



サノフィ株式会社

ザルトラップ点滴静注 100mg／同 200mg

CTD 第二部 － 非臨床概要

2.6.1 緒言

Total number of pages: 8

目 次

略号と用語の定義	3
1 緒言	4
1.1 血管内皮増殖因子及びその受容体	4
1.2 Aflibercept の背景	5
参 考 文 献	7

略号と用語の定義

CHO	チャイニーズハムスター卵巢（Chinese hamster ovary）
Ig	免疫グロブリン（Immunoglobulin）
K _D	平衡解離定数（Equilibrium dissociation constant）
PlGF	胎盤増殖因子（Placental growth factor）
VEGF	血管内皮増殖因子（Vascular endothelium growth factor）
VEGFR	血管内皮増殖因子受容体（Vascular endothelium growth factor receptor）
VEGF Trap	Aflibercept
VPF	血管透過性因子（Vascular permeability factor）

1 緒言

1.1 血管内皮増殖因子及びその受容体

血管内皮増殖因子（VEGF）又は血管透過性因子（VPF）は、2種類の高親和性受容体、すなわち、主に血管内皮に存在する Flt-1（VEGFR-1）及び Flk-1（VEGFR-2）に結合し、これを活性化させるサイトカインである(1)。VEGFは正常組織及び腫瘍組織の増殖に必要な新たな血管の形成（血管新生）を促進させる内皮細胞分裂促進因子であるとともに、血管の透過性を強力に亢進させる作用を有する(2)。増殖中の腫瘍の一般的な特徴として、組織中の酸素濃度が低下すると（低酸素状態）、VEGFの発現が亢進する(3)。

ヒト及びその他の哺乳動物の VEGF の蛋白質ファミリーには、VEGF（VEGF-A と呼ばれる）の他に、胎盤増殖因子（PlGF）、VEGF-B、VEGF-C 及び VEGF-D も含まれる。VEGF ファミリーに属するすべての因子は二量体を形成し、3種類の関連するチロシンキナーゼ型受容体、すなわち、VEGFR-1（flt-1；fms 様チロシンキナーゼ 1 としても知られる）、VEGFR-2（flk-1；胎児肝キナーゼ 1 としても知られる）及び VEGFR-3（flt-4；fms 様チロシンキナーゼ 4 としても知られる）の 1 つ以上にリガンドとして結合する(4)(5)。これらの受容体は、それぞれ細胞外領域に 7 つの免疫グロブリン（Ig）様ドメインを有する。リガンド結合により、VEGFR の二量体形成及び自己リン酸化が起こり、細胞機能の調節に関与する細胞内シグナル伝達カスケードが惹起される。

VEGFR-2 は主に血管内皮細胞に発現するのに対して、VEGFR-1 は内皮細胞に加えて、好中球、単球、マクロファージ、血管周囲細胞などの内皮細胞以外の数種の細胞にも発現する。VEGF に対する親和性は、VEGFR-2 に比べて VEGFR-1 の方が高いが、内皮細胞で VEGF が結合することにより二量体化が起こっても、VEGFR-1 はわずかに活性化されるだけである。したがって、内皮細胞に対するすべての VEGF アイソフォームの作用は、主に VEGFR-2 へのリガンド結合及び活性化を介していると考えられる。その活性は弱いですが、VEGF による VEGFR-1 の活性化は単球の遊走を誘発する。関連分子である PlGF 及び VEGF-B も VEGFR-1 に結合する。VEGF とは対照的に、PlGF 及び VEGF-B はいずれも、成人における正常な血管形成及び生理的な血管新生に不可欠なものではない。しかし、VEGF 同様、PlGF は腫瘍血管新生及び病的血管リモデリングに関与していると報告されている(4)。一方、VEGF-B の役割についてはあまり知られていない。残りの VEGF ファミリーメンバーである VEGF-C 及び VEGF-D は VEGFR-3 に対して高い親和性で結合する。VEGFR-3 は主にリンパ管内皮細胞に存在するので、VEGF-C 及び VEGF-D は主にリンパ管新生の制御に関与している(5)。

VEGF ファミリーは単一の遺伝子によってコード化されるが、選択的スプライシング又は蛋白質分解的切断の結果として、複数の異なる VEGF アイソフォームが存在する(4)。PlGF を含む他の VEGF ファミリーメンバーは様々な分子量のアイソフォームとして存在する。種々の VEGF アイソフォームはすべて二量体として活性を示し、主にその分子量及び細胞外マトリックス又はニューロピリンと呼ばれる補助受容体への結合能が異なる。例えば、VEGF-A₁₆₅ はヘパリン及びニューロピリンに結合し、

2.6.1 緒言

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ (遺伝子組換え)

ヒトの腫瘍で発現する主要アイソフォームである。VEGF-A₁₂₁ も多くの組織及び病的状態で高度に発現するが、ヘパリン及びニューロピリンへの結合に関与するドメインを持たない(4)(5)。すべての VEGF アイソフォームが主に VEGFR-2 に結合し、その活性を調節することにより作用を発揮するが、発生期の血管パターン形成の制御では異なる役割を果たしていると考えられる。VEGF 同様、PlGF についても、選択的スプライシングにより複数のアイソフォームが生成し、ヘパリン及びニューロピリンに対する結合能に差が認められる。VEGF は様々な腫瘍で高度に発現し、腫瘍血管新生及び脈管形成の誘導と機能的に関連づけられている(6)。VEGF は、その発見後まもなく、膠芽腫(7)、転移性黒色腫(8)、腎細胞癌(9)、結腸・直腸癌(10) 及び肺癌(11) を含む様々な腫瘍で発現し、その発現レベルは、対応する非腫瘍組織に比べてはるかに高いことが明らかになっている。マウス腫瘍モデルを用いた試験から、VEGF を特異的に阻害することにより、腫瘍の増殖が抑制されることが明らかになっている(12)。また、他の研究から、VEGFR-2 を阻害することでも、腫瘍の増殖が強力に抑制されることが明らかになっている(13)。逆に、マウスを用いた試験で、遺伝子操作により腫瘍細胞株の VEGF を過剰発現させると、血管密度が高くなり、腫瘍の増殖が亢進した(14)。数種のヒト腫瘍において、血管新生の程度と予後の間に関連性が認められている(15)(16)(17)。VEGF は *src* ファミリーキナーゼ依存的に血管透過性を亢進させる作用も有する(18)(19)。しかし、循環血中の VEGF の大部分は非腫瘍性宿主組織によって産生されたものであり、実際に腫瘍組織に由来するものはごく一部に過ぎないことに注意が必要である(20)。

VEGF 又は VEGFR-2 を薬理的に阻害すると、血管新生が抑制され、腫瘍血管密度が低下する。VEGF を介する血管新生及び血管透過性の阻害は、様々な腫瘍タイプの増殖及び転移、並びに血管外液貯留による合併症の制御に有用であると考えられる。動物モデルを用いた複数の試験、及び最近では、臨床試験から、VEGF を標的とする癌治療法の有効性が立証されている。

1.2 Afibercept の背景

Afibercept (VEGF Trap) は VEGFR-1 の Ig2 ドメイン、VEGFR-2 の Ig3 ドメイン及びヒト IgG1 の Fc ドメインから構成される新規の遺伝子組換えヒト融合蛋白質である。本薬は VEGF に結合し、VEGF とその受容体との相互作用を抑制することにより(21)、腫瘍組織に酸素及び栄養を供給する新規血管の成長を阻害する。本薬は VEGFR-1 のリガンドである PlGF 及び VEGF-B にも結合する。臨床で推定される本薬の作用機序として、*in vivo* で本薬がこれらのリガンドに結合する結果、腫瘍血管新生が阻害されるとともに、既存の腫瘍血管網を退縮させ、VEGF による血管透過性の亢進を抑制すると考えられる。

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) K1 細胞を用いて、遺伝子組換え蛋白質である afibercept を発現させ、得られたホモ二量体糖蛋白質を濾過及びクロマトグラフィー手法を組み合わせで精製する。複数の *ex vivo* 分析系で、精製した組換え afibercept が VEGF に結合し、その活性を阻害することが明らかになっている。例えば、afibercept は、VEGF、VEGF-A₁₆₅ 及び VEGF-A₁₂₁ のヘパリン結合型及びヘパリン非結合型アイソフォームの両方に結合し、その平衡解離定数 (K_D) は、それぞれ 0.5 pmol/L

2.6.1 緒言

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

及び 0.36 pmol/L と同程度である。本薬が高い親和性で VEGF と結合する結果、複合体が形成され、VEGF と細胞表面に存在する VEGF 受容体との相互作用が阻害される。本薬はこの他にも、ヒト胎盤増殖因子-2 (PlGF-2) 及び VEGF-B の 2 種類の VEGFR-1 リガンドにも高い親和性で結合し、その K_D 値は、それぞれ 39 pmol/L 及び 1.92 pmol/L と算出されている。

様々なマウス及びヒト腫瘍同種移植及び異種移植モデルにおいて、本薬は単剤及び化学療法剤との併用で抗腫瘍効果及び抗血管新生効果を示すことが立証されている。また、マウス卵巣癌モデルにおいて、腹水産生抑制効果も認められている。癌患者を対象とした臨床試験では、本薬が腫瘍血管網を退縮させ、新規血管の成長を抑制し、腫瘍血管の異常漏出を低下させることにより、原発性腫瘍及び転移性腫瘍の増殖を阻害する作用について検討されている。本薬は、腫瘍血管系の密度を低下させ、漏出性の腫瘍血管から漏出した栄養及び組織マトリックス成分の供給を低下させるという 2 つのメカニズムにより、腫瘍の増殖を抑制すると期待される。

本薬はマウス、ラット、ウサギ及び霊長類の VEGF 及び PlGF アイソフォームに対して、ヒトリガンドと同程度の親和性で結合することから、非臨床薬物動態試験及び毒性試験は、これらの動物種を用いて実施した。薬物動態試験では、本薬を静脈内又は皮下投与経路で全身性に投与したときの *in vivo* 分布及び消失を評価し、非臨床安全性試験の裏付けデータを収集した。また、マウス、ラット、ウサギ及びサルを含む複数の動物種を用いた単回及び反復投与毒性試験を実施し、本薬の毒性プロファイルを検討した。これらの非臨床試験から、本薬を全身性に投与したときに腫瘍血管新生及び増殖が効果的に抑制されると共に、良好な安全性プロファイルが認められることが明らかになった。

非臨床試験結果から、様々な種類の腫瘍に対して、本薬を数種の標準的化学療法と併用して使用できる可能性が裏付けられた。これらのデータは、以下に示すような、転移性結腸・直腸癌の二次治療を適応症として、本薬を使用することを支持している。

本申請において予定している「効能又は効果」及び「用法及び用量」を以下に示す。

効能又は効果

治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌

用法及び用量

他の抗悪性腫瘍剤との併用において、通常、成人に 1 日 1 回、アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）として 4 mg/kg（体重）を 1 時間かけて点滴静注する。投与間隔は 2 週間とする。なお、患者の状態により適宜減量する。

参 考 文 献

1. Dvorak HF, Dvorak AM, Manseau EJ, Wiberg L, Churchill WH. Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *J Natl Cancer Inst* 1979;62:1459-72.
2. Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, Churchill WH, Dvorak AM, Galli SJ, et al. Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *J Immunol* 1979;122:166-74.
3. Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol*. 2002;29(Suppl 16):3-9.
4. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science* 2005;109:227-41.
5. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. 2002;1:219-27.
6. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol*. 2001;106:148-56.
7. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*. 1992;359:845-8.
8. Salven P, Heikkilä P, Joensuu H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 1997;76:930-4.
9. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak H, et al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol*. 1993;143:1255-62.
10. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res*. 1993;53:4727-35.
11. Ohta Y, Endo Y, Tanaka M, Shimizu J, Oda M, Hayashi Y, et al. Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res*. 1996;2:1411-6.
12. Kim ES, Serur A, Huang J, Manley CA, McCrudden KW, Frischer JS, et al. Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002;99: 11399-404.
13. Shaheen RM, Tseng WW, Vellagas R, Liu W, Ahmad SA, Jung YD, et al. Effects of an antibody to vascular endothelial growth factor receptor-2 on survival, tumor vascularity, and apoptosis in a murine model of colon carcinomatosis. *Int J Oncol*. 2001;18:221-6.

2.6.1 緒言

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ (遺伝子組換え)

14. Claffey KP, Brown LF, del Aguila LF, Tognazzi K, Yeo KT, Manseau EJ, et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res.* 1996;56:172-81.
15. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, et al. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:1603-12.
16. Bigler SA, Deering RE, Brawer MK. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol.* 1993;24:220-6.
17. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324:1-8.
18. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995;146:1029-39.
19. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresch DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell.* 1999;4:915–24.
20. Rudge JS, Holash J, Hylton D, Russell M, Jiang S, Leidich R, et al. VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104: 18363-70.
21. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, et al. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:11393-8.



