# オンボー点滴静注 300mg
# オンボー皮下注 100mg オートインジェクター
# オンボー皮下注 100mg シリンジ

## 2.6.1　緒言

日本イーライリリー株式会社

# 目次

2.6.1　緒言..... 1

## 2.6.1 緒言

第 2.2 項参照

# オンボー点滴静注 300mg
# オンボー皮下注 100mg オートインジェクター
# オンボー皮下注 100mg シリンジ

# 2.6.2　薬理試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

# 目次

2.6.2 薬理試験の概要文 1
2.6.2.1 まとめ 1
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 2
2.6.2.2.1 In vitro 試験 2
2.6.2.2.1.1 ヒト IL-23 及びその他の IL-12 ファミリーメンバーに対する in vitro での結合動態及び親和性 2
2.6.2.2.1.2 ミリキズマブの in vitro エピトープマッピング 3
2.6.2.2.1.3 ミリキズマブによる IL-23 の IL-23 受容体への結合阻害 6
2.6.2.2.1.4 ヒト及びカニクイザル IL-23 に対するミリキズマブの中和作用 7
2.6.2.2.1.5 ミリキズマブ／IL-23 複合体の IL-12 シグナル伝達への影響 8
2.6.2.2.1.6 ミリキズマブの Fc 受容体及び補体に対する結合 10
2.6.2.2.2 In vivo 試験 11
2.6.2.2.2.1 ヒト IL-23 に対するミリキズマブの in vivo 中和作用（全身性） 11
2.6.2.2.2.2 ヒト IL-23 に対するミリキズマブの in vivo 中和作用（局所性） 11
2.6.2.2.2.3 マウスサロゲート抗体 LSN2479016 の結合能 12
2.6.2.2.2.4 マウスサロゲート抗体のイミキモド誘発性乾癬様皮膚疾患モデルでの有効性 13
2.6.2.2.2.5 マウスサロゲート抗体のマウス炎症性腸疾患モデルでの有効性 14
2.6.2.3 副次的薬理試験 15
2.6.2.4 安全性薬理試験 15
2.6.2.4.1 心血管系に関する試験 15
2.6.2.4.2 中枢神経系に関する試験 16
2.6.2.4.3 呼吸系に関する試験 16
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 16
2.6.2.6 考察及び結論 16
2.6.2.7 図表 16
2.6.2.8 参考文献 17

## 2.6.2 薬理試験の概要文

### 2.6.2.1 まとめ

インターロイキン（interleukin：IL）-23 は、サイトカインの IL-12 ファミリーのメンバーであり、2 つのサブユニット（IL-12 と共通の p40 サブユニット及び IL-23 に特異的と考えられている p19 サブユニット）からなるヘテロ二量体タンパク質である。IL-23 はヘルパーT（T helper：Th）17 細胞の維持及び増殖に大きく関与している。Th17 細胞に加えて、多くの自然免疫細胞が IL-23 に反応し、IL-17A などの炎症性サイトカインを産生することから、IL-23 は感染に対する抵抗性並びに多くの自己免疫疾患又は炎症性疾患の発症に重要とされている(Kikly et al. 2006)。動物モデルでの研究により、IL-23 p19 サブユニットの遺伝的欠損又は阻害は腸管の炎症を改善する又は予防することが示唆されている(Yen et al. 2006; Elson et al. 2007)。したがって、Th17 及び他の細胞集団での IL-17 産生に重要な IL-23 の活性を中和することは、Th17 細胞が関与する疾患を治療するための論理的なアプローチである。

ミリキズマブ（LY3074828）は、IL-23 の p19 サブユニットに結合するヒト化免疫グロブリン（immunoglobulin：Ig）G4 モノクローナル抗体である。主要な非臨床薬理試験成績を以下に示す。

- ミリキズマブはヒト及びサルの IL-23 に高い親和性で結合したが、ウサギ IL-23 への結合は弱く、その他のヒト IL-12 ファミリーメンバー並びにげっ歯類の IL-23 には結合しなかった（報告書 bTDR186）。
- ミリキズマブは IL-23 の特定の位置のアミノ酸に結合した（報告書 bTDR189 及び bTDR190）。
- ミリキズマブは IL-23 の IL-23 受容体への結合を阻害した（報告書 bTDR188）。
- In vitro 機能アッセイにおいて、ミリキズマブはヒト及びサルの IL-23 活性を中和し、IL-17 産生を抑制した（報告書 bTDR187 及び bTDR241）。
- ミリキズマブ／IL-23 複合体は、IL-12 シグナル伝達を阻害しなかった（報告書 bTDR228）。
- ミリキズマブは Fc 受容体 I、IIa 及び IIIa 並びに補体成分 C1q に結合せず、エフェクター機能を示す可能性は低いと考えられた（報告書 bTDR226）。
- マウスを用いた in vivo 急性全身性中和アッセイにおいて、ミリキズマブはヒト IL-23 誘導性 IL-17 産生を阻害した（報告書 bTDR191）。
- マウスを用いた in vivo 急性局所性中和アッセイにおいて、ミリキズマブはヒト IL-23 により誘導される IL-17A、IL-17F、及びケラチン-16 のメッセンジャーRNA（messenger RNA：mRNA）産生を阻害した（報告書 bTDR192）。

ミリキズマブはげっ歯類の IL-23 に結合しないため、マウス抗マウス IL-23 サロゲート抗体 LSN2479016 を用いて IL-23 に対する中和作用による正常な免疫応答及び自己免疫疾患モデルにおける影響を評価した。これらのモデルは潰瘍性大腸炎（ulcerative colitis：UC）の治療に関連すると予想される抗炎症効果を評価するためのサロゲートと考えられた。それらの結果を以下に示す。

- LSN2479016 はマウス IL-23 に高い親和性で結合したが、ラット IL-23 及びマウス IL-12 には結合しなかった（報告書 bTDR34）。
- In vitro 機能アッセイにおいて、LSN2479016 はマウス IL-23 活性を中和し、IL-17 産生を

抑制した（報告書 bTDR35）。

- イミキモド（imiquimod：IMQ）乾癬様疾患モデルにおいて、LSN2479016 は炎症性サイトカインの発現を減少させた（報告書 bTDR243）。
- In vivo マウス炎症性腸疾患モデルにおいて、LSN2479016 は有効性を示した（報告書 bTDR242）。

安全性薬理評価は、サルを用いた反復投与毒性試験（報告書 20029153、20043324 及び 20119229）の中で実施した（ICH S6[R1]及び S7A）。

- いずれの試験においても、安全性薬理評価項目（体温、心血管系、中枢神経系及び呼吸系）において、ミリキズマブによる影響は認められなかった。

### 2.6.2.2 効力を裏付ける試験

種々の in vitro 及び in vivo アッセイを用いてミリキズマブの薬効薬理作用を評価した。その結果、ミリキズマブは IL-23 p19 サブユニットに高い親和性を示す特異的なモノクローナル抗体であり、in vitro 及び in vivo で強い中和活性を示すことが確認された。

#### 2.6.2.2.1 In vitro 試験

##### 2.6.2.2.1.1 ヒト IL-23 及びその他の IL-12 ファミリーメンバーに対する in vitro での結合動態及び親和性

報告書 bTDR186（4.2.1.1.1）

ミリキズマブのヒト及びカニクイザル IL-23 に対する結合親和性を、表面プラズモン共鳴分析法（BIAcore 2000）を用いて評価した。結合親和性の測定は 37°C で行った。また、ヒト IL-23 以外の IL-12 ファミリーメンバー（IL-12、IL-27 及び IL-35）並びにマウス、ラット及びウサギ IL-23 に対する結合親和性も評価した（報告書 bTDR186）。

ミリキズマブは、ヒト及びサルの IL-23 に濃度依存的に結合し、ヒト及びサル IL-23 に対する $K_D$ はそれぞれ 21 pM 及び 55 pM であった。一方、ウサギ IL-23 に対する $K_D$ は 53000 pM であり、その他のヒト IL-12 ファミリーメンバー並びにマウス及びラット IL-23 に対する結合は認められなかった（表 2.6.2-1）。

