

**カドサイラ点滴静注用100 mg
カドサイラ点滴静注用160 mg
(トラスツズマブ エムタンシン (遺伝子組換え))
[HER2陽性手術不能又は再発乳癌]**

第2部 (モジュール2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
DM1	a derivative of maytansine	メイタンシン誘導体
ECD	extracellular domain	細胞外ドメイン
EGF	epidermal growth factor	上皮増殖因子
FcγR	Fc gamma receptor	IgG の Fc 領域に対する受容体
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	ヒト上皮増殖因子受容体2
HER3	human epidermal growth factor receptor 3	ヒト上皮増殖因子受容体3
HER4	human epidermal growth factor receptor 4	ヒト上皮増殖因子受容体4
IGF	insulin-like growth factor	インスリン様成長因子
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
MCC	4-(<i>N</i> -maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate	4-(<i>N</i> -マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシラート
MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	肝細胞増殖因子受容体
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	ホスホイノシチド3-キナーゼ
T-DM1	trastuzumab emtansine	トラスツズマブ エムタンシン

目次

	頁
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表.....	4
2.6.1 緒言.....	4
2.6.1.1 トラスツズマブ エムタンシン (T-DM1) の構造.....	4
2.6.1.2 標的分子 HER2 と抗体薬物複合体 T-DM1 によるアプローチ.....	4
2.6.1.3 T-DM1 の薬理学的特性・作用機序.....	5
2.6.1.4 申請した臨床適応症及び用法・用量.....	6
2.6.1.4.1 効能・効果.....	6
2.6.1.4.2 用法・用量.....	6
2.6.1.5 参考文献.....	6

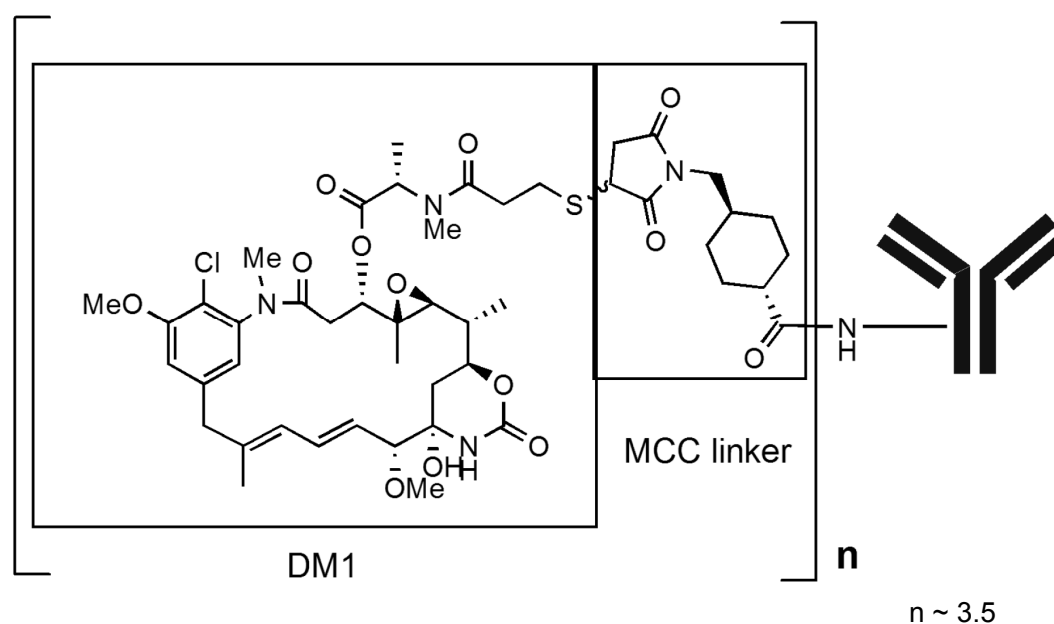
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 トラスツズマブ エムタンシン (T-DM1) の構造

トラスツズマブ エムタンシン (遺伝子組換え) (以下, T-DM1) は, 抗 HER2ヒト化モノクローナル抗体トラスツズマブ (IgG1) とチューブリン重合阻害作用を有する DM1を, チオエーテルリンカーを介して結合させた抗体薬物複合体である。DM1は, sulfhydryl 基を有するメイタンシン誘導体であり¹⁾, MCC リンカーを介してトラスツズマブの主にリシン残基に共有結合している (図 2.6.1.1-1)。T-DM1には, 1抗体分子当たり平均約3.5分子の DM1が含まれているが, 循環血中における安定性を指標にして, MCC リンカーを選択したため, 体内における DM1の自然遊離は限定的である。

図 2.6.1.1-1 トラスツズマブ エムタンシン (T-DM1) の構造



トラスツズマブ1分子に対して平均約3.5分子の DM1が結合している。

[3.2.S.1.2 Figure S.1.2-1を改変]

2.6.1.2 標的分子 HER2と抗体薬物複合体 T-DM1によるアプローチ

(1) HER2の機能, 乳癌における発現

HER2受容体型チロシンキナーゼ (別称 ErbB2, p185HER2) は, 膜貫通領域を有する EGF 受容体ファミリーに属している。HER3 (ErbB3), HER4 (ErbB4) も含め, 本ファミリー受容体は, 正常な発育並びに癌の増殖いずれにおいても重要な役割を果たしている²⁻⁴⁾。HER2の遺伝子増幅とタンパクの過剰発現は, ヒト乳癌の約20%で認められ, HER2陽性乳癌と呼ばれている。このような HER2の過剰発現は, 進行性の腫瘍増殖と臨床転帰不良に関連した予後不良因子であり^{5,6)}, HER2陽性乳癌は, HER2陰性の場合と比較して予後が悪かった。そのため, 20年以上前から, HER2陽性乳癌に対する分子標的治療法の開発が進められ, 抗 HER2ヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブを始めとした薬剤が既に承認されている。

(2) トラスツズマブの作用機序と HER2陽性乳癌の治療

トラスツズマブは, HER2の細胞外ドメイン (ECD) を標的とするヒト化抗体であり, HER2

陽性乳癌の治療を目的として開発された最初の治療薬である。トラスツズマブは早期及び転移性 HER2陽性乳癌患者に対し効果を示すなど、医療上の恩恵をもたらすことから、HER2陽性乳癌患者にとって最も重要な抗悪性腫瘍薬の1つであり、HER2陽性乳癌の治療体系において標準的な治療薬である。

トラスツズマブによって引き起こされる反応の機序には、まだ解明されていない点もあるものの、HER2 ECD の遊離（シェディング）抑制、HER2シグナル伝達経路の抑制、細胞周期進行の停止、DNA 修復の抑制、脈管形成の抑制、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）の惹起などの作用が、臨床におけるベネフィットに貢献している⁷⁻⁹。このように多様な作用機序を有しているにもかかわらず、トラスツズマブの治療を受けた患者の中には、最初から反応性を示さない患者、臨床的に奏効した後に再発する患者も多い^{10,11}。トラスツズマブを含む治療後の病勢進行には、シグナル伝達経路（例えば PI3K/AKT 経路）の異常な活性化¹²⁻¹⁵、IGF-1受容体^{16,17}、ErbB/HER リガンド^{18,19}あるいは MET²⁰のアップレギュレーションを介する代償性シグナルの活性化、又は細胞外領域を欠く構成的活性化型 HER2（p95HER2）の生成^{21,22}の寄与が報告されている。

(3) 抗体薬物複合体 T-DM1によるアプローチ

抗体薬物複合体とは、きわめて強力な細胞障害性薬剤とモノクローナル抗体を結合させたものであり、全身投与される抗腫瘍剤に腫瘍選択性を付与する新しいアプローチである。腫瘍特異的又は過剰に発現している細胞表面の抗原を利用して、細胞毒性を示す薬剤を腫瘍細胞選択的に到達させることを目標として設計されている。このアプローチにより、細胞毒性を示す薬剤をそのまま投与する場合に比べ、安全域が広がると想定される。DM1の元になった物質メイタンシンの治療効果については、抗癌剤として1970年代に臨床試験が実施されたが、忍容できない毒性が出現したため開発は中止された。T-DM1は、チューブリン重合阻害薬 DM1とトラスツズマブを安定なリンカーを介して共有結合させた抗体薬物複合体である。抗体と結合することにより選択性が付与され、HER2を高発現している癌細胞への DM1の到達性が改善される。また、リンカーを介した DM1との結合は、トラスツズマブの HER2及び FcγR 等との結合活性に影響を及ぼさず、トラスツズマブの生物活性も保持されている²³。非臨床では腫瘍移植モデルを用いて評価し、T-DM1はトラスツズマブ非感受性の HER2陽性腫瘍細胞に対しても有効性を示した。このように、T-DM1は HER2陽性乳癌患者の治療における新たな治療オプションとして、臨床的に意義がある有効性と忍容可能な安全性を示す薬物になるものと考えられる。

2.6.1.3 T-DM1の薬理学的特性・作用機序

T-DM1は、チューブリン重合阻害薬 DM1を HER2陽性の腫瘍細胞選択的に到達させる機能とトラスツズマブの生物活性とを併せ持っている。T-DM1が抗腫瘍効果を示すためには、T-DM1を構成するトラスツズマブ及び DM1がそれぞれ生物学的な活性を保持している必要があるが、この要件を満たすことは薬効薬理試験において確認された。

すなわち、T-DM1は、トラスツズマブと同程度の親和性で HER2 と結合すること、トラスツズマブと同様に、FcγR 及び補体タンパク質 C1q との結合活性、HER2 ECD の遊離（シェディング）抑制、HER2による PI3K/AKT シグナル伝達の抑制及び ADCC の惹起作用が確認され、トラスツズマブの作用機序を保持していることが示された。

また、T-DM1は HER2と結合することにより、細胞内に取り込まれ、リソゾームによる分解を受けて DM1を含有する異化代謝物が遊離すると考えられる²⁴。DM1は、メイタンシノイドと呼ばれる細胞障害性を示す薬物に属しており、メイタンシノイドは、強力な有糸分裂阻害剤であり、ピンカアルカロイドのように、チューブリン重合を阻害することが報告されている^{25,26}。T-DM1は、DM1と同様、腫瘍細胞の細胞周期を G2/M 期で停止させ、アポトーシスによる細胞死を誘導する。これらの所見は、有糸分裂阻害剤の作用機序と一致しているが、T-DM1による有糸分裂の停止及びアポトーシス誘導作用は、HER2陽性の腫瘍細胞に対し選択的であ

る。

2.6.1.4 申請した臨床適応症及び用法・用量

2.6.1.4.1 効能・効果

HER2陽性手術不能又は再発乳癌

2.6.1.4.2 用法・用量

通常，成人にはトラスツズマブ エムタンシンとして1回3.6 mg/kg（体重）を3週間間隔で点滴静注する。

2.6.1.5 参考文献

- 1) Chari RVJ, Martell BA, Gross JL, Cook SB, Shah SA, Blättler WA, et al. Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs. *Cancer Res* 1992;52:127-131.
- 2) Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-37.
- 3) Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:195-217.
- 4) Hynes NE, Lane HA. ErbB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341-54.
- 5) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
- 6) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/*neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12.
- 7) Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 1999;26(Suppl 12):60-70.
- 8) Hudis CA. Trastuzumab - mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007;357:39-51.
- 9) Nahta R, Esteva FJ. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett* 2006;232:123-38.
- 10) Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
- 11) Nahta R, Yu D, Hung M-C, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3:269-80.
- 12) Nagata Y, Lan K-H, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004;6:117-27.
- 13) Fujita T, Doihara H, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, Washio K, et al. PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. *Br J Cancer* 2006;94:247-52.
- 14) Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2007;12:395-402.
- 15) Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS, et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by

- the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell* 2009;15:429-40.
- 16) Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1852-7.
 - 17) Nahta R, Yuan LXH, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:11118-28.
 - 18) Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 2002;62:3151-8.
 - 19) Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, Guix M, Dugger T, Engelman JA, et al. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab *in vivo* overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res* 2007;13:4909-19.
 - 20) Shattuck DL, Miller JK, Carraway III KL, Sweeney C. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:1471-7.
 - 21) Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:628-38.
 - 22) Sáez R, Molina MA, Ramsey EE, Rojo F, Keenan EJ, Albanell J, et al. p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:424-31.
 - 23) Junttila TT, Li G, Parsons K, Lewis Phillips G, Sliwkowski MX. Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;128:347-56.
 - 24) Erickson HK, Lewis Phillips GD, Leipold DD, Provenzano CA, Mai E, Johnson HA, et al. The effect of different linkers on target cell catabolism and pharmacokinetics/pharmacodynamics of trastuzumab maytansinoid conjugates. *Mol Cancer Ther* 2012;11:1133-42.
 - 25) Remillard S, Rebhun LI, Howie GA, Kupchan SM. Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. *Science* 1975;189:1002-5.
 - 26) Cassady JM, Chan KK, Floss HG, Leistner E. Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2004;52:1-26.

カドサイラ点滴静注用100 mg
カドサイラ点滴静注用160 mg
(トラスツズマブ エムタンシン (遺伝子組換え))
[HER2陽性手術不能又は再発乳癌]

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

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
CR	complete response	完全奏効
CV	coefficient of variation	変動係数
DM1	a derivative of maytansine	メイタンシン誘導体
EC ₅₀	50% effective concentration	50%有効濃度
ECD	extracellular domain	細胞外ドメイン
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
FcγR	Fc gamma receptor	IgG の Fc 領域に対する受容体
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	ヒト上皮増殖因子受容体2
IC ₅₀	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL-8	interleukin-8	インターロイキン8
k _a	association rate constant	結合速度定数
k _d	dissociation rate constant	解離速度定数
K _D	dissociation equilibrium constant	解離定数
MCC	4-(<i>N</i> -maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate	4-(<i>N</i> -マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシラート
MMTV	mouse mammary tumor virus	マウス乳癌ウイルス
muMAb	murine monoclonal antibody	マウスモノクローナル抗体
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase	ポリ (ADP リボース) ポリメラーゼ
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
pH3	phosphorylated histone H3	リン酸化ヒストン H3
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	ホスホイノシチド3-キナーゼ
PR	partial response	部分奏効
RI	radioisotope	放射性同位元素
SMCC	<i>N</i> -succinimidyl 4-(<i>N</i> -maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate	<i>N</i> -スクシンイミジル 4-(<i>N</i> -マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシラート
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴法
T-DM1	trastuzumab emtansine	トラスツズマブ エムタンシン
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein	X 連鎖アポトーシス抑制蛋白質

目次

	頁
2.6.2 薬理試験の概要文.....	4
2.6.2.1 まとめ.....	4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....	7
2.6.2.2.1 <i>In vitro</i> 結合活性及び生物活性.....	7
2.6.2.2.1.1 HER2 ■■■ との結合活性.....	7
2.6.2.2.1.2 FcγR 及び C1q との結合活性, ADCC 活性.....	7
2.6.2.2.1.3 腫瘍増殖抑制活性及び作用機序.....	10
2.6.2.2.2 <i>In vivo</i> 抗腫瘍効果.....	21
2.6.2.2.2.1 T-DM1 による抗腫瘍効果と HER2 特異性.....	21
2.6.2.2.2.2 MMTV-HER2 Fo5 乳腺腫瘍移植モデルにおける抗腫瘍効果, 用量及び 投与スケジュール.....	26
2.6.2.2.2.3 BT-474EEI 乳癌細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果, 用量及び投与ス ケジュール.....	29
2.6.2.2.2.4 KPL-4 乳癌細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果.....	34
2.6.2.3 副次的薬理試験.....	36
2.6.2.4 安全性薬理試験.....	36
2.6.2.4.1 DM1: hERG 試験.....	36
2.6.2.4.2 T-DM1: 雌カニクイザル単回静脈内投与による安全性薬理試験 (3 週間の回 復期間).....	37
2.6.2.4.3 中枢神経系への作用.....	37
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	38
2.6.2.5.1 トラスツズマブ共存下における抗腫瘍効果.....	38
2.6.2.6 考察及び結論.....	38
2.6.2.7 図表.....	39
2.6.2.8 参考文献.....	39

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

トラスツズマブ エムタンシン（遺伝子組換え）（以下、T-DM1）は、抗 HER2ヒト化モノクローナル抗体トラスツズマブ（IgG1）とチューブリン重合阻害作用を有する DM1を、チオエーテルリンカーを介して結合させた抗体薬物複合体である。抗体との結合により選択性を付与することで、DM1の HER2陽性腫瘍細胞への到達性が向上しており、DM1の有効性と安全性を改善することができる。

薬効薬理試験では、T-DM1の結合活性、トラスツズマブ感受性及び非感受性乳癌細胞株に対する生物活性を明らかにすること、T-DM1が有する複合的な作用機序を明らかにすること、複数の腫瘍移植モデルを用いて *in vivo* での抗腫瘍活性を調べること、これらの腫瘍移植モデルにおいて用量と活性の関係を明らかにすることを主な目的とした。

(1) 結合活性（HER2, FcγR, C1q）及び ADCC の惹起

T-DM1について、HER2の ██████████（██████），ヒト Fcγ 受容体（RIa, RIIa, RIIb, RIIIa）及びヒト補体 C1q に対する結合活性、並びに抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）をトラスツズマブと比較しながら検討した。

- ・表面プラズモン共鳴法（SPR）で測定した組換え型 HER2 ██████████ に対する結合活性（解離定数）は、T-DM1（1.08 nmol/L, 5ロットの平均値）とトラスツズマブ（1.01 nmol/L）は同程度であった。
- ・高親和性 FcγR（FcγRIa）に対する結合活性は、T-DM1とトラスツズマブは同程度であった。低親和性 FcγR（FcγRIIa [H131及び R131], FcγRIIb, FcγRIIIa [V158及び F158]）に対する結合活性は、T-DM1の方がトラスツズマブよりも2倍～6倍強かった。
- ・補体 C1q との結合活性は、T-DM1とトラスツズマブの間で大きな差は認められなかった。
- ・健康な成人より採取した末梢血単核細胞（PBMC）を用いて ADCC 活性を比較したところ、T-DM1はトラスツズマブよりも、わずかに強い ADCC 活性を示す傾向が認められた。

T-DM1は、トラスツズマブと同様に HER2 ██████████, FcγR 及び C1q に対する結合活性を示した。トラスツズマブに MCC リンカーを介して DM1を共有結合させたことによる明らかな変化は認められず、トラスツズマブの生物活性が保持されていた。

(2) *In vitro* における乳癌細胞増殖抑制活性

HER2発現量の異なるヒト乳癌細胞株を用いて、T-DM1による増殖抑制活性について検討した。また、T-DM1を構成するトラスツズマブ、DM1並びに T-DM1の代謝物による細胞増殖に対する作用を調べた。

- ・T-DM1は、トラスツズマブ感受性乳癌細胞株の増殖に対し、トラスツズマブよりも強い抑制活性を示し、トラスツズマブ非感受性細胞株に対しても、強い増殖抑制活性を示した。
- ・T-DM1は、HER2に特異性を示し、正常レベルの HER2を発現している乳癌細胞あるいは HER2陰性の乳癌細胞に対する増殖抑制効果は認められなかった。
- ・T-DM1, T-DM1の各構成成分（トラスツズマブ、DM1、リンカー試薬 SMCC）及び同定されている代謝物（MCC-DM1, Lysine-MCC-DM1 [Lys-MCC-DM1]）について細胞増殖に対する影響を調べたところ、T-DM1及び DM1だけが細胞増殖抑制活性を示した。

T-DM1は、HER2陽性細胞株に対し特異的に腫瘍増殖抑制活性を示した。また、トラスツズ

マブ感受性及び非感受性のいずれの乳癌細胞株に対しても、強い腫瘍増殖抑制活性を示した。

(3) 作用機序

T-DM1の作用機序を検討するため、HER2陽性ヒト乳癌細胞株の細胞周期に対する作用、アポトーシス誘導作用、シグナル伝達に対する作用、細胞表面からのHER2 ECD遊離（シェディング）に対する抑制効果について、トラスツズマブ及びDM1と対比しながら検討した。

- T-DM1は、細胞周期をG2/M期で停止させ、カスパーゼ-3/7の誘導を伴うアポトーシスによる細胞死を誘導した。一方、トラスツズマブで処理した場合、G1期で細胞周期は停止するが、細胞死には至らなかった。
- トラスツズマブ及びT-DM1は、いずれもトラスツズマブ感受性乳癌細胞のPI3K/AKT経路シグナル伝達を阻害した。また、T-DM1は、トラスツズマブ非感受性乳癌細胞に対してもPI3K/AKT経路のシグナル伝達を阻害した。
- トラスツズマブ及びT-DM1は、いずれも乳癌細胞表面からのHER2 ECD遊離（シェディング）を阻害した。

T-DM1の作用機序は複合的であり、T-DM1を構成するトラスツズマブ及びDM1が示す薬理活性を併せ持っていた。

(4) 腫瘍移植モデルにおける抗腫瘍効果

HER2陽性及び陰性の乳癌細胞をマウスに移植したモデルを用いて、*in vivo*におけるT-DM1の腫瘍増殖抑制効果を検討した。

- T-DM1、トラスツズマブあるいはDM1の単独投与、並びにトラスツズマブとDM1の併用投与の中で、T-DM1だけが優れた抗腫瘍効果を示した。
- T-DM1は、HER2陽性腫瘍に選択的な抗腫瘍活性を示し、HER2陰性腫瘍には効果を示さなかった。また、コントロール抗体を用いた抗体薬物複合体（抗IL-8-MCC-DM1）は、HER2陽性腫瘍に対し効果を示さなかった。
- T-DM1は、トラスツズマブに非感受性を示すMMTV-HER2 Fo5及びBT-474EEI細胞移植モデルに対し、優れた抗腫瘍効果を示した。また、*in vivo*においてトラスツズマブ感受性を示すKPL-4細胞移植モデル（主にADCCの寄与により感受性を示すと考えられる）において、トラスツズマブよりも強い抗腫瘍効果を示した。
- T-DM1は、HER2陽性腫瘍移植モデルにおいて、3週間に1回投与では、3~30 mg/kgの用量で効果を示した。

*In vivo*におけるT-DM1の抗腫瘍効果は、HER2陽性腫瘍に特異的であるとともに、トラスツズマブ非感受性を示す細胞移植モデルに対しても腫瘍増殖抑制効果を示した。

(5) 安全性薬理試験

T-DM1のカニクイザルを用いた安全性薬理試験（0, 3, 10, 30 mg/kg, 単回投与）では、心血管系及び呼吸器系に対する影響はみられず、hERG試験ではDM1のIC₂₀は29.5 μMより上であった。T-DM1のカニクイザル3か月間試験（0, 3, 10, 30 mg/kg, 1回/3週）及び6か月間試験（0, 1, 3, 10 mg/kg, 1回/3週）の一般症状観察及び神経学的検査において、中枢神経系への作用を示唆する所見は認められなかった。

(6) 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験として、トラスツズマブ共存下における T-DM1の腫瘍増殖抑制効果について、MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍移植モデルを用いて検討し、トラスツズマブは、T-DM1の増殖抑制効果に対し拮抗的な作用を示さなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 結合活性及び生物活性

T-DM1分子中のトラスツズマブ部分が HER2に対する結合活性を示すことは、HER2陽性腫瘍に対し効率的に DM1を到達させるために重要である。また、T-DM1によるトラスツズマブ様の生物活性は、この抗体部分により担われている。そこで、T-DM1の *in vitro* における薬理作用を評価するにあたり、抗体部分が担う HER2 [REDACTED]、FcγR 等との結合特性が、MCC リンカーを介した DM1との共有結合により、影響を受けていないか検討した。また、T-DM1分子中の DM1部分は、種々の薬理活性（細胞分裂の停止、細胞死誘導など）を保持していなければならぬと考えられた。本項では、トラスツズマブと T-DM1の生物学的特性を比較することにより、T-DM1の作用機序におけるトラスツズマブと DM1両者の寄与について検討した。

