK1 = neurotrophic receptor tyrosine kinase 1

2.6.3.2　効力を裏付ける試験－in vitro（続き）

Test Article: Tralokinumab

Study Objective(s)	Test System	Method of administration	Doses	Noteworthy findings	GLP compliance	Study number
Effect of tralokinumab on IL-13 induced inflammatory mediators in human dermal fibroblasts	Primary human dermal fibroblasts	In vitro	≤ 30 nM	Tralokinumab: - Dose-dependently inhibited gene expression of *CCL2* (IC_{50} = 315 pM), *CCL11* (IC_{50} = 112 pM) and *POSTN* (IC_{50} = 241 pM) induced by IL-13 but not by IL-4 - Dose-dependently inhibited secretion of CCL-2/MCP-1 (IC_{50} = 336 pM) induced by IL-13 but not by IL-4 The IgG4 isotype control antibody had no effect on IL-13 induced gene expression of *CCL2*, *CCL11*, *POSTN* and secretion of CCL-2/MCP-1.	No	REP-HND-2019-04
Effect of tralokinumab on IL-13 induced upregulation of CD23 expression on the surface of human PBMCs	Human peripheral blood mononuclear cells	In vitro	≤ 30 nM	Tralokinumab: - Dose-dependently inhibited IL-13 induced CD23 expression on human PBMC, with an IC_{50} of 0.1 nM - Was unable to inhibit IL-4 induced CD23 expression CAT-001 did not inhibit either IL-13 or IL-4 induced CD23 expression	No	CAT354Rp039

Abbreviations: CAT-001 = isotype control antibody, CCL = C-C motif chemokine, CD23 = lower affinity receptor for IgE, IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration, Ig = immunoglobulin, IL = interleukin, MCP-1 = monocyte chemotactic, PBMC = peripheral blood mononuclear cell, POSTN = periostin

2.6.3.2　効力を裏付ける試験－in vitro（続き）

Test Article: Tralokinumab

Study Objective(s)	Test System	Method of administration	Doses	Noteworthy findings	GLP compliance	Study number
Effect of tralokinumab on the ability of IL-13, TNF-α, and TGF-β1 co-stimulated lung fibroblast media to induce eosinophil shape change	Granulocytes purified from human buffy coats	In vitro	≤ 875 nM	Conditioned media induced eosinophil shape change. Concentration of eotaxin-1 in conditioned media was 9.6 nM. and decreased dose-dependently with addition of increasing concentrations of tralokinumab to the original stimulants (IC_{50} = 32.4 nM). Tralokinumab inhibited eosinophil shape change (IC_{50} = 14 nM).	No	CAT354Rp042
Effect of tralokinumab on IgE class switching	Purified human peripheral B cells	In vitro	≤ 67 nM	B cells exhibited a dose-dependent IgE response to IL-13 and IL-4. Tralokinumab dose-dependently neutralized the IgE production induced by IL-13 (IC_{50} = 1.8 nM) but not by IL-4. CAT-001 had no effect on IgE production induced by IL-13 or IL-4.	No	CAT354Rp029

Abbreviations: CAT-001 = isotype control antibody, IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration, Ig = immunoglobulin, IL = interleukin, TGF = tumor growth factor, TNF = tumor necrosis factor

2.6.3.3 効力を裏付ける試験－in vivo

Test Article: Tralokinumab

Study Objective(s)	Species/ strain	Method of administration	Doses	Gender and No. per group	Noteworthy findings	GLP com-pliance	Study number
Effect of tralokinumab on human IL-13-induced inflammation in the mouse air pouch model	BALB/C female mice	A) PBS, tralokinumab, or CAT-251 (null antibody), IPO simultaneously with rhuIL-13 B) PBS, tralokinumab, or CAT-251 (null antibody), IV 30 minutes before rhuIL-13 IPO	A) Tralokinumab: 2, 20, or 200 µg CAT-251: 200 µg; and rhIL-13: 2 µg B) Tralokinumab: 1, 10, or 30 mg/kg; CAT-251: 30 mg/kg; and rhuIL-13:2 µg	100 animals; 2 blocks of 50; 10 animals per group	rhuIL-13 injected into the air pouch significantly increased infiltration of total leukocytes and eosinophils 24 hours after challenge as compared to the control animals. Tralokinumab given IPO or IV dose-dependently inhibited IL-13-induced infiltration of total leukocytes and eosinophils in the air pouch. CAT-251 had no effect on air pouch infiltration	No	CAT354Rp037
Effect of tralokinumab on AHR and lung inflammation induced by intra-tracheal administration of rhuIL-13	BALB/C male mice	Two groups received tralokinumab or CAT-001 IP 24 hours before intra-tracheal administration of rhuIL-13; One group received rhuIL-13 intra-tracheally; and One group received saline intra-tracheally	Tralokinumab: 1 mg/kg; CAT-001: 1 mg/kg; and rhuIL-13: 25 µg	32 males; 8/group	Intra-tracheal administration of 25 µg rhuIL-13 induced AHR, lung inflammation, and goblet cell metaplasia. Pretreatment with tralokinumab, but not CAT-001, significantly reduced AHR and BAL eosinophilia	No	CAT354Rp043