表 2.6.2-1. ヒト及びサルの IL-23 並びに IL-12 ファミリーメンバーに対するミリキズマブの結合動態及び親和性

| 抗原 | $k_{on}$ $M^{-1}s^{-1}$（$10^6$） | $k_{off}$ $s^{-1}$（$10^{-4}$） | $K_D$ pM |
|---|---|---|---|
| ヒト IL-12[a] | | | 結合せず |
| ヒト IL-23 | 2.43 | 0.52 | 21 |
| ヒト IL-27[b] | | | 結合せず |
| ヒト IL-35[b] | | | 結合せず |
| カニクイザル IL-23 | 1.28 | 0.7 | 55 |
| ウサギ IL-23 | 0.09 | 47.9 | 53000 |
| マウス IL-23[c] | | | 結合せず |
| ラット IL-23[c] | | | 結合せず |

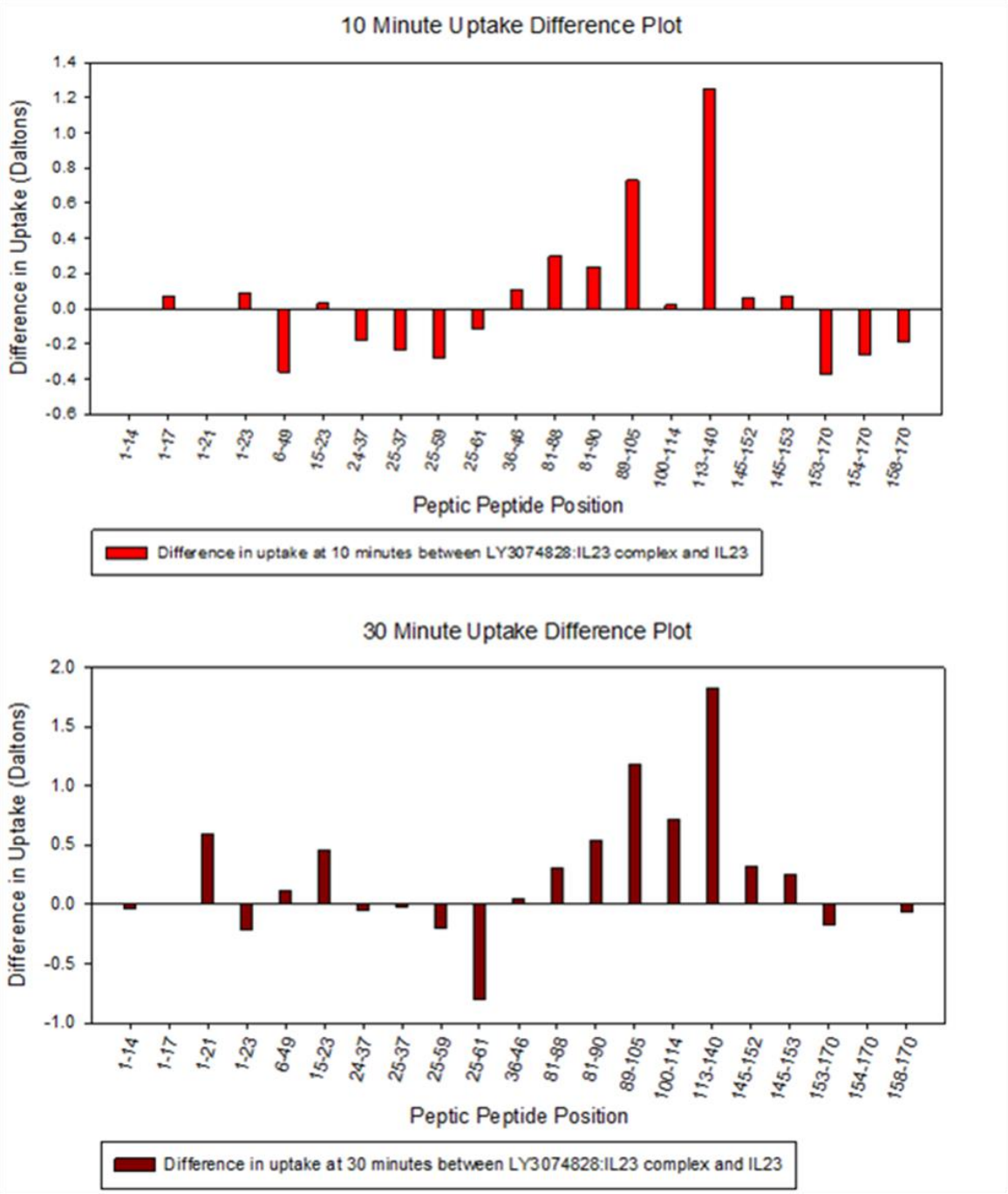
略語： $K_D$ = 解離定数（$k_{off}$/ $k_{on}$ の式から算出）、$k_{on}$ = 結合速度、$k_{off}$ = 解離速度
データは平均値を示す（n=2）。ブランクモニタリング緩衝液に対する結合は認められなかった。
a　IL-12 は、IL-23 の検出可能濃度の 400 倍の濃度で検討した。
b　IL-27 及び IL-35 は、IL-23 の検出可能濃度の 800 倍の濃度で検討した。
c　マウス及びラットの IL-23 は、ヒト IL-23 の検出可能濃度のそれぞれ 500 倍及び 300 倍の濃度で検討した。

### 2.6.2.2.1.2　ミリキズマブの in vitro エピトープマッピング

報告書 bTDR189（4.2.1.1.2）、bTDR190（4.2.1.1.3）

ミリキズマブとヒト IL-23 の相互作用を明らかにするため、本抗体のエピトープを検討する試験を実施した。

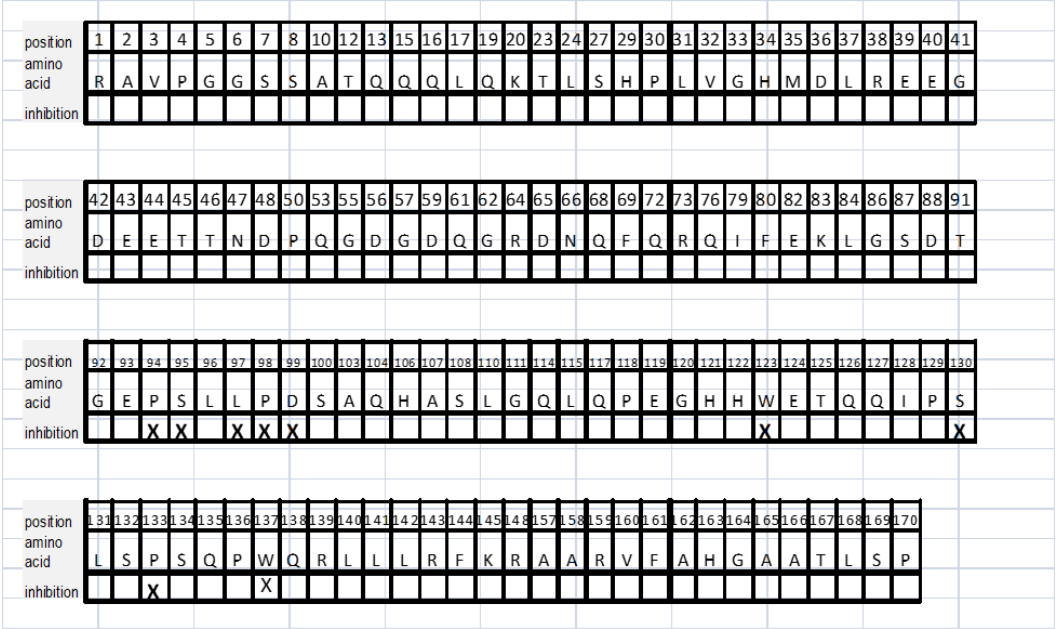
水素／重水素交換（Hydrogen/Deuterium exchange：HDX）試験では、アミド水素原子を重水素原子に時間依存的に交換し、質量の差によりその交換を測定する。抗体／抗原複合体の結合エピトープをマッピングするには、免疫複合体を $D_2O$ と混合して水素原子と重水素原子を交換させる。2 つのタンパク質が結合している領域では重水素への交換が阻害されるため、抗原単独での交換速度と比較したとき、その領域の動態に差が生じる。この方法を用いて、ヒト IL-23 の p19 及び p40 サブユニットのドメインに対するミリキズマブの結合エピトープをマッピングした。その結果、成熟 IL-23 p19 サブユニットのペプチド 81～88、81～89、89～105 及び 113～140 は、ミリキズマブ／IL-23 複合体と比較して、重水素交換に顕著な差が認められた。ペプチド 100～114 は、10 分の時点では重水素取込みに差は認められなかったが、30 分の時点では軽度の差が認められたことから、この領域はエピトープには含まれないが、この領域での重水素交換は構造的に若干阻害される可能性が示された（図 2.6.2-1）。このようにペプチドを重ね合わせることにより、ヒト IL-23 p19 サブユニットにおいてミリキズマブの結合エピトープが含まれる領域は、81～99 及び 115～140 に絞られた（報告書 bTDR189）。