2.6.2.2.1.1 HER2 [REDACTED] との結合活性

(資料番号4.2.1.1-1, 4.2.1.1-2)

トラスツズマブと DM1が MCC リンカーを介して共有結合したことにより、HER2との結合特性が影響を受けていないか、トラスツズマブを対照として比較した。

T-DM1あるいはトラスツズマブと HER2 [REDACTED] の遺伝子組換え体との結合について、SPR を用いて速度論的に解析し、結合活性を計測した。T-DM1及びトラスツズマブは、間接法を用いて SPR チップに固相化した。間接法には、直接固相化法におけるチップ再生時の潜在的な不安定性が回避できること、抗体分子が固相化された表面で一定に並ぶこと、不純物による干渉作用を最小化できるなどの利点がある。

T-DM1あるいはトラスツズマブと HER2 [REDACTED] との相互作用について、結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d) 及び解離定数 (K_D) を表 2.6.2.2.1.1-1に示した。T-DM1については、標準物質を含む5ロットについて測定し、 K_D 値の平均は1.08 nmol/L であった。また、トラスツズマブの K_D 値は1.01 nmol/L であった。T-DM1と HER2 [REDACTED] との結合における平均 k_a 値は 2.07×10^5 1/Ms、平均 k_d 値は 2.23×10^{-4} 1/s であり、同様に、トラスツズマブでは平均 k_a 値は 2.16×10^5 1/Ms、平均 k_d 値は 2.21×10^{-4} 1/s であった。

T-DM1は、トラスツズマブと同程度の HER2 [REDACTED] 結合活性を示したことから、T-DM1は、HER2陽性腫瘍細胞に DM1を到達させる能力という点で、必要な条件を備えていることが示唆された。

表 2.6.2.2.1.1-1 SPR 分析による HER2 [REDACTED] と T-DM1/トラスツズマブとの結合活性

リガンド	k_a (1/Ms $\times 10^5$)	k_d (1/s $\times 10^{-4}$)	K_D (nmol/L)
トラスツズマブ	2.16 ± 0.194	2.21 ± 0.542	1.01 ± 0.178
T-DM1	2.07 ± 0.162	2.23 ± 0.340	1.08 ± 0.193

k_a : 結合速度定数, k_d : 解離速度定数, K_D : 解離定数

T-DM1は、標準物質を含む5ロットの平均値、表示は、いずれも平均値 \pm 標準偏差。

[4.2.1.1-1 Table 3を改変]

本試験で示されたトラスツズマブと HER2 [REDACTED] との結合活性は、HER2 [REDACTED] を固相化した ELISA¹⁾、HER2陽性細胞を用いた RI 標識抗体との結合試験²⁾などの手法を用いて、報告されている数値の範囲内であった。また、開発の初期段階では、T-DM1と HER2 [REDACTED] との結合活性について ELISA を用いて検討しており、トラスツズマブと同程度の HER2結合活性が示されている (4.2.1.1-2 Table 1参照)。

2.6.2.2.1.2 FcγR 及び C1q との結合活性、ADCC 活性

免疫グロブリンの Fc 領域とエフェクター細胞上の FcγR あるいは補体蛋白との結合により、

種々の生物学的反応が惹起され、細胞傷害活性を示す。そこで、T-DM1及びトラスツズマブと種々のヒト FcγR あるいは補体 C1q との結合活性について、ELISA を用いたリガンド結合試験^{3),4)}により評価した。また、トラスツズマブの作用機序の1つと考えられている ADCC 活性については、HER2陽性のヒト乳癌細胞株 BT-474を標的細胞とし、健康な成人から採取した末梢血単核細胞 (PBMC) をエフェクター細胞として、T-DM1及びトラスツズマブの活性を評価した。

(1) FcγR との結合活性

(資料番号4.2.1.1-2, 4.2.1.1-3)

IgG の Fc 領域と細胞表面上の FcγR との結合により、エフェクター細胞が活性化され、細胞を介する様々なエフェクター機能が惹起される。そこで、主なヒト FcγR (FcγRIa, FcγRIIa の2つのアロタイプ [H131, R131], FcγRIIb, 及び FcγRIIIa の2つのアロタイプ [F158, V158]) の可溶性受容体を作製し、T-DM1との結合活性について、ELISA を用いたリガンド結合実験により測定した。低親和性受容体 (FcγRIIa-H131, FcγRIIa-R131, FcγRIIb, FcγRIIIa-F158及び FcγRIIIa-V158) の場合は、T-DM1及びトラスツズマブを抗ヒト κ 鎖抗体 F(ab')₂フラグメントを用いて、分子架橋させて調べた。高親和性受容体 (FcγRIa) の場合は、分子を架橋させる必要はないことから、単量体を用いて調べた。

各 FcγR との結合曲線から求めた50%有効濃度 (EC₅₀) に基づくと、T-DM1及びトラスツズマブは、高親和性受容体 FcγRIa に対し同程度の結合活性を示した (表 2.6.2.2.1.2-1)。また、開発初期に実施した試験においても、T-DM1はトラスツズマブと同程度の結合活性を示していることから (4.2.1.1-2 Figure 3a), MCC リンカーを介したトラスツズマブと DM1との結合は、FcγRIa との結合特性に有意な影響を及ぼさないことが示された。

表 2.6.2.2.1.2-1 ヒト FcγR と T-DM1/トラスツズマブとの結合活性, EC₅₀値による比較

抗体	Ia (ng/mL)	IIa-R131 (µg/mL)	IIa-H131 (µg/mL)	IIb (µg/mL)	IIIa-F158 (µg/mL)	IIIa-V158 (µg/mL)
トラスツズマブ	24.0 ± 0.964	6.30 ± 1.71	3.56 ± 0.566	8.19 ± 0.907	6.54 ± 1.31	0.531 ± 0.0748
T-DM1 標準物質	18.9 ± 3.46	2.34 ± 0.387	1.41 ± 0.110	3.94 ± 0.741	1.04 ± 0.121	0.182 ± 0.0307

表示は、いずれも平均値 ± 標準偏差 (n=3), EC₅₀: 50%有効濃度

[4.2.1.1-3 Table 2を改変]

低親和性受容体 FcγRIIa, IIb, IIIa との結合活性については、T-DM1がトラスツズマブと比較し、やや強い (2倍~6倍) 結合性を示した (表 2.6.2.2.1.2-1)。本試験において、T-DM1が低親和性受容体にやや強い結合性を示した要因は明らかになっていないが、FcγR と抗体との結合には、糖鎖構造の違いを含め様々な因子が関係するとされている。トラスツズマブ標準物質と T-DM1とでは、糖鎖構造についてわずかな違いが認められており、低親和性 FcγR との結合性における T-DM1とトラスツズマブの違いと関係している可能性がある (2.3.S.3.1.2(4)参照)。

(2) 補体 C1q との結合活性

(資料番号4.2.1.1-2, 4.2.1.1-3)

細胞表面の抗原に結合している IgG の Fc 領域に補体 C1q が結合することにより、補体活性化経路のカスケードが惹起され、細胞融解が誘導される。本試験では、*in vitro* における検体と C1q との結合活性について、正常ヒト血清から精製した C1q を用いた ELISA により評価した。

T-DM1の結合活性は、トラスツズマブと若干異なっていたものの、大きな差は認められなかった(表 2.6.2.2.1.2-2)。また、開発初期に実施した C1q との結合試験においても、トラスツズマブと T-DM1は同程度の結合活性を示しており(4.2.1.1-2 Figure 4)，トラスツズマブと T-DM1の補体 C1q との結合活性に大きな差はないものと考えられる。

表 2.6.2.2.1.2-2 補体 C1q と T-DM1/トラスツズマブとの結合活性, EC₅₀値による比較

抗体	EC ₅₀ (µg/mL)		相対比	
	平均値 ± 標準偏差	%CV	平均値 ± 標準偏差	%CV
トラスツズマブ	1.19 ± 0.115	9.69	1.45 ± 0.144	9.95
T-DM1 標準物質	1.72 ± 0.115	6.70	1.00	NA

EC₅₀ : 50%有効濃度 (n = 3) , CV : 変動係数, NA : 該当せず
 相対比 = T-DM1標準物質の EC₅₀値/検体の EC₅₀値

[4.2.1.1-3 Table 6を改変]

(3) ADCC 活性

(資料番号4.2.1.1-3)

ADCC 活性は、トラスツズマブの作用機序の1つと考えられており、抗原を発現する標的細胞に抗体が結合することで、エフェクター細胞による細胞傷害作用を誘導する免疫学的機能である。本試験では、T-DM1及びトラスツズマブの ADCC 活性について、HER2陽性のヒト乳癌細胞株 BT-474 を calcein AM 標識して標的細胞とし、健康な成人から採取した末梢血単核細胞 (PBMC) をエフェクター細胞として用いた。エフェクター細胞と標的細胞の比は25 : 1とし、抗体存在下で3時間培養することで、ADCC 活性を評価した。

ADCC 活性の EC₅₀値及び最大細胞傷害活性を、表 2.6.2.2.1.2-3, 表 2.6.2.2.1.2-4に示した。本試験において、T-DM1がトラスツズマブよりもわずかに強い ADCC 活性を示した要因は明らかではないものの、同じロットのトラスツズマブ原薬に由来するトラスツズマブと T-DM1が、同程度の ADCC 活性を示したことから(図2.3.S.3.1.2-10参照)，MCC リンカーを介したトラスツズマブと DM1との結合は、ADCC 活性に影響しないことが示唆された。

表 2.6.2.2.1.2-3 T-DM1とトラスツズマブによる ADCC 活性, EC₅₀値による比較

抗体	EC ₅₀ (ng/mL)		
	Test 1	Test 2	Test 3
トラスツズマブ	20.5 (0.644)	11.2 (0.571)	8.69 (0.899)
T-DM1 標準物質	13.2	6.39	7.81

EC₅₀ : 50%有効濃度, カッコ内は T-DM1標準物質の ADCC 活性に対する相対比
 相対比 = T-DM1標準物質の EC₅₀値/トラスツズマブの EC₅₀値

[4.2.1.1-3 Table 4を改変]

表 2.6.2.2.1.2-4 T-DM1とトラスツズマブによる ADCC 活性, 最大細胞傷害活性による比較

抗体	ADCCによる最大傷害活性 (%)		
	Test 1	Test 2	Test 3
トラスツズマブ	15.0 (0.701)	26.5 (0.701)	28.3 (0.813)
T-DM1 標準物質	21.4	37.8	34.8

カッコ内は、T-DM1標準物質の最大細胞傷害活性に対する相対比

相対比 = トラスツズマブの最大傷害活性/T-DM1標準物質の最大傷害活性

[4.2.1.1-3 Table 5を改変]

T-DM1分子中の DM1部分が、ADCC 活性の評価に影響するか検討するため、エフェクター細胞である PBMC を添加せずに ADCC 活性を評価したところ、細胞傷害活性は、ほとんど検出されなかった。したがって、本試験の条件下で検出された細胞傷害活性は、主に ADCC に起因することが確認された。ADCC 活性評価試験での培養時間が短いため、DM1に由来する細胞毒性が示されなかったと考えられる。

2.6.2.2.1.3 腫瘍増殖抑制活性及び作用機序

トラスツズマブは、*in vitro* 及び *in vivo* において、HER2陽性の腫瘍細胞に対し選択的に増殖抑制効果を示すことから、HER2陽性の乳癌患者における標準的な治療薬となっている。本項では、乳癌細胞に対する *in vitro* での生物活性について、T-DM1とトラスツズマブを比較した。以下に主な検討項目を示す。

- 乳癌細胞の増殖に対する作用
HER2発現量が異なる数種の乳癌細胞株を用いて評価した。
- 細胞周期及びアポトーシス誘導に対する作用
トラスツズマブ感受性 (SK-BR-3, BT-474) 及びトラスツズマブ非感受性 (KPL-4) の乳癌細胞株を用いて評価した。
- HER2 ECD シェディング及び PI3K/AKT 経路活性化に対する作用
トラスツズマブは、HER2 ECD の細胞表面からの遊離 (シェディング) を阻害すること⁵⁾、HER2活性化に伴うシグナル伝達経路 (PI3K/AKT 経路など) を抑制すること^{6),7)}が報告されていることから、T-DM1の作用について、トラスツズマブと比較した。
- T-DM1の各構成成分及び代謝物による細胞増殖に対する作用
T-DM1の各構成成分 (トラスツズマブ, SMCC 及び DM1) 並びに代謝物 (Lys-MCC-DM1 及び MCC-DM1) の細胞増殖に対する作用を SK-BR-3細胞を用いて評価し、T-DM1と比較した。

(1) 乳癌細胞株における HER2発現, フローサイトメトリーによる解析

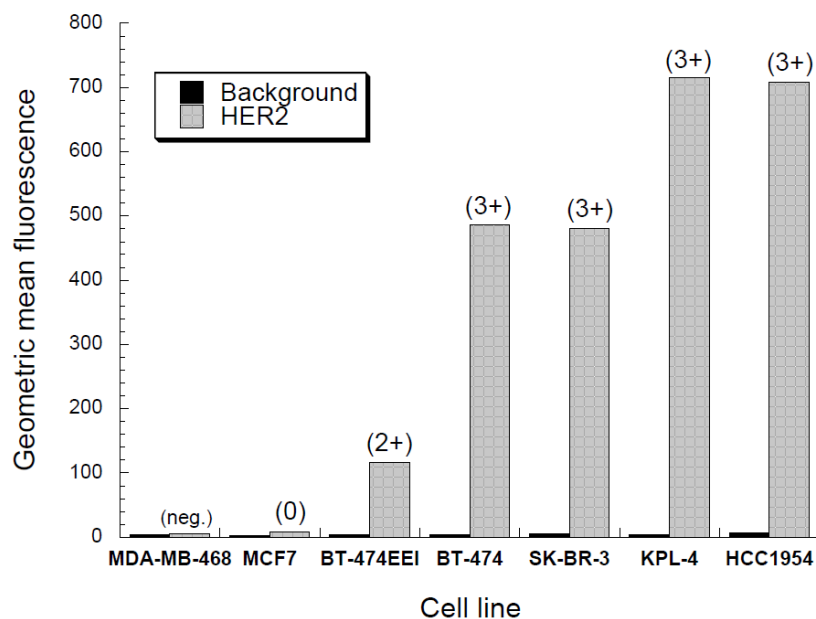
(資料番号4.2.1.1-4)

本項で用いた乳癌細胞株の HER2発現量を、トラスツズマブの親抗体 (マウス抗体) である muMAb 4D5を用い、フローサイトメトリーにより調べた。本抗体は、HER2 ECD 上にあるトラスツズマブ及び T-DM1と同じエピトープを認識する。

SK-BR-3, BT-474, KPL-4及び HCC1954細胞は HER2発現レベル3+, BT-474EEI 細胞は HER2発現レベル2+である。BT-474EEI 細胞は、BT-474派生株であり、エストロゲン・ペレットを補充しなくとも *in vivo* で増殖性を示す細胞株である。MCF7細胞は、正常組織レベルの HER2を発現しており、HER2発現レベルは0である。また、MDA-MB-468細胞は、HER2蛋白質を発現していない細胞株である。

これらの様々な HER2発現レベルの乳癌細胞株を用いて、T-DM1の生物活性と特異性を評価する試験を実施した。

図 2.6.2.2.1.3-1 乳癌細胞株における HER2発現, フローサイトメトリーによる分析



[4.2.1.1-4 Figure 2再掲]

(2) 乳癌細胞株に対する増殖抑制活性, 生存率

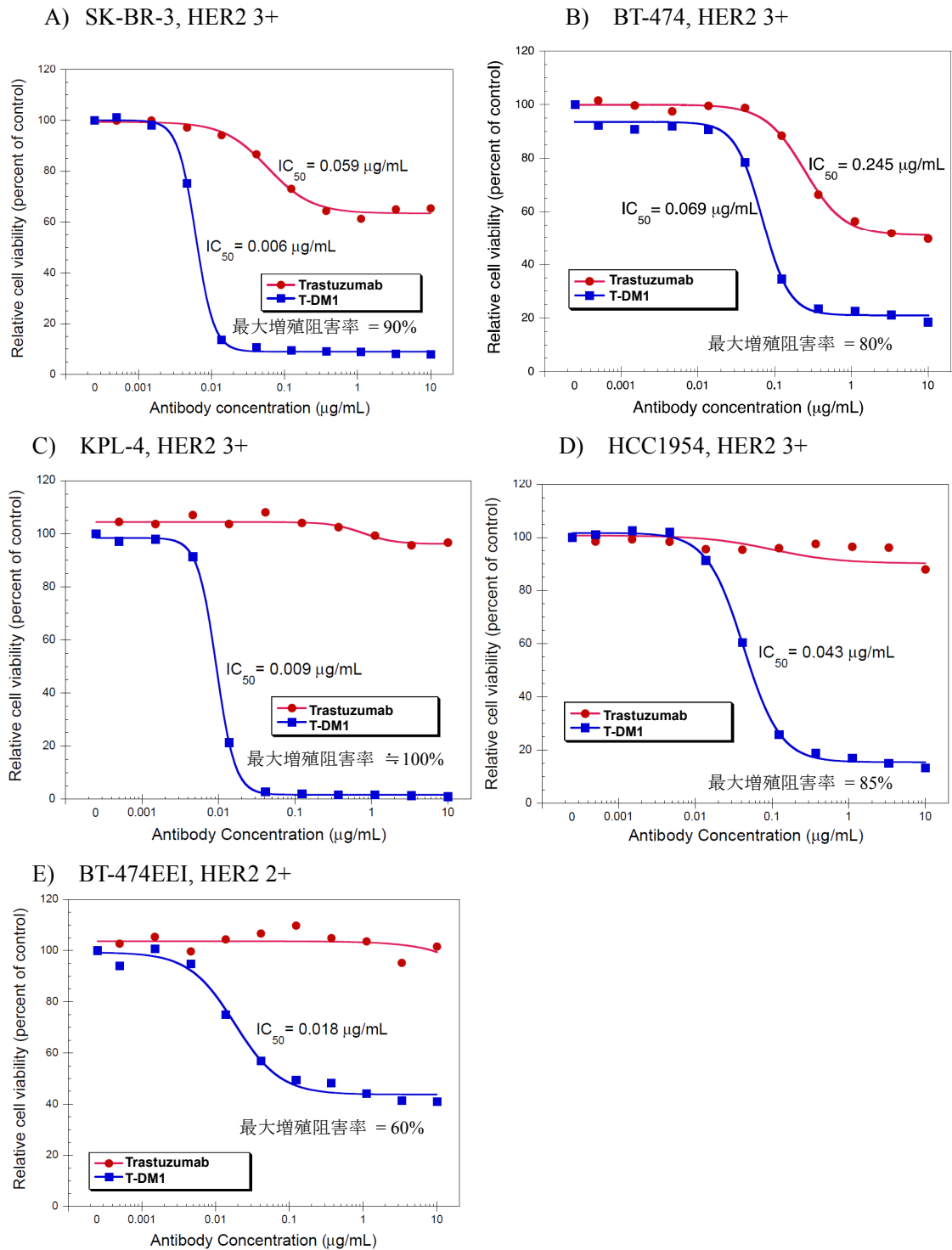
(資料番号4.2.1.1-4, 4.2.1.1-5)

トラスツズマブ感受性及び非感受性の乳癌細胞株を T-DM1 又はトラスツズマブ存在下で培養することにより, 腫瘍増殖に対する抑制効果を評価した。細胞生存率の測定には, CellTiter-Glo を用いた。

T-DM1 は, トラスツズマブ感受性株 SK-BR-3, BT-474 に対し, トラスツズマブよりも強い増殖抑制効果を示した (図 2.6.2.2.1.3-2 A, B)。また, T-DM1 が示した最大増殖阻害率 (カッコ内はトラスツズマブ) は, SK-BR-3 では 90% (40%), BT-474 では 80% (50%) であった。トラスツズマブは, KPL-4, HCC1954 及び BT-474EEI の各細胞に対し, 増殖抑制効果を示さなかったが, これら 3 細胞株は T-DM1 に対し明らかな感受性を示した (各々の IC_{50} 値は, 0.009, 0.043, 0.018 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (図 2.6.2.2.1.3-2 C~E)。また, 最大増殖阻害率は, KPL-4 ではほぼ 100%, HCC1954 では 85%, BT-474EEI では 60% であった。一方, トラスツズマブ及び T-DM1 は, HER2 低発現 (正常レベル) の細胞株 (MCF7, 図 2.6.2.2.1.3-3 A) 及び HER2 を発現していない細胞株 (MDA-MB-468, 図 2.6.2.2.1.3-3 B) の増殖を阻害しなかったことから, T-DM1 は, トラスツズマブ部分が示す特性により, HER2 陽性細胞株に対する選択性を示すことが確認された。

なお, 非臨床試験と臨床試験に用いた T-DM1 検体について, 細胞増殖抑制活性を比較したところ, 各ロットとも同様の活性を示すことが確認されている (4.2.1.1-5 Table 2)。

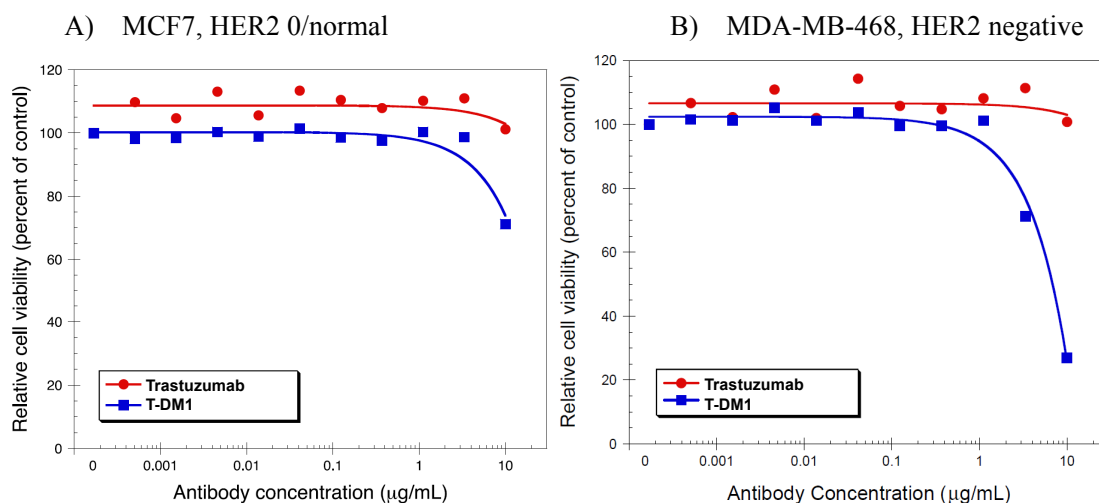
図 2.6.2.2.1.3-2 HER2発現量の異なる乳癌細胞株に対する T-DM1の腫瘍増殖抑制活性
トラスツズマブとの比較 (1)



IC_{50} : 50%阻害濃度

[4.2.1.1-4 Figure 3を改変]

図 2.6.2.2.1.3-3 HER2発現量の異なる乳癌細胞株に対する T-DM1の腫瘍増殖抑制活性
トラスツズマブとの比較 (2)



[4.2.1.1-4 Figure 3を改変]

(3) T-DM1の各構成成分及び同定された代謝物の細胞増殖に対する作用

(資料番号4.2.1.1-4)