サノフィ株式会社

ザルトラップ点滴静注 100mg／同 200mg

CTD 第二部 － 非臨床概要

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 49

目 次

略号と用語の定義	7
1 まとめ	9
2 効力を裏付ける試験	12
2.1 IN VITRO 活性	12
2.1.1 VEGF ファミリー関連リガンドに対する結合	12
2.1.2 ヒト臍帯静脈内皮細胞における VEGF-A ₁₆₅ 依存性受容体リン酸化の阻害作用	13
2.1.3 VEGF 誘導性カルシウム動員の阻害作用	14
2.1.4 VEGF-A ₁₆₅ 誘導性ヒト内皮細胞増殖の阻害作用	14
2.1.5 ラット大動脈輪モデルにおける血管形成の阻害作用	14
2.1.6 補体依存性細胞傷害作用及び抗体依存性細胞傷害作用	14
2.2 IN VIVO 活性	15
2.2.1 In vivo における腫瘍血管新生及び増殖の阻害	16
2.2.2 In vivo における VEGF : aflibercept 複合体の形成	16
2.2.3 腹水産生腎癌細胞株 RENCA の同所移植モデルに対する aflibercept の活性	18
2.2.4 遺伝子改変脾臓腫瘍モデル Rip1Tag2 マウスにおける aflibercept の活性	19
2.2.5 Aflibercept 単独投与時の皮下移植腫瘍に対する抗腫瘍効果スペクトル	20
2.2.5.1 卵巣癌	20
2.2.5.2 黒色腫	22
2.2.5.3 前立腺癌	22
2.2.5.4 乳癌	24
2.2.5.5 脾癌	24
2.2.5.6 胃癌	25
2.2.5.7 結腸癌	26

2.2.5.8	肺癌.....	27
2.2.5.9	神経芽腫.....	28
2.2.5.10	横紋筋肉腫.....	29
2.2.5.11	ユーイング肉腫.....	29
2.2.5.12	線維肉腫.....	29
2.2.5.13	リンパ腫.....	30
2.2.6	Aflibercept と化学療法剤の併用投与	30
2.2.6.1	Aflibercept とオキサリプラチンの併用投与	31
2.2.6.2	Aflibercept と 5-フルオロウラシルの併用投与	32
2.2.6.3	Aflibercept とドセタキセルの併用投与.....	32
2.2.6.4	Aflibercept とイリノテカンの併用投与.....	33
2.2.6.5	Aflibercept とパクリタキセルの併用投与.....	34
2.2.6.6	Aflibercept と化学療法剤併用投与時の活性のまとめ.....	35
3	副次的薬理試験.....	36
4	安全性薬理試験.....	37
4.1	中枢神経系.....	37
4.2	心血管系.....	37
4.2.1	正常マウス組織の血管密度への影響	37
4.2.2	げっ歯類の血圧に及ぼす影響	38
4.2.3	Aflibercept 誘発性血圧上昇に対する各種降圧剤の影響	39
4.3	血栓形成に対する影響.....	39
4.4	呼吸系	40
4.5	腎／泌尿器系	40
4.6	創傷治癒に対する影響.....	40
5	薬力学的薬物相互作用試験	42
6	考察及び結論	43

7	図表.....	47
---	---------	----

	参 考 文 献.....	48
--	--------------	----

表 目 次

表 1 -VEGF ファミリー関連リガンドとの結合相互作用パラメータ（BiaCore 法）	13
表 2 -Aflibercept の in vitro 活性	15
表 3 - 神経膠腫細胞株 C6 移植マウスにおける aflibercept の薬物動態及び薬力学的活性.....	17
表 4 - 横紋筋肉腫細胞株 A673 を異種移植した SCID マウスにおける aflibercept の薬物動態及び薬力学的活 性.....	18
表 5 - 卵巣癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果	21
表 6 - 黒色腫に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果	22
表 7 - 前立腺癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果	23
表 8 - 乳癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果	24
表 9 - 膀胱癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果.....	25
表 10 - 胃癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果.....	26
表 11 - 結腸癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果	27
表 12 - 肺癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果.....	28
表 13 - 神経芽腫に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果	28
表 14 - ユーイング肉腫に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果.....	29
表 15 - 線維肉腫に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果	30
表 16 - リンパ腫に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果	30
表 17 - マウス結腸腺癌細胞株 C51 移植 SCID マウスを用いた aflibercept+オキサリプラチン併用投与の評 価	31
表 18 - 乳癌細胞株 MA13/C 移植 Swiss 雌ヌードマウスを用いた aflibercept+5-FU 併用投与の評価	32
表 19 - 黒色腫細胞株 B16 移植 BALB/c ヌードマウスを用いた aflibercept+ドセタキセル併用投与の評価33	
表 20 - ヒト結腸癌細胞株 HCT 116 移植 NCR 雌ヌードマウスを用いた aflibercept+イリノテカン併用投与 の評価.....	34
表 21 - Aflibercept と化学療法剤を併用したときの in vivo 抗腫瘍効果.....	35

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 22 - Aflibercept 単独皮下投与時の in vivo 抗腫瘍効果.....	43
--	----

図 目 次

図 1 -Aflibercept（VEGF Trap）の概略図	10
図 2 - Rip1Tag2 マウスにおける CD105 及び CD31 陽性腫瘍血管系に対する aflibercept の影響	20
図 3 -進行期ヒト卵巣腺癌細胞株 SK-OV-3 移植 SCID マウスを用いた aflibercept の評価：用量反応試験	21
図 4 -進行期ヒト前立腺癌細胞株 DU 145 移植 SCID マウスを用いた aflibercept の評価：用量反応試験 ..	23

略号と用語の定義

5-FU	5-フルオロウラシル (5-fluorouracil)
ACE	アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin converting enzyme)
ADCC	抗体依存性細胞傷害 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
adm	投与 (Administration)
BWL	体重減少 (Body weight loss)
CDC	補体依存性細胞傷害 (Complement-dependent cytotoxicity)
CHO	チャイニーズハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary)
CR	完全退縮 (Complete regression)
ECG	心電図 (Electrocardiogram)
HDMEC	ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (Human dermal microvascular endothelial cells)
HDT	試験最大用量 (Highest dose tested)
HNTD	最大無毒性用量 (Highest non-toxic dose)
HUVEC	ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells)
IC ₅₀	50%阻害濃度 (Concentration inducing 50% of inhibition)
IgG1	免疫グロブリン G1 (Immunoglobulin G1)
ILS	生存期間延長 (Increase in life span)
IV	静脈内 (Intravenous)
ka	結合速度定数 (Association rate constant)
kd	解離速度定数 (Dissociation rate constant)
K _D	平衡解離定数 (Equilibrium dissociation constant)
kDa	キロダルトン (Kilodalton)
LDT	試験最少用量 (Lowest dose tested)
PECAM	血小板内皮細胞接着分子 (Platelet endothelial cell adhesion molecule)
PIGF	胎盤増殖因子 (Placental growth factor)
PO	経口 (Per os)
PR	部分退縮 (Partial regression)
Rip1 Tag2	Rat insulin promoter 1 T antigen 2
SC	皮下 (Subcutaneous)
SCID	重症複合免疫不全 (Severe combined immunodeficient)
T/C	腫瘍増殖抑制 (Tumor growth inhibition)
T-C	腫瘍増殖遅延 (Tumor growth delay)

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

Td	腫瘍倍加時間（Tumor doubling time）
VEGF	血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor）
VEGFR	血管内皮増殖因子受容体（Vascular endothelial growth factor receptor）
VEGF Trap	Aflibercept、AVE0005

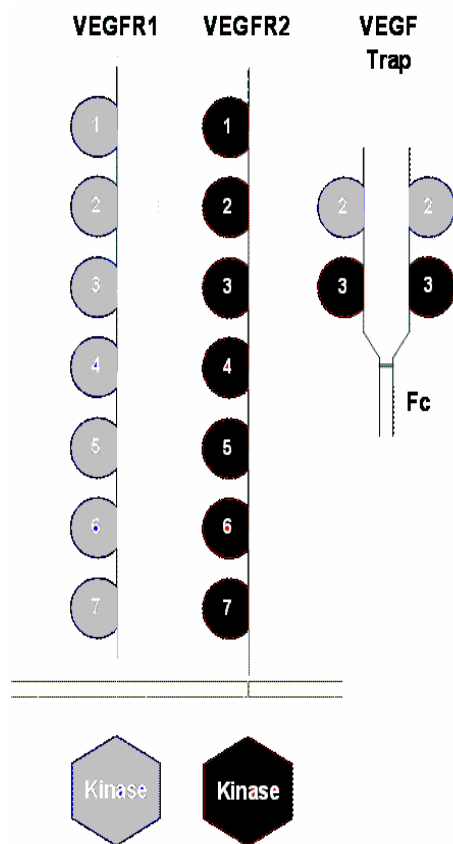
1 まとめ

血管内皮増殖因子 (VEGF) は、種々の腫瘍における血管新生を含めて、生理的及び病的な様々な血管新生に関与していることが明らかになっている。Aflibercept (VEGF Trap) は、ヒト血管内皮増殖因子受容体-1 (VEGFR-1) の第2 Ig ドメインとヒト血管内皮増殖因子受容体-2 (VEGFR-2) の第3 Ig ドメインを融合し、さらにそれをヒト免疫グロブリン G1 (IgG1) の定常領域 Fc に融合した遺伝子組換え蛋白質である。本薬は分子量 115 キロダルトン (kDa) の二量体糖蛋白質であり、約 10% の糖鎖付加により、総分子量は 115 kDa となる。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) K1 細胞を用いて、遺伝子組換え蛋白質である aflibercept を発現させ、精製した後、皮下又は静脈内投与用の滅菌液として製剤化される。

VEGF ファミリーは単一の遺伝子によってコード化されるが、選択的スプライシング又は蛋白分解性の切断の結果、複数の異なる VEGF アイソフォームが存在する。胎盤増殖因子 (PlGF) を含む他の VEGF ファミリーメンバーも様々な分子量のアイソフォームが存在する。種々の VEGF アイソフォームはすべて二量体として活性を示し、主にその分子量及び細胞外マトリックス又はニューロピリンと呼ばれる補助受容体への結合能が異なる。例えば、VEGF-A₁₆₅ はヒト腫瘍で発現する主要なアイソフォームであり、ヘパリン及びニューロピリンに結合する。VEGF-A₁₂₁ も多くの組織及び病態で高発現するが、ヘパリン及びニューロピリンへの結合に関与するドメインを持たない。

本薬はヒト VEGF-A に対して非常に高い結合親和性を示し、VEGF-A₁₆₅ 及び VEGF-A₁₂₁ アイソフォームの平衡解離定数 (K_D) は、それぞれ 0.5 pmol/L 及び 0.36 pmol/L と算出されている。本薬は高親和性で VEGF-A と結合して複合体を形成し、VEGF と細胞表面に存在する受容体 VEGFR-1 及び VEGFR-2 との相互作用を阻害する(1)。この VEGF : aflibercept 複合体濃度は *in vivo* で用量依存的に増加し、体内で合成されたすべての VEGF が捕捉された時点で最高値に達し、これ以上になると、血液中の遊離形 aflibercept 濃度が用量依存的に上昇する。また、本薬は VEGFR-1 のリガンドでもあるヒト PlGF-2 にも高い親和性 ($K_D = 39$ pmol/L) を示す。

図 1 -Aflibercept（VEGF Trap）の概略図



関連受容体である VEGFR-1 及び VEGFR-2 は、それぞれ細胞外領域に 7 つの Ig ドメインを、細胞内領域にチロシンキナーゼドメインを有する。Aflibercept は VEGFR-1 の第 2 Ig ドメインと VEGFR-2 の第 3 Ig ドメインを融合し、さらにそれを IgG1 の Fc ドメインに融合した蛋白質である。

本薬は強力な VEGF 阻害剤であり、非臨床薬理試験において抗血管新生作用及び抗腫瘍効果が認められている。In vitro 薬理試験において、本薬はウサギ、ラット及びマウスの VEGF に対して高い親和性で結合することが明らかになっている。また、様々なマウス、ラット及びヒト腫瘍細胞株を移植したマウスを用いた in vivo 薬理試験において、本薬は腫瘍増殖を効果的に阻害することが示されている。さらに、他の様々な in vitro 及び in vivo モデルを用いた非臨床試験でも、本薬の薬理活性が証明されている。

安全性薬理試験において、サルに最大 30 mg/kg までの aflibercept を反復投与しても、中枢神経系及び ECG パラメータに対する明らかな影響は認められなかった。マウスに 2.5 mg/kg 以上の aflibercept を 2～4 週間皮下投与したとき、主に肝臓、膵島及び甲状腺濾胞内の微小血管密度が低下した。マウスに 2.5 mg/kg 以上、ラットに 0.5 mg/kg 以上の aflibercept を単回皮下投与したとき、収縮期及び拡張期血圧が用量依存的に中等度に上昇した（最大上昇 15～20 mm Hg）。この作用持続時間は血清中遊離形 aflibercept 濃度と密接に関連していた。ラットにおける血圧上昇は、数種の降圧薬を投与することにより回復した。

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

ウサギ電解質障害モデルにおいて、30 mg/kg までの aflibercept を反復静脈内投与しても、静脈及び動脈血栓形成は誘発されなかった。また、ラットに 250 mg/kg までの aflibercept を単回静脈内持続投与しても、呼吸器系パラメータに生物学的に重要な変化は誘発されなかった。C57BL/6 雄マウスに aflibercept 25 mg/kg を週 2 回 4 週間皮下投与しても、腎機能に対して生物学的に問題となる影響を及ぼさなかった。ウサギ切除創及び切開創モデルに aflibercept を反復静脈内投与したとき、0.3 mg/kg 以上で創傷修復及び治癒が用量依存的に遅延した。全層切除創モデルにおいて、aflibercept を投与すると、線維化反応、血管新生及び再上皮化が抑制される一方、切開創モデルでは、創傷引っ張り強度（tensile strength）及び血管密度が低下した。高用量でみられたより強力かつ持続的な創傷治癒障害は、平均遊離形 aflibercept 濃度と相関しており、評価したすべての投与後時点で遊離形濃度は結合形（複合体）濃度を大幅に上回っていたが、0.3 mg/kg 投与群のウサギでは、遊離形濃度は一過性に結合形濃度を上回っただけであった。