上のプロットは 10 分、下のプロットは 30 分の時点における $D_2O$ 交換を示す。差は、3 回の解析で得られた抗原での交換平均値から複合体での交換平均値を減じた値である。

**図 2.6.2-1. ミリキズマブ／IL-23 複合体及び IL-23 単独での交換データの差**

HDX の結果を更に検討するため、酵母ディスプレイを用いたアラニンスキャニングにより、ミリキズマブの更なるエピトープマッピングを行った。ヒト IL-23 p19 サブユニットの特定のアミノ酸にアラニン変異を導入した変異体を複数作製し、酵母の表面に発現させ、ミリキズマブの結合をフローサイトメトリーでモニタリングした。ミリキズマブの結合が認められない場合、その位置のアミノ酸が抗体結合に重要であることが示唆される。本試験の結果から、ヒト IL-23 p19 サブユニットの 94P、95S、97L、98P、99D、123W、130S、133P 及び 137W のアミノ酸がミリキズマブの結合に重要であることが示された（図 2.6.2-2 及び表 2.6.2-2）（報告書 bTDR190）。




成熟ヒト IL-23 p19 サブユニットの露出又は部分的に露出している位置のアミノ酸配列。露出していないと判断された位置は本試験から除外した。露出しているすべての位置にアラニン変異を導入し、V5 抗体及びミリキズマブによる二重染色で陽性が得られるかを検討した。V5 染色が陽性でミリキズマブの結合が認められなかった残基を「X」で示し（94P、95S、97L、98P、99D、123W、130S、133P 及び 137W）、これらがミリキズマブのエピトープを形成すると判断した。

図 2.6.2-2. 酵母ディスプレイで決定されたミリキズマブのエピトープ

表 2.6.2-2. ミリキズマブのエピトープマッピング

| アミノ酸の位置 | 二重染色陽性率（%）（V5 及びミリキズマブ） |
|---|---|
| 87 | 26 |
| 88 | 27 |
| 91 | 37 |
| 92 | 29 |
| **94** | **16** |
| **95** | **12** |
| 96 | 35 |
| **97** | **7** |
| **98** | **10** |
| **99** | **7** |
| 100 | 22 |
| 118 | 31 |
| 119 | 28 |
| 120 | 26 |
| 121 | 28 |
| 122 | 31 |
| **123** | **5** |
| 124 | 26 |
| 125 | 18 |
| 126 | 22 |
| 127 | 25 |
| 129 | 21 |
| **130** | **4** |
| **133** | **1** |
| 134 | 16 |
| 136 | 15 |
| **137** | **2** |
| 140 | 23 |

p19 サブユニットアラニン変異体及び二重染色陽性率（%）（V5 及びミリキズマブ結合）の包括的な表。二重染色陽性率が周囲の残基と比較して 50%超低下した残基を、結合に重要な残基と判断した。太字で示した残基（94P、95S、97L、98P、99D、123W、130S、133P 及び 137W）はこの二重染色陽性率の低下が認められた残基であり、ミリキズマブの結合に重要であることが示唆される。

### 2.6.2.2.1.3　ミリキズマブによる IL-23 の IL-23 受容体への結合阻害

報告書 bTDR188（4.2.1.1.4）

通常、サイトカインに対する中和抗体は、サイトカインの受容体への結合を阻害することにより中和作用を示す。IL-23 シグナル伝達に関与する受容体は 2 つのサブユニット、すなわち IL-23R 及び IL-12Rβ1 からなる。IL-23R は IL-23 の p19 サブユニットと結合して STAT3 を介したシグナル伝達に関与し、IL-12Rβ1 は IL-23 の p40 サブユニットと結合してサイトカイン／受容体複合体の相互作用を安定化する(Parham et al. 2002)。表面プラズモン共鳴法を用いて、ミリキズマブ／ヒト IL-23 複合体と IL-23R 又は IL-12Rβ1 の細胞外ドメインとの結合を評価した（報告書 bTDR188）。その結果、ミリキズマブは IL-23 と IL-23R との結合を阻害したが、IL-23 と IL-12Rβ1 との結合には影響を及ぼさなかった（表 2.6.2-3）。

表 2.6.2-3. ミリキズマブによる IL-23 の IL-23R への結合阻害

| サイトカイン | 抗体 | IL-23R への結合 | IL-12Rβ1 への結合 |
|---|---|---|---|
| IL-23 | なし | あり | あり |
| IL-23 | 抗 p40 サブユニット抗体 | あり | なし |
| IL-23 | ミリキズマブ | なし | あり |

遺伝子組換えヒト IL-23R/Fc、ヒト IL-12Rβ1/Fc 又は IgG1/Fc（対照）をバイオセンサーチップ上に固定化／捕捉した。ミリキズマブの存在下又は非存在下で遺伝子組換えヒト IL-23 を 90 分間プレインキュベートしてフローセルに添加した。ヒト IgG1/Fc はセンサーチップに対する IL-23 の非特異的結合をモニタリングするために使用した。

### 2.6.2.2.1.4 ヒト及びカニクイザル IL-23 に対するミリキズマブの中和作用

報告書 bTDR187（4.2.1.1.5）、bTDR241（4.2.1.1.6）

ヒト脾臓細胞をヒト IL-23 で刺激すると IL-17 が産生される。また、マウス脾臓細胞をヒト又はサルの IL-23 及び IL-2 で刺激すると IL-17 が産生される(Aggarwal et al. 2003)。マウスの脾臓細胞を用いた in vitro アッセイにおいて、ミリキズマブ（又は IgG4 対照）と IL-23 を混合し、IL-2 により活性化させたマウス脾臓細胞とともにインキュベートし、マウス IL-17 産生の用量依存的な減少によりミリキズマブの IL-23 中和作用を評価した。ヒト及びカニクイザル IL-23 のそれぞれについて 2 回アッセイを行い、50%阻害濃度（half-maximal inhibitory concentration：$IC_{50}$）を算出した（報告書 bTDR187）。その結果、ミリキズマブはヒト及びサルの IL-23 を完全に中和した。ヒト及びサル IL-23 に対する $IC_{50}$ 値は、それぞれ 82 及び 120 pM であった（表 2.6.2-4）。

ヒト末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cells：PBMC）を用いた in vitro アッセイにおいて、ミリキズマブを漸増添加したときのヒト IL-23 の中和作用を、IL-17 産生の用量依存的な減少によって評価した。20 例（Prep 1）又は 29 例（Prep 2）のドナーの全血から PBMC を分離し、100000 個の PBMC を組織培養プレートに播種した後、ミリキズマブを 10 段階の濃度（各点 n=8）で添加し、プレインキュベート後、抗ヒト CD3 抗体、抗ヒト CD28 抗体及びヒト IL-23 を添加することにより IL-17 の分泌を刺激した。37°C で 48 時間インキュベートした後、上清中の IL-17 を ELISA で分析し、各 Prep に対してそれぞれ $IC_{50}$ 値を算出した（報告書 bTDR241）。

ミリキズマブは抗 CD3／抗 CD28 抗体と共刺激したヒト PBMC からの IL-23 刺激 IL-17 分泌を完全に阻害した（図 2.6.2-3）。PBMC Prep 1 及び Prep 2 に対する $IC_{50}$ 値は、それぞれ 22 ng/mL 及び 29 ng/mL であった（平均値：25 ng/mL）。この結果から、ミリキズマブのヒト IL-23 中和作用がヒト PMBC でも確認された。