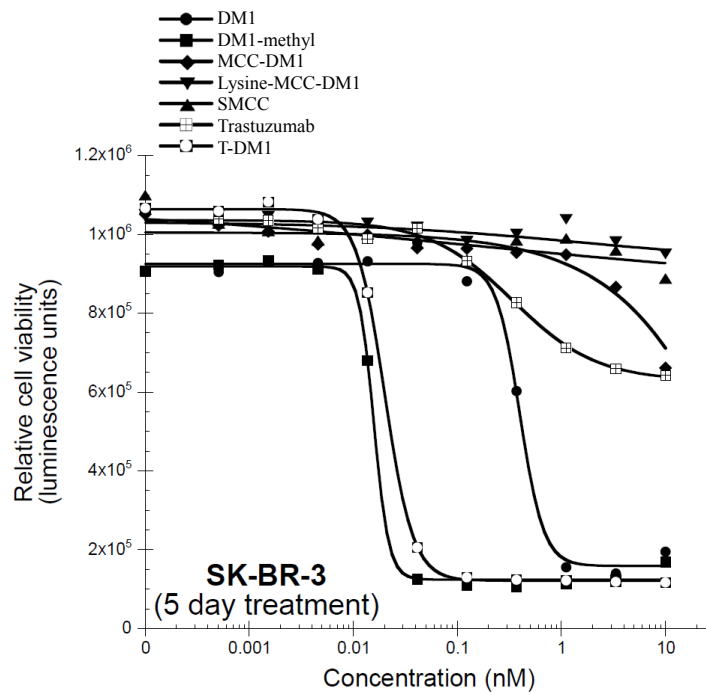
培養細胞、マウス腫瘍移植モデルあるいは非臨床薬物動態試験において同定されている T-DM1の主な代謝物として、Lys-MCC-DM1、MCC-DM1及び DM1がある⁸⁾。そこで、T-DM1、トラスツズマブ、DM1、DM1-methyl (DM1のチオール基を保護するためメチル基を付加)、リンカー試薬である SMCC 並びに代謝物 MCC-DM1及び Lys-MCC-DM1を対象として、SK-BR-3細胞と5日間培養することにより、細胞増殖に対する作用を検討した。

T-DM1、DM1-methyl 及び DM1は、SK-BR-3細胞の増殖を強く阻害した(図 2.6.2.2.1.3-4)。T-DM1及び DM1-methyl の IC₅₀値は、それぞれ0.02 nmol/L 及び0.016 nmol/L であった。一方、DM1の IC₅₀値は0.4 nmol/L であり、約20倍弱かった。DM1は、共有結合を形成させるため、sulfhydryl 基を有しているが、この官能基は、他の sulfhydryl 基を含む分子(例えばグルタチオン、アルブミンなど)と反応すると想定されるため、有効性が低下し、sulfhydryl 基を保護した DM1-methyl よりも弱い作用を示したものと思われる。

T-DM1の代謝物である Lys-MCC-DM1及び MCC-DM1についても、細胞増殖に対する作用を調べた。DM1及び DM1-methyl のいずれも、1 nmol/L (0.7 ng/mL) 及び0.1 nmol/L (0.08 ng/mL) で増殖抑制活性を示したが、Lys-MCC-DM1は、10 nmol/L (11 ng/mL) であっても SK-BR-3細胞の増殖を抑制しなかった。同様に MCC-DM1は、調べた最高濃度(10 nmol/L, 9.7 ng/mL)においても増殖抑制効果を示さなかった。Lys-MCC-DM1は、リシンがイオン化しており細胞内に入りにくいいため、細胞外から添加する試験系では効果を示さなかった可能性がある。以上の結果から、T-DM1の代謝物の中で DM1が最も細胞増殖抑制活性が強いことが示された。

臨床における T-DM1代謝物の血漿中濃度は、JO22997試験において測定されており、T-DM1のサイクル2以降における DM1及び MCC-DM1の最高血漿中濃度の平均値は、各々2.93~4.58 ng/mL、5.60~10.4 ng/mL のレンジ内であった。Lys-MCC-DM1については、ほとんど検出されおらず、患者1例の1測定ポイント(1.41 ng/mL)を除く、すべての被験者のすべての採血時点で定量下限値未満であった(2.7.2.2.6参照)。

図 2.6.2.2.1.3-4 T-DM1, T-DM1の構成成分及び代謝物による腫瘍細胞増殖に対する作用



[4.2.1.1-4 Figure 5を改変]

(4) 細胞周期に対する作用

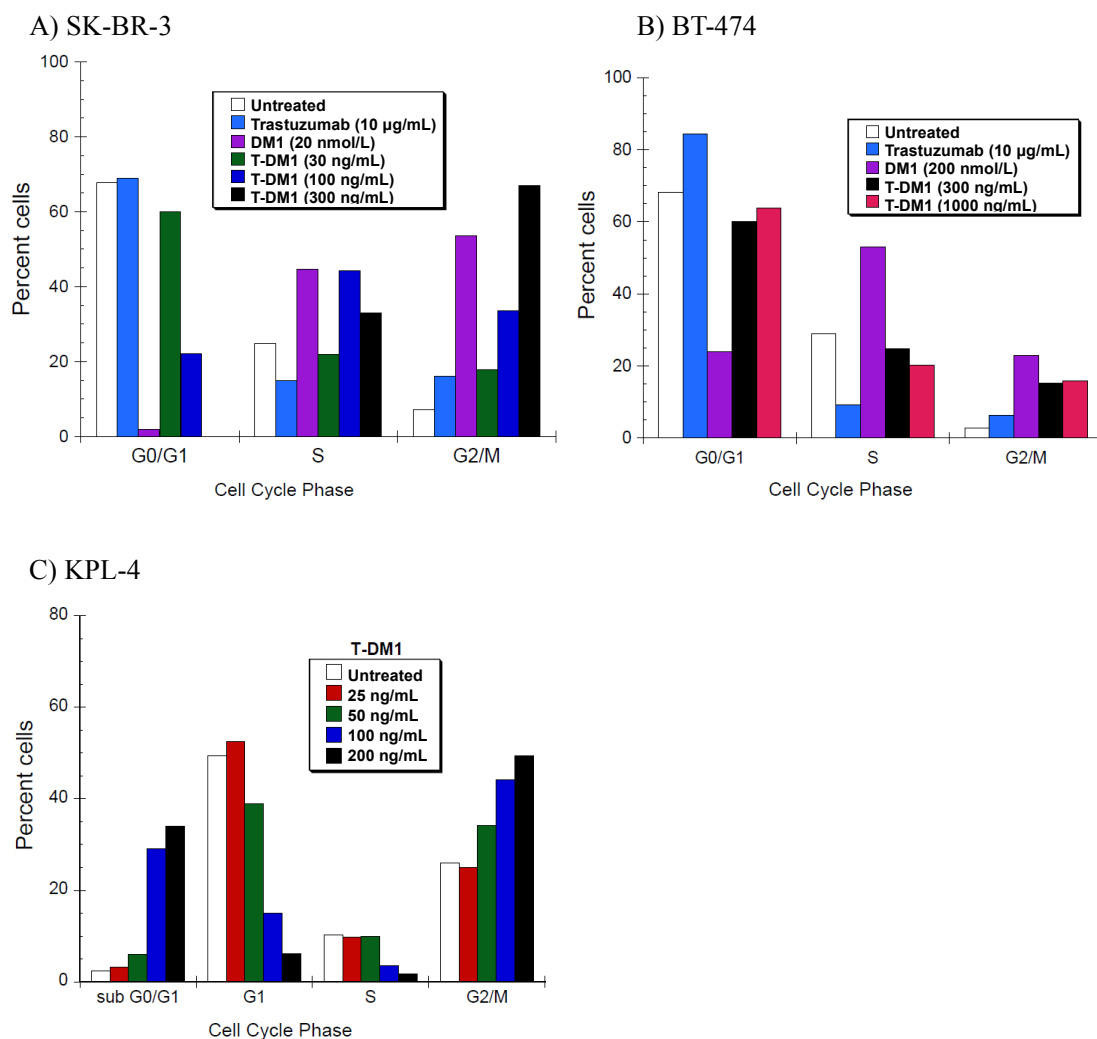
(資料番号4.2.1.1-4)

トラスツズマブ感受性のヒト乳癌細胞株 SK-BR-3及び BT-474を用いて、トラスツズマブ、DM1及び T-DM1の細胞周期の進行に対する作用を比較した。両細胞株を48時間薬剤と培養した後、トリプシン処理により細胞を剥離し、細胞周期を分析した。

トラスツズマブを用いて細胞を処理した場合、既に報告されている結果⁹⁾と同様、G1期で細胞周期は停止し、G0/G1期細胞が増え、S期細胞が減少した(図 2.6.2.2.1.3-5 A, B)。一方、T-DM1を用いて両細胞株を処理した場合、G2/M期細胞が増加し、SK-BR-3細胞では用量依存性が認められた。これは微小管の機能を阻害する薬剤の作用として想定される反応と一致する。DM1も同様にG2/M期細胞の比率を増加させた。更に、DM1処理では、いずれの細胞においてもS期細胞の増加、G0/G1期細胞の減少が認められた。同様の傾向は、T-DM1処理したSK-BR-3細胞においても認められた。

T-DM1による細胞周期への作用については、トラスツズマブが細胞増殖抑制活性を示さなかったHER2陽性ヒト乳癌細胞株 KPL-4を用いて、24時間培養後における細胞周期の解析及びアポトーシスの指標である sub-G0/G1領域を調べた。T-DM1は、G2/M期細胞及びアポトーシス細胞(sub-G0/G1領域)の両者を用量依存的に増加させた(図 2.6.2.2.1.3-5 C)。この結果から、トラスツズマブに感受性を示さないHER2陽性の乳癌細胞に対しても、T-DM1は細胞周期をG2/M期で停止させ、アポトーシスを誘導することが示された。

図 2.6.2.2.1.3-5 T-DM1の細胞周期に対する作用, DM1, トラスツズマブとの比較



[4.2.1.1-4 Figure 6を改変]

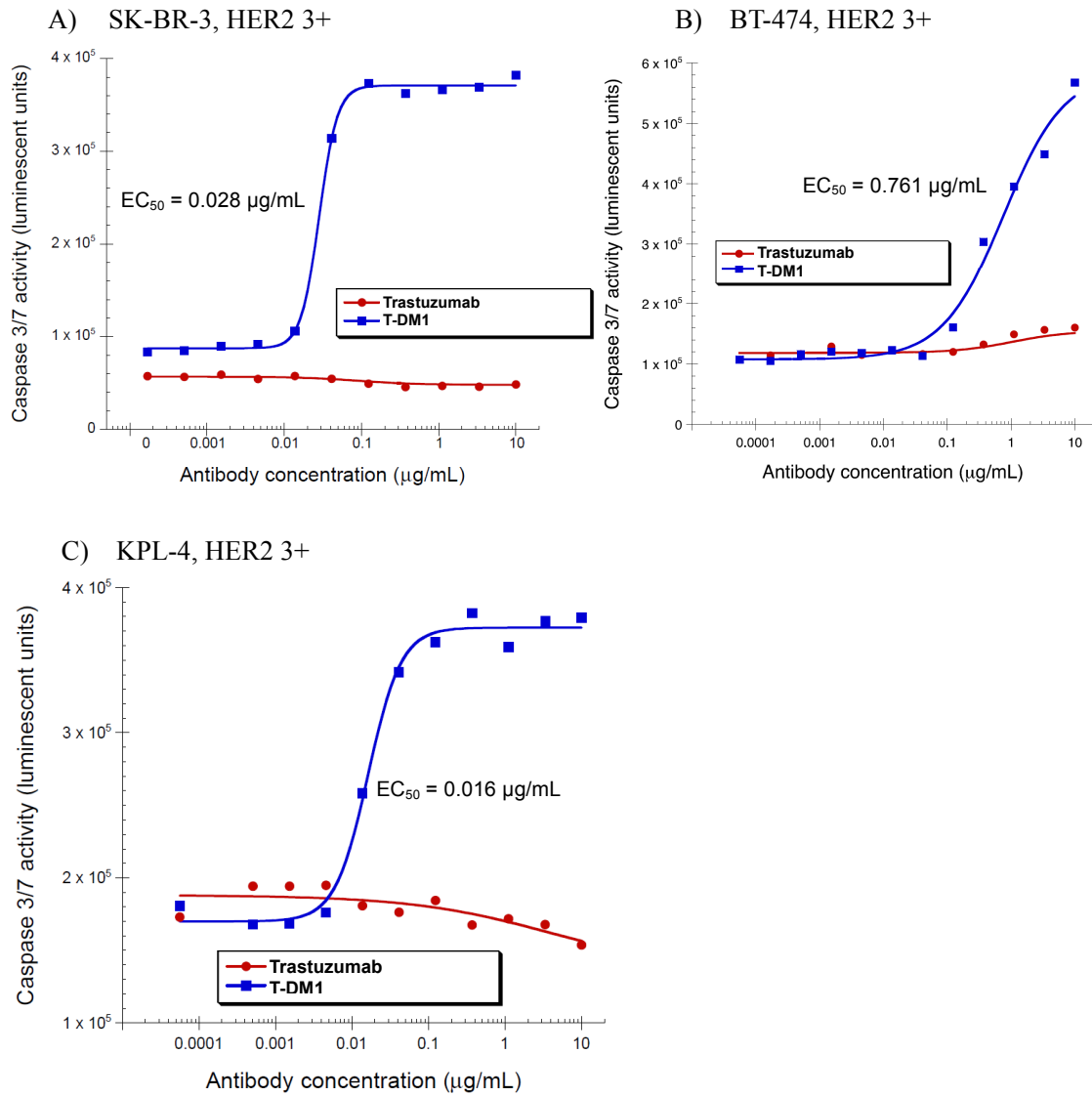
(5) アポトーシス誘導作用

(資料番号4.2.1.1-4)

T-DM1によるアポトーシス誘導能について検討した。SK-BR-3, BT-474及び KPL-4乳癌細胞株を T-DM1又はトラスツズマブ存在下で48時間培養し, カスパーゼ-3/7の活性化を指標としてアポトーシス誘導作用を評価した。

T-DM1は, 3つの細胞株のいずれに対してもカスパーゼ-3/7の活性を強く誘導した (図 2.6.2.2.1.3-6 A~C)。一方, トラスツズマブにはこのような効果は認められず, *in vitro*において腫瘍細胞の増殖を抑制するものの, 直接的な細胞死誘導作用は示さないというトラスツズマブの特性と一致していた。

図 2.6.2.2.1.3-6 T-DM1によるヒト乳癌細胞株に対するアポトーシス誘導
トラスツズマブとの比較



EC₅₀ : 50%有効濃度

[4.2.1.1-4 Figure 4を改変]

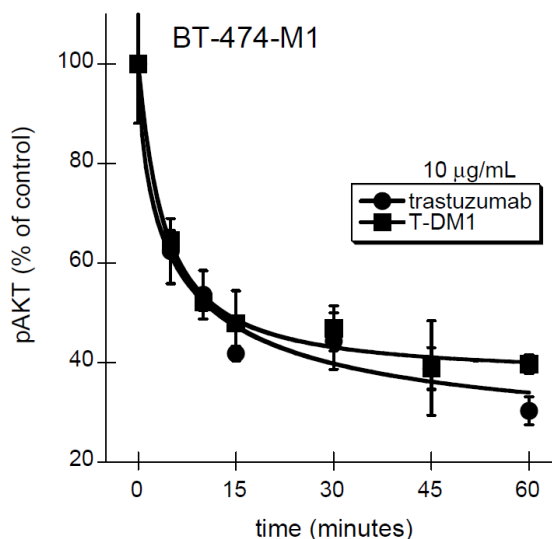
(6) 細胞周期、シグナル伝達及びアポトーシスの各マーカー発現に対する作用

(資料番号4.2.1.1-4)

トラスツズマブが細胞増殖抑制効果を示すにあたり、トラスツズマブによる HER3リン酸化阻害及び PI3K/AKT シグナル伝達経路の抑制作用が、重要な役割を果たしている^{6,7)}。そこで、本経路のシグナル伝達分子である AKT のリン酸化に対する T-DM1の作用を検討した。BT-474-M1細胞 (BT-474に由来する細胞株) を T-DM1又はトラスツズマブ処理し、AKT1分子中の Ser473リン酸化に対する影響を ELISA を用いて検出した。

トラスツズマブ及び T-DM1 (10 µg/mL) のいずれにおいても、処理開始後5~10分以内に AKT リン酸化の抑制が検出され、60分間維持された (図 2.6.2.2.1.3-7)。また、T-DM1及びトラスツズマブ (1 µg/mL) 処理を最長16時間継続した場合、トラスツズマブ及び T-DM1いずれも、リン酸化 AKT (pAKT) は60%減少した。T-DM1は、トラスツズマブと同様、乳癌細胞での AKT リン酸化を速やかに阻害し、トラスツズマブにリンカーを介して DM1を共有結合させた影響は認められなかった。

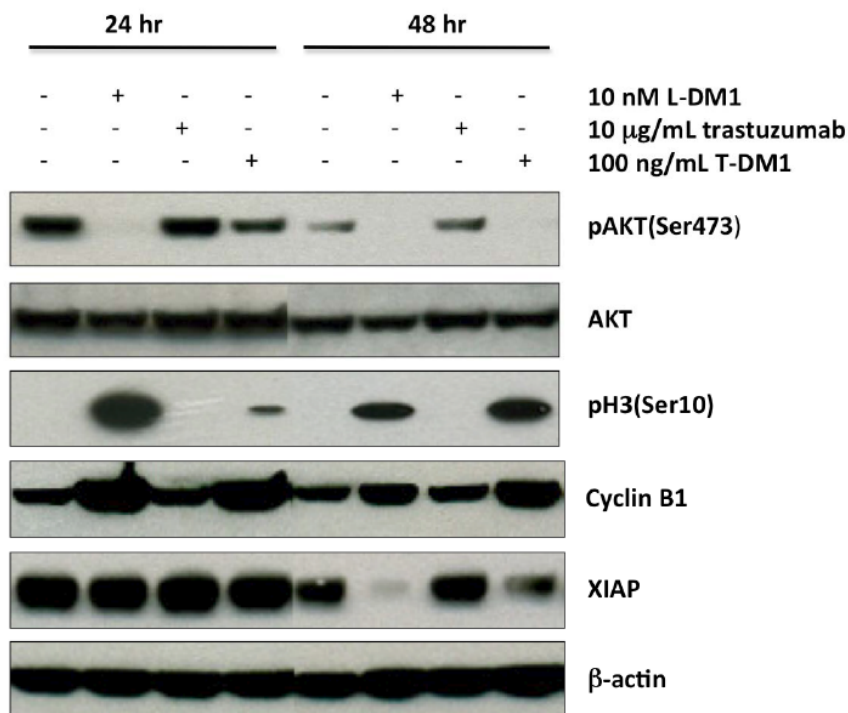
図 2.6.2.2.1.3-7 T-DM1及びトラスツズマブによる AKT リン酸化の抑制活性



[4.2.1.1-4 Figure 7再掲]

更に、トラスツズマブが細胞増殖抑制活性を示さない細胞株 KPL-4を用いて、AKT リン酸化のウエスタン分析を実施した。本試験において、トラスツズマブは PI3K シグナル (pAKTとして検出) を阻害しなかった。一方、KPL-4細胞を T-DM1 (100 ng/mL) 存在下で24時間培養することにより、AKT のリン酸化は部分的に阻害され、48時間処理では、ほぼ完全に抑制された (図 2.6.2.2.1.3-8)。DM1についても同様に調べたところ、DM1 (10 nmol/L, 図中では L-DM1と表記) により、24時間及び48時間いずれにおいても AKT のリン酸化を完全に抑制した。T-DM1の場合、AKT リン酸化に対する抑制効果が遅発性を示すのは、T-DM1から活性成分が放出されるために、細胞内でのプロセッシングが必要であることを反映しているためと考えられる。

図 2.6.2.2.1.3-8 T-DM1, トラスツズマブ, DM1による AKT リン酸化並びに細胞周期とアポトーシス関連マーカーの発現, KPL-4細胞



L-DM1 : DM1

[4.2.1.1-4 Figure 8再掲]

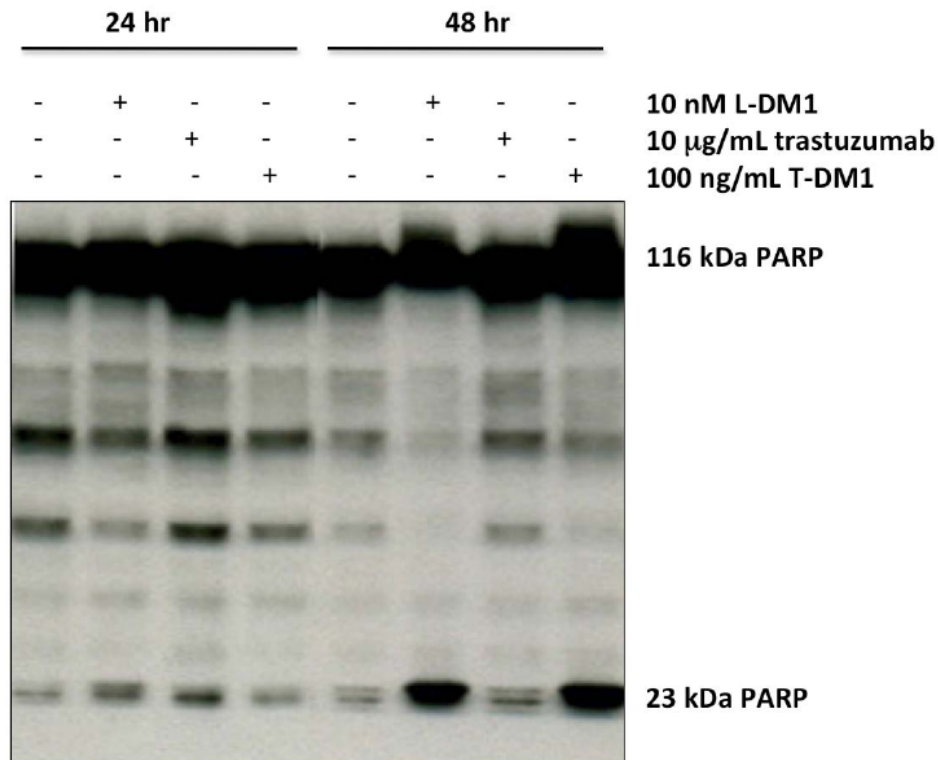
細胞周期の各期に特異的なマーカーの発現についても、ウエスタン分析により検討した。サイクリン B1及びリン酸化ヒストン H3 (pH3) は、G2/M 期特異的なマーカーである。サイクリン B1の発現量は、G2/M 期の進行中に増加し、有糸分裂時に最も高値を示す。その後、細胞が有糸分裂を完了すると、サイクリン B1はユビキチン/プロテアソーム複合体により速やかに分解される。同様に、ヒストン H3は有糸分裂の間はリン酸化され、有糸分裂の完了とともに脱リン酸化される。

サイクリン B1及び pH3の発現に対する作用を検討するため、KPL-4細胞をトラスツズマブ, DM1 (図中では L-DM1と表記) 又は T-DM1で24時間あるいは48時間処理し、ウエスタン分析を行った (図 2.6.2.2.1.3-8)。DM1又は T-DM1処理した細胞では、サイクリン B1の発現レベルは24時間目で顕著に増加し、T-DM1処理では48時間目においても増加傾向を維持した。しかし、トラスツズマブ処理では、このような変化は認められなかった。細胞におけるヒストン H3リン酸化について、DM1処理と T-DM1処理を比較したところ、カイネティクスが異なっていた。すなわち、DM1により24時間処理した場合、pH3の発現は増加したが、T-DM1処理ではわずかな上昇にとどまった。DM1で48時間処理した細胞では、pH3の発現は24時間の時点と比較して低下したが、T-DM1処理細胞の場合は、pH3の発現が24時間の時点と比べて増加していた。すなわち、DM1処理では pH3発現レベルが速やかに上昇し低下したが、T-DM1処理では、より長い期間 pH3の発現増加が認められた。このようなカイネティクスの違いは、T-DM1が生物活性を発揮するためには、プロセッシング/代謝が重要であることを示唆すると考えられる。

アポトーシスのマーカーとなる蛋白質の発現についても、同様に KPL-4細胞を用いて調べた。カスパーゼ-3, -7及び-9に結合し、その機能を阻害する X 連鎖アポトーシス抑制蛋白質 (XIAP)