2 効力を裏付ける試験

VEGF-A は内皮細胞の生存、遊走及び増殖に対する作用を通して、腫瘍血管新生に重要な役割を果たすメディエータである。当初、血管透過性因子として発見された VEGF-A は、内皮の防御機能を低下させる作用も有し、腫瘍関連血管からの高分子物質の漏出を亢進させる原因になると考えられる。VEGF 遺伝子ファミリーに属する他のメンバーには、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 及び PIGF が含まれる。種々の VEGF ファミリーメンバーは、様々なスプライシングを受けることから、分子量及び細胞外マトリックスへの結合の程度が異なるスプライシングアイソフォームが存在する。例えば、腫瘍由来 VEGF-A は一般に VEGF-A₁₂₁ 及び VEGF-A₁₆₅ アイソフォームとして存在する。

VEGF-A は 2 種類の受容体型チロシンキナーゼ、VEGFR-1 及び VEGFR-2 に結合し、血管新生を促進させる。これらの受容体 VEGFR-1 及び VEGFR-2 は主に血管内皮細胞表面に存在し、VEGF-A が結合すると、リン酸化され、細胞内シグナルを活性化させて、細胞の生存、遊走及び増殖を促進させる。VEGFR-1 は一部の白血球にも発現する。PIGF は VEGFR-1 のみに結合し、内皮細胞に対して作用することにより直接的に、あるいは、白血球及び内皮前駆細胞を動員することにより間接的に、血管形成を促進すると考えられる(2)(3)。VEGF-C 及び VEGF-D が結合する 3 番目の受容体 VEGFR-3 は、主にリンパ管の制御に関与している (4)。

VEGF-A、PIGF 及び VEGF-B を含む VEGF ファミリーメンバーに対する aflibercept の結合特性を in vitro で評価した。また、内因性 VEGF 受容体を発現するヒト内皮細胞を用いて、VEGF 依存性の VEGFR-2 の活性化（リン酸化）及び VEGF 誘発性増殖に対する aflibercept の影響を評価した。さらに、様々な腫瘍を移植した動物モデルを用いて腫瘍増殖抑制効果を評価した in vivo 試験において、aflibercept を単独投与及び化学療法剤と併用投与したときの抗腫瘍効果及び抗血管新生効果が示された。

2.1 IN VITRO 活性

2.1.1 VEGF ファミリー関連リガンドに対する結合

[Module 4.2.1.1-1] [Module 4.2.1.1-2] [Module 4.2.1.1-3] [Module 4.2.1.1-4]

Aflibercept は種々の VEGF-A アイソフォームに加えて、VEGFR-1 に結合することが知られている PIGF アイソフォームや VEGF-B などのリガンドに結合する。さらに、aflibercept はげっ歯類やウサギなど、ヒト以外の動物種の VEGF/PIGF リガンドファミリーメンバーに強力に結合することから、非臨床試験では、これらの動物種を使用した。ヒト及びサル種の VEGF-A のアミノ酸配列は全く同じであるため、これら 2 種類の動物種由来の VEGF-A への結合を区別することはできない。

Aflibercept と 9 種類の VEGF ファミリー関連リガンドとの相互作用に関する平衡解離定数 K_D を表面プラズモン共鳴法 (BiaCore 法) により測定した。これらのリガンドには、ヒト VEGF-A₁₆₅、ヒト VEGF-A₁₂₁、ヒト PIGF-1、ヒト PIGF-2、ヒト VEGF-B₁₀₈、ヒト VEGF-C、ヒト VEGF-D、マウス VEGF-A₁₆₄、マウ

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

ス VEGF-A₁₂₀、マウス PIGF-2、ラット VEGF-A₁₆₄ 及びウサギ VEGF-A₁₆₅ が含まれていた。Aflibercept は検討した 12 種類中 10 種類のリガンドと特異的かつ測定可能な結合相互作用を示し、測定可能な結合相互作用が認められなかったのはヒト VEGF-C 及びヒト VEGF-D のみであった。Aflibercept はヒト、マウス、ラット及びウサギ VEGF-A に対して、ピコモル濃度以下の K_D 値で高い結合親和性を示し、結合速度定数も速かった。Aflibercept はヒト及びマウス PIGF に対しても高い親和性を示した。リガンド／aflibercept 相互作用の K_D 値を表 1 に示す。

表 1 -VEGF ファミリー関連リガンドとの結合相互作用パラメータ（BiaCore 法）

リガンド	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pmol/L)
ヒト VEGF-A ₁₆₅	4.05×10^7	2.01×10^{-5}	0.497
ヒト VEGF-A ₁₂₁	3.75×10^7	1.35×10^{-5}	0.360
ヒト VEGF-B ₁₀₈	3.52×10^7	6.74×10^{-5}	1.92
ヒト PIGF-2	1.75×10^6	6.81×10^{-5}	38.8
ヒト PIGF-1	6.73×10^6	2.64×10^{-3}	392.0
マウス VEGF-A ₁₆₄	2.80×10^7	1.64×10^{-5}	0.585
マウス VEGF-A ₁₂₀	2.15×10^7	1.23×10^{-5}	0.571
マウス PIGF-2	1.64×10^7	5.45×10^{-5}	3.33
ラット VEGF-A ₁₆₄	3.67×10^7	1.73×10^{-5}	0.471
ウサギ VEGF-A ₁₆₅	3.39×10^7	2.63×10^{-5}	0.775
ヒト VEGF-C	NB	NB	NB
ヒト VEGF-D	NB	NB	NB

略語： k_a =結合速度定数、 k_d =解離速度定数、 K_D =平衡解離定数、NB=結合せず

2.1.2 ヒト臍帯静脈内皮細胞における VEGF-A₁₆₅ 依存性受容体リン酸化の阻害作用

[Module 4.2.1.1-5] [Module 4.2.1.1-6] [Module 4.2.1.1-7]

VEGF 受容体を発現するヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）は、in vitro で培養可能であり、外因性に VEGF を添加することにより、その活性化を誘導することができる。この HUVEC を用いて、VEGF-A₁₆₅ 依存性 VEGFR-2 リン酸化に対する aflibercept の阻害能を評価した。

VEGF-A₁₆₅ (1 nmol/L) を様々な濃度の aflibercept とともにインキュベートし、この混合物を HUVEC に添加して VEGFR-2 のチロシンリン酸化を刺激した。化学量論的濃度未満の aflibercept（aflibercept 濃度／VEGF-A₁₆₅ 濃度のモル比が 1 未満）では、非結合形 VEGF-A₁₆₅ によって受容体のリン酸化が誘導されたが、モル比が 1 以上になると、受容体のリン酸化が完全に阻害された。また、VEGFR-2 を発現するブタ大動脈内皮細胞を用いた試験において、VEGF-A 及び VEGF-C による VEGFR-2 のリン酸化刺激に対する aflibercept の影響を検討したとき、aflibercept は VEGF-A によって誘導した VEGFR-2 のリン酸化を効果的に阻害したが（IC₅₀ 値 3.15 nmol/L）、VEGF-C によって誘導したリン酸化は阻害

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

しなかった。これらのデータは、aflibercept が VEGF-A に結合するが、VEGF-C には結合しないことと一致している。

2.1.3 VEGF 誘導性カルシウム動員の阻害作用

[Module 4.2.1.1-5] [Module 4.2.1.1-6]

HUVEC を用いて、VEGFR-2 への VEGF-A₁₆₅ 結合及びこれに続くカルシウム動員の活性化に対する aflibercept の阻害能についても検討した。独立した 3 試験において、濃度 50 pmol/L の VEGF-A₁₆₅ によって誘導したカルシウム流入量に対する様々な濃度の aflibercept の阻害作用を検討した。Aflibercept はカルシウム動員を効果的に阻害し、その IC₅₀ 値は 1.2~1.7 nmol/L と算出された。

2.1.4 VEGF-A₁₆₅ 誘導性ヒト内皮細胞増殖の阻害作用

[Module 4.2.1.1-8]

初代培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞（HDMEC）を用いて、¹⁴C チミジンの取込みを測定することにより、VEGF 誘導性内皮細胞増殖に対する aflibercept の阻害能を評価した。成長因子を添加していない基礎培地を用いて、10 ng/mL (238 pmol/L) ヒト組換え VEGF-A₁₆₅ 存在下、細胞を培養した。VEGF-A₁₆₅、¹⁴C チミジン及び aflibercept (濃度 1 pmol/L~1 nmol/L) の存在下、HDMEC を 4 日間血清飢餓培養した。¹⁴C チミジンの取込みを測定することにより、aflibercept の影響を定量した。Aflibercept は VEGF 誘導性の HDMEC 増殖を阻害し、その IC₅₀ 値は 192 pmol/L と算出された。

2.1.5 ラット大動脈輪モデルにおける血管形成の阻害作用

[Module 4.2.1.1-9]

Ex vivo で培養したラット大動脈を用いて、血管新生に対する aflibercept の阻害作用を評価した。このモデルでは、コラーゲンゲルにラット大動脈を包埋し、新たに微小血管を分岐伸長させた。この新生血管の分岐伸長は外因性 VEGF を添加することで増幅され、血管新生阻害剤を添加することで抑制される。この大動脈輪アッセイ法を用いて、微小血管形成に対する aflibercept の影響を評価した。外植した大動脈に aflibercept (濃度 10 pmol/L~1 nmol/L) を 9 日間連続曝露した。形成した微小血管数を計数し、この血管数を対照に比べて 50%低下させる aflibercept 濃度 (IC₅₀) を算出することにより、aflibercept の影響を定量した。Aflibercept はラット大動脈からの微小血管の分岐伸長を阻害し、その IC₅₀ 値は外因性 VEGF-A (10 ng/mL、260 pmol/L) 存在下で 121 pmol/L、非存在下で 42 pmol/L であった。

2.1.6 補体依存性細胞傷害作用及び抗体依存性細胞傷害作用

[Module 4.2.1.1-10] [Module 4.2.1.1-11]

Aflibercept の活性に Fc 媒介性エフェクター機能が果たしている役割を検討するため、複数の ex vivo セルベースアッセイ法を開発し、補体依存性細胞傷害 (CDC) 作用及び抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 作用を測定した。初代培養 HUVEC 及び腫瘍細胞株 (肺癌細胞株 Calu-6、結腸癌細胞株 DLD-1 及び扁平上皮癌細胞株 A431) のいずれにおいても、aflibercept は ADCC 活性を示さなかった。同様に、初代

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

培養 HUVEC 及び腫瘍細胞株（線維肉腫細胞株 HT-1080、肺癌細胞株 Calu-6、結腸癌細胞株 DLD-1 及び扁平上皮癌細胞株 A431）のいずれにおいても、本アッセイの陽性対照であるリツキシマブ（抗 CD20 IgG1 抗体）が CD20 抗原を発現するバーキットリンパ腫細胞株 Daudi を死滅させる条件下において、aflibercept は CDC 活性を示さなかった。

これらの結果に基づいて、aflibercept は in vivo で CDC 及び ADCC 作用を媒介しないと予想され、in vivo で aflibercept は VEGF 及び他の VEGF 受容体リガンドとの結合及び捕捉を介してのみ機能することが示された。

セルベースアッセイにおける aflibercept の活性を要約して表 2 に示す。

表 2 -Aflibercept の in vitro 活性

セルベースアッセイ	Aflibercept の活性
VEGF-A ₁₆₅ （1 nmol/L）依存性 VEGFR2 リン酸化	1 nmol/L で完全阻害
VEGF-C 依存性 VEGFR-2 リン酸化	8.7 nmol/L まで阻害なし
VEGF-A ₁₆₅ （50 pmol/L）誘導性カルシウム動員	IC ₅₀ = 1.2～1.7 nmol/L で阻害
VEGF-A ₁₆₅ 誘導性ヒト内皮細胞増殖	IC ₅₀ = 192 pmol/L で阻害
ラット大動脈輪モデルにおける VEGF 誘導性血管形成	IC ₅₀ = 121 pmol/L で阻害
VEGF-A ₁₆₅ （10 nmol/L）存在下での aflibercept（0.85 pmol/L～50 nmol/L）の補体依存性細胞傷害作用	活性なし
VEGF-A ₁₆₅ （10 nmol/L）存在下での aflibercept（0.85 pmol/L～50 nmol/L）の抗体依存性細胞傷害作用	活性なし

略号：IC₅₀=50%阻害濃度

2.2 IN VIVO 活性

Aflibercept が VEGF 媒介性血管新生を抑制することにより、腫瘍増殖を阻害する作用について、様々な固形腫瘍を用いた薬理試験で検討した。担癌マウスに aflibercept を漸増用量で投与し、VEGF：aflibercept 複合体の形成をモニタリングすることにより、aflibercept による効果的な内因性 VEGF 捕捉作用を確認した。

広範なげっ歯類及びヒト腫瘍モデルに対する aflibercept の抗腫瘍効果を評価した。抗腫瘍効果の評価は、最大無毒性用量（HNTD）又は毒性用量に達していない場合は試験最大用量（HDT）で実施した。体重減少の最低値が 20%又は薬物による死亡が 10%以上見られた用量を毒性用量とみなした。免疫不全マウスに 120 mg/kg/日までの aflibercept を 1～3 週間投与したとき、検討したいずれの用量でも毒性は認められなかった。

ヒト由来成分から構成される aflibercept に対する免疫学的反応を回避するため、腫瘍皮下異種移植試験は概して免疫不全マウス、すなわち、Swiss 雌ヌードマウス、BALB/c 雌ヌードマウス、重症複合免疫不全（SCID）雌雄マウス、又は NCR 雌ヌードマウスを用いて実施した。免疫機能が正常なマウ