表 2.6.2-4. In vitro のヒト及びサル IL-23 中和アッセイにおけるミリキズマブの $IC_{50}$ 値

| IL-23 | $IC_{50}$（pM） |
|---|---|
| ヒト | 82 |
| サル | 120 |

データは平均値を示す（n=2）。

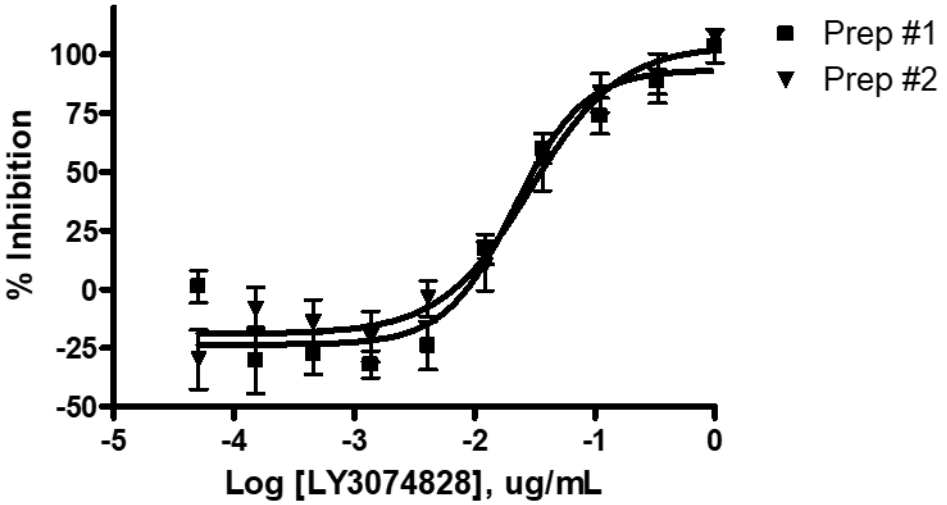


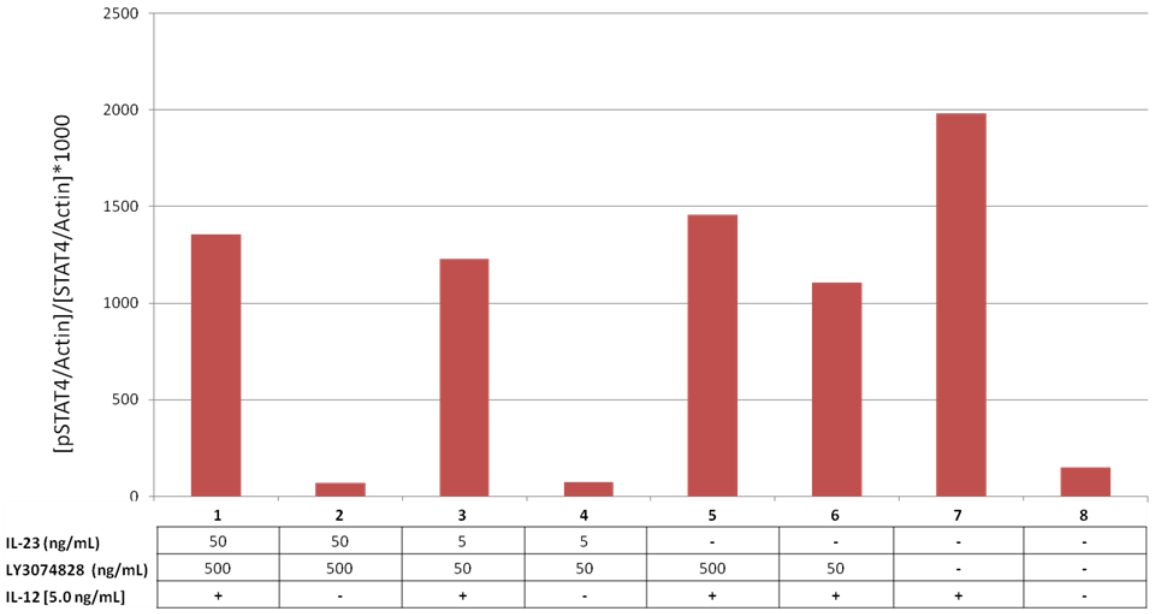

図 2.6.2-3. ミリキズマブによるヒト PBMC からの IL-23 誘導 IL-17 分泌阻害

#### 2.6.2.2.1.5　ミリキズマブ／IL-23 複合体の IL-12 シグナル伝達への影響

報告書 bTDR228（4.2.1.1.7）

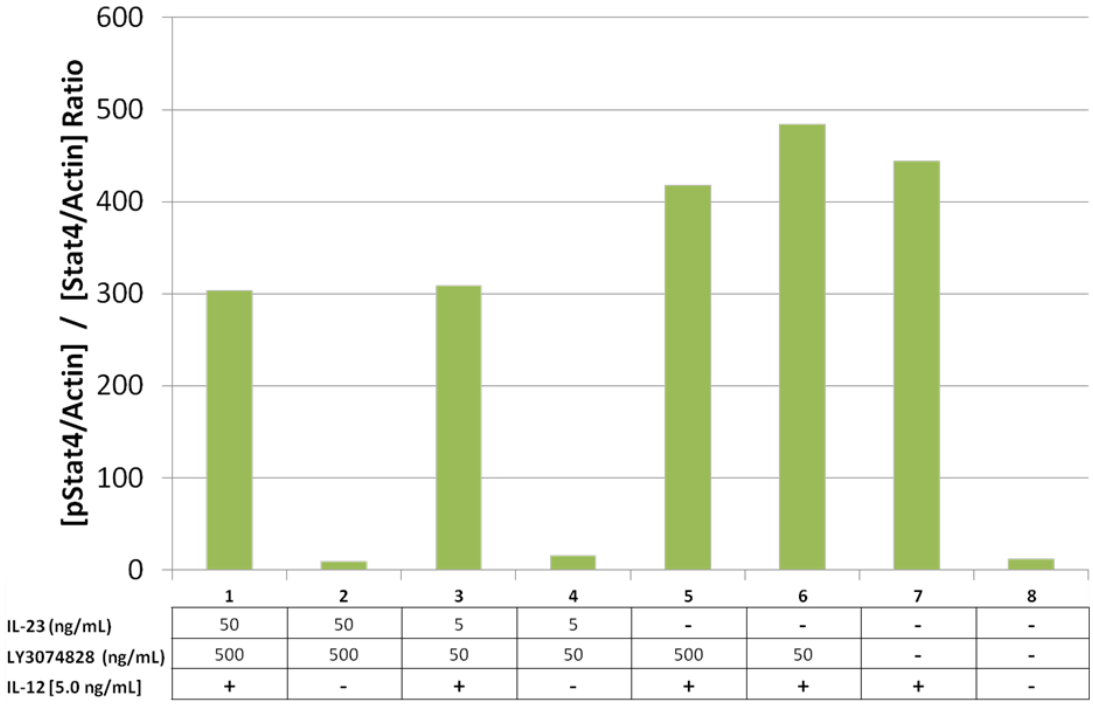
IL-12 及び IL-23 はいずれも受容体サブユニット IL-12Rβ1 に結合し、ミリキズマブ／IL-23 複合体も IL-12Rβ1 に結合するため、IL-12 シグナル伝達に対する影響について検討した。IL-12 受容体（IL-12Rβ1 及び IL-12Rβ2）を発現し、IL-12 に対する反応として STAT4 のリン酸化が認められる 2 種類のヒト培養細胞株（KIT-225 及び TALL-104）を IL-23 の存在下又は非存在下でミリキズマブとともにインキュベートした後、IL-12 で刺激した。刺激後に細胞を回収して溶解し、タンパク質を採取して SDS-PAGE ウエスタンブロット解析でリン酸化 STAT4 タンパク質の有無を評価した（報告書 bTDR228）。

その結果、ミリキズマブ／IL-23 複合体はいずれの細胞株においても STAT4 を介した IL-12 シグナル伝達を阻害しなかった（図 2.6.2-4 及び図 2.6.2-5）。




略語：pSTAT = リン酸化 STAT
pSTAT4 及び STAT4 のシグナルをアクチンシグナルに対して補正し、比（$\times 10^3$）で表した。
pSTAT4/STAT4 比 =（pSTAT4/アクチン）/（STAT4/アクチン）×1000。N=2。

図 2.6.2-4. IL-12 刺激 KIT-225 細胞における pSTAT4/STAT4 シグナル比




略語：pSTAT = リン酸化 STAT
pSTAT4 及び STAT4 のシグナルをアクチンシグナルに対して補正し、比で表した。
pSTAT4/STAT4 比 =（pSTAT4/アクチン）/（STAT4/アクチン）。N=1。