について調べたところ、その発現は、T-DM1あるいは DM1を48時間処理することで低下したが、トラスツズマブはこのような作用を示さなかった（図 2.6.2.2.1.3-8）。また、アポトーシス反応に特徴的なマーカーであるポリ（ADP リボース）ポリメラーゼ（PARP）の切断について、KPL-4細胞を用いて検討したところ、DM1あるいは T-DM1処理することにより、全長116 kDa の PARP が切断されて23 kDa の PARP 切断断片が出現した（図 2.6.2.2.1.3-9）。このように、T-DM1処理により、カスパーゼ-3、-7の活性化に加えて、XIAP 発現の抑制と PARP 切断が惹起されたことから、T-DM1のアポトーシス誘導活性が裏付けられた。

図 2.6.2.2.1.3-9 PARP 切断反応を指標とした T-DM1による KPL-4細胞アポトーシス誘導活性



L-DM1 : DM1

[4.2.1.1-4 Figure 9再掲]

(7) HER2 ECD シェディングに対する T-DM1とトラスツズマブの作用

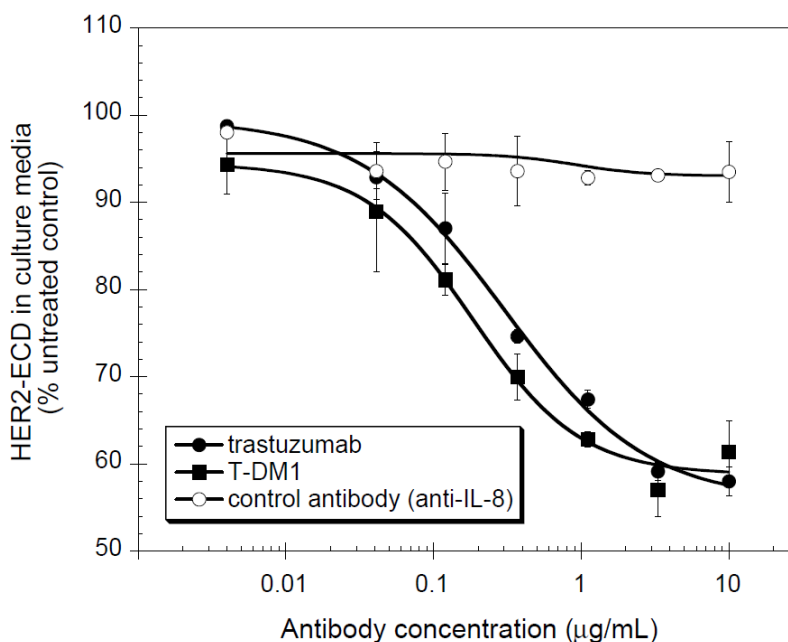
(資料番号4.2.1.1-4)

トラスツズマブの生物活性あるいは想定される作用機序として、HER2 ECD 切断反応（シェディング）に対する抑制作用が報告されている⁵⁾。全長185 kDa の HER2はシェディングを媒介する酵素により、膜貫通領域の近くで切断されると考えられており、その結果、可溶性のシェディング断片である HER2 ECD と膜結合細胞内断片（p95）になる。HER2 ECD が切断される部位は、トラスツズマブが結合するエピトープの近傍にあるため、トラスツズマブが結合することにより、HER2 ECD の遊離を阻害することが想定される。

T-DM1による HER2シェディング阻害活性について、BT-474-M1を T-DM1、トラスツズマブあるいはコントロール抗体で24時間処理した培養上清中に含まれる可溶性 HER2 ECD 量を測定することで調べた。T-DM1と24時間培養した条件では細胞数の減少は認められなかったことから、培養上清中の HER2 ECD 量の変化は、培養中の細胞数減少によるものではない。

HER2シェディングに対する最大抑制活性は、トラスツズマブでは42%、T-DM1では43%であった（図 2.6.2.2.1.3-10）。HER2 ECD シェディングに対する50%抑制濃度（IC₅₀）は、トラスツズマブでは0.30 ± 0.05 µg/mL、T-DM1では0.18 ± 0.04 µg/mL であった。このように、T-DM1はHER2 ECD シェディングに対し、トラスツズマブと同程度の阻害活性を示した。

図 2.6.2.2.1.3-10 T-DM1及びトラスツズマブによる HER2 ECD 切断反応（シェディング）の抑制



[4.2.1.1-4 Figure 10を改変]

2.6.2.2.2 *In vivo* 抗腫瘍効果

HER2陽性乳癌細胞株を移植して作製した複数のマウスモデルに T-DM1を投与し、以下の抗腫瘍試験を実施した。

- T-DM1, トラスツズマブ, DM1及びトラスツズマブ+DM1による抗腫瘍効果の比較
- コントロール抗体を用いて作製した抗体薬物複合体と T-DM1の抗腫瘍効果の比較
- HER2発現腫瘍細胞に対する特異性
- T-DM1の用量, 投与スケジュールと抗腫瘍効果 (MMTV-HER2 Fo5及び BT-474EEI 細胞)
- T-DM1の用量と抗腫瘍効果 (KPL-4細胞)

2.6.2.2.2.1 T-DM1による抗腫瘍効果と HER2特異性

(1) T-DM1, トラスツズマブ, DM1, トラスツズマブ+DM1の抗腫瘍効果比較

(資料番号4.2.1.1-6)

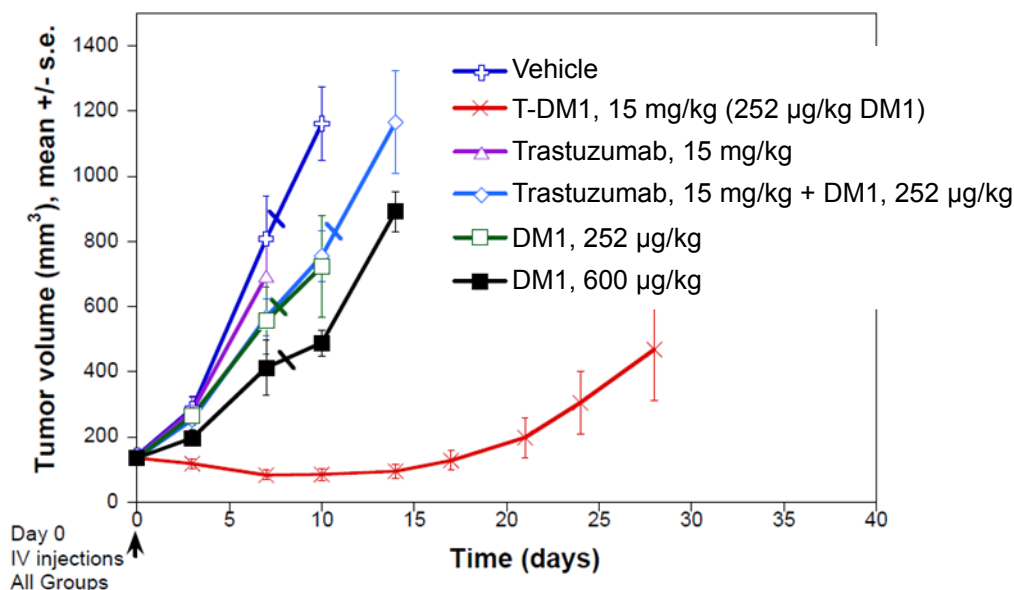
T-DM1の抗腫瘍効果について、MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍細胞移植モデルを用いて調べた。本細胞株は、MMTV プロモーターを用いて FVB マウスに HER2遺伝子を導入して樹立した乳腺腫瘍であり¹⁰⁾、ヒト HER2を高発現 (3+) しているが、トラスツズマブには反応性を示さない。本細胞移植モデルでは、HER2 ECD の血中レベルが高く、活性型 p95HER2の発現亢進が認められている (4.2.1.1-14 p.4)。

MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍組織片 (約2 mm 角) を雌ヌードマウスの乳腺脂肪組織内に同所性移植し、T-DM1 (15 mg/kg, DM1として252 µg/kg), トラスツズマブ (15 mg/kg), DM1 (252 µg/kg 及び600 µg/kg) の各投与群, トラスツズマブと DM1 (252 µg/kg) の併用投与群, 及び溶媒投与群に無作為化割付した (1群8匹)。DM1単独投与群の用量は、T-DM1 (15 mg/kg) 中の含量に合わせた用量 (252 µg/kg) 及び最大耐量に近い高用量 (600 µg/kg) の2用量を設定した。なお、投与した DM1溶液が、設定よりも低濃度であったことが判明しており、実際の投与量は設定値よりも約25%少ない。群分け日に各検体を単回静脈内投与し、腫瘍増殖抑制活性を比較した。

各投与群の腫瘍増殖に対する効果を、図 2.6.2.2.2.1-1及び表 2.6.2.2.2.1-1に示す。各投与群の腫瘍増殖抑制効果を、腫瘍体積の倍加時間に基づいて比較したところ、T-DM1 (15 mg/kg) 投与群の倍加時間は27.6日であり、対照群 (2.8日) と比べ統計学的に有意な腫瘍増殖抑制効果を示した ($P < 0.05$, log-rank 分析)。また、高用量の DM1投与群における倍加時間は、4.8日であり、対照群に比べ有意な抗腫瘍活性を示したが、T-DM1投与群が示した活性よりも劣っていた ($P < 0.05$, log-rank 分析)。低用量の DM1投与群及びトラスツズマブ (15 mg/kg) 投与群は、本腫瘍の増殖に有意な影響を及ぼさなかった。また、低用量の DM1とトラスツズマブ (15 mg/kg) を併用した群の倍加時間は3.2日であり、低用量の DM1投与群 (3.1日) とほぼ同等であったことから、併用による効果の増強は認められなかった。

本試験の結果から、T-DM1はトラスツズマブ部分により HER2に結合し、細胞障害性の薬物である DM1部分が標的細胞に輸送されることで抗腫瘍活性を発揮することが示唆された。

図 2.6.2.2.1-1 MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果 標的分子到達性の付与



矢印は、各薬物の投与日を示す。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 8)

DM1溶液が設定よりも低濃度であったため、実際の投与量は図中の表示よりも約25%少ない。

斜線は、腫瘍体積が1000 mm³を越えたため安楽死させたことを示す。

[4.2.1.1-6 Figure 1を改変]

表 2.6.2.2.1-1 MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果 標的分子到達性の付与

投与群	検体	抗体用量 (mg/kg)	DM1 (µg/kg)	PR	CR	倍加時間 (day)	Log-rank 分析*
第1群	溶媒	-	-	0	0	2.8	α
第2群	T-DM1	15	252	4	0	27.6	β
第3群	トラスツズマブ	15	-	0	0	2.9	α
第4群	トラスツズマブ + DM1	15	252	0	0	3.2	α
第5群	DM1	-	252	0	0	3.1	α
第6群	DM1	-	600	0	0	4.8	χ

第4~6群の DM1溶液が設定よりも低濃度であったため、実際の投与量は表示よりも約25%少ない。

PR : day 0 (無作為化割付日) での腫瘍体積と比較した縮小率が50%を越え100%未満になった個体

CR : 試験期間中に腫瘍体積の縮小率が100%になった個体

倍加時間 (Doubling Time) : 腫瘍体積が day 0の2倍になるまでにかかった日数

* : 異なるシンボルで示されたグループ間では統計学的に有意な差が認められた

(P < 0.05, log-rank 分析)。

[4.2.1.1-6 Table 2を改変]

(2) コントロール抗体を用いた抗体薬物複合体の抗腫瘍効果

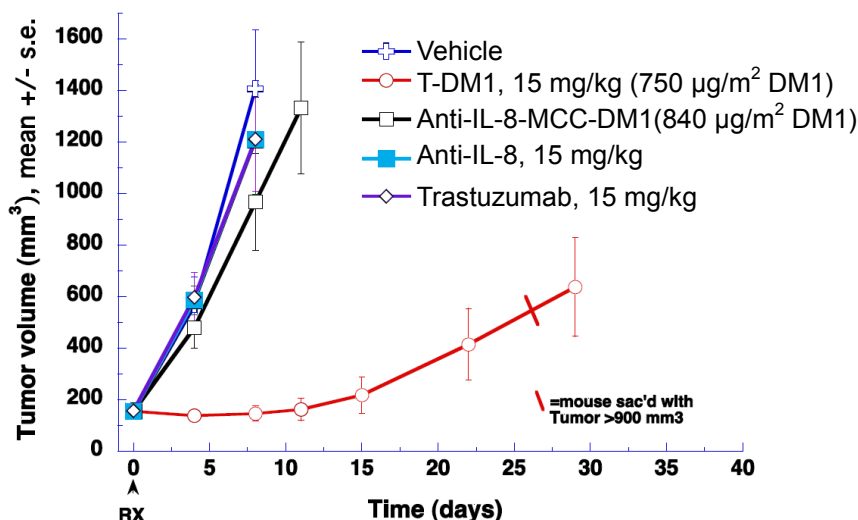
(資料番号4.2.1.1-7)

T-DM1の特異性について検討するため、コントロール抗体（抗 IL-8抗体）に DM1を結合させた抗 IL-8-MCC-DM1を対照物質として作製した。MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍組織片（約2 mm角）を雌ヌードマウスの乳腺脂肪組織内に同所性移植した後、T-DM1（15 mg/kg）、抗 IL-8-MCC-DM1（15 mg/kg）、抗 IL-8抗体（15 mg/kg）、トラスツズマブ（15 mg/kg）及び溶媒の各投与群に無作為化割付した（1群8匹）。群分け日に各検体を単回静脈内投与し、腫瘍増殖抑制効果を比較した。

上記の抗体及び抗体薬物複合体を投与した4群の中で、T-DM1投与群のみが腫瘍体積の倍加時間を著しく延長し（対照群1.8日に対し T-DM1投与群23.0日）、腫瘍増殖抑制活性を示した。一方、トラスツズマブ、抗 IL-8抗体及び抗 IL-8-MCC-DM1投与群では、本モデルにおいて腫瘍増殖抑制活性を示さなかった（図 2.6.2.2.1-2、表 2.6.2.2.1-2）。

本試験の結果から、抗体薬物複合体が抗腫瘍効果を示すためには、HER2陽性腫瘍に対する抗原特異的な結合が必要条件になることが示唆された。

図 2.6.2.2.1-2 MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果
標的分子特異性の付与



矢印は、各薬物の投与日を示す。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 8)
斜線は、腫瘍体積が900 mm³を越えたため安楽死させたことを示す。

[4.2.1.1-7 Figure A1を改変]

表 2.6.2.2.1-2 MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果
標的分子特異性の付与

投与群	検体	抗体用量 (mg/kg)	DM1 (µg/m ²)	倍加時間 (day)
A 群	溶媒	-	-	1.8
B 群	T-DM1	15	750	23.0
C 群	抗 IL-8-MCC-DM1	15	840	2.3
D 群	抗 IL-8抗体	15	0	1.5
E 群	トラスツズマブ	15	0	1.8

倍加時間 (Doubling Time) : 腫瘍体積が day 0 (無作為化割付日) の2倍になるまでにかかった日数

[4.2.1.1-7 Figure A1を改変]

(3) HER2発現腫瘍細胞に特異的な抗腫瘍効果

(資料番号4.2.1.1-8)

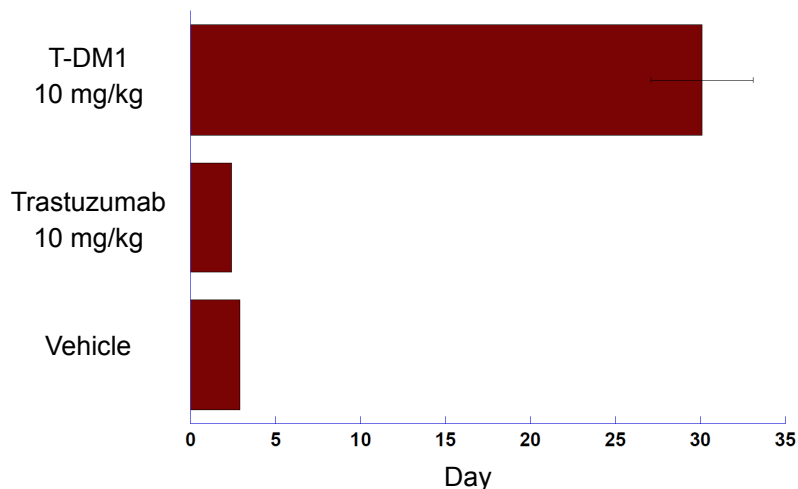
T-DM1が、HER2発現腫瘍に対し特異的に抗腫瘍効果を示すことを明らかにするため、MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍（HER2陽性）及び MMTV-Wnt 乳腺腫瘍（HER2陰性）を用いて比較した。MMTV-Wnt は、Wnt 遺伝子を導入したマウスに由来する乳腺腫瘍である。

MMTV-HER2 Fo5あるいは MMTV-Wnt の乳腺腫瘍組織片（いずれも約2 mm 角）を雌バーヂュヌードマウスの乳腺脂肪組織内に同所性移植し、トラスツズマブ（10 mg/kg）、T-DM1（10 mg/kg）あるいは溶媒の各投与群に無作為化割付した（1群7匹）。群分け日に各検体を単回静脈内投与し、腫瘍増殖抑制効果を比較した。

両乳腺腫瘍モデルにおけるトラスツズマブ、T-DM1の作用を腫瘍体積の倍加時間により比較した結果を図 2.6.2.2.2.1-3及び図 2.6.2.2.2.1-4に示す。MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍モデルにおいて、T-DM1投与群では対照群に比べ腫瘍体積の倍加時間が延長し、対照群よりも27日長くなった（図 2.6.2.2.2.1-3）。一方、MMTV-Wnt 乳腺腫瘍移植モデルでは、対照群、トラスツズマブ投与群と比べ、T-DM1投与群における倍加時間に有意な差は認められず、腫瘍増殖抑制効果を示さなかった（図 2.6.2.2.2.1-4）。

T-DM1投与群が、HER2陽性の MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍に対し選択的に腫瘍増殖抑制効果を示したことから、T-DM1は、HER2陽性腫瘍に対し特異的に作用を発現することが示された。

図 2.6.2.2.1-3 MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果
HER2発現腫瘍特異的な作用発現 (1) 腫瘍体積の倍加時間

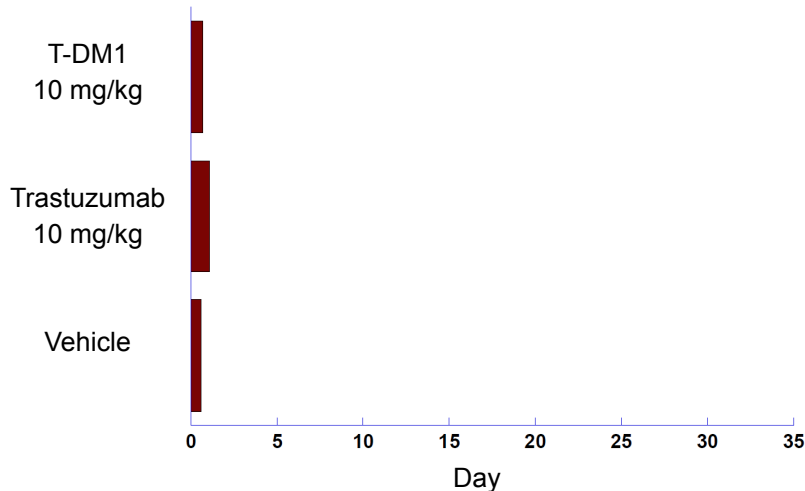


無作為化割付日を day 0とした。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 7)

倍加時間 (Doubling Time) : 腫瘍体積が day 0の2倍になるまでにかかった日数

[4.2.1.1-8 Figure 1を改変]

図 2.6.2.2.1-4 MMTV-Wnt 乳腺腫瘍移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果
HER2発現腫瘍特異的な作用発現 (2) 腫瘍体積の倍加時間



無作為化割付日を day 0とした。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 7)

倍加時間 (Doubling Time) : 腫瘍体積が day 0の2倍になるまでにかかった日数

[4.2.1.1-8 Figure 2を改変]

2.6.2.2.2.2 MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍移植モデルにおける抗腫瘍効果、用量及び投与スケジュール

(資料番号4.2.1.1-9, 4.2.1.1-10)

T-DM1の用量、投与スケジュールと抗腫瘍効果との関係について、MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍細胞移植モデルを用いて検討した。最初に、3週間に1回投与における投与量との関係を調べた。

MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍組織片(約2 mm 角)を雌ヌードマウスの乳腺脂肪組織に同所性移植し、各投与群に無作為化割付後(1群8匹)、群分け日からT-DM1を3週間に1回、1, 3, 10, 15又は30 mg/kgの用量で計3回静脈内投与した。対照群には、溶媒をT-DM1と同様に投与した。腫瘍体積は、最終投与日(Day 42)以降も経時的に測定した。

各T-DM1投与群の腫瘍増殖に対する効果を、腫瘍体積の推移及び倍加時間で示した(図2.6.2.2.2.2-1)。T-DM1の腫瘍増殖抑制活性は、10 mg/kg投与群で認められ、15 mg/kg投与群ではほぼ指摘用量に達した。また、15 mg/kg投与群と30 mg/kg投与群の腫瘍増殖遅延効果は同程度であった。両投与群において、試験期間中に腫瘍の完全な退縮が認められた個体は、15 mg/kg投与群では8匹中3匹、30 mg/kg投与群では8匹中6匹であった。このような腫瘍の退縮は、30 mg/kg投与群の1例を除いて一過性であり、15 mg/kg投与群ではDay 65~Day 129の間に、30 mg/kg投与群ではDay 73~Day 108の間に腫瘍の再増殖が認められた。

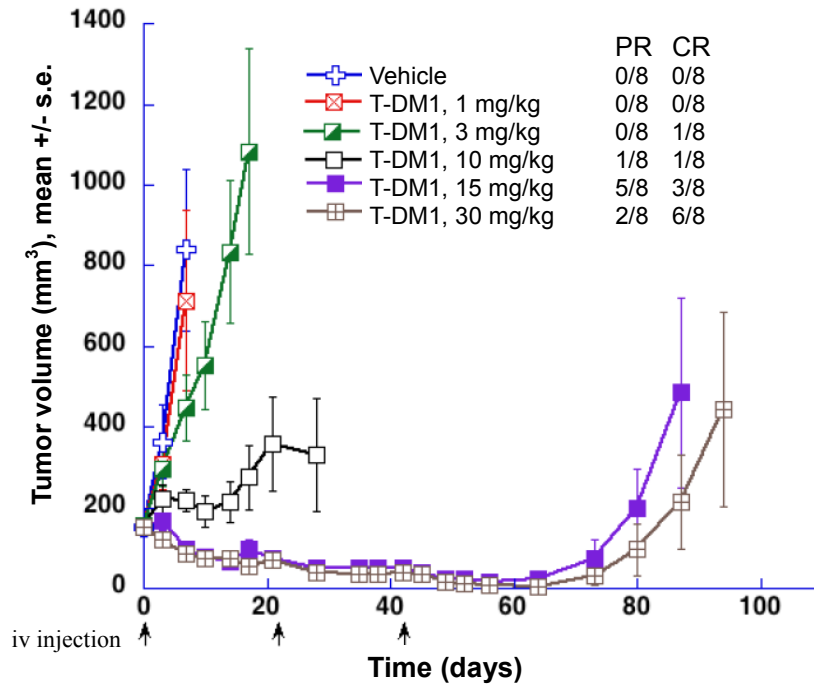
次に、T-DM1の週1回投与と3週間に1回投与を比較する試験を実施した。MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍組織片(約2 mm 角)を雌ヌードマウスの乳腺脂肪組織に同所性移植し、各投与群に無作為化割付後(1群8匹)、T-DM1を週1回、3.3, 5又は10 mg/kgの用量で計9回静脈内投与した。また、T-DM1を3週間に1回、15 mg/kgを計3回投与し、陽性対照群とした。本投与群は、T-DM1の累積投与量が45 mg/kgであり、週1回5 mg/kgを計9回投与する群に相当する用量である。対照群には、溶媒をT-DM1と同様に投与した。