Abbreviations: AHR = airway hyperresponsiveness, BAL = bronchoalveolar lavage, CAT-001 = isotype control antibody, CAT-251 = isotype control antibody, IL = interleukin, IP = intraperitoneal, IPO = into the air pouch, IV = intravenous, PBS = phosphate buffered saline, rhuIL = recombinant human interleukin

2.6.3.3 効力を裏付ける試験－in vivo（続き）

Test Article: Tralokinumab

Study Objective(s)	Species/ strain	Method of administration	Doses	Gender and No. per group	Noteworthy findings	GLP com-pliance	Study number
Single-dose pharmacokinetics of tralokinumab in allergic cynomolgus monkeys	*Ascaris suum*-sensitive cynomolgus monkeys	IV	Tralokinumab: 10 mg/kg	2 males, 2 females	Total serum levels of IgE were measured at baseline, 15 minutes, 2 hours, 8 hours, and at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, and 28 days after dosing. Tralokinumab caused a 60% inhibition of total serum IgE levels by 7 days after administration in females with high baseline IgE levels (1209 and 449 ng/mL). Tralokinumab did not reduce serum IgE levels in males with low baseline IgE levels (60 and 67 ng/mL).	No	CAT354Rp034
Effect of tralokinumab on AHR and lung inflammation in a cynomolgus monkey antigen challenge model	*Ascaris suum*-sensitive cynomolgus monkeys	Phase 1: IV histamine challenge on Day 1 and 11; Antigen challenge on Day 9 and 10 Phase 2: IV histamine challenge on Day 1 and 11; Antigen challenge on Day 9 and 10; IV tralokinumab on Day 1, 5, and 9	Tralokinumab: 30 mg/kg	20 males, 7 females	Tralokinumab: - Non-significantly inhibited AHR measured by PC_{30} - Inhibited AHR measured by R_L AUC ($p < 0.05$) - Inhibited antigen priming ($p < 0.01$) - Inhibited eosinophil ($p < 0.05$) and total cell ($p < 0.05$) but not macrophage, lymphocyte, or mast cell influx into the BAL	No	CAT354Rp038

Abbreviations: AHR = airway hyperresponsiveness, AUC = area under the curve, BAL = bronchoalveolar lavage, Ig = immunoglobulin IV = intravenous, PC_{30} = the histamine dose required to generate a 30% increase in lung resistance above baseline, RL = lung resistance

2.6.3.4 副次的薬理試験

Test Article: Tralokinumab

Study Objective(s)	Test System	Method of administration	Doses	Noteworthy findings	GLP compliance	Study number
Effect of tralokinumab on the potentiation of histamine-induced Ca^{2+} signaling in bronchial smooth muscle	Primary human bronchial smooth muscle cells	In vitro	67 nM	Pre-treatment of primary human bronchial smooth muscle cells with IL-13 or IL-4 significantly enhanced Ca^{2+} signaling responses of the cells to the contractile agonist histamine. At the single antibody concentration tested (67 nM), tralokinumab significantly inhibited the potentiation of Ca^{2+} signaling responses induced by IL-13 but not by IL-4. CAT-001 did not inhibit the potentiation of Ca^{2+} signaling responses induced by IL-13 or IL-4.	No	CAT354Rp025

Abbreviations: CAT-001 = isotype control antibody, IL = interleukin

2.6.3.5 安全性薬理試験

No stand-alone safety pharmacology studies were conducted with tralokinumab but relevant safety pharmacological parameters were included in the repeat-dose toxicology studies, please see section 2.6.6.3 Repeat-dose toxicity and 2.6.6.6.3 Pre- and Postnatal Development, including Maternal Function.

Test Article: Tralokinumab

Organ systems evaluated	Species/strain	Method of administration	Doses	No. of animals per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study number
Cardiovascular (ECG), respiratory/neurobehavioural (clinical observations)	Cynomolgus monkey	i.v.	0, 10, 30 and 100 mg/kg/week	3M+3F main, 2M+2F recovery	None	Yes	1348/053
Cardiovascular (ECG), respiratory/neurobehavioural (clinical observations)	Cynomolgus monkey	i.v.	0, 10, 30 and 100 mg/kg/week	3M+3F main, 2M+2F recovery	None	Yes	1348/058
Cardiovascular (ECG), respiratory/neurobehavioural (clinical observations)	Cynomolgus monkey	i.v.	0, 10, 30 and 100 mg/kg/week	4M+4F main 3M+3F recovery	None	Yes	509615
Cardiovascular (ECG), respiratory/neurobehavioural (clinical observations)	Cynomolgus monkey	s.c.	75, 150 and 225 mg/animal/week (26.8-30.0, 53.6-62.5, or 90.0-107.1 mg/kg, respectively)	3M	None	Yes	513066
Cardiovascular (ECG), respiratory/neurobehavioural (clinical observations)	Cynomolgus monkey	s.c.	0, 75, 150 and 300 mg/animal/week (0.0, 24.2-34.0, 48.4-68.2, or 96.8-136.4 mg/kg, respectively)	3M+3F main, 3M+3F recovery	None	Yes	514981
Cardiovascular (heart rate), CNS (neurobehavioural test battery)	Infant cynomolgus monkeys	i.v. (maternal exposure)	0, 30 and 100 mg/kg/week GD 20-GD160	16-17 live births/group	None	Yes	20054081

Abbreviations: ECG = electrocardiogram, F = female, GD = gestational day, i.v. = intravenous, M = male, s.c. = subcutaneous