図 2.6.2-5. IL-12 刺激 TALL-104 細胞における pSTAT4/STAT4 シグナル比

### 2.6.2.2.1.6　ミリキズマブの Fc 受容体及び補体に対する結合

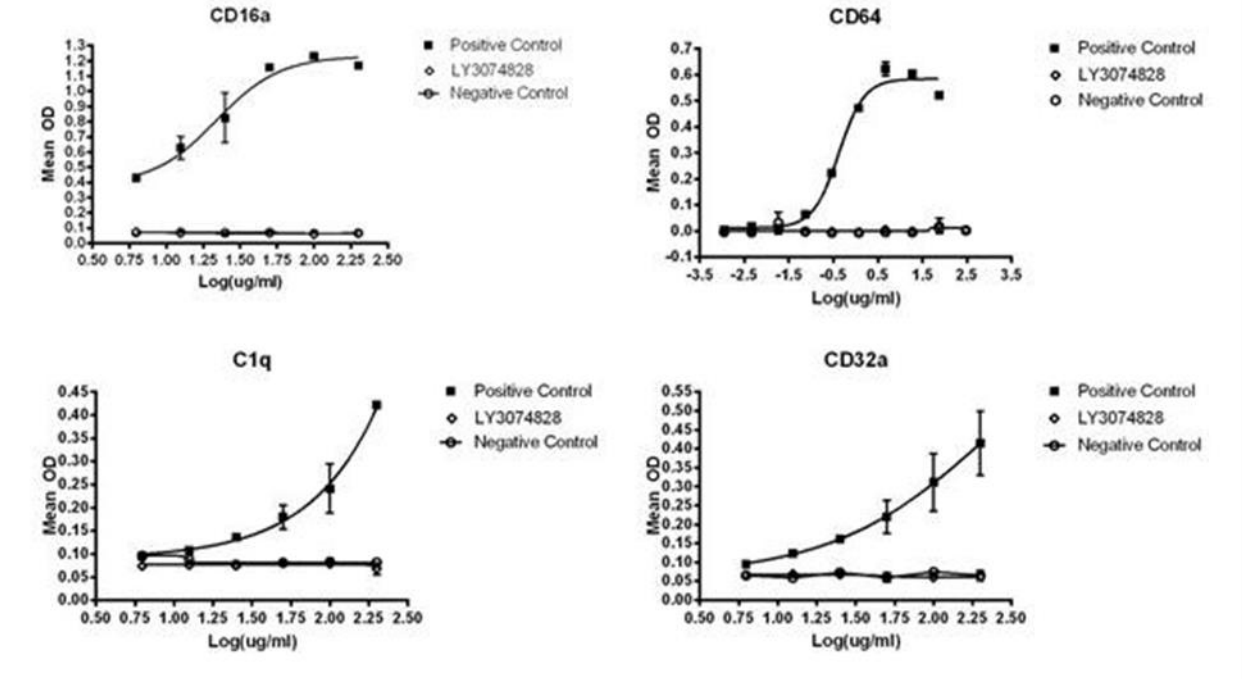
報告書 bTDR226（4.2.1.1.8）

一部の IgG アイソタイプは、Fcγ受容体又は補体成分との相互作用を介して免疫系を活性化するが、これらはミリキズマブで期待する作用ではないことから、Fcγ受容体及び補体成分への結合能が低い IgG4 をミリキズマブの構造として選択した。また、下部ヒンジ領域に 2 つのアラニン変異を導入することで、この結合能を更に低下させている。In vitro 結合アッセイを用いて、ミリキズマブのヒト Fcγ受容体 I、IIa 及び IIIa（それぞれ CD64、CD32a 及び CD16a）並びに補体成分 C1q に対する結合能を評価した。

ヒスチジンタグ標識 Fcγ受容体 I、IIa 及び IIIa 並びに C1q を固相化したプレートにミリキズマブ、ヒト IgG4（陰性対照抗体）又はヒト IgG1（陽性対照抗体）を添加し、室温で 2 時間（CD64 は 1 時間）インキュベートした。ホースラディッシュペルオキシダーゼ（Horseradish Peroxidase：HRP）標識ヤギ抗ヒト IgG F(ab')2 抗体を用いて吸光度を測定した。各抗体は、CD64 では 0.001～300 mg/mL、CD32a、CD16a 及び C1q では 6.25～200 mg/mL の濃度範囲で検討した。

結果を図 2.6.2-6 に示す。CD64、CD32a、CD16a 又は C1q に対するミリキズマブの結合はいずれも陰性対照抗体と同程度であった。一方、陽性対照抗体はいずれの分子にも結合したことから、アッセイの妥当性が確認された（報告書 bTDR226）。

これらの結果から、ミリキズマブが Fc 受容体又は補体を介した生物学的作用を及ぼす可能性は低いことが示唆された。




データは平均値 ± 標準偏差を示す（n = 2）。

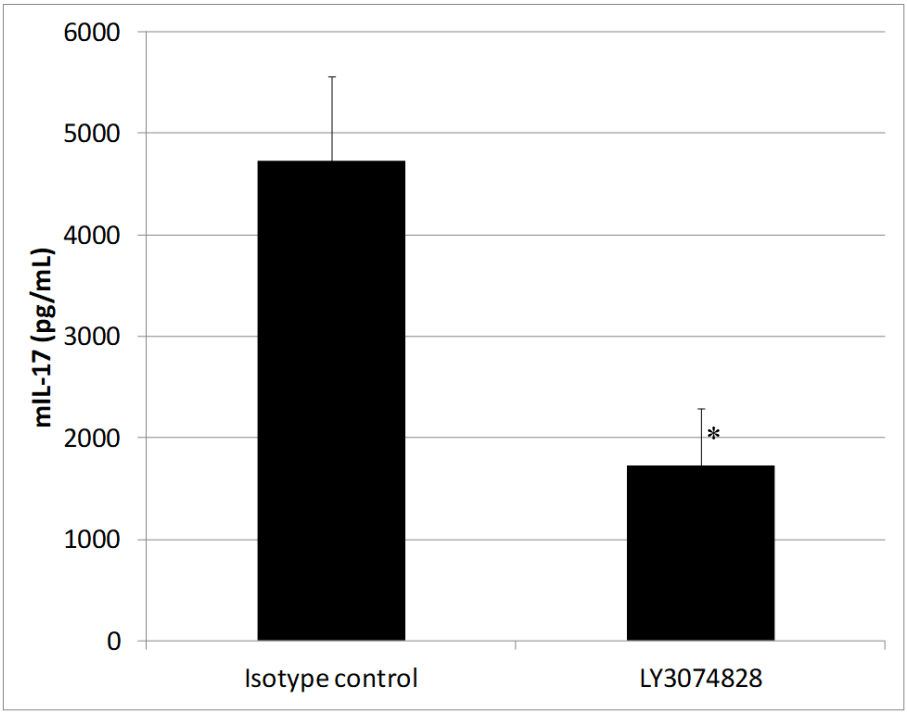
図 2.6.2-6. ミリキズマブの Fcγ受容体及び補体に対する結合

#### 2.6.2.2.2　In vivo 試験

##### 2.6.2.2.2.1　ヒト IL-23 に対するミリキズマブの in vivo 中和作用（全身性）

報告書 bTDR191（4.2.1.1.9）

げっ歯類にヒト IL-23 及び IL-2 を同時に腹腔内（intraperitoneal：IP）投与し、脾臓細胞を採取して ex vivo で再刺激すると、IL-17 が産生される。この試験系を用いて、ミリキズマブ（1.5 mg/マウス）を投与することによりヒト IL-23 が中和され、ex vivo 脾臓細胞活性化アッセイにおいてマウス IL-17 の産生が阻害されるか否かを検討した（報告書 bTDR191）。ヒト IL-23 及び IL-2 を in vivo で反復 IP 投与したマウスの脾臓細胞を ex vivo で抗 CD3／抗 CD28 抗体により再刺激すると、大量のマウス IL-17 が産生された。ミリキズマブの IP 投与は in vivo でヒト IL-23 を中和し、細胞再刺激下でのマウス IL-17 の産生を有意に阻害した（p<0.01、図 2.6.2-7）。この試験は 2 回実施し（各 4 例／群）、統計学的有意性の評価には t 検定を使用した。