各T-DM1投与群の腫瘍増殖に対する効果を、腫瘍体積の推移及び倍加時間で示した(図2.6.2.2.2.2-2)。3週間に1回15 mg/kg計3回投与群において、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。本投与群では、腫瘍体積の倍加時間は89日であり、溶媒を投与した対照群の約19倍に延び、8匹中5匹で腫瘍が完全に退縮した。同様の腫瘍増殖抑制効果が、週1回5 mg/kg計9回投与群においても認められ、腫瘍体積の倍加時間は78日、対照群の約16倍であった。最も持続的な抗腫瘍効果が認められたのは、週1回10 mg/kg計9回投与群であり、腫瘍体積の倍加時間は141日、対照群の約30倍であり、8匹中5匹で腫瘍が完全に退縮した。一方、週1回3.3 mg/kg投与群の腫瘍増殖抑制活性は低く、腫瘍体積の倍加時間は23日で対照群の約4倍、腫瘍が完全に退縮した個体も認められなかった。

T-DM1の総投与量が一致している2投与群、週1回5 mg/kg計9回投与群と3週間に1回15 mg/kg計3回投与群において、腫瘍体積の倍加時間には統計学的な有意差は認められず、同程度の腫瘍増殖抑制効果を示した。

図 2.6.2.2.2-1 MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果
3週間に1回投与スケジュールでの用量による比較

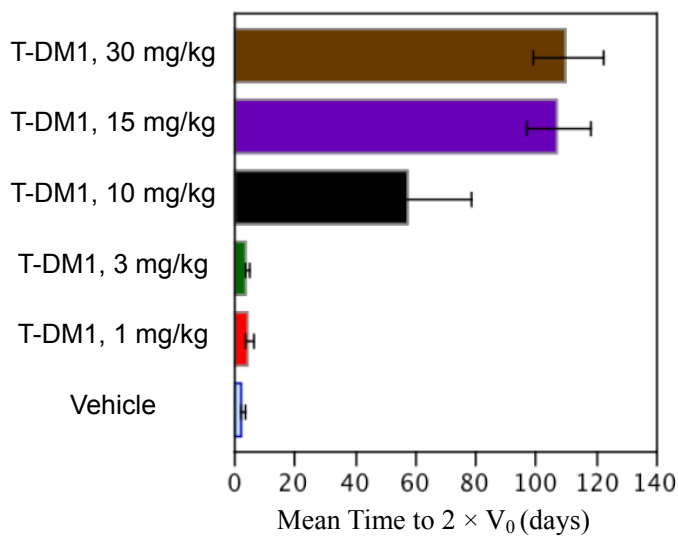
A) 腫瘍体積の推移



矢印は、T-DM1の投与日を示す。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 8)
 各投与群の結果は、腫瘍体積が1000 mm³を越えたため安楽死させた個体が出た時点までを表示した。
 PR : day 0での腫瘍体積と比較した縮小率が50%を越え100%未満になった個体
 CR : 試験期間中に腫瘍体積の縮小率が100%になった個体

[4.2.1.1-9 Figure 1を改変]

B) 腫瘍体積の倍加時間

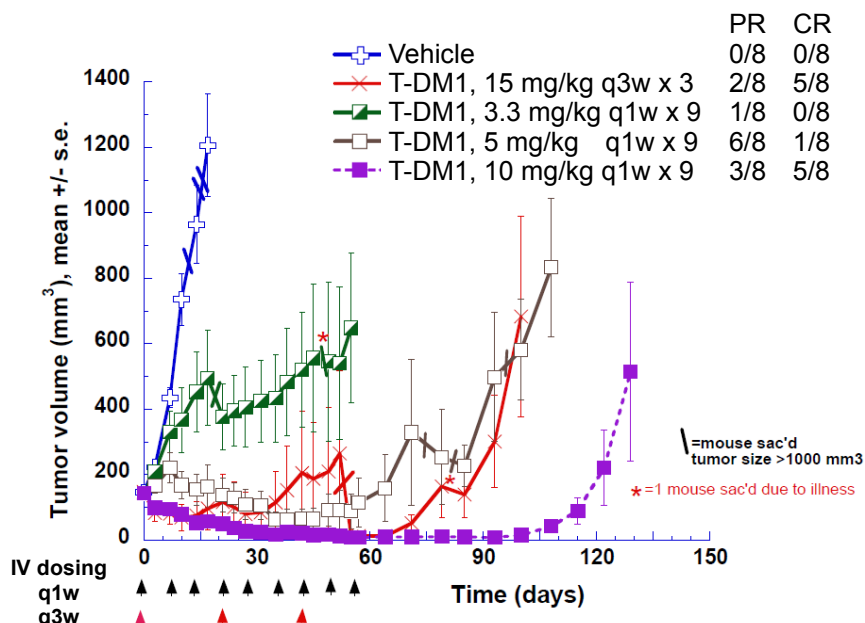


無作為化割付日を day 0とした。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 8)
 倍加時間 (Doubling Time) : 腫瘍体積が day 0の2倍になるまでにかかった日数

[4.2.1.1-9 Figure 2を改変]

図 2.6.2.2.2-2 MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果
3週間に1回投与と1週間に1回投与の比較

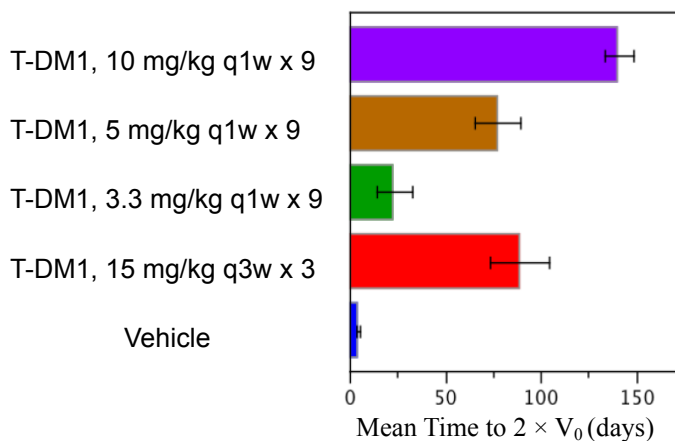
A) 腫瘍体積の推移



矢印は、T-DM1の投与日を示す。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 8)
 斜線は、腫瘍体積が1000 mm³を越えたため安楽死させたことを示す。
 PR : day 0での腫瘍体積と比較した縮小率が50%を越え100%未満になった個体
 CR : 試験期間中に腫瘍体積の縮小率が100%になった個体

[4.2.1.1-10 Figure 1を改変]

B) 腫瘍体積の倍加時間



無作為化割付日を day 0とした。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 8)
 倍加時間 (Doubling Time) : 腫瘍体積が day 0の2倍になるまでにかかった日数

[4.2.1.1-10 Figure 2を改変]

2.6.2.2.2.3 BT-474EEI 乳癌細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果, 用量及び投与スケジュール

(資料番号4.2.1.1-11, 4.2.1.1-12)

BT-474EEI 乳癌細胞株を用いた腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果を検討した。BT-474EEI 細胞は、HER2陽性のヒト乳癌細胞株 BT-474に由来し、エストロゲン非依存性、トラスツズマブ非感受性となった細胞株である。

最初に、投与スケジュールを3週間に1回とした時の T-DM1用量と腫瘍増殖抑制効果との関係について検討した。BT-474EEI 細胞を雌ベージュヌードマウスの乳腺脂肪組織中に1匹あたり 2×10^7 個同所性移植し (Matrigel 使用), 11日後に無作為化割付後 (1群10匹), 群分け日から T-DM1を3週間に1回, 0.3, 1, 3, 10及び15 mg/kg で計3回静脈内投与した。トラスツズマブ15 mg/kg 及び溶媒 (対照群) も同じスケジュールにて投与した。

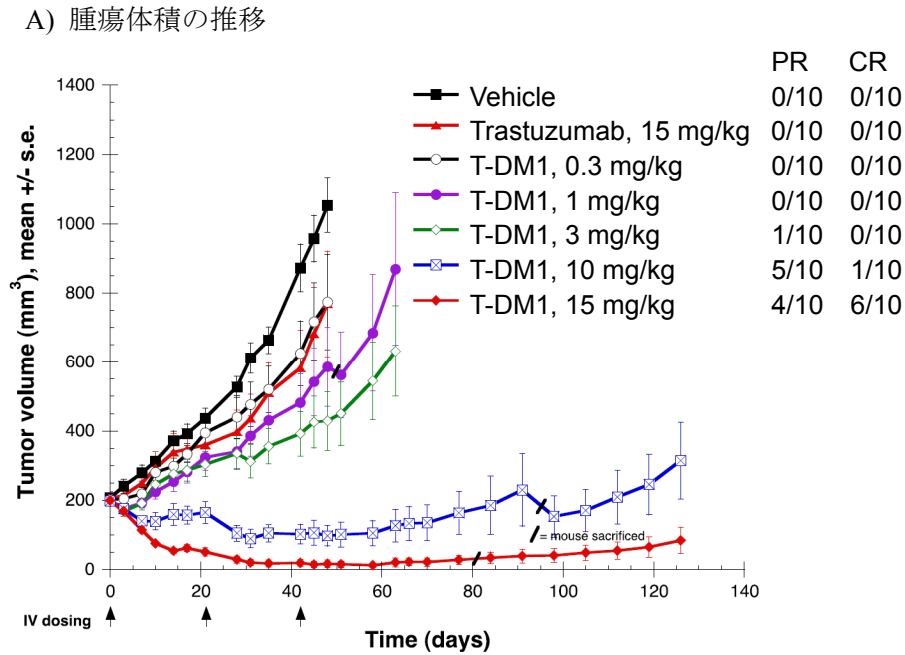
各投与群の腫瘍増殖に対する効果を、腫瘍体積の推移, 倍加時間及び腫瘍の完全退縮が認められた比率で示した (図 2.6.2.2.2.3-1, 図 2.6.2.2.2.3-2)。T-DM1 1及び3 mg/kg 投与群では、腫瘍増殖を抑制する傾向を示したものの、トラスツズマブ投与群及び T-DM1 0.3 mg/kg 投与群も含め、対照群との間で腫瘍体積の倍加時間に有意な差は認められなかった。T-DM1 10及び15 mg/kg 投与群では、他の投与群と比べ、腫瘍体積の倍加時間の有意な延長が示された ($P < 0.05$, Tukey-Kramer HSD)。この2投与群の腫瘍増殖速度に大きな差はなかったものの、腫瘍が完全に退縮する比率に関しては、15 mg/kg 投与群 (60%) が、10 mg/kg 投与群 (10%) に比べ優れており、他の投与群との間で有意な差が認められた ($P < 0.05$, Tukey-Kramer HSD)。

次に、T-DM1の投与スケジュールを3通り設定し、腫瘍増殖抑制効果との関係について検討した。先の試験と同様、BT-474EEI 細胞を雌ベージュヌードマウスの乳腺脂肪組織中に1匹あたり 2×10^7 個同所性移植し (Matrigel 使用), 12日後に無作為化割付後 (1群8匹), T-DM1の投与を開始した。T-DM1は、3週間に1回15 mg/kg を計3回静脈内投与 (総投与量は45 mg/kg), 週1回, 3.3, 5及び10 mg/kg を計9回静脈内投与 (各々, 総投与量は30, 45, 90 mg/kg), 2週間に1回, 6, 9及び18 mg/kg を計5回静脈内投与 (各々, 総投与量は30, 45, 90 mg/kg) とし、異なる投与スケジュール間で T-DM1の総投与量を合わせて比較した。また、対照群には溶媒を週1回, 計9回静脈内投与した。

各投与群の腫瘍増殖に対する効果を、腫瘍体積の推移, 倍加時間及び腫瘍の完全退縮が認められた比率で示した (図 2.6.2.2.2.3-3, 図 2.6.2.2.2.3-4)。すべての T-DM1投与群において、腫瘍体積の倍加時間が対照群よりも有意に延長した ($P < 0.05$, Tukey-Kramer HSD)。T-DM1投与群の内、週1回10 mg/kg 投与群, 2週間に1回18 mg/kg 投与群, 2週間に1回9 mg/kg 投与群及び3週間に1回15 mg/kg 投与群において強い腫瘍増殖抑制活性が示され、対照群と比較した倍加日数の延長日数は、順に129日, 131日, 117日, 117日であったが、これらの投与群間に統計学的な有意差は認められなかった。また、腫瘍の完全な退縮が認められた個体の比率は、週1回10 mg/kg 投与群, 2週間に1回18 mg/kg 投与群, 3週間に1回15 mg/kg 投与群において高く、順に75%, 75%, 63%であった。

BT-474EEI 乳癌細胞を移植したモデルにおいて、T-DM1は、MMTV-HER2 Fo5モデルと同様の投与スケジュール, 用量で高い有効性を示した。

図 2.6.2.2.3-1 BT-474EEI 乳癌細胞移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果
3週間に1回投与スケジュールでの用量による比較 (1)



矢印は、各抗体の投与日を示す。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 10)

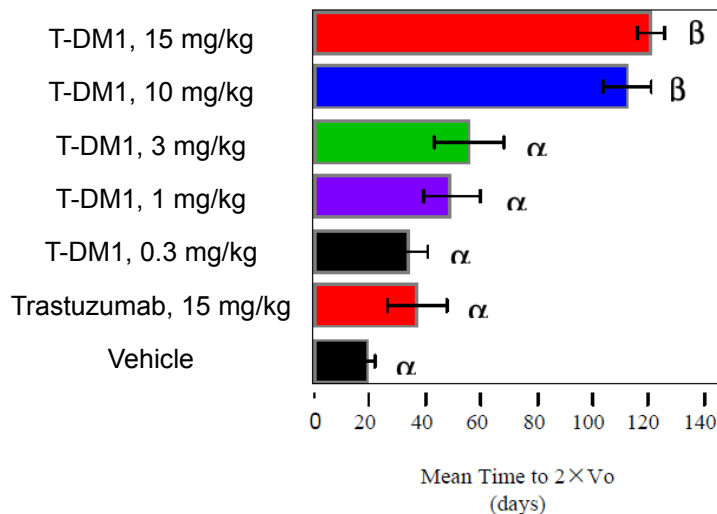
斜線は、腫瘍体積が1000 mm³を越えたか、腫瘍の潰瘍化、あるいはリンパ腫を発症したため安楽死させたことを示す。

PR：day 0での腫瘍体積と比較した縮小率が50%を越え100%未満になった個体

CR：試験期間中に腫瘍体積の縮小率が100%になった個体

[4.2.1.1-11 Figure 2を改変]

B) 腫瘍体積の倍加時間



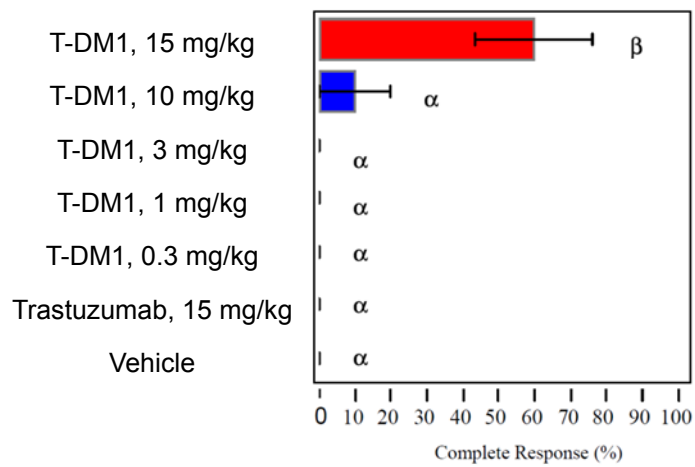
無作為化割付日を day 0とした。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 10)

倍加時間 (Doubling Time)：腫瘍体積が day 0の2倍になるまでにかかった日数

α, β：異なるシンボルで示されたグループ間では統計学的に有意な差が認められた (Tukey-Kramer HSD, P < 0.05)。

[4.2.1.1-11 Figure 1を改変]

図 2.6.2.2.3-2 BT-474EEI 乳癌細胞移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果
3週間に1回投与スケジュールでの用量による比較 (2)
試験期間中に腫瘍の完全退縮 (縮小率100%) が認められた個体の比率



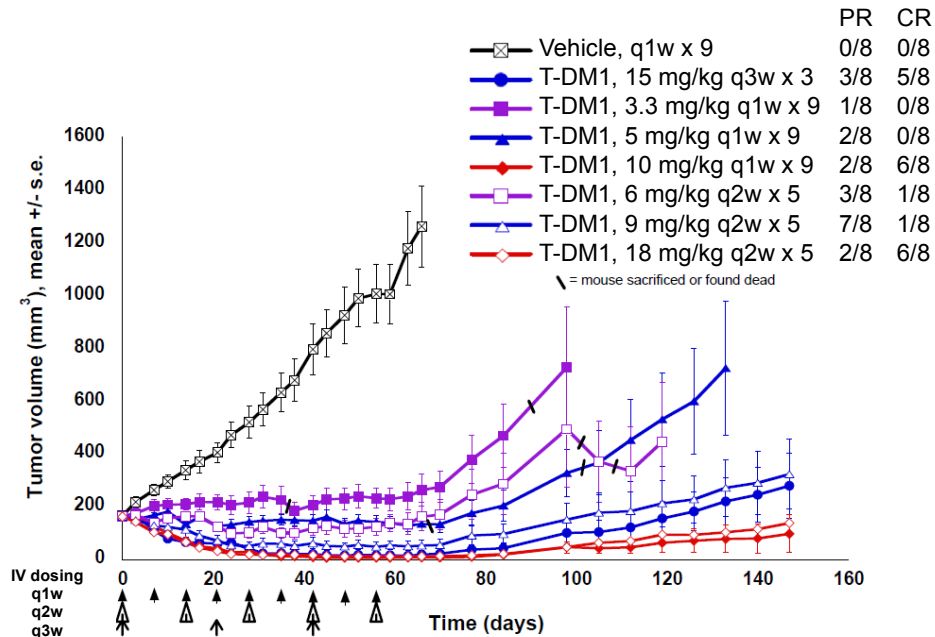
無作為化割付日を day 0とした。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 10)

α, β : 異なるシンボルで示されたグループ間では統計学的に有意な差が認められた (Tukey-Kramer HSD, P < 0.05)。

[4.2.1.1-11 Figure 3を改変]

図 2.6.2.2.3-3 BT-474EEI 乳癌細胞移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果
3週間に1回, 2週間に1回, 週1回投与の比較 (1)

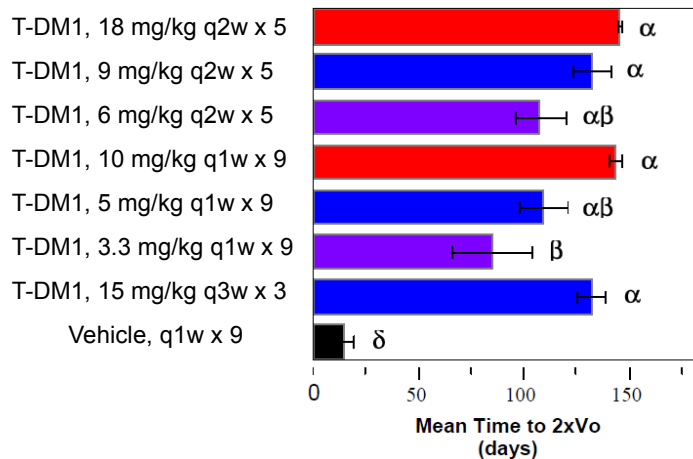
A) 腫瘍体積の推移



矢印は、T-DM1の投与日を示す。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 8)
 斜線は、腫瘍体積が1000 mm³を越えたか潰瘍化したため、安楽死させたことを示す。
 PR : day 0での腫瘍体積と比較した縮小率が50%を越え100%未満になった個体
 CR : 試験期間中に腫瘍体積の縮小率が100%になった個体

[4.2.1.1-12 Figure 2を改変]

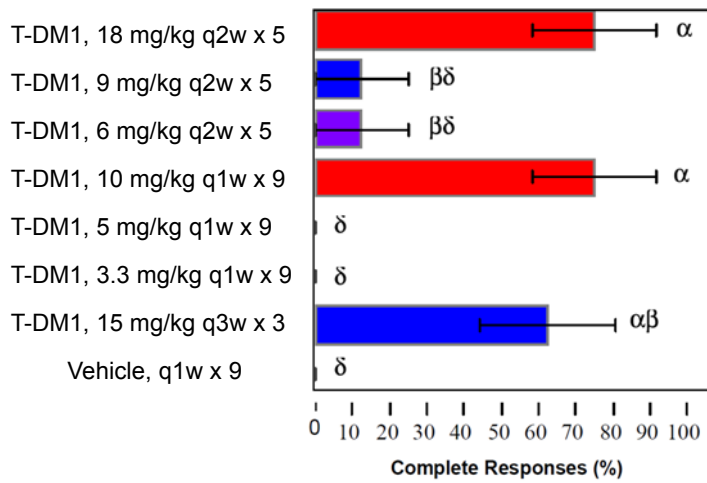
B) 腫瘍体積の倍加時間



無作為化割付日を day 0とした。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 8)
 倍加時間 (Doubling Time) : 腫瘍体積が day 0の2倍になるまでにかかった日数
 α, β, δ : 異なるシンボルで示されたグループ間では統計学的に有意な差が認められた (Tukey-Kramer HSD, P < 0.05) 。

[4.2.1.1-12 Figure 1を改変]

図 2.6.2.2.3-4 BT-474EEI 乳癌細胞移植モデルにおける T-DM1 の抗腫瘍効果
 3週間に1回, 2週間に1回, 週1回投与の比較 (2)
 試験期間中に腫瘍の完全退縮 (縮小率100%) が認められた個体の比率



表示は, 平均値 ± 標準誤差 (n = 8)

α, β, δ : 異なるシンボルで示されたグループ間では統計学的に有意な差が認められた (Tukey-Kramer HSD, P < 0.05) 。

[4.2.1.1-12 Figure 3を改変]

2.6.2.2.4 KPL-4乳癌細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果

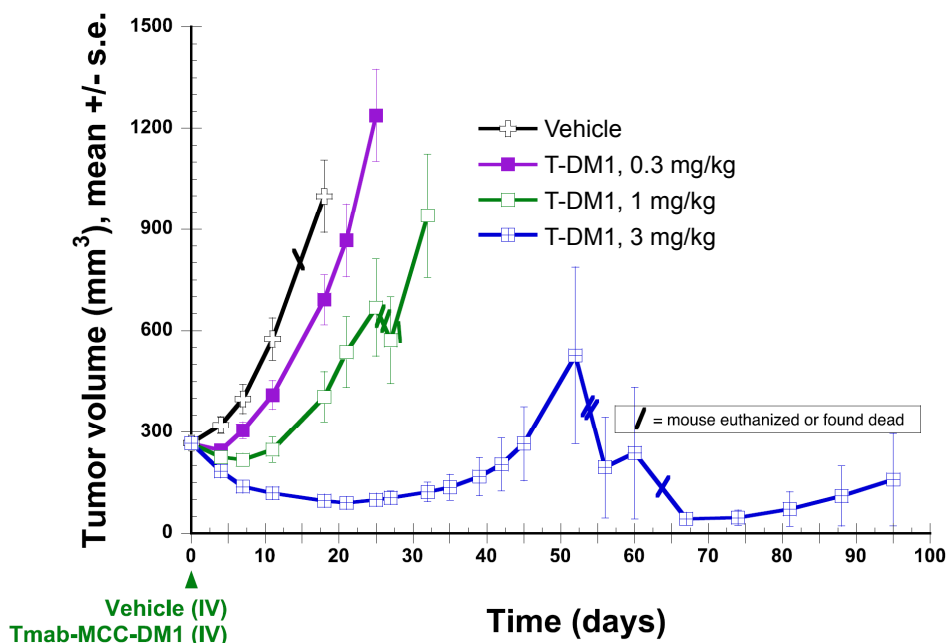
(資料番号4.2.1.1-13, 4.2.1.1-14)