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

スを用いた試験では、4～40 mg/kg で投与期間は4週間までとし、投与終了時に抗腫瘍効果に影響を及ぼす可能性がある抗 aflibercept 抗体の産生をモニターした。

2.2.1 In vivo における腫瘍血管新生及び増殖の阻害

[Module 4.2.1.1-12] [Module 4.2.1.1-13]

VEGF は正常な血管新生に必須であるとともに、腫瘍血管新生においても重要な役割を果たしている。腫瘍組織で VEGF が阻害されると、腫瘍血管の成長が抑制され、VEGF に依存して維持される未熟な腫瘍血管が退縮するため、腫瘍への血液供給及び腫瘍の増殖が制限されると予想される。ラット神経膠腫細胞株 C6(1)、ヒト横紋筋肉腫細胞株 A673(1)、マウス黒色腫細胞株 B16F10.9 (1)、ヒト膠芽腫細胞株 U87 及びヒト腎細胞癌由来細胞株 786-0 を用いた非臨床試験を実施し、腫瘍を aflibercept で処理することにより、血管が退縮するか否かを検討した。

Aflibercept の投与後短時間（4～72 時間）における腫瘍血管に対する影響を評価した。神経膠腫細胞株 C6、膠芽腫細胞株 U87 又は腎細胞癌由来細胞株 786-0 を異種移植した SCID マウスに aflibercept を 25 mg/kg の用量で単回投与し、各時間後の腫瘍の組織学的検査を実施した。内皮細胞マーカーである血小板内皮細胞接着分子（PECAM1）を免疫染色することにより、血管系を可視化した。Aflibercept はマウスに皮下移植した数種の腫瘍で形成された腫瘍血管密度を急速に低下させた。Aflibercept (25 mg/kg) を単回投与したとき、投与 72 時間後における C6 腫瘍の血管密度は対照腫瘍で認められた血管密度の 20% に過ぎなかった。また、aflibercept で処理した U87 腫瘍の血管密度は対照の 43%、aflibercept で処理した 786-0 腫瘍の血管密度は対照の 40% であった。この組織学的検査から、aflibercept が血管新生を阻害することにより、腫瘍の増殖を抑制することが立証された (1)。

2.2.2 In vivo における VEGF : aflibercept 複合体の形成

[Module 4.2.1.1-14] [Module 4.2.1.1-15] [Module 4.2.1.1-16] [Module 4.2.1.1-17]

用量反応試験を実施し、血清中の VEGF : aflibercept 複合体及び非結合形（遊離形）aflibercept 濃度、並びに腫瘍組織量に対する aflibercept の影響を同時に評価した。

ラット神経膠腫細胞株 C6 を異種移植した SCID マウスに対して、腫瘍移植 7、10 及び 13 日目に aflibercept を 0.5、1、2.5、10 及び 25 mg/kg の用量で皮下投与した。この試験では、最終 aflibercept 投与 3 日後に血液を採取し、血清中 aflibercept 濃度を測定した。その結果、aflibercept 投与後の血清中遊離形 aflibercept 濃度平均値は、HDT (25 mg/kg) における 190 µg/mL まで用量依存的に上昇することが明らかになった。一方、マウス VEGF : aflibercept 複合体濃度平均値は用量増加に伴って上昇し、表 3 に示すように、用量が 2.5 mg/kg 以上になると約 1 µg/mL でプラトーに達した。

用量 0.5～2.5 mg/kg の範囲で遊離形 aflibercept は非線形性の薬物動態を示した後、2.5 mg/kg を超える用量で、ほぼ線形性の薬物動態を示すようになったことから、2.5 mg/kg 以下の用量では、投与量のかなりの部分が高い親和性で VEGF に結合していることが示された。この aflibercept への VEGF の結合は、遊離形 aflibercept の薬物動態に影響し、標的媒介性薬物動態（target-mediated drug disposition）と呼ばれる ([Module 2.6.5.6])。

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

SCID マウスに移植したラット神経膠腫細胞株 C6 に対して、aflibercept は 1 mg/kg 以上の用量で活性を示すことが明らかになった。これらの活性用量における血清中の遊離形 aflibercept 濃度は、VEGF : aflibercept 複合体濃度を上回っていた。

表 3 - 神経膠腫細胞株 C6 移植マウスにおける aflibercept の薬物動態及び薬力学的活性

腫瘍モデル	Aflibercept 用量 (mg/kg)	遊離形 aflibercept の血清 中濃度 (µg/mL)	VEGF : aflibercept 複合体の血清中濃度 (µg/mL)	T/C
ラット神経膠腫細胞株 C6	0.5	0.13	0.38	非有意
	1	1	0.65	有意*
	2.5	13	0.93	有意*
	10	103	1.2	有意*
	25	190	0.97	有意*

略号：T/C=腫瘍増殖抑制

* Dunnett 検定で $p < 0.05$

ヒト横紋筋肉腫細胞株 A673 を異種移植した SCID マウスに対して、腫瘍移植 12 日後から、aflibercept を 0.5、1、2.5、10 及び 25 mg/kg の用量で皮下投与した。この試験では、aflibercept 最終投与 3 日後に血液を採取し、血清中 aflibercept 濃度を測定した。その結果、aflibercept 投与後の血清中遊離形 aflibercept 濃度は、用量依存的に上昇し、HDT（25 mg/kg）では 182 µg/mL であった。マウス VEGF : aflibercept 複合体濃度は用量増加に伴って上昇し、用量が 2.5 mg/kg 以上になると約 1 µg/mL でプラトーに達した。表 4 に示すように、ヒト VEGF : aflibercept 複合体濃度も 0.1 µg/mL（血清中マウス VEGF : aflibercept 複合体濃度の 10 分の 1）でプラトーに達した。

ヒト腫瘍細胞株 A673 の増殖を有意に阻害する aflibercept 用量（10 mg/kg 以上）における血清中遊離形 aflibercept 濃度は、血清中 VEGF : aflibercept 複合体濃度に比べて 73～164 倍高かった。

表 4 - 横紋筋肉腫細胞株 A673 を異種移植した SCID マウスにおける aflibercept の薬物動態及び薬力学的活性

腫瘍モデル	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	遊離形 aflibercept の血清中濃度 (µg/mL)	マウス VEGF : aflibercept 複合体の血清中濃度 (µg/mL)	ヒト VEGF : aflibercept 複合体 の血清中濃度 (µg/mL)	T/C
ヒト横紋筋肉 腫細胞株 A673	0.5	0.09	0.31	0.065	非有意
	1	0.72	0.61	0.102	非有意
	2.5	9.38	0.92	0.108	非有意
	10	79	1.08	0.086	有意*
	25	182	1.11	0.056	有意*

略号：T/C=腫瘍増殖抑制

* Dunnett 検定で $p < 0.01$

さらに、Lewis 肺癌細胞株 LLC、マウス乳癌細胞株 MMT、マウス黒色腫細胞株 B16F10 及び B16F1、ヒトユーイング肉腫細胞株 A673、ヒト線維肉腫細胞株 HT-1080、及びヒトウィルムス腫瘍細胞株 SK-NEP を異種移植したマウスにおける遊離形及び結合形 aflibercept 濃度も測定した ([Module 2.6.4.8.1])。同様に、マウス VEGF : aflibercept 複合体濃度は用量増加に伴って上昇し、用量が 2.5 mg/kg を超えると約 1~2 µg/mL でプラトーに達した。これらの用量における血清中遊離形 aflibercept 濃度は、血清中 VEGF : aflibercept 複合体濃度に比べて高かった。Aflibercept 用量が 10 及び 25 mg/kg に上昇すると、遊離形 aflibercept 濃度はさらに上昇した。腫瘍増殖を阻害する用量（10 mg/kg 以上）の aflibercept を投与したときの遊離形 aflibercept 濃度は、マウス又はヒト VEGF : aflibercept 複合体濃度に比べてはるかに高かった。

これらの試験から、aflibercept は内因性の VEGF 及び腫瘍由来の VEGF を効果的に捕捉し、複合体を形成することが明らかになった。腫瘍増殖を阻害する用量の aflibercept を投与したときの遊離形 aflibercept 濃度は、マウス又はヒト VEGF : aflibercept 複合体濃度をはるかに超えていた。

2.2.3 腹水産生腎癌細胞株 RENCA の同所移植モデルに対する aflibercept の活性

[Module 4.2.1.1-18]

VEGF は血管漏出の亢進が原因となる腹水産生に重要な役割を果たしていることから、腫瘍同所移植モデル（RENCA）を用いて、aflibercept の腹水産生及び腫瘍進行に対する抑制効果を評価した。マウス腎皮質腺癌から単離した RENCA 細胞をマウスの腎臓被膜下に注入・移植し、腎臓内で腫瘍を増殖させ、腹水を産生させた。

最初の試験では、進行期 RENCA 移植 BALB/c ノードマウスを用いて、腫瘍が測定可能な大きさに達した時点で aflibercept の評価を行った。移植 13、16 及び 19 日後に 40 mg/kg の aflibercept を皮下投与した。20 日目における対照群の平均腹水容量は 0.68 mL であったが、aflibercept 投与群のマウスで

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

は腹水は検出されなかった。また、超音波画像検査による腫瘍組織量測定でも、対照群に比べて aflibercept 投与群で腫瘍縮小（ $\Delta T/\Delta C$ （薬物投与群における腫瘍増加量/対照群における腫瘍増加量）=24%）が認められ、aflibercept が腹水産生及び RENCA 腫瘍の増殖の両方を抑制することが示された。

2 番目の試験では、進行期 RENCA 移植 SCID マウスを用いて、aflibercept の用量反応関係を評価した。移植 13、16 及び 19 日後に 1、2.5、10 及び 25 mg/kg の aflibercept を皮下投与した。21 日目における対照群の平均腹水容量は 0.057 mL であったが、aflibercept 10 及び 25 mg/kg 投与群のマウスでは腹水は検出されなかった。また、超音波画像検査により測定した腫瘍組織量も、対照群に比べて減少し、 $\Delta T/\Delta C$ は、10 及び 25 mg/kg 投与群でそれぞれ 26% 及び 22% であった。これより低用量の 1 及び 2.5 mg/kg 投与群では、腫瘍増殖も腹水産生も有意に阻害されることはなかった。

腎臓に悪性腹水を産生させる RENCA 腫瘍細胞を移植した後、aflibercept を投与すると、腹水産生量及び腫瘍組織量の両方が減少することが明らかになった。

2.2.4 遺伝子改変膵臓腫瘍モデル Rip1Tag2 マウスにおける aflibercept の活性

[Module 4.2.1.1-19]

Rat insulin promoter 1 T antigen 2 (Rip1Tag2) モデルは遺伝子改変マウス癌モデルである(5)。遺伝子操作により膵臓の β 細胞にラージ T 抗原を発現させると、膵島細胞癌が形成される。膵島細胞癌は特徴的病期として、膵島の過形成/異形成、膵島の血管新生性異形成、辺縁明瞭な固形癌及び浸潤癌という一連の段階を経て進行する。

Rip1Tag2 モデルを用いて、aflibercept の抗腫瘍効果を評価した。Aflibercept を漸増用量で投与したときの以下のパラメータ、すなわち、マウスの生存期間、肉眼で小結節が認められるマウス数、腫瘍血管系及び細胞増殖に対する影響を評価した。

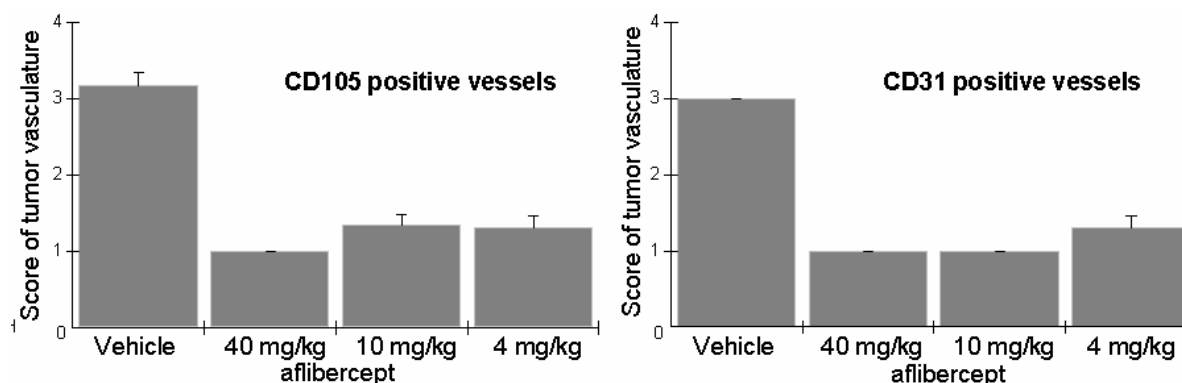
12 週齢の Rip1Tag2 マウスに 4、10 又は 40 mg/kg の aflibercept を週 2 回、4 週間投与した。この投与により、2 用量で生存期間が統計学的有意に延長した（生存期間延長 [ILS] は、10 及び 40 mg/kg 投与群でそれぞれ 229% 及び 312%）。このモデルを用いて、HNTD (80 mg/kg) のスニチニブを週 5 回、4 週間投与、及び HNTD (15 mg/kg) のドセタキセルを 1、3 及び 5 日目に投与したときにも生存期間が有意に延長した（ILS はそれぞれ 122% 及び 44%）。

また、10 週齢の Rip1Tag2 マウスモデルを用いて、aflibercept の作用の用量依存性を評価した。この試験では、マウスに aflibercept を週 2 回、3 週間投与した後、安楽死させた。各動物の膵臓を摘出し、肉眼で小結節が認められないマウスの数を計数した。また、腫瘍血管系及び腫瘍細胞増殖の程度についても評価した。