図は 2 回の試験のうちの 1 試験を示し、データは平均値 + 標準偏差を示す（n=4）。
*p<0.01（t 検定）

図 2.6.2-7. ヒト IL-23 によるマウスの IL-17 産生に対するミリキズマブの in vivo 中和作用

##### 2.6.2.2.2.2　ヒト IL-23 に対するミリキズマブの in vivo 中和作用（局所性）

報告書 bTDR192（4.2.1.1.10）

マウスにヒト IL-23 を皮内投与すると乾癬様疾患が誘発され、表皮過形成並びにケラチン-16、IL-17A 及び IL-17F の mRNA の局所発現増加が認められる(Chan et al. 2006)。ミリキズマブの全身投与により、ヒト IL-23 投与に対する局所反応が中和されるか否かを検討するため、マウス（10 例/群）にミリキズマブ又はアイソタイプ（IgG4）対照抗体（0.54 mg/マウス）を単回皮下（subcutaneous：SC）投与した。その 2 日後に、マウスの背部の片側 1 ヵ所に 1 µg のヒト IL-23 を皮内投与した。溶媒対照として無菌の生理食塩液を反対側の背部に投与した。IL-23 の投与 24

時間後にマウスの皮膚検体を採取し、IL-17A、IL-17F 及びケラチン-16 の mRNA の相対量を算出した（各マウスの mRNA を単離し、逆転写は triplicate で実施した）。試験は 2 回実施した（報告書 bTDR192）。

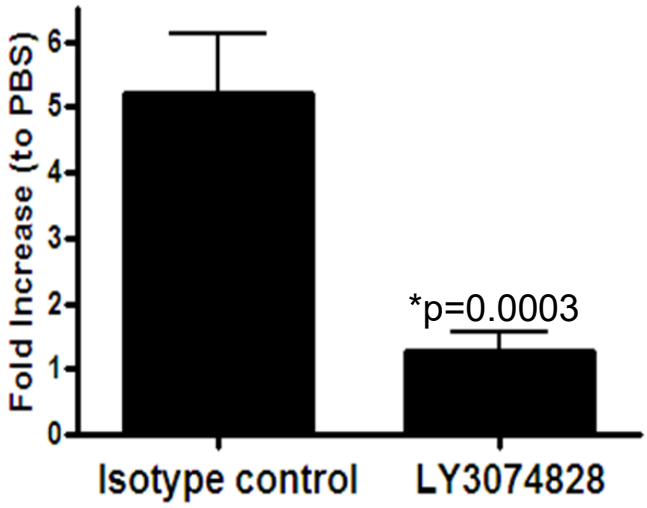
溶媒を投与した皮膚では、検出可能なレベルの IL-17A 及び IL-17F は認められなかった。一方、ヒト IL-23 を投与すると IL-17A 及び IL-17F の mRNA 発現が誘導され、これはミリキズマブの投与により阻害された。アイソタイプ対照抗体の投与では阻害されなかった（表 2.6.2-5）。

**表 2.6.2-5. ヒト IL-23 によるマウス皮膚の IL-17A 及び IL-17F mRNA 発現に対するミリキズマブの in vivo 中和作用**

| | Ct 値 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 溶媒投与側の皮膚 | | IL-23 投与側の皮膚 | |
| | IL-17A | IL-17F | IL-17A | IL-17F |
| アイソタイプ対照抗体 | ≥40 | ≥40 | 35.4 | 31.6 |
| ミリキズマブ | ≥40 | ≥40 | ≥40 | ≥40 |

略語：Ct = 増幅回数（threshold cycle）
Ct 値は検出された mRNA の相対量（Ct が多いほど mRNA 量は少ない）を表す。2 回の試験のうち 1 試験のデータを示す（平均値、n = 10）。

IL-23 による表皮の肥厚はケラチン-16 の mRNA 発現増加に関連している(Chan et al. 2006)。ミリキズマブの投与により、ケラチン-16 の誘導は有意に阻害された（図 2.6.2-8）。




略号：LY3074828 = ミリキズマブ、PBS = リン酸緩衝生理食塩液
データは平均値 + 標準偏差を示し（n = 10）、2 試験のうち 1 試験のデータを示す。
*p=0.0003（対応のない t 検定）

**図 2.6.2-8. IL-23 による皮膚ケラチン-16 の発現誘導に対するミリキズマブの in vivo 中和作用**

### 2.6.2.2.2.3　マウスサロゲート抗体 LSN2479016 の結合能

報告書 bTDR34（4.2.1.1.11）、bTDR35（4.2.1.1.12）

ミリキズマブはげっ歯類の IL-23 に結合しないため、非臨床疾患モデルでの使用を目的としてマウス IL-23 を中和させるためのサロゲート抗体を作成した。LSN2479016 はマウス IL-23 の p19

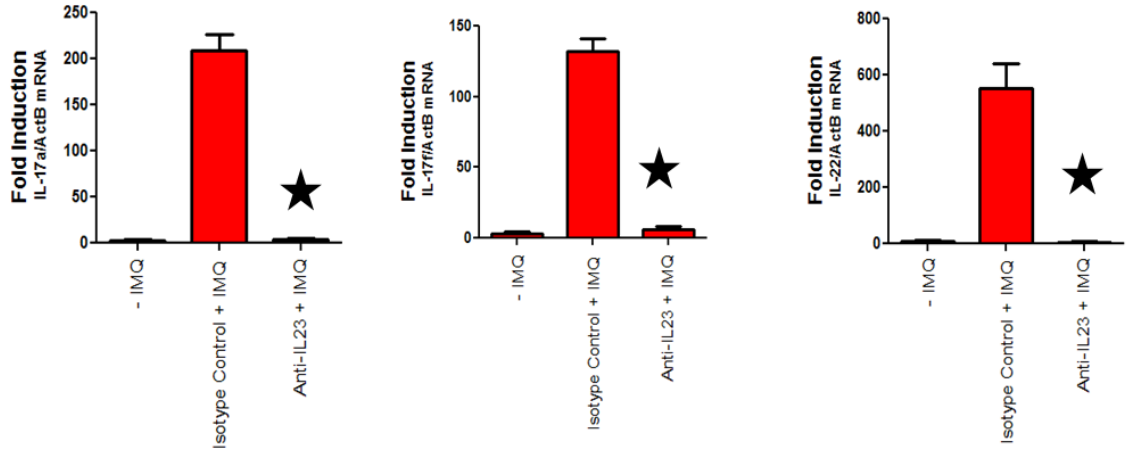
サブユニットに特異的に結合するマウス IgG1 モノクローナル抗体である。LSN2479016 のマウス IL-23 に対する $K_D$ は 103 pM であった（報告書 bTDR34）。LSN2479016 はマウス IL-23 を完全に中和して IL-17 産生を抑制し、$IC_{50}$ は 400 pM と算出された（報告書 bTDR35）。

#### 2.6.2.2.2.4　マウスサロゲート抗体のイミキモド誘発性乾癬様皮膚疾患モデルでの有効性

報告書 bTDR243（4.2.1.1.13）

ヒトでは、toll 様受容体 7/8 のリガンドであり強力な免疫活性化剤であるイミキモド（IMQ）が乾癬を誘発し、悪化させることが示されている。マウスの背部皮膚に IMQ を連日塗布すると、ヒトの尋常性乾癬に類似した炎症性鱗屑性皮膚病変が誘発される。これらの病変では、表皮の増殖亢進、異常な分化、表皮微小膿瘍での好中球の集積、血管新生並びに $CD4^+$ T 細胞、$CD11c^+$ 樹状細胞及び形質細胞様樹状細胞の浸潤が認められた。IMQ は表皮における IL-23、IL-17A 及び IL-17F の発現並びに脾臓 Th17 細胞の増加を誘発した。IMQ による皮膚炎は、部分的には T 細胞の存在に依存しているが、IL-23 又は IL-17 受容体欠損マウスでは疾患の発症がほぼ完全に抑制されたことから、本疾患では IL-23/IL-17 軸が重要な役割を果たしていることが示されている(van der Fits et al. 2009)。

本モデルで IL-23 が重要な役割を果たしていることを裏付けるため、マウスに IMQ（62.5 mg/日）を塗布し炎症を誘発する 48 時間前に LSN2479016（3 mg/kg）を投与した。図 2.6.2-9 に示すように、LSN2479016 は IMQ 処置皮膚において IL-17A、IL-17F 及び IL-22 の mRNA 誘導を有意に阻害した。これらのデータから、本乾癬様モデルでの炎症性サイトカインの誘導において、IL-23 が重要な役割を果たしていることが裏付けられた（報告書 bTDR243）。