T-DM1の抗腫瘍効果について、HER2陽性のヒト乳癌細胞株 KPL-4をマウスに移植した腫瘍モデルを用いて検討した。

最初に、単回投与における投与量と腫瘍増殖抑制活性について調べた。KPL-4細胞を雌 SCID ベージュマウスの乳腺脂肪組織に1匹あたり 3×10^6 個同所性移植し (Matrigel 使用) , 11日後に無作為化割付後 (1群8匹) , 群分け日に T-DM1を0.3, 1又は3 mg/kg あるいは溶媒を単回静脈内投与した。

各投与群の腫瘍増殖に対する効果を、腫瘍体積の推移、倍加時間及び腫瘍の完全退縮が認められた個体数で示した (図 2.6.2.2.4-1, 表 2.6.2.2.4-1) 。T-DM1 3 mg/kg を単回投与したマウスでは、持続的な腫瘍の退縮が認められ、腫瘍体積の倍加時間も対照群の10.4日に対し、75.4日に延長した。

図 2.6.2.2.4-1 KPL-4乳癌細胞移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果



矢印は、T-DM1の投与日を示す。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 8)

斜線は、腫瘍の増殖に伴う悪液質の発症あるいは腫瘍体積が 1000 mm^3 を越えたため安楽死させたことを示す。

[4.2.1.1-13 Figure 1を改変]

表 2.6.2.2.2.4-1 KPL-4乳癌細胞移植モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果

検体	抗体用量 (mg/kg)	PR	CR	倍加時間 (day)
溶媒	-	0	0	10.4
T-DM1	0.3	0	0	14.8
T-DM1	1	1	0	22.3
T-DM1	3	7	0	75.4*

無作為化割付日を day 0とした。

PR：day 0での腫瘍体積と比較した縮小率が50%を越え100%未満になった個体

CR：試験期間中に腫瘍体積の縮小率が100%になった個体

倍加時間 (Doubling Time)：腫瘍体積が day 0の2倍になるまでにかかった日数

本資料は、抗 HER2抗体ペルツズマブとの併用投与について検討した試験であるが、

T-DM1単独投与に関するデータを抽出して記載した。

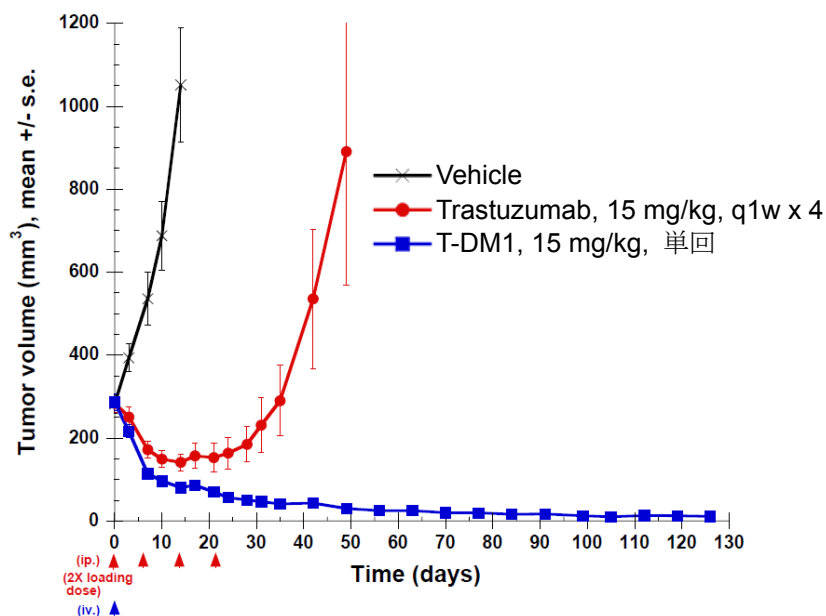
*T-DM1 3 mg/kg 投与群では、腫瘍体積が day 0の2倍になる前に安楽死例あり。

[4.2.1.1-13 Table 2を改変]

次に、KPL-4腫瘍細胞移植モデルでの T-DM1の腫瘍増殖抑制効果について、トラスツズマブと比較した。KPL-4細胞を雌 SCID ベージュマウスの乳腺脂肪組織に1匹あたり 3×10^6 個同所性移植し (Matrigel 使用)，T-DM1 15 mg/kg を単回静脈内投与した。トラスツズマブは15 mg/kg を週1回計4回腹腔内投与としたが、初回のみ2倍の用量 (30 mg/kg) を投与した (総投与量75 mg/kg)。なお、各投与群とも1群8匹とした。

トラスツズマブ投与群 (週1回投与, 15 mg/kg) は、KPL-4細胞に対し腫瘍増殖抑制効果を示し、腫瘍を退縮させたが、投与期間終了後、腫瘍は速やかに再増殖した。本細胞株は、*in vitro* 細胞増殖試験ではトラスツズマブに感受性を示さなかったが、トラスツズマブによる ADCC には感受性を示すことから、ADCC の寄与が考えられる¹¹⁾。一方、T-DM1 (単回投与, 15 mg/kg) は、126日間の観察期間を通して持続的で著しい腫瘍退縮効果を示した。

図 2.6.2.2.4-2 KPL-4乳癌腫瘍モデルにおける T-DM1の抗腫瘍効果
トラスツズマブとの比較



矢印は、T-DM1（青）及びトラスツズマブ（赤）の投与日を示す。

表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 8)

[4.2.1.1-14 Figure 6A を改変]

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当なし

2.6.2.4 安全性薬理試験

本薬の心血管系及び呼吸系に対する作用は T-DM1の雌カニクイザルを用いた安全性薬理試験で、中枢神経系に対する作用は T-DM1のカニクイザルを用いた反復投与毒性試験で評価した。また、DM1の I_{Kr} 抑制作用を検討するため、hERG 試験を実施した。

2.6.2.4.1 DM1: hERG 試験

(資料番号4.2.1.3-1)

DM1の hERG チャネルに対する作用について、hERG チャネル強制発現ヒト胎児腎細胞を用いて検査した。DM1の濃度は、2.6~29.5 μM (全処理群ともに1群3例)とした。hERG 電流はパッチクランプ法により測定した。

対照群が $0.6 \pm 0.3\%$ に対し、DM1は hERG チャネルを2.6 μM では $0.3 \pm 0.6\%$ 、8.8 μM では $1.0 \pm 0.5\%$ 、29.5 μM では $2.5 \pm 0.4\%$ 阻害した。試験した最高濃度である29.5 μM の hERG 阻害が2.5%であることから、hERG 電流に対する DM1の阻害作用の IC_{20} 及び IC_{50} は求めることができず、 IC_{20} は29.5 μM より上であると考えられた。

2.6.2.4.2 T-DM1: 雌カニクイザル単回静脈内投与による安全性薬理試験（3週間の回復期間）

(資料番号4.2.1.3-2)

雌カニクイザル（1群雌4匹）に T-DM1を0（溶媒），3，10，30 mg/kg の用量で，単回静脈内投与した（Day 1）。投与容量は 6 mL/kg とした。対照群には溶媒（ \blacksquare mM \blacksquare ， \blacksquare mg/mL \blacksquare ， \blacksquare % \blacksquare ，pH \blacksquare ）を同様に投与した。

試験期間中，一般状態観察，体重測定及び摂餌状態観察を行い，心電図及び血圧（心拍数，収縮期血圧・拡張期血圧・平均動脈圧・脈圧）は，薬物投与前から投与22日目（Day 22）までテレメトリー法により測定した。また，呼吸数測定及び定性的な呼吸深度評価を，投与前から Day 22まで実施した。血中トロポニン I 及び T，クレアチンキナーゼアイソザイム，T-DM1 の血漿中濃度測定（投与前，Day 2，Day 22），並びに ATA 分析（投与前，Day 22）のために採血を行った。

表 2.6.2.4.2-1 安全薬理試験：群構成

群	被験薬物	投与用量		薬液濃度 (mg/mL)	試験動物数	
		(mg/kg)	(μ g DM1/m ²)		雄	雌
1	溶媒	0	0	0	0	4
2	T-DM1	3	612	0.5	0	4
3	T-DM1	10	2040	1.67	0	4
4	T-DM1	30	6120	5	0	4

DAR = \blacksquare

T-DM1の3，10，30 mg/kg を雌カニクイザルに単回静脈内投与した時，一般症状，体重・摂餌状態，呼吸数，定性的な呼吸深度評価，心電図，トロポニン I，トロポニン T 及びクレアチンキナーゼに対して，薬物投与の影響は認められなかった。収縮期血圧，拡張期血圧，平均動脈圧及び脈圧の軽度な増加が，30 mg/kg 群で投与約4日目よりみられ，22日目まで持続した。しかしながら，個別の測定値のほとんどは投与前値の範囲内であり，軽度な増加であることから毒性作用とは考えられなかった。

以上の結果から，T-DM1の心血管系及び呼吸器系に対する無毒性量は30 mg/kg [6120 μ g DM1/m²]と推定された。

2.6.2.4.3 中枢神経系への作用

(資料番号4.2.1.3-3 (4.2.3.2-4と同じ)，4.2.1.3-4 (4.2.3.2-5と同じ))

T-DM1の中枢神経系への作用は，T-DM1のカニクイザルを用いた3か月間反復静脈内投与毒性試験（投与量：0，3，10，30 mg/kg）及び6か月間反復静脈内投与毒性試験（投与量：0，1，3，10 mg/kg）における一般状態観察及び神経学的検査で評価した（4.2.1.3-3，4.2.1.3-4）。両試験とも最高用量まで，T-DM1投与に起因する中枢神経系への作用は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.2.5.1 トラスツズマブ共存下における抗腫瘍効果

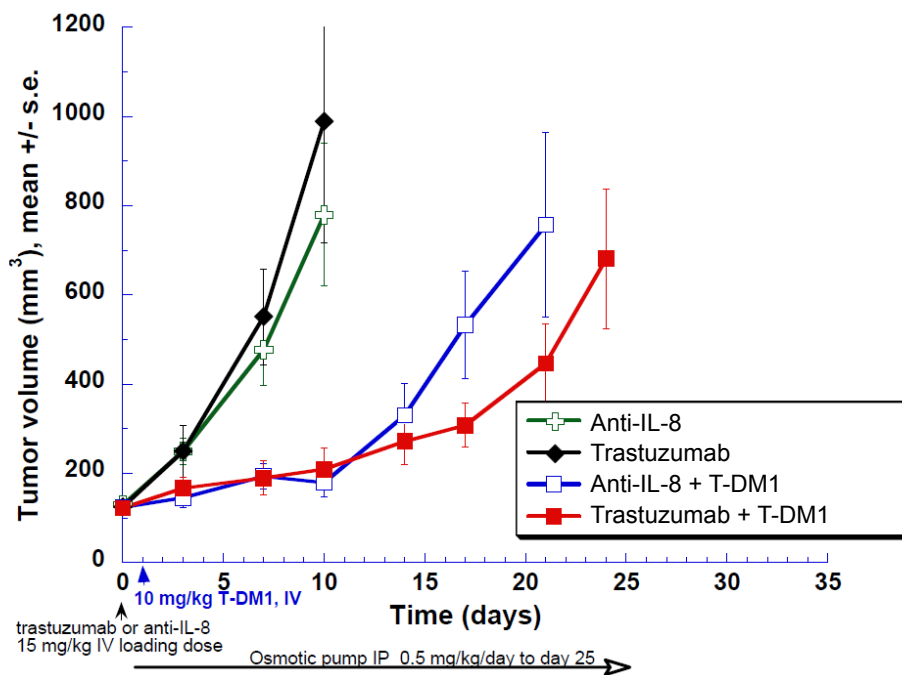
(資料番号4.2.1.4-1)

臨床試験において、トラスツズマブの治療歴のある患者に対し T-DM1を投与可能としている。そのため、臨床試験に登録される患者の中には、循環血及び組織中にトラスツズマブが残存している例がある。そこで、残存しているトラスツズマブが T-DM1の抗腫瘍活性に影響を及ぼすか検討した。

MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍組織片(約2 mm 角)を雌ヌードマウスの乳腺脂肪組織内に同所性移植した動物モデルを用いた。先ずトラスツズマブ又はコントロール抗体(抗 IL-8抗体) 15 mg/kg を単回静脈内にボラス投与し、4時間後から同じ抗体を浸透圧ポンプを用いて25日間 0.5 mg/kg/day の用量で緩徐に腹腔内に持続注入した(各投与群とも1群8匹)。投与開始日の翌日、T-DM1を10 mg/kg 単回静脈内投与し、以降、腫瘍体積を週2回計測した。

各投与群の腫瘍増殖に対する効果を図 2.6.2.5-1に示す。トラスツズマブ共存下で T-DM1を投与したトラスツズマブ + T-DM1群は、コントロール抗体共存下で T-DM1を投与した抗 IL-8抗体 + T-DM1群に比べ、有意差は示さないものの、わずかに強い腫瘍増殖抑制効果を示した。トラスツズマブは、マウスでの腫瘍移植モデルにおいて、T-DM1による腫瘍増殖抑制効果に対し拮抗的な阻害作用を示さないことが示唆された。

図 2.6.2.5-1 MMTV-HER2 Fo5動物モデルでの T-DM1の効果に対するトラスツズマブの作用



矢印は、薬物の投与日及び期間を示す。表示は、平均値 ± 標準誤差 (n = 8)

[4.2.1.4-1 Figure 3を改変]

2.6.2.6 考察及び結論

本項では、HER2 XXXXXXXXXX、ヒト FcγR、ヒト補体 C1q との結合活性、ADCC 活性及び作用機序について、T-DM1とトラスツズマブを比較し、ほとんどの試験において、T-DM1とトラスツズマブは類似した結合活性、作用を示した。これらの結果から、T-DM1のトラスツズマブ部分は、トラスツズマブの構造・機能を良く保持していることが示され、リンカーを介した DM1との共有結合がトラスツズマブの結合特性、生物活性に対し、ほとんど影響しないことが示唆され

た。トラスツズマブ部分の結合特性が保持されていることは、標的である HER2陽性細胞に対し選択的に DM1を到達させるための必要条件であり、本薬のコンセプトを支持する重要な知見である。

T-DM1が示す作用機序は複合的であり、T-DM1を構成するトラスツズマブ及び DM1の薬理作用を併せ持っていた。T-DM1は、トラスツズマブと同様に HER2陽性の腫瘍細胞に対する選択性を示し、HER2 ECD シェディングの抑制、PI3K/AKT シグナル伝達の抑制及び ADCC の誘導等、トラスツズマブと同様の作用機序を発現した。また、DM1と同様に細胞周期を G2/M 期で停止させ、アポトーシスによる細胞死を誘導した。したがって、T-DM1は、両者の作用を併せ持つ抗体薬物複合体であることが示された。

T-DM1は、*in vitro*において、トラスツズマブ感受性及びトラスツズマブ非感受性の HER2陽性細胞株に対し、トラスツズマブよりも強い増殖抑制効果を示した。HER2陽性腫瘍細胞を移植したマウスモデルにおいては、T-DM1、DM1単独投与あるいは DM1とトラスツズマブの併用投与の中で、T-DM1だけが強い腫瘍増殖抑制効果を示したが、HER2陰性腫瘍細胞を移植したマウスモデルにおいて T-DM1は効果を示さず、*in vivo*においても HER2に対する特異性を維持していた。また、トラスツズマブ非感受性を示す HER2陽性腫瘍細胞の移植モデルに対しても強い腫瘍増殖抑制効果を示した。

T-DM1は、HER2陽性腫瘍に対し治療効果を示すトラスツズマブと強い細胞障害性を有する DM1を安定なリンカーを介して結合させた新規薬剤であり、既存薬にはない強い抗腫瘍活性を示す HER2陽性腫瘍選択的な薬物であると考えられる。

2. 6. 2. 7 図表

本文中に記載。

2. 6. 2. 8 参考文献

- 1) Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185^{HER2} antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:4285-9.
- 2) Kotts CE, Su FM, Leddy C, Dodd T, Scates S, Shalaby MR, et al. ¹⁸⁶Re-labeled antibodies to p185^{HER2} as HER2-targeted radioimmunopharmaceutical agents: comparison of physical and biological characteristics with ¹²⁵I and ¹³¹I-labeled counterparts. Cancer Biother Radiopharm 1996;11:133-44.
- 3) Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR. J Biol Chem 2001;276:6591-604.
- 4) Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PY, Ultsch M, et al. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. J Immunol 2000;164:4178-84.
- 5) Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (Herceptin), a humanized anti-HER2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated HER2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. Cancer Res 2001;61:4744-9.
- 6) Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seeling S, Arteaga CL. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. Cancer Res 2002;62:4132-41.
- 7) Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS, et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. Cancer Cell 2009;15:429-40.
- 8) Erickson HK, Lewis Phillips GD, Leipold DD, Provenzano CA, Mai E, Johnson HA, et al. The effect

- of different linkers on target cell catabolism and pharmacokinetics/pharmacodynamics of trastuzumab maytansinoid conjugates. *Mol Cancer Ther* 2012;11:1133-42.
- 9) Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 1999;26(Suppl 12):60-70.
 - 10) Finkle D, Quan ZR, Asghari V, Kloss J, Ghaboosi N, Mai E, et al. HER2-targeted therapy reduces incidence and progression of midlife mammary tumors in female murine mammary tumor virus huHER2-transgenic mice. *Clin Cancer Res* 2004;10:2499-511.
 - 11) Junttila TT, Parsons K, Olsson C, Lu Y, Xin Y, Theriault J, et al. Superior *in vivo* efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Cancer Res* 2010;70:4481-9.

カドサイラ点滴静注用100 mg
カドサイラ点滴静注用160 mg
(トラスツズマブ エムタンシン (遺伝子組換え))
[HER2陽性手術不能又は再発乳癌]

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

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ADC	antibody drug conjugate	抗体薬物複合体
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ANOVA	analysis of variance	分散分析
DM1	a derivative of maytansine	メイタンシン誘導體
EC ₅₀	50% effective concentration	50%有効濃度
ECD	extracellular domain	細胞外ドメイン
Fc γ R	Fc gamma receptor	IgG の Fc 領域に対する受容体
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	ヒト上皮増殖因子受容体2
IC ₅₀	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IL-8	interleukin-8	インターロイキン8
i.v.	intravenous	静脈内注射
k _a	association rate constant	結合速度定数
k _d	dissociation rate constant	解離速度定数
K _D	dissociation equilibrium constant	解離定数
MCC	4-(<i>N</i> -maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate	4-(<i>N</i> -マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシラート
MMTV	mouse mammary tumor virus	マウス乳癌ウイルス
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase	ポリ (ADP リボース) ポリメラーゼ
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝食塩液
SMCC	<i>N</i> -succinimidyl 4-(<i>N</i> -maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate	<i>N</i> -スクシンイミジル 4-(<i>N</i> -マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴法
T-DM1	trastuzumab emtansine	トラスツズマブ エムタンシン
Tmab	trastuzumab	トラスツズマブ
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein	X 連鎖アポトーシス抑制蛋白質

目次

	頁
2.6.3 薬理試験概要表.....	4
2.6.3.1 薬理試験一覧表.....	4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験.....	6
2.6.3.2.1 <i>In vitro</i> 結合活性及び生物活性.....	6
2.6.3.2.1.1 HER2 ■■■ との結合活性.....	6
2.6.3.2.1.2 HER2 ■■■, FcγR, C1q との結合活性及び生物活性.....	7
2.6.3.2.1.3 FcγR, C1q との結合活性及び ADCC 活性.....	8
2.6.3.2.1.4 生物活性（細胞増殖抑制活性, アポトーシス誘導等）及び作用機序.....	9
2.6.3.2.1.5 細胞増殖抑制活性（非臨床及び臨床試験ロットの比較）.....	10
2.6.3.2.2 <i>In vivo</i> 抗腫瘍効果.....	11
2.6.3.2.2.1 T-DM1, トラスツズマブ, DM1, トラスツズマブ + DM1 の比較.....	11
2.6.3.2.2.2 コントロール抗体を用いた抗体薬物複合体の抗腫瘍効果.....	12
2.6.3.2.2.3 HER2 発現腫瘍細胞に特異的な抗腫瘍効果.....	13
2.6.3.2.2.4 MMTV-HER2 Fo5 乳腺腫瘍移植モデルにおける抗腫瘍効果.....	14
2.6.3.2.2.5 MMTV-HER2 Fo5 乳腺腫瘍移植モデルでの投与スケジュール比較.....	15
2.6.3.2.2.6 BT-474EEI 乳癌細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果.....	16
2.6.3.2.2.7 BT-474EEI 乳癌細胞移植モデルでの投与スケジュール比較.....	17
2.6.3.2.2.8 KPL-4 乳癌細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果.....	18
2.6.3.2.2.9 KPL-4 乳癌細胞移植モデルにおけるトラスツズマブとの比較.....	19
2.6.3.3 副次的薬理試験.....	19
2.6.3.4 安全性薬理試験.....	19
2.6.3.4.1 DM1 : hERG 試験.....	19
2.6.3.4.2 T-DM1 : 雌カニクイザル単回静脈内投与による安全性薬理試験.....	20
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	22
2.6.3.5.1 トラスツズマブ共存下における抗腫瘍効果.....	22

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

(1) 試験の種類：効力を裏付ける試験

1) *In vitro* 結合活性及び生物活性

被験物質：トラスツズマブ エムタンシン（遺伝子組換え）

試験の種類	検体	実験施設	試験番号	資料番号
HER2 ■■■ との結合活性 (SPR)	T-DM1 trastuzumab	Genentech, Inc.	■■■-0010	4.2.1.1-1
結合活性 (HER2 ■■■, ヒト FcγR, ヒト補体 C1q) 及び生物活性 (細胞増殖抑制活性, アポトーシス誘導活性, 細胞周期の制御)	T-DM1 trastuzumab T-DM1構成成分	Genentech, Inc.	■■■-1111	4.2.1.1-2
FcγR 結合活性, C1q 結合活性, ADCC 活性	T-DM1 trastuzumab	Genentech, Inc.	■■■-0046	4.2.1.1-3
生物活性 (細胞増殖抑制活性, アポトーシス誘導活性, 細胞周期の制御) 及び作用機序	T-DM1 trastuzumab T-DM1構成成分 T-DM1代謝物	Genentech, Inc.	■■■-0825	4.2.1.1-4
細胞増殖抑制活性	T-DM1	Genentech, Inc.	■■■-0826	4.2.1.1-5

2) *In vivo* 抗腫瘍効果

被験物質：トラスツズマブ エムタンシン（遺伝子組換え）

移植細胞	移植部位	動物種	投与方法	実験施設	試験番号	資料番号
HER2発現乳腺腫瘍 MMTV-HER2 Fo5	同所性 (乳腺脂肪組織)	マウス	<i>i.v.</i>	Genentech, Inc.	■■■-1508	4.2.1.1-6
HER2発現乳腺腫瘍 MMTV-HER2 Fo5	同所性 (乳腺脂肪組織)	マウス	<i>i.v.</i>	Genentech, Inc.	■■■-292 ZF-1469	4.2.1.1-7
HER2発現乳腺腫瘍 MMTV-HER2 Fo5 Wnt 発現乳腺腫瘍 MMTV-Wnt	同所性 (乳腺脂肪組織)	マウス	<i>i.v.</i>	Genentech, Inc.	■■■-292 X-1459	4.2.1.1-8
HER2発現乳腺腫瘍 MMTV-HER2 Fo5	同所性 (乳腺脂肪組織)	マウス	<i>i.v.</i>	Genentech, Inc.	■■■-292 ZC-1459	4.2.1.1-9
HER2発現乳腺腫瘍 MMTV-HER2 Fo5	同所性 (乳腺脂肪組織)	マウス	<i>i.v.</i>	Genentech, Inc.	■■■-292 ZD-1459	4.2.1.1-10
ヒト乳癌細胞株 BT474EEI	同所性 (乳腺脂肪組織)	マウス	<i>i.v.</i>	Genentech, Inc.	■■■-0962-1459	4.2.1.1-11
ヒト乳癌細胞株 BT474EEI	同所性 (乳腺脂肪組織)	マウス	<i>i.v.</i>	Genentech, Inc.	■■■-0962-A-1459	4.2.1.1-12
ヒト乳癌細胞株 KPL-4	同所性 (乳腺脂肪組織)	マウス	<i>i.v.</i>	Genentech, Inc.	■■■-1629	4.2.1.1-13
ヒト乳癌細胞株 KPL-4	同所性 (乳腺脂肪組織)	マウス	<i>i.v.</i>	Genentech, Inc.	Cancer Res 2008;68:9280-90	(参考資料) 4.2.1.1-14