試料採取時点（22 日目、13 週齢）において、肉眼で小結節が認められたマウス数は、溶媒投与群に比べて aflibercept (4、10 及び 40 mg/kg) 投与群で有意に減少した（10 及び 40 mg/kg 投与群でそれぞれ $p < 0.0001$ 、4 mg/kg 投与群で $p = 0.0091$ ）。

Aflibercept を 4、10 及び 40 mg/kg 投与した結果、抗 CD105 及び抗 PECAM-1 (CD31) 染色により評価した腫瘍内の血管分布が有意に減少した。Rip1Tag2 マウスに aflibercept を投与したとき、すべての用量で、抗 CD105 及び抗 CD31 抗体染色切片における腫瘍血管密度が約 3 分の 1 に減少した。

図 2 - Rip1Tag2 マウスにおける CD105 及び CD31 陽性腫瘍血管系に対する aflibercept の影響



用量 4 mg/kg ($p=0.0023$)、10 mg/kg ($p=0.0046$) 及び 40 mg/kg ($p=0.0002$) の aflibercept を投与したとき、CD105 マーカーを用いる評価で腫瘍血管系に有意な減少が認められた。CD31 マーカーを用いた腫瘍血管の評価でも、用量 4 mg/kg ($p=0.0064$)、10 mg/kg ($p=0.0007$) 及び 40 mg/kg ($p=0.0006$) で有意な減少が認められた (Kruskal-Wallis 検定)。

細胞増殖マーカーである Ki-67 で染色した腫瘍切片の顕微鏡検査により、対照群に比べて aflibercept 投与群の腫瘍で増殖中 (Ki67 陽性) の細胞数が有意に減少することが明らかになった。認められた腫瘍増殖抑制に 4 mg/kg 群 ($p=0.0274$)、10 mg/kg 群 ($p=0.0197$) 及び 40 mg/kg 群 ($p=0.0045$) で有意性が認められた (Kruskal-Wallis 検定)。

2.2.5 Aflibercept 単独投与時の皮下移植腫瘍に対する抗腫瘍効果スペクトル

広範なげっ歯類及びヒト腫瘍モデルに対する aflibercept の抗腫瘍効果を評価した。なお、これらの腫瘍モデルには、神経膠腫細胞株 C6、卵巣腺癌細胞株 SK-OV-3、A2780 及び OVCAR-3、黒色腫細胞株 B16、LOX 及び A-375、前立腺癌細胞株 DU 145 及び PC-3、乳癌細胞株 UISO BCA-1 及び MA13/C、膀胱癌細胞株 BxPC-3 及び PANC-1、胃癌細胞株 MKN-45 及び Hs746T、結腸癌細胞株 C51、HT-29、COLO 205 及び HCT 116、肺癌細胞株 NCI-H460、A549 及び SHP-77、神経芽腫細胞株 SK-N-MC 及び SK-N-AS、横紋筋肉腫細胞株 A673 及び RH-30、ユーイング肉腫細胞株 TC-71 及び SK-ES-1、肉腫細胞株 HT-1080、リンパ腫細胞株 NAMALWA 及び WSU-DLCL2 が含まれていた(1)(6)(7)。

評価項目は、腫瘍組織量に対する影響、腫瘍増殖抑制作用 (T/C)、完全退縮率 (CR)、腫瘍増殖遅延作用 (T-C) 及び log cell kill 値 ($T-C / 3.32 \times \text{腫瘍倍加時間 (Td)}$) の式で計算) であった(8)(9)(10)。Aflibercept の log cell kill 値が 0.7 未満であった場合、不活性であり、log cell kill 値が 2.8 を超えた場合、活性が高いと判断した。

2.2.5.1 卵巣癌

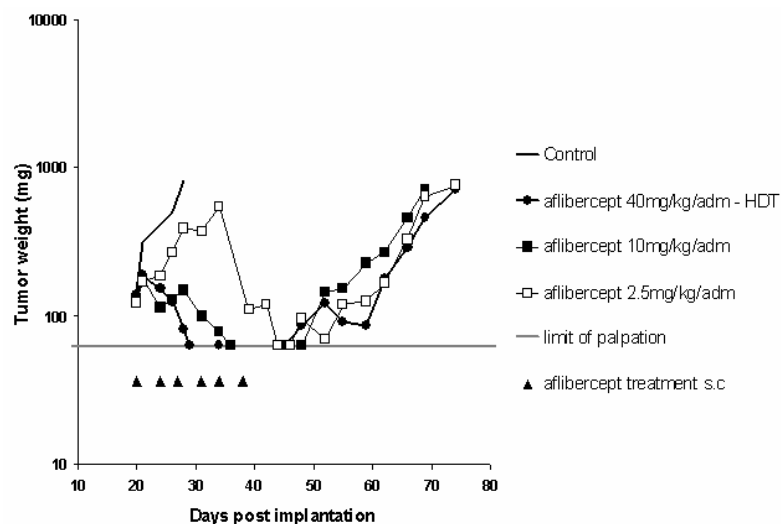
[Module 4.2.1.1-20]

進行期ヒト卵巣腺癌細胞株 SK-OV-3 移植 SCID マウスを用いて aflibercept の抗腫瘍効果を評価した。図 3 に示すように、投与期間全体を通して、aflibercept は用量依存的に腫瘍増殖を抑制した。検討したすべての用量 (2.5~40 mg/kg) で aflibercept は高い活性を示し、log cell kill 値は 3.8~4.2 であった(表 5)。Aflibercept は優れた治療係数 (最大有効量 [多くの場合は HNTD 又は HTD] を最小有効量で割ること

2.6.2 薬理試験の概要文
AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

により算出した比）を示し、このモデルにおける治療係数は 16 以上であった（典型的な細胞毒性薬の治療係数は 1～3）。

図 3 -進行期ヒト卵巣腺癌細胞株 SK-OV-3 移植 SCID マウスを用いた aflibercept の評価：用量反応試験



進行期ヒト卵巣腺癌細胞株 A2780 及び OVCAR-3 移植 SCID マウスにおける aflibercept の抗腫瘍効果も評価した。これら 2 種類の追加卵巣癌モデルにおいても、検討した用量 (2.5～40 mg/kg) で aflibercept は活性を示した（表 5）。

表 5 - 卵巣癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍モデル (投与開始時点における腫瘍組織量中央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
進行期 SK-OV-3 (122-147 mg)	20, 24, 27, 31, 34, 38 日	2.5	44.2	4.0	高活性
		10	41.5	3.8	高活性
		40	46.3	4.2	高活性
進行期 A2780 (128-174 mg)	11, 14, 18, 21 日	2.5	7.9	1.4	活性
		10	14.1	2.5	活性
		40	13.2	2.3	活性
進行期 OVCAR-3 (126-131 mg)	21, 24, 28, 31, 35, 37 日	2.5	19.0	0.9	活性
		10	34.0	1.6	活性
		40	44.5	2.0	活性

略号：T-C=腫瘍増殖遅延

2.2.5.2 黒色腫

[Module 4.2.1.1-20]

3種類の黒色腫モデルを用いて aflibercept の抗腫瘍効果を評価した。

早期黒色腫細胞株 B16 移植 Swiss 雌ヌードマウスにおいて、aflibercept は 2.5～40 mg/kg の用量範囲で用量依存性の高い活性を示し（表 6）、優れた治療係数（16 以上）が認められた（11）。また、進行期黒色腫細胞株 B16 移植 BALB/c ヌードマウスにおいても、aflibercept は 2.5～40 mg/kg の範囲で活性を示すことが明らかになった（表 6）。

進行期ヒト黒色腫細胞株 LOX 移植 BALB/c ヌードマウスにおいて、aflibercept は活性を示さなかった（表 6）。

進行期ヒト黒色腫細胞株 A-375 移植 BALB/c ヌードマウスにおいて、高用量 2 用量（120 及び 40 mg/kg）の aflibercept は活性を示したが、10 及び 4 mg/kg では活性を示さなかった（表 6）。

表 6 - 黒色腫に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍モデル (投与開始時点における 腫瘍組織量中央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
早期 B16	3, 6, 10, 13, 17, 20 日	2.5	8.8	2.4	活性
		10	14.2	3.9	高活性
		25	18.3	5.0	高活性
		40	19.8	5.4	高活性
進行期 B16 (113-125 mg)	7, 10, 13 日	2.5	2.9	0.9	活性
		10	6.2	1.9	活性
		25	7.0	2.1	活性
		40	8.6	2.6	活性
進行期 LOX (96-112 mg)	7, 10, 14 日	40	5.2	0.6	不活性
進行期 A-375 (166-189 mg)	10, 13, 17, 20 日	4	1.0	0.2	不活性
		10	1.9	0.4	不活性
		40	6.2	1.2	活性
		120	9.5	1.9	活性

略号：T-C=腫瘍増殖遅延

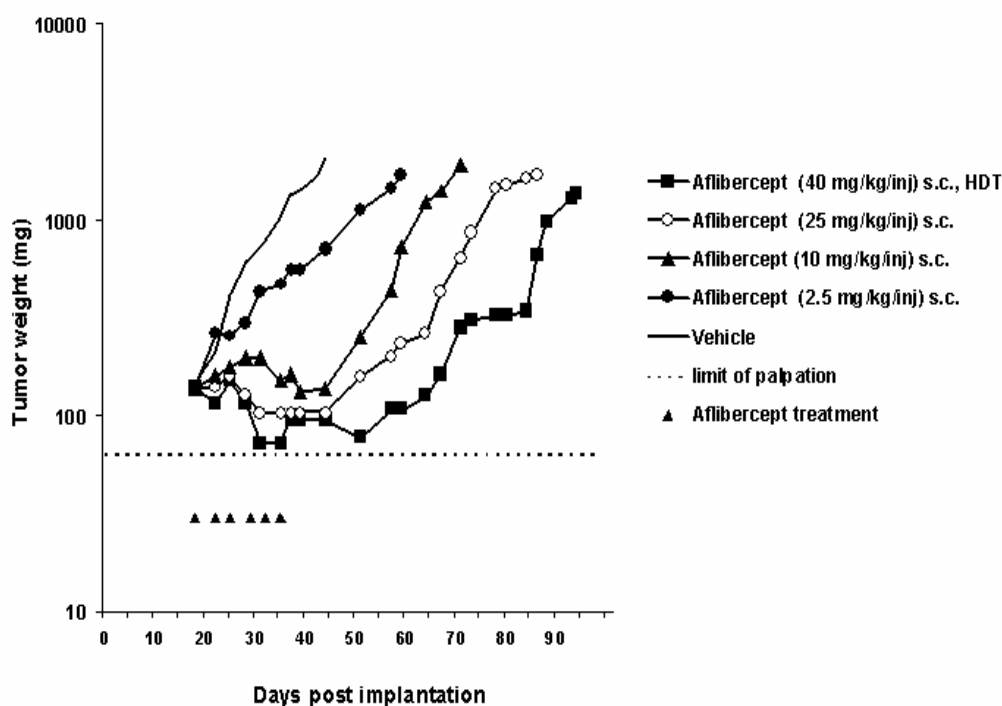
2.2.5.3 前立腺癌

[Module 4.2.1.1-20]

2種類のヒト前立腺癌モデル DU 145 及び PC-3 を用いて、aflibercept の抗腫瘍効果を評価した。

進行期ヒト前立腺癌細胞株 DU 145 移植 SCID マウスにおいて、aflibercept は用量依存性の腫瘍増殖抑制効果を示した（図 4）。このモデルにおいて、HDT（40 mg/kg）で高い活性が認められた。Aflibercept の log cell kill 値は 4.7 であり、5 例中 2 例で CR が達成され、このうち 1 例では試験 127 日目に腫瘍が認められなくなった。用量 25 mg/kg では高い活性が認められ、log cell kill 値は 3.5 であり、5 例中 1 例で CR が達成された。低用量 2 用量の aflibercept でも、腫瘍増殖抑制が見られた。以上のように、aflibercept は前立腺癌 DU 145 の増殖に対して用量依存性の高い活性を示した（表 7）。

図 4 -進行期ヒト前立腺癌細胞株 DU 145 移植 SCID マウスを用いた aflibercept の評価：用量反応試験



進行期ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 移植 SCID 雌マウスにおける aflibercept の抗腫瘍効果を評価した（表 7）。このモデルで HDT（40 mg/kg）の aflibercept は不活性であった。

表 7 - 前立腺癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍モデル (投与開始時点における腫瘍組織量中 央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
進行期 DU 145 (138-145 mg)	18, 22, 25, 29 32, 35 日	2.5	13.3	1.1	活性
		10	28.4	2.4	活性
		25	40.7	3.5	高活性
		40	54.6	4.7	高活性

腫瘍モデル (投与開始時点における腫瘍組織量中 央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
進行期 PC-3 (144-163 mg)	13, 16, 20, 23 日	40	3.6	0.3	不活性

略号：T-C=腫瘍増殖遅延

2.2.5.4 乳癌

[Module 4.2.1.1-20] [Module 4.2.1.1-21]

マウス乳腺癌細胞株 MA13/C 及びヒト乳腺癌細胞株 UISO BCA-1 に対する aflibercept の抗腫瘍効果を評価した。

早期 MA13/C 移植 Swiss 雌ヌードマウスにおいて、aflibercept は 10～40 mg/kg の用量範囲で活性を示したが、2.5 mg/kg では不活性であった(11) (表 8)。同様に、進行期 UISO BCA-1 移植 BALB/c 雌ヌードマウスにおいて、aflibercept は 10～40 mg/kg の用量範囲で活性を示したが、2.5 mg/kg では不活性であった (表 8)。