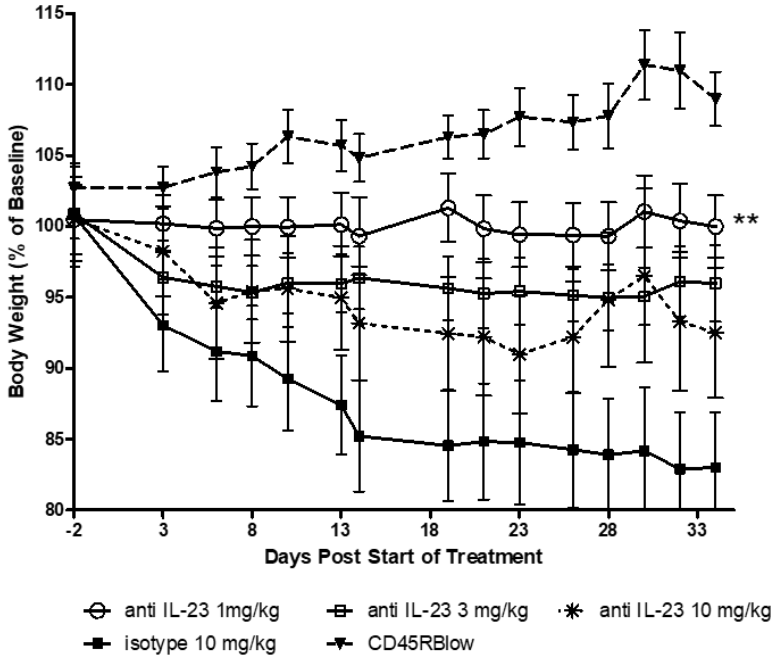

略語： IMQ＝イミキモド、SC＝皮下
注：マウスの剃毛した皮膚に IMQ を塗布する 48 時間前に抗 IL-23 抗体を SC 投与した。IMQ 塗布 96 時間後に皮膚生検検体を採取し、IL-17A（左パネル）、IL-17F（中央パネル）及び IL-22（右パネル）の mRNA を分析した。
星印は抗 IL-23 抗体とアイソタイプ対照抗体を比較したときの統計学的有意差（$p<0.01$、一元配置 ANOVA、Tukey の HSD 事後検定）を示す。データは平均値+標準誤差を示す（N=6）。

**図 2.6.2-9. 抗 IL-23 抗体投与による、IMQ 処置マウスの皮膚での炎症性サイトカイン IL-17A（左パネル）、IL-17F（中央パネル）及び IL-22（右パネル）の mRNA 誘導阻害**

### 2.6.2.2.2.5　マウスサロゲート抗体のマウス炎症性腸疾患モデルでの有効性

報告書 bTDR242（4.2.1.1.14）

組換え活性化遺伝子（recombination activating gene：RAG）欠損マウス又は重症複合免疫不全（severe combined immunodeficiency：SCID）マウスのような免疫不全マウスにナイーブ T 細胞を移植すると、大腸及び小腸の両方の炎症が誘発されることから、クローン病のモデルとされている(Maxwell and Viney 2009, Ostanin et al. 2009)。SCID マウスに同系のナイーブ $CD4^+$ T 細胞（$CD45RB^{hi}$）を IP 移植することにより疾患を誘発した。$CD4^+$ $CD45RB^{low}$ 細胞は陰性対照として使用した。29 日後に T 細胞の生着を確認し、マウスを投与群に無作為に割り付けた（n=7～8/群）。このモデルでの重要な臨床的特徴は、結腸の炎症及び下痢による体重減少である。LSN2479016 を 1 mg/kg の用量で週 1 回 SC 投与したとき、アイソタイプ対照抗体と比較して、体重減少の進行が有意に抑制された（図 2.6.2-10）。また、1 及び 3 mg/kg 群における結腸の組織学的スコア（単核細胞浸潤、上皮過形成及びムチン減少の複合スコア）の有意な改善も認められた（表 2.6.2-6、報告書 bTDR242）。




注：T 細胞移植 29 日後に投与を開始した。陰性対照として $CD45RB^{low}$ 細胞を移植した。抗 IL-23 抗体を投与したすべての群でアイソタイプ対照抗体群よりも体重は良好に維持されたが、1 mg/kg 群のみで対照抗体群との統計学的な有意差が認められた。
** $p<0.02$（反復測定の二元配置 ANOVA 後 Bonferroni の事後検定）

**図 2.6.2-10　サロゲート抗 IL-23 抗体の T 細胞養子移植炎症性腸疾患モデルでの有効性**

表 2.6.2-6　同系 T 細胞移植による炎症性腸疾患モデルにサロゲート抗 IL-23 抗体を治療的に投与したときの結腸病態に対する作用

| | CD45RB$^{low}$ | IgG アイソタイプ対照抗体 | 抗 IL-23 モノクローナル抗体 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 mg/kg | 3 mg/kg | 10 mg/kg |
| 重量／長さ（mg/cm） | 21.3 ± 0.8* | 56.9 ± 6.5 | 39.9 ± 4.1* | 35.3 ± 1.9* | 43.4 ± 0.9 |
| 組織学的スコア | 0.3 ± 0.7* | 11.0 ± 5.0 | 6.4 ± 3.5* | 6.4 ± 2.4* | 11.1 ± 1.8 |

データは平均値 ± 標準誤差で示す（n = 7~8）。
* p≤0.05（アイソタイプ対照抗体との比較、ANOVA 後 Dunnett の事後検定）

### 2.6.2.3　副次的薬理試験

該当資料なし。

### 2.6.2.4　安全性薬理試験

ミリキズマブの安全性薬理評価を、サルを用いた反復投与毒性試験（4 週間試験及び 2 つの 6 ヵ月試験）の中で実施した。

4 週間試験（報告書 20029153）では、1 及び 30 mg/kg の用量で SC 投与もしくは 100 mg/kg の用量で IV 投与を週 1 回、4 週間（計 5 回）行い、安全性薬理（体温、心血管系、呼吸系及び中枢神経系を含む）の評価を実施した。対照群及び高用量群のみに 8 週間の休薬期間をおく回復試験群も設定した。最初の 6 ヵ月試験（報告書 20043324）では、10 又は 100 mg/kg の用量で週 1 回、6 ヵ月間 SC 投与し心電図検査を実施した。6 ヵ月試験（2 回目）（報告書 20119229）では、100 又は 300 mg/kg の用量で週 2 回（200 又は 600 mg/kg/週）、6 ヵ月間 IV 投与し、心電図検査を実施した。

すべての試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice：GLP）に従い、経済協力開発機構（Organization for Economic Cooperation and Development：OECD）加盟国の試験施設で実施した。

#### 2.6.2.4.1　心血管系に関する試験

報告書 20029153 (4.2.3.2.1)、20043324 (4.2.3.2.2)、20119229 (4.2.3.2.3)

サル 4 週間試験（報告書 20029153）では、全例において体外ジャケット式テレメトリー（Jacketed External Telemetry：JET）による心電図測定を、投与開始前に 1 回（24 時間）並びに 8 及び 22 日目（投与の 3 時間以上前から投与の少なくとも 20 時間後まで）に実施した。1 つ目のサル 6 ヵ月間試験（報告書 20043324）では、全例において JET による心電図測定を、試験前期間に 1 回（24 時間）並びに 92 及び 169 日目（投与の 3 時間以上前から投与の少なくとも 20 時間後まで）に実施した。2 つ目の 6 ヵ月間試験（報告書 20119229）では、JET による心電図測定を、試験前期間に 1 回（24 時間）並びに 2、12 及び 25 週目（投与の 1 時間前から投与の少なくとも 20 時間後まで）に実施した。心電図は定性的及び定量的に評価した。心電図波形から、心拍数、PR、QRS 及び QT（QT を心拍数で補正して QTca を算出）間隔を算出した。

これら 3 つの試験のいずれの用量においても、定性的及び定量的な評価でミリキズマブに関連する変化は認められなかった。

#### 2.6.2.4.2　中枢神経系に関する試験

報告書 20029153 (4.2.3.2.1)

サル 4 週間試験（報告書 20029153）では、無麻酔下での神経学的検査を、初回投与時（投与前並びに投与の 1、12、24、48、96 及び 144 時間後）、29 日目（投与前並びに投与の 1 及び 24 時間後）及び回復期間終了時付近で 1 回実施した。評価したパラメータは、全身姿勢及び行動、歩行、体位の反応（自己受容感覚による位置調整並びに視覚及び触覚性踏み直り反応の評価）、脳神経機能（頭部の動き／対称性、頭部の筋緊張度、眼の反応、眼の対称性、前庭性眼振、眼位、角膜反射及び対光反射の評価）及び脊髄神経機能（筋緊張度、屈筋反射及び会陰反射の評価）であった。全例において神経学的検査の直後に直腸温を測定した。