(2) 試験の種類：安全性薬理試験

被験物質：トラスツズマブ エムタンシン（遺伝子組換え）及びDM1

試験の種類 (投与方法)	被験物質	動物種 (系統)	実験施設	試験番号	資料番号
hERG Assay (<i>In vitro</i>)	DM1	HEK293 cell	■■■■■	■■-0234	4.2.1.3-1
Safety Pharmacology (iv, single)	T-DM1	Cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>)	■■■■■	■■-1031-1605	4.2.1.3-2
中枢神経系評価： 3カ月間反復投与試験	T-DM1	Cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>)	■■■■■	■■-0977-1459	4.2.1.3-3 (4.2.3.2-4 と同じ)
中枢神経系評価： 6カ月間反復投与試験	T-DM1	Cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>)	■■■■■	■■-0653	4.2.1.3-4 (4.2.3.2-5 と同じ)

■■■■■ = ■■■■■); ■■■■■ = ■■■■■);

(3) 試験の種類：薬力学的薬物相互作用試験

被験物質：トラスツズマブ エムタンシン（遺伝子組換え）

移植細胞	移植部位	動物種	投与方法	実験施設	試験番号	資料番号
HER2発現乳腺腫瘍 MMTV-HER2 Fo5	同所性 (乳腺脂肪組織)	マウス	<i>i.v.</i>	Genentech, Inc.	■■-0901-4747	4.2.1.4-1

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 *In vitro* 結合活性及び生物活性

2.6.3.2.1.1 HER2 [REDACTED] との結合活性

資料番号	4.2.1.1-1																																
報告書 タイトル	Binding of trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) to HER2 [REDACTED] by surface plasmon resonance (Biacore™ Technology)																																
試験方法	HER2 [REDACTED] ([REDACTED]) とトラスツズマブ-MCC-DM1 (T-DM1) との結合・解離反応に関する反応速度論的解析を実施した。 測定方法：表面プラズモン共鳴法 (SPR, Biacore™) , T-DM1標準物質及び第II相及び第III相臨床試験に用いた複数のT-DM1ロットについて測定した。																																
結果	<p>T-DM1の各ロット及びトラスツズマブは、HER2 [REDACTED] と高親和性で結合した。HER2 [REDACTED] との解離定数 K_D 値は、T-DM1では1.08 nmol/L (標準物質を含む5ロットの平均値) , トラスツズマブは1.01 nmol/L であった。T-DM1の各ロットとトラスツズマブが HER2 [REDACTED] に結合する際の結合パラメータ (結合速度定数 k_a 及び解離速度定数 k_d) は、T-DM1 5ロットの平均 k_a 値は 2.07×10^5 1/Ms, 平均 k_d 値は 2.23×10^{-4} 1/s, トラスツズマブの平均 k_a 値は 2.16×10^5 1/Ms, 平均 k_d 値は 2.21×10^{-4} 1/s であった。k_a 値, k_d 値及び K_D 値は、両薬物間で同程度であり、センサーチップあるいはフローセルによる影響も認められなかった。反応速度論的な解析において、T-DM1はトラスツズマブと比べ、HER2 [REDACTED] との結合活性に変化は認められなかった。</p> <p style="text-align: center;">SPR 分析による HER2 [REDACTED] と T-DM1/トラスツズマブとの結合活性</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">リガンド</th> <th style="text-align: center;">k_a (1/Ms $\times 10^5$)</th> <th style="text-align: center;">k_d (1/s $\times 10^{-4}$)</th> <th style="text-align: center;">K_D (nmol/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>トラスツズマブ</td> <td style="text-align: center;">2.16 \pm 0.194</td> <td style="text-align: center;">2.21 \pm 0.542</td> <td style="text-align: center;">1.01 \pm 0.178</td> </tr> <tr> <td>T-DM1 標準物質</td> <td style="text-align: center;">2.19 \pm 0.167</td> <td style="text-align: center;">2.31 \pm 0.338</td> <td style="text-align: center;">1.06 \pm 0.144</td> </tr> <tr> <td>[REDACTED]</td> <td style="text-align: center;">1.93 \pm 0.0656</td> <td style="text-align: center;">2.44 \pm 0.0763</td> <td style="text-align: center;">1.27 \pm 0.0685</td> </tr> <tr> <td>[REDACTED]</td> <td style="text-align: center;">2.11 \pm 0.246</td> <td style="text-align: center;">2.07 \pm 0.444</td> <td style="text-align: center;">0.986 \pm 0.225</td> </tr> <tr> <td>[REDACTED]</td> <td style="text-align: center;">2.06 \pm 0.115</td> <td style="text-align: center;">2.20 \pm 0.290</td> <td style="text-align: center;">1.08 \pm 0.167</td> </tr> <tr> <td>[REDACTED]</td> <td style="text-align: center;">2.08 \pm 0.118</td> <td style="text-align: center;">2.13 \pm 0.459</td> <td style="text-align: center;">1.03 \pm 0.258</td> </tr> <tr> <td>全ロット平均</td> <td style="text-align: center;">2.07 \pm 0.162</td> <td style="text-align: center;">2.23 \pm 0.340</td> <td style="text-align: center;">1.08 \pm 0.193</td> </tr> </tbody> </table> <p>表示は、いずれも平均値 \pm 標準偏差</p>	リガンド	k_a (1/Ms $\times 10^5$)	k_d (1/s $\times 10^{-4}$)	K_D (nmol/L)	トラスツズマブ	2.16 \pm 0.194	2.21 \pm 0.542	1.01 \pm 0.178	T-DM1 標準物質	2.19 \pm 0.167	2.31 \pm 0.338	1.06 \pm 0.144	[REDACTED]	1.93 \pm 0.0656	2.44 \pm 0.0763	1.27 \pm 0.0685	[REDACTED]	2.11 \pm 0.246	2.07 \pm 0.444	0.986 \pm 0.225	[REDACTED]	2.06 \pm 0.115	2.20 \pm 0.290	1.08 \pm 0.167	[REDACTED]	2.08 \pm 0.118	2.13 \pm 0.459	1.03 \pm 0.258	全ロット平均	2.07 \pm 0.162	2.23 \pm 0.340	1.08 \pm 0.193
リガンド	k_a (1/Ms $\times 10^5$)	k_d (1/s $\times 10^{-4}$)	K_D (nmol/L)																														
トラスツズマブ	2.16 \pm 0.194	2.21 \pm 0.542	1.01 \pm 0.178																														
T-DM1 標準物質	2.19 \pm 0.167	2.31 \pm 0.338	1.06 \pm 0.144																														
[REDACTED]	1.93 \pm 0.0656	2.44 \pm 0.0763	1.27 \pm 0.0685																														
[REDACTED]	2.11 \pm 0.246	2.07 \pm 0.444	0.986 \pm 0.225																														
[REDACTED]	2.06 \pm 0.115	2.20 \pm 0.290	1.08 \pm 0.167																														
[REDACTED]	2.08 \pm 0.118	2.13 \pm 0.459	1.03 \pm 0.258																														
全ロット平均	2.07 \pm 0.162	2.23 \pm 0.340	1.08 \pm 0.193																														

[4.2.1.1-1 Table 3を改変]

2.6.3.2.1.2 HER2 █████, FcγR, C1q との結合活性及び生物活性

資料番号	4.2.1.1-2
報告書 タイトル	<i>In vitro</i> binding and activity of Tmab-MCC-DM1
試験方法	<p>T-DM1 (Tmab-MCC-DM1) と HER2 █████, ヒト FcγR, ヒト補体 C1q との結合活性及び生物活性等について、主にトラスツズマブと比較して評価した。開発初期に実施した試験であり、2.6.2においては主に資料4.2.1.1-3及び4のデータを用いた。</p> <p>主な測定項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ T-DM1の結合活性 (HER2 █████, ヒト FcγR, ヒト補体 C1q) ・ T-DM1による細胞増殖抑制作用 (使用細胞株：乳癌 BT-474, BT-474EEI, SK-BR-3, MCF7, MDA-MB-468, 卵巣癌 SK-OV-3, 胃癌 MKN7, 非小細胞肺癌 Calu-3) ・ T-DM1によるアポトーシスの誘導 (カスパーゼ-3/7の活性化) ・ T-DM1による細胞周期に対する作用 ・ T-DM1の各構成成分 (トラスツズマブ, MCC-DM1, DM1) による細胞増殖抑制作用
結果	<ul style="list-style-type: none"> ・ T-DM1とトラスツズマブは、HER2 █████ に対し同程度の結合活性を示した。 ・ T-DM1とトラスツズマブは、高親和性 FcγRIa に対し同程度の結合活性を示した。低親和性受容体 (FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa-V158及び FcγRIIIa-F158) に対する T-DM1の結合活性は、トラスツズマブよりも約3倍強かった。 ・ T-DM1とトラスツズマブは、補体 C1q に対し同程度の結合活性を示した。 ・ HER2陽性の腫瘍細胞 (乳癌 BT-474, BT-474EEI, SK-BR-3, 卵巣癌 SK-OV-3, 胃癌 MKN7及び非小細胞肺癌 Calu-3) を T-DM1処理したところ、トラスツズマブに反応性を示さない細胞株 (BT-474EEI, SK-OV-3, MKN7及び Calu-3) においても、用量依存的に増殖抑制活性を示した。BT-474細胞では、トラスツズマブよりも約3倍強い増殖抑制活性を示した。 ・ HER2陰性 (MDA-MB-468) 及び正常レベルの HER2発現乳癌細胞株 (MCF7) に対し増殖抑制活性を示したのは、高濃度 (10 µg/mL) 条件下のみであった。また、コントロール抗体を用いた DM1結合体 (抗 IL-8-MCC-DM1) は、BT-474細胞に対し増殖抑制作用を示さなかった。 ・ T-DM1は、HER2陽性の乳癌細胞株に対しアポトーシスを誘導した。一方、トラスツズマブ処理ではアポトーシス誘導が認められなかった。 ・ T-DM1は、SK-BR-3細胞の細胞周期を G2/M 期で停止させた。この作用は、チューブリン重合阻害剤と一致した。一方、トラスツズマブは、G0/G1期で細胞周期を停止させて細胞増殖を阻害した。 ・ DM1の BT-474細胞に対する増殖抑制作用は、T-DM1よりも約20倍弱かった。また、MCC-DM1が BT-474細胞に対して示した増殖抑制作用は、T-DM1よりも約100倍弱かった。 ・ MCC-DM1が BT-474及び SK-BR-3細胞に示した増殖抑制作用は、DM1よりも5~10倍弱かった。

2.6.3.2.1.3 FcγR, C1q との結合活性及び ADCC 活性

資料番号	4.2.1.1-3
報告書 タイトル	<i>In vitro</i> biological characterization of trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) for Fc gamma receptor binding, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, and C1q binding activities
試験方法	<p>T-DM1のヒト FcγR 及びヒト補体 C1q との結合活性, 並びに ADCC 活性を検討した。</p> <p>主な測定項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ T-DM1の結合活性 (ヒト FcγR 及びヒト補体 C1q) ・ T-DM1の ADCC 活性 (標的細胞：ヒト乳癌細胞株 BT-474, エフェクター細胞：ヒト末梢血単核細胞) <p>なお, 本報告書では, T-DM1の標準物質以外に [REDACTED] 及び [REDACTED] 臨床試験に用いた複数の T-DM1ロット ([REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED]) についても検討されている。</p>
結果	<ul style="list-style-type: none"> ・ T-DM1とトラスツズマブは, FcγRIa に対し同程度の結合活性を示した。 ・ T-DM1は, トラスツズマブと比較し, FcγRIIa, IIb 及び IIIa に対し, やや強い結合活性を示した (2倍~6倍)。 ・ T-DM1は, トラスツズマブよりも C1q 結合活性が若干弱かったものの, 大きな差は認めなかった。 ・ T-DM1は, トラスツズマブと比較してわずかに強い ADCC 活性を示した。 ・ 試験した T-DM1の各ロットは, いずれも同程度の FcγR (Ia, IIa [H131及び R131], IIb, IIIa [V158及び F158]) 結合活性, C1q 結合活性及び ADCC 活性を示した。

2.6.3.2.1.4 生物活性（細胞増殖抑制活性，アポトーシス誘導等）及び作用機序

資料番号	4.2.1.1-4
報告書 タイトル	<i>In vitro</i> characterization of trastuzumab-MCC-DM1 in breast cancer cell lines
試験方法	<p>乳癌細胞株に対する T-DM1の作用及びそのメカニズムを検討した。また、T-DM1の各構成成分及び代謝物の細胞増殖に対する作用を調べた。</p> <p>主な測定項目</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒト乳癌細胞株における HER2発現量（フローサイトメトリーによる測定） ・T-DM1による乳癌細胞増殖に対する抑制作用（使用細胞株：SK-BR-3, BT-474, BT-474EEI, KPL-4, HCC1954, MCF7, MDA-MB-468） ・T-DM1の各構成成分（トラスツズマブ, DM1, DM1-methyl, リンカー試薬 SMCC）及び代謝物（Lys-MCC-DM1, MCC-DM1）による SK-BR-3乳癌細胞の増殖に対する作用 ・T-DM1によるアポトーシスの誘導（カスパーゼ-3/7の活性化） ・T-DM1による細胞周期に対する作用 ・T-DM1による細胞周期, シグナル伝達及びアポトーシスのマーカー発現 ・T-DM1による HER2 ECD シェディングに対する作用
結果	<ul style="list-style-type: none"> ・各ヒト乳癌細胞株における HER2発現量をフローサイトメトリーにより測定し、発現レベルを確認した。 ・T-DM1は、トラスツズマブ感受性細胞（SK-BR-3, BT-474）に対し、トラスツズマブよりも強い増殖抑制作用を示し、トラスツズマブ非感受性の乳癌細胞（KPL-4, HCC1954, BT-474EEI）に対しても細胞増殖を強く抑制した。 ・T-DM1は、HER2低発現（正常レベル）の細胞株（MCF7）、あるいは HER2を発現していない細胞株（MDA-MB-468）の増殖に対する作用は、トラスツズマブと類似しており、増殖抑制作用は認められなかった。 ・SK-BR-3乳癌細胞の増殖に対して、T-DM1, DM1, DM1-methyl（チオール基を保護するためメチル基を付加）が阻害活性を示した。リンカー試薬（SMCC）及び腫瘍細胞あるいは血中で検出された代謝物（Lys-MCC-DM1, MCC-DM1）は、最高濃度（10 nmol/L）においても細胞増殖抑制活性を示さなかった。 ・T-DM1は HER2陽性の乳癌細胞株においてカスパーゼ-3/7を活性化し、アポトーシスを誘導した。また、ウエスタン分析においても XIAP 発現の抑制と PARP 切断が認められた。一方、トラスツズマブ処理ではアポトーシス誘導が認められなかった。 ・T-DM1及び DM1は、SK-BR-3, BT-474細胞の細胞周期を G2/M 期で停止させた。この作用は、微小管の機能を阻害する薬剤において想定される作用と一致していた。一方、トラスツズマブは、G1期で細胞周期を停止させて細胞増殖を阻害し、S 期細胞は減少した。また、サイクリン B1及びリン酸化ヒストンのウエスタン分析により、T-DM1及び DM1は、乳癌細胞を G2/M 期で停止させることが確認された。 ・T-DM1とトラスツズマブは、いずれも乳癌細胞株 BT-474-M1の AKT リン酸化を速やかに阻害した。 ・T-DM1とトラスツズマブは、乳癌細胞株 BT-474-M1での HER2 ECD シェディングに対し、同程度の阻害活性を示した。

2.6.3.2.1.5 細胞増殖抑制活性（非臨床及び臨床試験ロットの比較）

資料番号	4.2.1.1-5
報告書 タイトル	Viability/Proliferation assays on T-DM1 clinical qualification lots
試験方法	<p>T-DM1の標準物質、XXXXXXXXXX及びXXXXXXXXXX臨床試験に用いた複数のロット及びXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXでの標準的なロット（XXXXXXXXXX）について、HER2陽性の乳癌細胞株に対する増殖抑制効果を調べた。</p> <p>主な測定項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ T-DM1による乳癌細胞増殖に対する抑制作用（使用細胞株：SK-BR-3, BT-474, BT-474EEI, KPL-4, HCC1954）
結果	<p>各乳癌細胞株の増殖に対する50%阻害活性（IC₅₀）は、T-DM1の各ロット間で差を認めなかった。市販品の標準物質（XXXXXXXXXX臨床試験に用いたXXXXXXXXXXとXXXXXXXXXXを合わせて作成）、非臨床研究での標準的なロット（XXXXXXXXXX）、XXXXXXXXXX臨床試験用 Qualification ロット（XXXXXXXXXX、XXXXXXXXXX及びXXXXXXXXXX）及びXXXXXXXXXX臨床試験用 Qualification ロット（XXXXXXXXXX）は、ほぼ同様の細胞増殖抑制活性を示した。</p>

2.6.3.2.2 *In vivo* 抗腫瘍効果

2.6.3.2.2.1 T-DM1, トラスツズマブ, DM1, トラスツズマブ + DM1の比較

資料番号	4.2.1.1-6
報告書 タイトル	Response of MMTV-HER2 Fo5 tumor to treatment of trastuzumab and DM1 approximately 30 minutes later in nude mice
試験方法	<p>腫瘍細胞：MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍 細胞移植：約2×2 mmの小切片とし、No.2/3乳腺脂肪組織に同所性移植 移植動物：雌ヌードマウス 主な測定項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> 腫瘍体積の計測及び一般状態の観察 <p>最初の4週間は週2回、その後の2週間は週1回観察し記録した。 腫瘍体積 (mm³) = (腫瘍長径 × 腫瘍短径²) × 0.5 腫瘍体積の倍加時間を比較するため、log-rank 分析を用いた (JMP ソフトウェア ver 6.0)</p>
投与方法	<p>腫瘍が生着したマウスを各群8匹ずつ6群に無作為化割付し、各群の平均腫瘍体積は81~242 mm³であった。</p> <p>第1群：溶媒 (ADC Buffer #2) 第2群：T-DM1 15 mg/kg (DM1として252 µg/kg) 第3群：トラスツズマブ15 mg/kg 第4群：トラスツズマブ15 mg/kg, 30分後に DM1 252 µg/kg (実投与量は184 µg/kg) 第5群：DM1 252 µg/kg (実投与量は184 µg/kg) 第6群：DM1 600 µg/kg (実投与量は454 µg/kg)</p> <p>Day 0に各群とも薬物を静脈内投与した。なお、第4群~第6群で用いた DM1投与液は、設定よりも約25%低濃度であり、実投与量を併記した。投与後のマウス血清中総トラスツズマブ濃度及びDM1濃度を測定した。</p>
結果	<p>MMTV-HER2 Fo5腫瘍モデルにおいて、T-DM1 15 mg/kg 投与群 (第2群) 及び DM1 600 µg/kg 投与群 (第6群) は、対照群に比べ有意な抗腫瘍活性を示した (P < 0.05, log-rank 分析)。T-DM1投与群は、DM1の最大耐量に近い600 µg/kg 投与群よりも有意に強い効果を示した (P < 0.05, log-rank 分析)。トラスツズマブと DM1を併用した第4群は、対照群と比べ有効性を示さなかった。また、低用量の DM1投与群及びトラスツズマブ (15 mg/kg) 投与群は、本腫瘍の増殖に有意な影響を及ぼさなかった。なお、各薬物の曝露は、血清中濃度に基づいて確認した。</p> <p>本試験の結果から、細胞障害活性を示す薬物である DM1が標的細胞に到達し、抗腫瘍効果を発揮するために、トラスツズマブが果たしている役割の重要性が示された。</p>

2.6.3.2.2.2 コントロール抗体を用いた抗体薬物複合体の抗腫瘍効果

資料番号	4.2.1.1-7
報告書 タイトル	Response of MMTV-HER2 Fo5 tumor to control antibody-MCC-DM1
試験方法	<p>腫瘍細胞：MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍 細胞移植：約2×2 mmの小切片とし，No.2乳腺脂肪組織に同所性移植 移植動物：雌ヌードマウス 主な測定項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> 腫瘍体積の計測及び一般状態の観察 15日目まで週2回，その後更に28日間は週1回観察し記録した。 腫瘍体積 (mm³) = (腫瘍長径 × 腫瘍短径²) × 0.5 腫瘍体積の倍加時間を比較するため，分散分析 (ANOVA) 及び Tukey-Kramer HSD 検定を用いた。統計解析は，JMP ソフトウェア (version 5.1.2) を用いて実施した。
投与方法	<p>腫瘍が生着したマウスを平均腫瘍体積が100~200 mm³になるように各群8匹ずつ5群に無作為化割付した。 A 群：溶媒 (ADC buffer 2) B 群：T-DM1 15 mg/kg, (DM1として750 µg/m²) C 群：抗 IL-8-MCC-DM1 15 mg/kg (DM1として840 µg/m²) D 群：抗 IL-8抗体15 mg/kg, E 群：トラスツズマブ 15 mg/kg Day 0に各群とも尾静脈内に単回投与した。また，投与後のマウス血清中ヒト抗体濃度を測定した。</p>
結果	<p>MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍に対し，抗 IL-8-MCC-DM1投与群は，抗 IL-8抗体投与群，トラスツズマブ投与群及び溶媒コントロール投与群と比べて，腫瘍体積の倍加時間において有意な差を認めなかった。しかし，T-DM1投与群では，腫瘍体積の倍加時間は23日となり増殖を遅延させた。なお，各薬物の曝露は，血清中濃度に基づいて確認した。 本試験の結果は，HER2陽性の腫瘍細胞に対し抗原特異的に結合することが，抗体薬物複合体が抗腫瘍活性を示すために必要であることを示している。</p>

2.6.3.2.2.3 HER2発現腫瘍細胞に特異的な抗腫瘍効果

資料番号	4.2.1.1-8
報告書 タイトル	Specificity of trastuzumab-MCC-DM1 for HER2 over-expressing mammary tumors
試験方法	<p>腫瘍細胞：MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍，MMTV-Wnt 乳腺腫瘍 細胞移植：両腫瘍とも約2 × 2 mm の小切片とし，No.2乳腺脂肪組織に同所性移植 移植動物：雌ページヌードマウス 主な測定項目： ・腫瘍体積の計測及び一般状態の観察 試験終了まで週2回実施した。 腫瘍体積 (mm³) = (腫瘍長径 × 腫瘍短径²) × 0.5 腫瘍体積の倍加時間を比較するため，分散分析 (ANOVA) 及び Fisher's PLSD 検定を用いた。統計解析は，Statview 5.0.1を用いた。</p>
投与方法	<p>腫瘍が生着したマウスを平均腫瘍体積が100～200 mm³になるように，両腫瘍とも各群7匹ずつ3群に無作為化割付した。 MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍：第1～3群，MMTV-Wnt 乳腺腫瘍：第4～6群 第1群，第4群：溶媒 (PBS) 第2群，第5群：トラスツズマブ 10 mg/kg 第3群，第6群：T-DM1 10 mg/kg Day 0にマウス尾静脈内に単回投与した。</p>
結果	<p>MMTV-HER2 Fo5腫瘍モデルでは，T-DM1投与群は，MMTV-HER2 Fo5腫瘍の倍加時間を対照群よりも27日間延長した。トラスツズマブ投与群は対照群と比較して腫瘍体積の倍加時間に影響を及ぼさなかった。MMTV-Wnt 腫瘍モデルでは，対照群及びトラスツズマブ投与群と比べ，T-DM1投与群において，腫瘍体積の倍加時間に有意な差はなかった。 T-DM1は，HER2陽性の MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍の腫瘍増殖を有意に遅延させたが，HER2を発現していない Wnt 乳腺腫瘍に対しては作用を示さなかった。T-DM1は，HER2陽性腫瘍に特異的に作用を発現することが示された。</p>