表 8 - 乳腺癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍モデル (投与開始時点における腫 瘍組織量中央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
早期 MA13/C	4, 7, 11, 14, 18, 21 日	2.5	5.2	0.6	不活性
		10	12.1	1.3	活性
		25	13.9	1.5	活性
		40	12.7	1.4	活性
進行期 UISO-BCA-1 (93-112 mg)	19, 24, 28, 32, 35, 39 日	2.5	0.3	0.1	不活性
		10	16.2	1.1	活性
		25	17.0	1.2	活性
		40	29.9	2.1	活性

略号：T-C=腫瘍増殖遅延

2.2.5.5 膵癌

[Module 4.2.1.1-20]

2 種類のヒト膵癌細胞株 BxPC3 及び PANC-1 に対する aflibercept の抗腫瘍効果を評価した。

早期膵癌細胞株 BxPC3 移植 BALB/c 雌ヌードマウスにおいて、10、25 及び 40 mg/kg の aflibercept は同程度の活性を示した。最低用量である 2.5 mg/kg でも腫瘍増殖抑制効果が認められた (表 9) (11)。進行期 BxPC3 移植 BALB/c 雌ヌードマウスにおいても、40 mg/kg の aflibercept は腫瘍増殖抑制効果を示した (表 9)。

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

進行期膵癌細胞株 PANC-1 移植 SCID 雌マウスにおいて、aflibercept は検討した 2.5～40 mg/kg の範囲のすべての用量で不活性であった（表 9）。

表 9 - 膵癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍モデル (投与開始時点における 腫瘍組織量中央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
早期 BxPC3	3, 6, 10, 13, 17, 20 日	2.5	22.1	1.1	活性
		10	41.7	2.1	活性
		25	34.1	1.7	活性
		40	38.1	1.9	活性
進行期 BxPC-3 (115 mg)	10, 13, 17, 20, 24, 27 日	40	25.8	1.3	活性
進行期 PANC-1 (152-158 mg)	10, 13, 17, 20 日	2.5	1.0	0.2	不活性
		10	1.1	0.2	不活性
		40	2.9	0.4	不活性

略号：T-C=腫瘍増殖遅延

2.2.5.6 胃癌

[Module 4.2.1.1-20]

3 種類のヒト胃癌細胞株 MKN-45、Hs746T 及び SNU-5 に対する aflibercept の抗腫瘍効果を 2.5～40 mg/kg の用量範囲で評価した。

進行期ヒト胃腺癌細胞株 MKN-45 移植 SCID マウスにおいて、aflibercept は HDT（40 mg/kg）で高い活性を示した。Aflibercept は、10 及び 2.5 mg/kg でも腫瘍増殖が抑制された（表 10）。

進行期胃癌細胞株 Hs746T 移植 SCID マウスにおいて、aflibercept は 10 及び 40 mg/kg で活性を示した。最低用量である 2.5 mg/kg の aflibercept は不活性であった（表 10）。

進行期ヒト胃癌細胞株 SNU-5 移植 SCID マウスにおいて、aflibercept は検討したすべての用量（2.5～40 mg/kg）で活性を示した（表 10）。

表 10 - 胃癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍モデル (投与開始時点における腫瘍組織量中央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
進行期 MKN-45 (112-115 mg)	8, 12, 15, 19 日	2.5	15.4	1.1	活性
		10	21.5	1.6	活性
		40	38.2	2.8	高活性
進行期 Hs746T (163-174 mg)	10, 13, 17, 20 日	2.5	1.8	0.5	不活性
		10	4.9	1.3	活性
		40	4.1	1.1	活性
進行期 SNU-5 (119-126 mg)	10, 14, 17, 21, 24, 28 日	2.5	14.8	1.4	活性
		10	27.3	2.5	活性
		40	26.8	2.4	活性

略号：T-C=腫瘍増殖遅延

2.2.5.7 結腸癌

[\[Module 4.2.1.1-20\]](#)[\[Module 4.2.1.1-22\]](#) [\[Module 4.2.1.1-23\]](#) [\[Module 4.2.1.1-24\]](#) [\[Module 4.2.1.1-25\]](#)

4 種類の結腸癌細胞株 C51、HT-29、COLO 205 及び HCT 116 に対する aflibercept の抗腫瘍効果を評価した。

早期マウス結腸腺癌細胞株 C51 移植 SCID マウスを用いて、aflibercept の抗腫瘍効果を評価した。このモデルにおいて、高用量 2 用量 (40 及び 10 mg/kg) の aflibercept は高い腫瘍増殖抑制効果を示した。最低用量である 2.5 mg/kg でも活性が認められた (表 11)。進行期 C51 に対する aflibercept の用量反応関係も検討した。40 及び 25 mg/kg の aflibercept は活性を示したが、10 及び 2.5 mg/kg では活性を示さなかった (表 11)。

進行期ヒト結腸腺癌細胞株 HT29 移植 SCID マウスにおいて、aflibercept は検討したすべての用量 (2.5 ~ 40 mg/kg) で活性を示した (表 11)。

進行期ヒト結腸癌細胞株 COLO 205 移植 SCID マウスにおいて、10 ~ 40 mg/kg の aflibercept は活性を示した (表 11)。

早期ヒト結腸癌細胞株 HCT 116 移植 Swiss 雌ヌードマウスにおいて、aflibercept は検討したすべての用量 (2.5 ~ 40 mg/kg) で活性を示した (表 11)。

進行期結腸癌細胞株 HCT 116 移植 SCID マウスを用いた aflibercept の評価も行った。Aflibercept は 10 ~ 40 mg/kg の範囲で活性を示したが、4 mg/kg では不活性であった (表 11)。この試験において、80 mg/kg のスニチニブの忍容性は良好であり、log cell kill 値 0.9 で活性を示した[\[Module 4.2.1.1-24\]](#) [\[Module 4.2.1.1-25\]](#)。

表 11 - 結腸癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍モデル (投与開始時点における腫瘍 組織量中央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
早期 C51	3, 6, 10, 13, 17, 20 日	2.5	5.4	1.1	活性
		10	15.3	3.1	高活性
		40	20.7	4.2	高活性
進行期 C51 (261-271 mg)	9, 14 日	2.5	0.9	0.2	不活性
		10	0.5	0.1	不活性
		25	4.7	1.2	活性
		40	7.9	2.0	活性
進行期 HT-29 (132-136 mg)	10, 13, 17, 20, 24, 27 日	2.5	8.8	0.7	活性
		10	23.0	1.8	活性
		40	27.2	2.2	活性
進行期 COLO 205 (108-135 mg)	13, 16, 20, 23 日	10	16.0	0.9	活性
		25	19.7	1.1	活性
		40	27.4	1.6	活性
早期 HCT 116	4,7,11,14 日	2.5	13.2	1.3	活性
		10	21.9	2.2	活性
		25	22.1	2.2	活性
		40	25.2	2.5	活性
進行期 HCT 116 (113-144 mg)	11, 14, 18, 21, 25, 28 日	4	8.1	0.6	不活性
		10	12.9	0.9	活性
		25	20.2	1.4	活性
		40	22.1	1.6	活性

略号 : T-C=腫瘍増殖遅延

2.2.5.8 肺癌

[Module 4.2.1.1-26]

3 種類のヒト肺癌細胞株 NCI-H460、A549 及び SHP-77 を移植した SCID マウスモデルを用いて、aflibercept の抗腫瘍効果を評価した。

進行期非小細胞肺癌細胞株 NCI-H460 移植 SCID マウスモデルにおいて、40 及び 10 mg/kg の aflibercept は活性を示したが、2.5 mg/kg では不活性であった（表 12）。

進行期肺癌細胞株 A549 移植 SCID マウスモデルにおいて、40 及び 10 mg/kg の aflibercept は活性を示したが、2.5 mg/kg では不活性であった（表 12）。

進行期小細胞肺癌細胞株 SHP-77 移植 SCID マウスモデルにおいて、40 及び 10 mg/kg の aflibercept は高い活性を示したが、2.5 mg/kg では不活性であった（表 12）。

表 12 - 肺癌に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍モデル (投与開始時点における腫瘍 組織量中央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与 量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
進行期 NCI-H460 (152-155 mg)	7, 10, 14, 17 日	2.5	2.1	0.4	不活性
		10	13.2	2.7	活性
		40	17.0	3.4	高活性
進行期 A549 (148-152 mg)	13, 16, 20, 23, 27 日	2.5	3.5	0.3	不活性
		10	15.6	1.4	活性
		40	19.3	1.7	活性
進行期 SHP-77 (151-166 mg)	17, 21, 24, 28, 31, 35 日	2.5	2.5	0.3	不活性
		10	36.0	3.7	活性
		40	41.1	4.3	高活性

略号：T-C=腫瘍増殖遅延

2.2.5.9 神経芽腫

[Module 4.2.1.1-20]

2 種類のヒト神経芽腫細胞株 SK-N-MC 及び SK-N-AS に対する aflibercept 40 mg/kg 単回投与時の抗腫瘍効果を評価した。

進行期神経芽腫細胞株 SK-N-MC 移植 SCID マウスにおいて、aflibercept は活性を示し、log cell kill 値は 2.5 であった（表 13）。同じ試験において、ソラフェニブ 100 mg/kg を 14～18 日目、21～25 日目及び 28 日目に経口投与したとき、軽度の活性が認められ、log cell kill 値は 0.8 であった。

進行期ヒト神経芽腫細胞株 SK-N-AS 移植 SCID 雌マウスにおいて、aflibercept 40 mg/kg は不活性であった（表 13）。

表 13 - 神経芽腫に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍モデル (投与開始時点における腫瘍 組織量中央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
進行期 SK-N-MC (88-96 mg)	14, 17, 21, 24, 28 日	40	36.6	2.5	活性
進行期 SK-N-AS (143-147 mg)	17, 21, 24, 28 日	40	3.9	0.6	不活性

略号：T-C=腫瘍増殖遅延

2.2.5.10 横紋筋肉腫

[Module 4.2.1.1-20]

進行期ヒト横紋筋肉腫細胞株 RH-30 移植 SCID 雌マウスを用いて、aflibercept の評価を行った（群当たりの腫瘍組織量中央値 160 mg）。Aflibercept は用量 40 mg/kg を 14、17、21 及び 24 日目に皮下投与した。この用量で活性が認められ、T-C 値は 23.7 日、log cell kill 値は 2 であった。

2.2.5.11 ユーイング肉腫

[Module 4.2.1.1-20]

2 種類のヒトユーイング肉腫細胞株 TC-71 及び SK-ES-1 に対する aflibercept 40 mg/kg 単回投与時の抗腫瘍効果を評価した。

進行期 TC-71 移植 SCID 雌マウスにおいて、aflibercept は高い活性を示し、log cell kill 値は 3.7 であった（表 14）。同じ試験において、ソラフェニブ 100 mg/kg を 10～14 日目及び 17 日目に経口投与したときにも活性が認められ、log cell kill 値は 1.1 であった。

進行期 SK-ES-1 移植 SCID 雌マウスにおいて、aflibercept は高い活性を示し、log cell kill 値は 3.2 であった（表 14）。同じ試験において、ソラフェニブ 100 mg/kg を 11～21 日目に経口投与したときにも活性が認められ、log cell kill 値は 1.4 であった。

表 14 - ユーイング肉腫に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍モデル (投与開始時点における腫瘍 組織量中央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
進行期 TC-71 (131-138 mg)	10, 13, 17 日	40	19.6	3.7	高活性
進行期 SK-ES-1 (96-100 mg)	11, 14, 18, 21 日	40	25.5	3.2	高活性

略号：T-C=腫瘍増殖遅延

2.2.5.12 線維肉腫

[Module 4.2.1.1-27] [Module 4.2.1.1-28]

進行期ヒト線維肉腫細胞株 HT-1080 移植 SCID 雌マウスを用いて、aflibercept の抗腫瘍効果を評価した（表 15）。このモデルにおいて、aflibercept は検討した 4～40 mg/kg のすべての用量で不活性であった。

表 15 - 線維肉腫に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍モデル (投与開始時点における腫瘍 組織量中央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
HT-1080 (144-179 mg)	11, 14, 17, 20, 23 日	4	1.2	0.1	不活性
		10	0.5	0.0	不活性
		25	2.3	0.2	不活性
		40	2.4	0.2	不活性

略号：T-C=腫瘍増殖遅延

2.2.5.13 リンパ腫

[Module 4.2.1.1-20]

ヒトバーキットリンパ腫細胞株 NAMALWA 及びヒトびまん性大細胞型リンパ腫細胞株 WSU-DLCL-2 に対する aflibercept の抗腫瘍効果を評価した。

進行期 NAMALWA 移植 SCID 雌マウスにおいて、aflibercept は検討した 3 用量 (10、25 及び 40 mg/kg) で等しい活性を示した (表 16)。

進行期 WSU-DLCL-2 移植 SCID 雌マウスにおいて、40 mg/kg の aflibercept は活性を示した (表 16)。

表 16 - リンパ腫に対する aflibercept の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍モデル (投与開始時点における腫瘍 組織量中央値)	投与スケジュール (腫瘍移植後日数)	Aflibercept 投与量 (mg/kg)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
進行期 NAMALWA (101-107 mg)	10, 14, 17, 21 日	10	12.9	2.3	活性
		25	12.1	2.1	活性
		40	12.7	2.3	活性
進行期 WSU-DLCL2 (106-109 mg)	15, 19, 23 日	40	13.3	2.0	活性