ミリキズマブによる神経学的パラメータへの影響は認められなかった。

#### 2.6.2.4.3　呼吸系に関する試験

報告書 20029153 (4.2.3.2.1)

サル 4 週間試験（報告書 20029153）では、無麻酔下での呼吸系の検査を、初回投与時（投与前並びに投与の 1、12、24、48、96 及び 144 時間後）、29 日目（投与前並びに投与の 1 及び 24 時間後）及び回復期間終了時付近で 1 回実施した。定性的な呼吸評価（深度）及び定量的な呼吸数（回/分）の推定を行った。

ミリキズマブによる呼吸数への影響は認められず、定性的な呼吸評価においても所見は認められなかった。

### 2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

### 2.6.2.6　考察及び結論

ミリキズマブは、IL-23 の p19 サブユニットを標的とすることにより、ヒト又はカニクイザルの IL-23 に特異的な中和作用を示す高親和性の IgG4 モノクローナル抗体である。中和作用は、IL-23 p19 サブユニットの IL-23 受容体への結合を阻害することにより得られる。ミリキズマブはマウス及びラットの IL-23 に結合せず、ウサギの IL-23 への結合親和性は極めて弱いことから、げっ歯類及びウサギの非臨床モデルで使用することはできなかった。

サルで評価した安全性薬理評価項目（体温、心血管系、中枢神経系及び呼吸系への影響）において、ミリキズマブによる影響は認められなかった。

### 2.6.2.7　図表

図表は本文中の適切な箇所に記載した。

### 2.6.2.8 参考文献

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*. 2003; 278(3):1910-1914.

Chan JR, Blumenschein W, Murphy E, Diveu C, Wiekowski M, Abbondanzo S, Lucian L, Geissler R, Brodie S, Kimball AB, Gorman DM, Smith K, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, McClanahan TK, Bowman EP. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med*. 2006; 203(12):2577-2587.

Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB, Kastelein RA. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. G*astroenterology*. 2007;132(7):2359-70.

Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. The IL-23/Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18:670-675.

Maxwell JR, Viney JL. Overview of mouse models of inflammatory bowel disease and their use in drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol.* 2009; 47:5.57.1-5.57.19

Ostanin DV, Bao J, Koboziev I, Gray L, Robinson-Jackson SA, Kosloski-Davidson M, Price VH, Grisham MB. T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 296(2):G135-G146.

Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rβ1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol.* 2002; 168(11):5699-5708.

van der Fits L, Mourits S, Voerman JSA, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F, Mus AM, Florencia E, Prens EP, Lubberts E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol*. 2009; 182(9):5836-5845.

Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell–mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest.* 2006; 116(5):1310-1316.

# オンボー点滴静注 300mg
# オンボー皮下注 100mg オートインジェクター
# オンボー皮下注 100mg シリンジ

## 2.6.3　薬理試験概要表

日本イーライリリー株式会社

# 目次

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary ..... 1
2.6.3.1 Pharmacology: Overview ..... 1
2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics ..... 3
2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics ..... 3
2.6.3.4 Safety Pharmacology ..... 3
2.6.3.5 Pharmacodynamic Drug Interactions ..... 3

# 2.6.3. Pharmacology Tabulated Summary

Note: Mirikizumab is also known as LY3074828.

## 2.6.3.1. Pharmacology: Overview

| Type of Study | Test System | Route | Testing Facility | Document ID | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| **Primary Pharmacodynamics** | | | | | |
| Binding kinetics activity | Recombinant human IL-23, recombinant cynomolgus monkey IL-23, recombinant rabbit IL-23, recombinant mouse IL-23, recombinant rat IL-23, recombinant human IL-12, recombinant human IL-27, recombinant human IL-35 | In vitro | Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA | bTDR186 | 4.2.1.1.1 |
| Epitope mapping | Recombinant human IL-23 | In vitro | Lilly Biotechnology Center San Diego, CA, USA | bTDR189 | 4.2.1.1.2 |
| Epitope mapping | Recombinant human IL-23 | In vitro | Lilly Biotechnology Center San Diego, CA 92121 | bTDR190 | 4.2.1.1.3 |
| Binding assay | Recombinant human IL-23, recombinant human IL-23R/Fc, recombinant human IL-12Rβ1/Fc, recombinant human IgG1 Fc, mouse anti-6X HIS antibody | In vitro | Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA | bTDR188 | 4.2.1.1.4 |
| Functional assay | Recombinant human IL-23 and recombinant cynomolgus monkey IL-23 | In vitro | Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA | bTDR187 | 4.2.1.1.5 |
| Functional assay | Anti-human CD3, anti-human CD28, IL-23 stimulated human PBMC | In vitro | Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA | bTDR241 | 4.2.1.1.6 |
| Complex interaction | Human IL-12, human IL-23 | In vitro | Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA | bTDR228 | 4.2.1.1.7 |
| Binding assays | Recombinant human CD16a, CD32a, CD64, and C1q | In vitro | Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA | bTDR226 | 4.2.1.1.8 |
| Neutralization assay | C57BL/6 mice | In vivo | Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA | bTDR191 | 4.2.1.1.9 |
| Neutralization assay | C57BL/6 mice | In vivo | Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA | bTDR192 | 4.2.1.1.10 |

(continued)

## 2.6.3.1. Pharmacology: Overview (Concluded)

| Type of Study | Test System | Route | Testing Facility | Document ID | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Binding kinetics activity of surrogate mouse antibody | Recombinant murine IL-23 | In vitro | Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA | bTDR34 | 4.2.1.1.11 |
| Neutralization assay of surrogate mouse antibody | Recombinant murine IL-23 | In vitro | Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA | bTDR35 | 4.2.1.1.12 |
| Imiquimod-induced psoriasis-like skin model | BALB/c mice | In vivo | Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA | bTDR243 | 4.2.1.1.13 |
| Inflammatory bowel disease model | SCID mice and BALB/c mice | In vivo | Lilly Biotechnology Center San Diego, CA 92121 | bTDR242 | 4.2.1.1.14 |
| **Secondary Pharmacodynamics** | | | | | |
| Not applicable. | | | | | |
| **Safety Pharmacology** | | | | | |
| Repeat-Dose Toxicity[a] (Cardiovascular system, central nervous system, respiratory system) | Monkey, Cynomolgus | SC or IV | [redacted] USA | 20029153 | 4.2.3.2.1 |
| Repeat-Dose Toxicity[a] (Cardiovascular system) | Monkey, Cynomolgus | SC | [redacted] USA | 20043324 | 4.2.3.2.2 |
| Repeat-Dose Toxicity[a] (Cardiovascular system) | Monkey, Cynomolgus | IV | [redacted] USA | 20119229 | 4.2.3.2.3 |
| **Pharmacodynamic Drug Interactions** | | | | | |
| Not applicable. | | | | | |

Abbreviations: IV = intravenous; SC = subcutaneous; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; SCID = Severe Combined Immunodeficient.

[a] Contains a GLP compliance statement.

## 2.6.3.2. Primary Pharmacodynamics

See section 2.6.2, Pharmacology Written Summary.

## 2.6.3.3. Secondary Pharmacodynamics

Not applicable.

## 2.6.3.4. Safety Pharmacology

| Organ Systems Evaluated | Species, Strain | Route, Frequency, and Duration | Doses | Number of Animals | Noteworthy Findings | GLP | Document ID |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cardiovascular, central nervous, and respiratory | Monkey, cynomolgus | SC or IV, once weekly, 1 month | 0, 1, 30 mg/kg SC, 100 mg/kg IV | 3-5/sex/group | None.<br>NOEL for safety pharmacology: 100 mg/kg/week | Yes | 20029153 |
| Cardiovascular | Monkey, cynomolgus | SC, once weekly, 6 months | 0, 10, 100 mg/kg | 4/sex/group | None.<br>NOEL for safety pharmacology: 100 mg/kg/week | Yes | 20043324 |
| Cardiovascular | Monkey, cynomolgus | IV, twice weekly, 6 months | 0, 100, 300 mg/kg | 4/sex/group | None.<br>NOEL for safety pharmacology: 300 mg/kg twice weekly (600 mg/kg/week) | Yes | 20119229 |

Abbreviations: IV = intravenous; NOEL = no-observed-effect level; SC = subcutaneous.

## 2.6.3.5 Pharmacodynamic Drug Interactions

Not applicable.