2.6.3.2.2.4 MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍移植モデルにおける抗腫瘍効果

資料番号	4.2.1.1-9
報告書 タイトル	Response of MMTV-HER2 Fo5 tumor to 3 doses of trastuzumab-MCC-DM1 administered as an every-3-week regimen
試験方法	<p>腫瘍細胞：MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍 細胞移植：約2×2 mmの小切片とし、No.2乳腺脂肪組織に同所性移植 移植動物：雌ヌードマウス 主な測定項目： ・腫瘍体積及び一般状態の観察 試験開始後、最初の8週間は週2回、その後は週1回実施した。 腫瘍体積 (mm³) = (腫瘍長径 × 腫瘍短径²) × 0.5 腫瘍体積の倍加時間を比較するため、分散分析 (ANOVA) 及び Tukey-Kramer HSD 検定を用いた。統計解析は、JMP ソフトウェア (version 5.1.2) を用いて実施した。</p>
投与方法	<p>移植後12日目に、平均腫瘍体積が100~200 mm³になるように各群8匹ずつ6群に無作為化割付した。また、マウスに投与後の T-DM1曝露を確認するため、腫瘍を移植していない第7~9群 (各群3匹) を設定した。 第1群：溶媒、第2群：T-DM1 1 mg/kg、第3群：T-DM1 3 mg/kg、 第4群：T-DM1 10 mg/kg、第5群：T-DM1 15 mg/kg、 第6群：T-DM1 30 mg/kg、第7群 (腫瘍無し)：T-DM1 1 mg/kg、 第8群 (腫瘍無し)：T-DM1 10 mg/kg、第9群 (腫瘍無し)：T-DM1 30 mg/kg いずれの投与群も3週間に1回、計3回 (Day 0, 21, 42) 尾静脈内に投与した。</p>
結果	<p>3週間に1回投与のスケジュールにおいて、T-DM1 1及び3 mg/kg 投与群 (各々DM1として50, 150 µg/m²) は、MMTV-HER2 Fo5腫瘍モデルに対して効果を示さず、対照群とほぼ同様に増殖した。T-DM1 10 mg/kg 投与群では、MMTV-HER2 Fo5腫瘍に対する増殖抑制効果が示された。T-DM1 15及び30 mg/kg 投与群 (各々DM1として750, 1500 µg/m²) では、強い増殖抑制活性が認められ、ほぼ同程度の腫瘍増殖遅延効果を示した。また、15 mg/kg 投与群では8匹中3匹 (38%)、30 mg/kg 投与群では8匹中6匹 (75%) で腫瘍が完全に退縮した。しかし、T-DM1 15 mg/kg 群の3例で認められた腫瘍の完全な退縮は一過性であり、Day 65, 115, 129に腫瘍の再増殖が認められた。また、T-DM1 30 mg/kg 投与群では、1匹で腫瘍が完全に退縮した状態を Day 171まで維持した (Day 178に本個体の死亡を発見)。30 mg/kg 投与群で腫瘍の完全な退縮が認められた残り5匹に対する効果は一過性であり、Day 73, 87, 101, 101, 108に腫瘍の再増殖が認められた。なお、マウス血清中濃度に基づいて T-DM1の曝露を確認した。</p>

2.6.3.2.2.5 MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍移植モデルでの投与スケジュール比較

資料番号	4.2.1.1-10
報告書 タイトル	Dose response of MMTV-HER2 Fo5 tumor to trastuzumab-MCC-DM1 administered on a weekly schedule in mice
試験方法	<p>腫瘍細胞：MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍</p> <p>細胞移植：約2×2 mmの小切片とし、No.2乳腺脂肪組織に同所性移植</p> <p>移植動物：雌ヌードマウス</p> <p>主な測定項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> 腫瘍体積の計測及び一般状態の観察 <p>腫瘍体積は、試験開始後6週間は週2回、その後は週1回計測した。</p> <p>一般状態の観察は、試験開始後57日間は週2回、その後は週1回とした。</p> <p>腫瘍体積 (mm³) = (腫瘍長径 × 腫瘍短径²) × 0.5</p> <p>腫瘍体積の倍加時間を比較するため、分散分析 (ANOVA) 及び Tukey-Kramer HSD 検定を用いた。統計解析は、JMP ソフトウェア (version 5.1.2) を用いて実施した。</p>
投与方法	<p>腫瘍が生着したマウスを平均腫瘍体積が100~200 mm³になるように各群8匹ずつ5群に無作為化割付した。</p> <p>第1群：溶媒 (ADC buffer) を週1回投与</p> <p>第2群：T-DM1 15 mg/kg, 3週間に1回計3回投与, T-DM1の総投与量45 mg/kg</p> <p>第3群：T-DM1 3.3 mg/kg, 1週間に1回計9回投与, T-DM1の総投与量30 mg/kg</p> <p>第4群：T-DM1 5 mg/kg, 1週間に1回計9回投与, T-DM1の総投与量45 mg/kg</p> <p>第5群：T-DM1 10 mg/kg, 1週間に1回計9回投与, T-DM1の総投与量90 mg/kg</p> <p>Day 0からマウス尾静脈内に投与した。また、投与後のマウス血清中総トラスツズマブ濃度及びT-DM1濃度を測定した。</p>
結果	<p>MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍モデルに対し、T-DM1 15 mg/kg を3週間に1回、計3回投与することにより、有意な抗腫瘍活性が認められた。溶媒投与群と比較し、腫瘍体積の倍加時間は約19倍に延長され、試験期間中に8匹中5匹で腫瘍の完全な退縮が認められた。しかし、5匹とも Day 71から Day 164の間に腫瘍の再増殖が認められた。同様の腫瘍増殖遅延効果が、週1回5 mg/kg の9回投与群においても認められた (溶媒投与群に対し約16倍)。本投与群で完全な腫瘍退縮が認められたのは、8匹中1匹であり、Day 86には腫瘍の再増殖が認められた。週1回10 mg/kg 9回投与群では、溶媒対照群に比べ約30倍の腫瘍増殖遅延効果が認められ、8匹中5匹で完全な腫瘍退縮が認められた。しかし、この内4匹では Day 136までに腫瘍の再増殖が認められた。T-DM1の週1回3.3 mg/kg 9回投与群では完全な腫瘍退縮を示した個体は無く、溶媒投与群との比較で腫瘍増殖の遅延効果は4倍であった。なお、T-DM1の曝露は、血清中濃度に基づいて確認した。</p> <p>T-DM1の総投与量が一致している2投与群、週1回5 mg/kg 9回投与群及び3週間に1回15 mg/kg 3回投与群において、腫瘍体積の倍加時間には統計学的な有意差は認められず、同程度の腫瘍増殖抑制効果を示した。</p>

2.6.3.2.2.6 BT-474EEI 乳癌細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果

資料番号	4.2.1.1-11
報告書 タイトル	Response of BT474EI tumor to 3 doses of trastuzumab-MCC-DM1 administered as an every 3 week regimen in beige nude mice
試験方法	<p>腫瘍細胞：BT474EEI 細胞（本細胞株は、BT474EI と呼称されていた時期があり、本報告書では旧称を使用している）</p> <p>細胞移植：1匹あたり 2×10^7 個ずつ 50% Matrigel (phenol red free) に混ぜた状態で No.2 乳腺脂肪組織に同所性移植</p> <p>移植動物：雌バージュヌードマウス</p> <p>主な測定項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> 腫瘍体積の計測及び一般状態の観察 <p>いずれも試験開始後最初の10週間は週2回、その後は週1回。</p> <p>腫瘍体積 (mm^3) = (腫瘍長径 × 腫瘍短径²) × 0.5</p> <p>腫瘍体積の倍加時間及び完全退縮率を比較するため、分散分析 (ANOVA) 及び Tukey-Kramer HSD 検定を用いた。統計解析は、JMP ソフトウェア (version 5.1.2) を用いて実施した。</p>
投与方法	<p>腫瘍細胞を移植した11日後に、各群の平均腫瘍体積が約 200 mm^3 になるように各群10匹ずつ7群 (A~G 群) に無作為化割付した。また、マウスに投与後の T-DM1 曝露を確認するため、腫瘍を移植していない H~J 群 (各群3匹) を設定した。</p> <p>A 群：溶媒 (ADC buffer) ,</p> <p>B 群：トラスツズマブ 15 mg/kg, C 群：T-DM1 0.3 mg/kg,</p> <p>D 群：T-DM1 1 mg/kg, E 群：T-DM1 3 mg/kg,</p> <p>F 群：T-DM1 10 mg/kg, G 群：T-DM1 15 mg/kg,</p> <p>H 群 (腫瘍無し) : T-DM1 0.3 mg/kg, I 群 (腫瘍無し) : T-DM1 3 mg/kg,</p> <p>J 群 (腫瘍無し) : T-DM1 15 mg/kg</p> <p>いずれの投与群においても、薬物は3週間に1回計3回、マウス尾静脈内に投与した。また、投与後のマウス血清中総トラスツズマブ等の濃度を測定した。</p>
結果	<p>BT-474EEI 腫瘍移植モデルにおいて、トラスツズマブ 15 mg/kg, T-DM1 0.3, 1, 3 mg/kg の各投与群は溶媒を投与した対照群との間で、腫瘍体積の倍加時間について有意な差を認めなかった。T-DM1 10及び15 mg/kg 投与群は、他の投与群に比べ、腫瘍体積の倍加時間は有意に長かった ($P < 0.05$, Tukey-Kramer HSD)。高用量投与した2群間では、腫瘍体積の倍加時間に有意な差を認めなかったものの、T-DM1 15 mg/kg 投与群では、60%の個体で腫瘍が完全に退縮し、他の投与群との間で有意差が認められた ($P < 0.05$, Tukey-Kramer HSD)。なお、各薬物の曝露は、血清中濃度に基づいて確認した。</p>

2.6.3.2.2.7 BT-474EEI 乳癌細胞移植モデルでの投与スケジュール比較

資料番号	4.2.1.1-12
報告書 タイトル	Dose response of trastuzumab-MCC-DM1 (administered on a weekly or biweekly basis) against BT474EI xenograft tumors in beige nude mice
試験方法	<p>腫瘍細胞：BT474EEI 腫瘍（本細胞株は、BT474EI と呼称されていた時期があり、本報告書では旧称を使用している）</p> <p>細胞移植：1匹あたり 2×10^7 個ずつ 50% Matrigel (phenol red free) に混ぜた状態で No.2 乳腺脂肪組織に同所性移植</p> <p>移植動物：雌バージュヌードマウス</p> <p>主な測定項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> 腫瘍体積の計測及び一般状態の観察 <p>いずれも試験開始後最初の10週間は週2回、その後試験終了時まで週1回。</p> <p>腫瘍体積 (mm^3) = (腫瘍長径 \times 腫瘍短径²) \times 0.5</p> <p>腫瘍体積の倍加時間及び完全退縮率を比較するため、分散分析 (ANOVA) 及び Tukey-Kramer HSD 検定を用いた。統計解析は、JMP ソフトウェア (version 5.1.2) を用いて実施した。</p>
投与方法	<p>腫瘍細胞を移植した12日後に、各群の平均腫瘍体積が $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ になるように各群8匹ずつ8群に無作為化割付した。T-DM1の総投与量を30, 45又は90 mg/kg とし、以下のように、週1回計9回投与、2週間に1回計5回投与、3週間に1回計3回投与した。</p> <p>A 群：溶媒 (ADC buffer) , 1週間に1回計9回投与</p> <p>B 群：T-DM1 15 mg/kg, 3週間に1回計3回投与, T-DM1の総投与量45 mg/kg</p> <p>C 群：T-DM1 3.3 mg/kg, 1週間に1回計9回投与, T-DM1の総投与量30 mg/kg</p> <p>D 群：T-DM1 5 mg/kg, 1週間に1回計9回投与, T-DM1の総投与量45 mg/kg</p> <p>E 群：T-DM1 10 mg/kg, 1週間に1回計9回投与, T-DM1の総投与量90 mg/kg</p> <p>F 群：T-DM1 6 mg/kg, 2週間に1回計5回投与, T-DM1の総投与量30 mg/kg</p> <p>G 群：T-DM1 9 mg/kg, 2週間に1回計5回投与, T-DM1の総投与量45 mg/kg</p> <p>H 群：T-DM1 18 mg/kg, 2週間に1回計5回投与, T-DM1の総投与量90 mg/kg</p> <p>Day 0からマウス尾静脈内に投与した。また、投与後のマウス血清中総トラスツズマブ濃度及び T-DM1濃度を測定した。</p>
結果	<p>すべての T-DM1投与群において、腫瘍体積の倍加時間が、溶媒を投与した対照群と比較し有意に延長された ($P < 0.05$, Tukey-Kramer HSD)。T-DM1投与群の内、週1回10 mg/kg 投与群、2週間に1回18 mg/kg 投与群、2週間に1回9 mg/kg 投与群及び3週間に1回15 mg/kg 投与群で強い抗腫瘍効果が示されたが、これらの投与群間に統計学的な有意差は認められなかった。また、試験期間中に腫瘍の完全退縮が認められた個体の比率は、週1回10 mg/kg 投与群、2週間に1回18 mg/kg 投与群、3週間に1回15 mg/kg 投与群において高く、順に75%, 75%, 63%であった。なお、T-DM1の曝露は、血清中濃度に基づいて確認した。</p>

2.6.3.2.2.8 KPL-4乳癌細胞移植モデルにおける抗腫瘍効果

資料番号	4.2.1.1-13
報告書 タイトル	Effect of single agent or combinations of pertuzumab and trastuzumab-MCC-DM1 on KPL-4 tumors inoculated into the mammary fat pad of SCID beige mice
試験方法	<p>本試験は、T-DM1と抗 HER2抗体ペルツズマブとの併用投与を評価するため実施したが、試験結果については、T-DM1単独投与群に限定して記載した。</p> <p>腫瘍細胞：KPL-4細胞</p> <p>細胞移植：1匹あたり 3×10^6 個ずつ50%Matrigel (phenol red free) に混ぜた状態で No.2/3乳腺脂肪組織に同所性移植</p> <p>移植動物：雌 SCID ベージュマウス</p> <p>主な測定項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> 腫瘍体積の計測及び一般状態の観察 <p>腫瘍体積の計測は Day 60まで週2回、その後 Day 95まで週1回実施した。また、マウスの一般状態は、試験終了まで週2回観察した。</p> <p>腫瘍体積 (mm^3) = (腫瘍長径 \times 腫瘍短径²) \times 0.5</p>
投与方法	<p>腫瘍細胞を移植した11日後に、各群の平均腫瘍体積が約265 mm^3になるように各群8匹ずつ8群に無作為化割付した。</p> <p>第1群：溶媒 (ADC buffer) 単回静脈内投与</p> <p>第2群：ペルツズマブ単独投与群 (投与量等は省略)</p> <p>第3群：T-DM1 0.3 mg/kg 単回静脈内投与</p> <p>第4群：T-DM1 1 mg/kg 単回静脈内投与</p> <p>第5群：T-DM1 3 mg/kg 単回静脈内投与</p> <p>第6群～第8群：T-DM1とペルツズマブの併用投与群 (投与量等は省略)</p>
結果	<p>腫瘍体積の倍加時間は、溶媒投与群 (10.4日) に対し、T-DM1 0.3 mg/kg では14.8日、1 mg/kg 投与群では22.3日、3 mg/kg 投与群では75.4日であった。3 mg/kg 投与群では、持続的な腫瘍の退縮が認められた。</p>

2.6.3.2.2.9 KPL-4乳癌細胞移植モデルにおけるトラスツズマブとの比較

資料番号	4.2.1.1-14
報告書 タイトル	Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. Cancer Res 2008;68:9280-90.
試験方法	腫瘍細胞：KPL-4細胞 細胞移植：1匹あたり3 × 10 ⁶ 個ずつ50%Matrigel に混ぜた状態で乳腺脂肪組織に同所性移植 移植動物：雌 SCID ベージュマウス 主な測定項目： ・腫瘍体積を週2回計測。
投与方法	各群の平均腫瘍体積が約300 mm ³ になるように各群8匹ずつ3群に無作為化割付した。 第1群：溶媒（ADC buffer） 第2群：トラスツズマブ15 mg/kg 週1回，計4回腹腔内投与 第3群：T-DM1 15 mg/kg 単回静脈内投与 トラスツズマブの初回投与は，2倍量（30 mg/kg）を投与した。
結果	T-DM1投与群では，投与開始後126日の観察期間を通じて持続的で著しい腫瘍退縮効果が認められた。一方，トラスツズマブ投与群では，投与期間中は腫瘍体積が縮小したものの，投与完了後，腫瘍は速やかに再増殖した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当なし

2.6.3.4 安全性薬理試験

2.6.3.4.1 DM1：hERG 試験

表 2.6.3.4.1-1 DM1：hERG 試験（Study ■-0234）

Test Article: DM1

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Concentrations (μM)	No./Sex Per Group	Noteworthy Findings	Study No.
Human Embryonic kidney cells	<i>In vitro</i>	NA	DM1: 2.6, 8.8, 29.5	NA	hERG assay: DM1 inhibited hERG potassium current by (Mean ± SEM; n = 3) 0.3 ± 0.6% at 2.6 μM, 1.0 ± 0.5% at 8.8 μM and 2.5 ± 0.4% at 29.5 μM versus 0.6 ± 0.3% in control. IC ₂₀ and IC ₅₀ were estimated to be greater than 29.5 μM.	■-0234 GLP

NA = not applicable

2.6.3.4.2 T-DM1 : 雌カニクイザル単回静脈内投与による安全性薬理試験

表 2.6.3.4.2-1 T-DM1 : 雌カニクイザル単回静脈内投与による安全性薬理試験 (3週間の回復期間) (Study ■-1031-1605)

Test Article: T-DM1

Species/Strain: Cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) Initial Age: 3 to 6 years Date of First Dose: ■■■■■■ Special Features: Cardiovascular telemetry Highest Non-Severely Toxic Dose: NA		Duration of Dosing: Single dose Duration of Post-dose: 22 Days Method of Administration: Intravenous Vehicle/Formulation: T-DM1 vehicle		Study No.: ■-1031-1605 Study Title: A Single Dose Intravenous Cardiovascular Safety Pharmacology Study of Trastuzumab-MCC-DM1 (PRO132365) Administered to Female Cynomolgus Monkeys with a 3 Week Recovery Period GLP Compliance: Yes	
Dose (mg/kg)		0 (Control)	3	10	30
Number of Animals		F: 4	F: 4	F: 4	F: 4
Noteworthy Findings					
Died or Sacrificed Moribund		—	—	—	—
Body Weight		—	—	—	—
Food Consumption		—	—	—	—
Clinical Observations ^a		—	—	—	—
Hemodynamics					
Systolic Pressure	Onset	—	—	—	Day 3
	Day 5 (%) ^b	107.5 mmHg	6.8	5.6	22.5
	Duration	—	—	—	19 Days
Diastolic Pressure	Onset	—	—	—	Day 3
	Day 5 (%) ^b	69.5 mmHg	12.9	8.6	27.6
	Duration	—	—	—	19 Days

表 2.6.3.4.2-1 T-DM1 : 雌カニクイザル単回静脈内投与による安全性薬理試験 (3週間の回復期間) (Study ■-1031-1605) (続)

Test Article: T-DM1

Dose (mg/kg)		0 (Control)	3	10	30
Number of Animals		F: 4	F: 4	F: 4	F: 4
Mean Arterial Pressure	Onset	—	—	—	Day 3
	Day 5 (%) ^b	88.8 mmHg	9.9	7.0	24.3
	Duration	—	—	—	19 Days
Pulse Pressure	Onset	—	—	—	Day 5
	Day 15 (%) ^b	37.0 mmHg	- 13.8	- 18.4	16.5
	Duration	—	—	—	10 Days
Heart Rate	—	—	—	—	
Respiration	Frequency	—	—	—	—
	Depth	—	—	—	—
Electrocardiography	RR interval	—	—	—	—
	QT interval ^c	226 mSec	- 10.2*	2.7	- 10.2*
	QTc interval	—	—	—	—
Clinical Pathology ^d	—	—	—	—	

— = No noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$; QT = interval from electrocardiogram Q wave to the end of the T wave;

QTc = QT interval corrected for heart rate; RR = interval between two consecutive R waves in the electrocardiogram.

^a No clinical observations were considered to be test article related.

^b The day with peak mean difference between the control and high-dose animals. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

^c At 4 hours post dose.

^d Hematology and clinical chemistry including creatine kinase isoenzymes and troponins I and T.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.3.5.1 トラストズマブ共存下における抗腫瘍効果

資料番号	4.2.1.4-1
報告書 タイトル	The influence of HERCEPTIN [®] on MMTV-HER2 Fo5 tumor response to trastuzumab-DM1 conjugates
試験方法	<p>T-DM1の抗腫瘍効果に対するトラストズマブの影響について検討した。</p> <p>腫瘍細胞：MMTV-HER2 Fo5乳腺腫瘍</p> <p>細胞移植：約2×2 mmの小切片とし，No.2乳腺脂肪組織に同所性移植</p> <p>移植動物：雌ヌードマウス</p> <p>主な測定項目：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・腫瘍体積の計測及び一般状態の観察 <p>いずれも試験開始後28日まで週2回実施した。</p> <p>本試験では，トラストズマブの血清中濃度を約80 µg/mLに維持した条件下で，T-DM1の抗腫瘍効果に及ぼすトラストズマブの影響について検討した。</p> <p>トラストズマブ濃度80 µg/mLとは，トラストズマブ治療を受けた患者の血清中濃度に近く，T-DM1投与時に残存するトラストズマブ濃度として最も可能性が高いと想定される。</p> <p>統計解析には，分散分析（ANOVA）及び Tukey-Kramer HSD 検定を用いた（JMP ソフトウェア version 5.1.2）。</p>
投与方法	Day 0にトラストズマブあるいは抗 IL-8抗体（コントロール）各15 mg/kgをボラス静脈内投与し，4時間後から同じ抗体を埋め込み型の浸透圧ポンプを用いて，約25日間0.5 mg/kg/dayの用量で緩徐に腹腔内に持続注入した。Day 1にT-DM1 10 mg/kgを単回静脈内投与した。
結果	<ul style="list-style-type: none"> ・腫瘍増殖抑制作用 <p>トラストズマブ共存下で T-DM1を投与したトラストズマブ + T-DM1群は，コントロール抗体共存下で T-DM1を投与した抗 IL-8抗体 + T-DM1群に比べ，有意差は示さないものの，わずかに強い腫瘍増殖抑制効果を示した。トラストズマブは，マウスでの腫瘍移植モデルにおいて，T-DM1による腫瘍増殖抑制効果に対し拮抗的な阻害作用を示さないことが示唆された。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・（参考）トラストズマブ及びトラストズマブ結合体の濃度推移 <p>トラストズマブのみをボラス投与後，点滴注入した投与群では，Day 7におけるトラストズマブの平均血清中濃度は約100 µg/mLであり，Day 28における約25 µg/mLまで徐々に低下した。投与後7日目では，トラストズマブ濃度の目標値（約80 µg/mL）を上回っているものの，その後の試験期間中は維持できなかった。トラストズマブと T-DM1を併用投与した群では，総トラストズマブ濃度（DM1結合型及び遊離トラストズマブの総計）は，トラストズマブ単独投与群と同程度ないしやや高くなった。T-DM1に対し，10～20倍トラストズマブが過剰になる条件は25日間維持された。</p>