略号：T-C=腫瘍増殖遅延

2.2.6 Aflibercept と化学療法剤の併用投与

併用投与試験は 3 群試験として計画した。2 種類の薬剤の単独投与及び併用投与のそれぞれについて用量反応関係を検討することにより、各群の HNTD 及び用量反応関係を特定した。抗腫瘍効果の評価は、HNTD 又は毒性用量に達していない場合は HDT で実施した。体重の最小減少が 20%、又は薬物死が 10%以上見られた用量を過剰毒性用量とみなした。

評価項目は、腫瘍増殖遅延作用 (T-C) 及び log cell kill 値 (T-C/3.32×Td の式で計算)、部分退縮が認められた例数 ([PR] = 最初の腫瘍組織量の 50%退縮)、完全退縮が認められた例数 ([CR] = 触診

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

限界未満への腫瘍退縮）であった (8) (9) (10)。Aflibercept と別の薬剤の併用投与で log cell kill 値が 0.7 未満であった場合、不活性であり、log cell kill 値が 2.8 を超えた場合、活性が高いと判断した。等毒性用量の単独投与と比較して、併用投与により log cell kill 値が増加し、その差が 1 未満である場合を効果の増強あり、1 以上の場合を相乗効果ありと判断した。

2.2.6.1 Aflibercept とオキサリプラチンの併用投与

[Module 4.2.1.1-29]

マウス結腸腺癌を皮下移植した SCID マウスを用いて、aflibercept とオキサリプラチンの併用投与を評価した（表 17）。各薬剤単独投与及び aflibercept+オキサリプラチン併用投与による 3 群用量反応試験を実施した。Aflibercept は 40 mg/kg を皮下投与し、オキサリプラチンは 4.8 又は 7.8 mg/kg を静脈内投与した。両薬剤は 10 及び 13 日目に投与した。

このモデルにおいて、aflibercept 単独投与（HDT=40 mg/kg）で活性が認められ、log cell kill 値は 1.5 であり、対照群との間に有意差が認められた（ $p=0.0021$ ）。オキサリプラチン単独投与（HNTD=7.8 mg/kg）で高い活性が認められ、log cell kill 値は 3.4 であり、6 例中 6 例で PR、6 例中 1 例で CR が達成された。この用量以下（4.8 mg/kg）でも活性が認められ、log cell kill 値は 2.5 であり、6 例中 2 例で PR、6 例中 1 例で CR が達成された。両用量のオキサリプラチン投与群と対照群の間に有意差が認められた（いずれも $p=0.0021$ ）。

HDT の aflibercept と HNTD のオキサリプラチンを併用投与したとき、高い活性が認められ、log cell kill 値は 4.6 であり、6 例中 6 例で CR が達成された。この併用投与の活性はオキサリプラチン 4.8 mg/kg でも見られ、log cell kill 値は 3.9 で、6 例中 6 例で CR が認められた。両用量の併用投与群と対照群の間に有意差が認められた（ $p=0.0021$ ）。HDT の aflibercept と HNTD のオキサリプラチンの併用投与の抗腫瘍効果は、最良の単独投与である HNTD のオキサリプラチンに比べて強力であり、有意差が認められた（ $p=0.0114$ ）。

表 17 - マウス結腸腺癌細胞株 C51 移植 SCID マウスを用いた aflibercept+オキサリプラチン併用投与の評価

投与量 (mg/kg/投与) (総投与量、mg/kg)		薬物誘発死	nadir 時の % BWL (nadir 日)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
Aflibercept 皮下投与 (10,13 日目)	オキサリプラチン 静脈内投与 (10,13 日目)					
40 (80)	-	0/6	3.6 (20)	10.2	1.5	HDT 活性
-	7.8 (15.6)	0/6	10.6 (14)	24.0	3.4	HNTD 高活性
-	4.8 (9.6)	0/6	3.3 (11)	17.7	2.5	活性
40 (80)	7.8 (15.6)	0/6	16.8 (16)	32.4	4.6	HNTD 高活性
40 (80)	4.8 (9.6)	0/6	6.7 (14)	27.4	3.9	高活性

略号：BWL=体重減少、HDT=試験最大用量、HNTD=最大無毒性用量、T-C=腫瘍増殖遅延、-=該当なし

2.2.6.2 Afibercept と 5-フルオロウラシルの併用投与

[Module 4.2.1.1-21]

乳腺癌細胞株 MA13/C を皮下移植した Swiss ノードマウスを用いて、afibercept と代謝拮抗薬 5-フルオロウラシル（5-FU）の併用投与を評価した（表 18）（11）。各薬剤単独投与及び afibercept+5-FU 併用投与による 3 群用量反応試験を実施した。なお、この試験では、5-FU（34.6～145 mg/kg）週 1 回静脈内投与及び afibercept（2.5～40 mg/kg）週 2 回皮下投与の 3 週間投与スケジュールを使用した。

このモデルにおいて、各薬剤単独投与で活性が認められ、afibercept（HDT）の log cell kill 値は 1.4、5-FU（HNTD）の log cell kill 値は 1.3 と算出された。HNTD の併用投与（afibercept 40 mg/kg+5-FU 90 mg/kg）による log cell kill 値は 2.7 であり、相乗効果が得られることが示された。

これより低い用量の 5-FU と afibercept の併用投与でも相乗作用が認められ、検討した最低用量（afibercept 2.5 mg/kg+5-FU 34.6 mg/kg）での log cell kill 値は 1.3 であった。また、HDT の afibercept と HNTD の 5-FU を安全に併用できたことから、宿主毒性の重複はないことが明らかになった。

表 18 - 乳腺癌細胞株 MA13/C 移植 Swiss 雌ノードマウスを用いた afibercept+5-FU 併用投与の評価

投与量 (mg/kg/日) (総投与量、mg/kg)		薬物誘 発死	nadir 時の % BWL (nadir 日)	T-C%	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
Afibercept 皮下投与 (4,7,11,14,18,21 日目)	5-FU 静脈内投与 (4,11,18 日目)						
40 (240)	-	0/5	2.3 (12)	4	12.7	1.4	HDT 活性
-	90 (270)	0/5	4.8 (13)	0	12.5	1.3	HNTD 活性
40 (240)	90 (270)	0/5	8.0 (20)	0	25.2	2.7	HDT 活性
2.5 (15)	34.6 (103.8)	0/5	2.0 (20)	6	11.7	1.3	LDT 活性

略号：BWL=体重減少、HDT=試験最大用量、HNTD=最大無毒性用量、LDT=試験最少用量、T-C=腫瘍増殖遅延、-=該当なし、5-FU=5-フルオロウラシル

早期乳腺癌細胞株 MA13/C に対して afibercept と 5-FU の併用投与は相乗的腫瘍増殖抑制効果を示し、宿主毒性の重複は認められなかった。

2.2.6.3 Afibercept と ドセタキセルの併用投与

[Module 4.2.1.1-21]

黒色腫細胞株 B16 を移植した BALB/c 雌ノードマウスを用いて、afibercept の皮下投与とドセタキセル（Taxotere[®]）静脈内投与の併用療法を評価した。各薬剤単独投与及び afibercept+ドセタキセル併用投与に関する 3 群用量反応試験を実施した。各薬剤は 3、6 及び 9 日目に投与した。

このモデルにおいて、各薬剤単独投与で活性が認められ、afibercept（HDT 40 mg/kg/日）の log cell kill 値は 4.2、ドセタキセル（HNTD 15 mg/kg/日）の log cell kill 値は 1.5 と算出された。HNTD の併用投与（afibercept 40 mg/kg/日+ドセタキセル 9.4 mg/kg/日）による log cell kill 値は 5 であり、この併用投与の活性は高く、各薬剤単独投与に比べて強力であることが示された。HNTD（15 mg/kg/日）のドセタ

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

キセルを投与した場合、aflibercept の用量を 10 mg/kg/日に減量する必要があったことから、宿主毒性の重複が示された。ドセタキセル (HNTD 15 mg/kg/日) 投与時の log cell kill 値は 1.5、aflibercept (10 mg/kg/日) 投与時の log cell kill 値は 2.5 であり、両剤をこれらの用量で併用投与したときにはより高い活性が認められ、log cell kill 値は 3.4 であった（表 19）。

表 19 - 黒色腫細胞株 B16 移植 BALB/c ノードマウスを用いた aflibercept+ドセタキセル併用投与の評価

投与量 (mg/kg/日) (総投与量、mg/kg)		薬物誘発死	nadir 時の % BWL (nadir 日)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
Aflibercept 皮下投与 (3,6,9 日目)	ドセタキセル 静脈内投与 (3,6,9 日目)					
40 (120)	-	0/5	1.5 (8)	13.9	4.2	HDT 高活性
25 (75)	-	0/5	0.1 (8)	10	3	高活性
10 (30)	-	0/5	0 (10)	8.3	2.5	活性
-	15 (45)	0/5	12.7 (15)	5	1.5	HNTD 活性
-	9.3 (27.9)	0/5	7.3 (15)	3.1	0.9	活性
40 (120)	9.4 (28.2)	0/5	17.6 (15)	16.6	5.0	HNTD 高活性
10 (30)	15.2 (45.6)	0/5	15.5 (15)	11.4	3.4	高活性
2.5 (7.5)	3.7 (11.1)	0/5	5.7 (15)	6.1	1.8	LDT 活性

略号：BWL=体重減少、HDT=試験最大用量、HNTD=最大無毒性用量、LDT=試験最少用量、T-C=腫瘍増殖遅延、-=該当なし

Aflibercept の皮下投与とドセタキセル（Taxotere[®]）静脈内投与の併用療法は高い活性を示し、各薬剤単独投与時に比べて高い log cell kill 値が得られたが、宿主毒性に重複がみられた。

2.2.6.4 Aflibercept とイリノテカンの併用投与

[Module 4.2.1.1-30] [Module 4.2.1.1-31]

ヒト結腸癌細胞株 HCT 116 を移植した NCR 雌ノードマウスを用いて、aflibercept とトポイソメラーゼ I 阻害剤であるイリノテカンの併用投与を評価した (12)。この試験は 3 群試験とし、2 種類の薬剤の単独投与と aflibercept+イリノテカン併用投与について、反復投与により検討した。

各薬剤は腫瘍移植 12、15 及び 18 日後に、aflibercept は 1 日 1 回皮下投与、イリノテカンは 1 日 2 回静脈内投与した。

HNTD (12.5 mg/kg) のイリノテカンは活性を示し、log cell kill 値は 1.8 と算出された（表 20）。HDT (40 mg/kg) の aflibercept を単独投与したときにも同様の活性が認められ、log cell kill 値は 1.7 であった。これより低い 2 用量（25 及び 10 mg/kg）の aflibercept でも抗腫瘍効果が認められ、log cell kill 値はそれぞれ 1.7 及び 1.3 であった。最低用量である 2.5 mg/kg では、活性は認められなかった（log cell kill 値 0.2、表 20 にデータ示さず）。

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

併用投与の HNTD は、aflibercept 40 mg/kg、イリノテカン 20.2 mg/kg であった。この併用投与は相乗的であり、最良の単独投与に比べて、log cell kill 値で 1 以上優れた抗腫瘍効果が認められた（併用投与の log cell kill 値が 3.0 であるのに対して、HNTD のイリノテカン及び HDT の aflibercept 単独投与での log cell kill 値はそれぞれ 1.8 及び 1.7）。HNTD を下回る用量でも良好な抗腫瘍効果が維持された。選択した 3 用量を表 20 に示す。

表 20 - ヒト結腸癌細胞株 HCT 116 移植 NCR 雌ヌードマウスを用いた aflibercept+イリノテカン併用投与の評価

投与量 (mg/kg/日) (総投与量、mg/kg)		薬物誘発死	nadir 時の % BWL (nadir 日)	T-C (日)	Log cell kill 値	コメント
Aflibercept 皮下投与 (12,15,18 日目、 1 日 1 回)	イリノテカン 静脈内投与 (12,15,18 日目、 1 日 2 回)					
40 (120)	-	0/8	3.1 (13)	18.3	1.7	HDT 活性
25 (75)	-	0/8	2.2 (13)	18.3	1.7	活性
10 (30)	-	0/8	5.0 (19)	13.5	1.3	活性
-	12.5 (75)	0/8	15.9 (21)	19.1	1.8	HNTD 活性
40 (120)	20.2 (121.2)	0/8	13.0 (21)	32.4	3.0	HNTD 高活性
25 (75)	20.2 (121.2)	0/8	11.9 (19)	31.1	2.9	高活性
40 (120)	12.5 (75)	0/8	11.0 (19)	28.3	2.7	活性
2.5 (7.5)	12.5 (75)	0/8	14.3 (21)	21.5	2.0	LDT 活性

略号：BWL=体重減少、HDT=試験最大用量、HNTD=最大無毒性用量、LDT=試験最少用量、T-C=腫瘍増殖遅延、--=該当なし

進行期結腸癌細胞株 HCT 116 において、複数用量の aflibercept とイリノテカン併用投与で相乗効果が認められたが、宿主毒性に重複はみられなかった。

2.2.6.5 Aflibercept とパクリタキセルの併用投与

卵巣癌細胞株 OVCAR-3 モデルを用いて、aflibercept とパクリタキセルの併用投与による抗腫瘍効果を評価した(13)。このモデルでは、最初に 2 週間にわたり腫瘍を生着させた後、aflibercept (10 mg/kg) 及びパクリタキセル (10 mg/kg) を単独又は併用により、週 3 回 4 週間投与した。Aflibercept 又はパクリタキセル単独投与では、対照群（溶媒単独）と比較して 56% ($p < 0.05$) 又は 55%の腫瘍組織量減少が認められた。Aflibercept+パクリタキセル併用投与では、98%の減少が見られた ($p < 0.01$)。また、対照群の平均腹水量は、腫瘍移植 6 週間後で 2.3 mL であったのに対して、aflibercept 又はパクリタキセル単独投与群では、対照群に比べて、平均腹水量がそれぞれ 96%又は 85%減少した。aflibercept+パクリタキセル併用投与群では、腹水は検出されなかった。

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

卵巣癌細胞株 OVCAR-3 モデルにおいて、aflibercept とパクリタキセルを併用投与することにより腫瘍組織量が減少し、aflibercept 及びパクリタキセルを単独投与したときに比べて高い活性が認められた。

2.2.6.6 Aflibercept と化学療法剤併用投与時の活性のまとめ

化学療法剤と併用したときの aflibercept の抗腫瘍効果を表 21 に要約して示す。

表 21 - Aflibercept と化学療法剤を併用したときの in vivo 抗腫瘍効果

併用薬 (+aflibercept)	マウスに移植した腫瘍	併用時の結果
オキサリプラチン	マウス結腸腺癌細胞株 C51	相乗効果
5-フルオロウラシル	マウス乳癌細胞株 MA13/C	相乗効果
ドセタキセル	マウス黒色腫細胞株 B16	効果の増強あり
イリノテカン	ヒト結腸癌細胞株 HCT 116	相乗効果
パクリタキセル	ヒト卵巣腺癌細胞株 OVCAR-3	効果の増強あり

Aflibercept と広く使用されている数種類の化学療法剤の併用投与で効果が認められた。Aflibercept と細胞毒性薬であるオキサリプラチンを併用投与したとき、マウス結腸腺癌細胞株 C51 の増殖を相乗的に抑制した。Aflibercept と代謝拮抗薬 5-FU を複数用量の組合せで併用投与したとき、早期乳癌細胞株 MA13/C の増殖を相乗的に抑制し、宿主毒性の重複はみられなかった。Aflibercept とトポイソメラーゼ I 阻害剤であるイリノテカンを併用投与したときにも、複数の用量で進行期結腸癌細胞株 HCT 116 に対する相乗的効果が認められ、宿主毒性の重複はみられなかった。また、微小管を標的とするドセタキセル及びパクリタキセルの 2 剤と aflibercept を併用投与したときには、複数の用量で抗腫瘍効果が増強された。

3 副次的薬理試験

該当なし。

4 安全性薬理試験

日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S7A ガイドライン で規定されている *in vitro* 安全性薬理コアバッテリー試験の大部分は、融合蛋白質のような高分子量製剤の評価においては意味がないと考えられることから、安全性薬理試験は *in vivo* 試験のみを実施した。2.1項に記載したように、aflibercept はマウス、ラット及びウサギ由来の VEGF-A に対して高い結合親和性を示し（ K_D 値はピコモル濃度以下）、VEGF-A 蛋白質の相同性から判断して、ヒト及びサル（*non-human primate*）の VEGF-A と aflibercept の結合相互作用は区別できないと考えられることから、aflibercept の安全性薬理試験はマウス、ラット、ウサギ又はサルを用いて実施した。マウス又はラットを用いて実施した aflibercept の心血管系及び腎／泌尿器系に対する影響を評価する試験を除いて、すべての安全性薬理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（GLP）を遵守して実施した。

4.1 中枢神経系

中枢神経系に対する aflibercept の影響を評価することを目的とした特別な *in vivo* 安全性薬理試験は実施しなかったが、毒性試験の一部として、一般状態の観察及び直腸温のような安全性薬理評価項目を評価した。カニクイザルに 1.5、5、15 及び 30 mg/kg を週 2 回 3 ヶ月間皮下投与（[Module 2.6.7.7F]）、2、10 及び 30 mg/kg を週 1 回 1 ヶ月間静脈内投与（[Module 2.6.7.7B]）、3、10 及び 30 mg/kg を週 1 回 3 ヶ月間静脈内投与（[Module 2.6.7.7C]）又は 3、10 及び 30 mg/kg を週 1 回 15 週間静脈内投与後、27 週目まで隔週投与（[Module 2.6.7.7D]）しても、中枢神経系に対する投与と直接関連した重要な影響は認められなかった。

4.2 心血管系

心電図（ECG）パラメータに対する aflibercept の影響を評価することを目的とした特別な *in vivo* 安全性薬理試験は実施しなかったが、毒性試験の一部として、ECG パラメータを評価した。カニクイザルに 1.5、5、15 及び 30 mg/kg を週 2 回 3 ヶ月間皮下投与（[Module 2.6.7.7F]）、2、10 及び 30 mg/kg を週 1 回 1 ヶ月間静脈内投与（[Module 2.6.7.7B]）、3、10 及び 30 mg/kg を週 1 回 3 ヶ月間静脈内投与（[Module 2.6.7.7C]）又は 3、10 及び 30 mg/kg を週 1 回 15 週間静脈内投与後、27 週目まで隔週投与（[Module 2.6.7.7D]）しても、これらのパラメータに対する投与に関連した有意な影響は認められなかった。

4.2.1 正常マウス組織の血管密度への影響

[Module 4.2.1.3-1] [Module 2.6.3.4.2]

C57BL/6 雄マウスに aflibercept を週 2 回、2 又は 4 週間皮下投与したときの正常組織の微小血管密度に対する影響を評価した。最初の試験群（4 例／群）には、対照蛋白質（ヒト Fc、25 mg/kg）又は aflibercept

12.5 又は 25 mg/kg を 2 週間投与した。2 番目の試験群（6 例／群）には、対照蛋白質又は aflibercept 2.5 又は 25 mg/kg を 2 又は 4 週間投与した。脾臓、甲状腺、下垂体、十二指腸、副腎、精巣上体脂肪、肝臓及び網膜を採取し、血管密度を評価した。

Aflibercept を皮下投与したとき、すべての用量及び評価時点で肝臓、脾臓及び甲状腺濾胞内の微小血管密度が統計学的に有意に低下した。また、下垂体前葉又は下垂体後葉及び脂肪組織でも、これより一貫性及び程度は低いものの、微小血管密度の低下が認められた。副腎（髄質及び皮質）、十二指腸、膵外分泌腺及び網膜では、いずれの用量及び時点においても、微小血管密度の低下は認められなかった。

4.2.2 げっ歯類の血圧に及ぼす影響

[Module 4.2.1.3-2] [Module 2.6.3.4.3]

テレメトリー装置を埋め込んだ C57BL/6 マウス及び Wistar-Kyoto ラット（3～9 例／群）にそれぞれ、0、2.5、25 mg/kg 及び 0、0.05、0.15、0.5、1、2.5、5、10、25 mg/kg の aflibercept を単回皮下投与したときの血圧に対する影響を評価した。少なくとも投与 48 時間前から、投与 3～4 週間後まで、血圧及び心拍数の両方又は一方を記録した。投与後期間中に認められた平均変化量の最大値及び最大個別変化量平均値（最大上昇平均値）を概要表に示すが、以下では、最大上昇平均値について考察する。

C57BL/6 マウスの血圧及び心拍数に対する aflibercept の影響

C57BL/6 マウスに aflibercept を 2.5 及び 25 mg/kg の用量で単回皮下投与したとき、収縮期及び拡張期血圧の両方が統計学的有意に上昇し、投与 1～2 日後に最大の影響が認められた。マウスに用量 2.5 及び 25 mg/kg の aflibercept を投与したときの収縮期血圧の最大上昇平均値はそれぞれ、 14.4 ± 0.7 mm Hg 及び 17.3 ± 1.1 mm Hg であった。血圧上昇持続時間は、2.5 mg/kg 投与群で 7 日間であったのに対して、25 mg/kg 投与群では、約 21～24 日間にわたり収縮期血圧が上昇した。拡張期血圧上昇持続時間についても、同様の用量依存性が認められた。血圧上昇持続時間と血清中の遊離形 aflibercept 濃度の間に相関関係が認められ、血清中の aflibercept 濃度が約 1 µg/mL 未満に低下するまで、収縮期及び拡張期血圧は投与前のベースライン値よりも上昇したままであった。また、2.5 及び 25 mg/kg 投与群で統計学的有意性はないものの、一過性の用量依存的な心拍数減少が認められた。血圧に対する影響の持続時間に比べて、この作用の持続時間は非常に短かった（1～4 日間）。

Wistar-Kyoto ラットの血圧及び心拍数に対する aflibercept の影響

Wistar-Kyoto ラットに aflibercept を単回皮下投与したとき、用量 0.5 mg/kg 以上で収縮期及び拡張期血圧の両方が用量依存的に有意に上昇し、投与 2～4 日後に最大の影響が認められた。25 mg/kg 投与群のラットにおける収縮期及び拡張期血圧の最大上昇はそれぞれ、 22 ± 1.5 mm Hg 及び 17.8 ± 1.0 mm Hg であった。この血圧上昇持続時間に用量比例性が認められ、0.5 mg/kg 投与群で 5 日間、25 mg/kg 投与群で 16～17 日間にわたり持続した。Aflibercept による血圧上昇持続時間と血清中の遊離形 aflibercept 濃度の間に明白な関連性が認められ、血清中の遊離形 aflibercept 濃度が約 6 µg/mL を超えたときに最

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

大の血圧上昇が認められ、血清中の遊離形 aflibercept 濃度が約 1 µg/mL 未満に低下するまで、血圧はベースラインよりも上昇したままであった。0.15 及び 0.05 mg/kg の aflibercept を投与しても、血圧は上昇しなかった。

さらに、1 mg/kg 以上の aflibercept を投与したラットで、一過性（1～4 日間）の心拍数減少が認められた。心拍数に対する最大の影響は 10～25 bpm の範囲であり、統計学的に有意なものではなかった。この心拍数減少は、血圧上昇に対する反射的反応であると考えられた。

4.2.3 Aflibercept 誘発性血圧上昇に対する各種降圧剤の影響

[Module 4.2.1.3-3] [Module 2.6.3.4.4]

Wistar-Kyoto ラットを用いて、aflibercept 誘発性血圧上昇に対する様々な種類の降圧剤の影響を評価した。ラットに aflibercept を 25 mg/kg の用量で週 1 回、3 週間皮下投与した。Aflibercept 投与 3 日後から、ラット（4～6 例/群）に溶媒又は漸増用量の降圧剤を 1 日 1 回 3 日間投与した。検討した降圧剤は、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬（カプトプリル、ラミプリル）、カルシウムチャネル拮抗薬（ニフェジピン）、細胞内カルシウム調節薬（ヒドララジン）、α アドレナリン受容体拮抗薬（プラゾシン）、利尿薬（フロセミド）、β アドレナリン受容体拮抗薬（プロプラノロール）、β アドレナリン受容体作動薬（イソプロテレノール）及び一酸化窒素供与剤（モルシドミン）であった。

Aflibercept を投与したラットの血圧上昇に対して、様々な種類の降圧剤が有効であることが明らかになった。ACE 阻害薬（カプトプリル、ラミプリル）、カルシウムチャネル拮抗薬（ニフェジピン）、細胞内カルシウム調節薬（ヒドララジン）、α アドレナリン受容体拮抗薬（プラゾシン）及び一酸化窒素供与剤（モルシドミン）は、aflibercept によって誘発された血圧上昇を効果的に低下させ、β アドレナリン受容体作動薬（イソプロテレノール）も血圧を低下させた。

これらの結果から、健康な成熟げっ歯動物において、様々な種類の降圧剤が VEGF 阻害により無効になることはないと考えられた。特に、ACE 阻害、カルシウムチャネル拮抗及び α アドレナリン受容体拮抗作用によって効果を発揮する一般的な降圧剤は、aflibercept によって誘発された血圧上昇を効果的に軽減した。β アドレナリン受容体作動薬も同様に血圧を低下させたが、この方法は、現在の標準的な高血圧治療法ではない。

4.3 血栓形成に対する影響

[Module 4.2.1.3-4] [Module 2.6.3.4.5]

ニュージーランドホワイトウサギ電解質障害モデルを用いて、静脈及び動脈血栓形成に対する aflibercept の影響を評価した。雄ウサギ（6～11 例/群）に対して、電流刺激開始日を起点として、-6、-3 及び 1 日目に aflibercept を 0.3、3 及び 30 mg/kg の用量で 30 分間静脈内持続投与した。

ウサギ電解質障害モデルにおいて、aflibercept を 0.3、3.0 及び 30 mg/kg 静脈内投与しても、活性化凝固時間、血液学的検査及び凝固検査パラメータ、血圧、心拍数、血流量（下行大動脈及び右頸静脈）、電流刺激開始から血栓性閉塞までの経過時間、及び血管重量（血栓重量を含む）によって評価される静脈及び動脈血栓形成に対する影響は認められなかった。

4.4 呼吸系

[Module 4.2.1.3-5] [Module 2.6.3.4.6]

非拘束覚醒下 Sprague Dawley ラット（雄 8 例／群）を用いて、用量 10、50 及び 250 mg/kg の aflibercept を単回 30 分間静脈内持続投与した後、全身プレチスモグラフィ法を用いて、呼吸パラメータに対する影響を評価した。陽性対照としてテオフィリン（30 mg/kg 静脈内投与）を使用した。

非拘束覚醒下の Sprague Dawley ラットに aflibercept を 10、50 又は 250 mg/kg 単回 30 分間静脈内持続投与しても、投与後 1 日目及び 7 日目の測定時点に関係なく、呼吸パラメータに対する生物学的に問題となる影響は誘発されなかった。

4.5 腎／泌尿器系

[Module 4.2.1.3-6] [Module 2.6.3.4.7]

健康な成熟 C57BL/6 雄マウス（6 例／群）に aflibercept を 25 mg/kg の用量で週 2 回、4 週間皮下投与しても、腎機能に対する生物学的に問題となる影響は誘発されなかった。

4.6 創傷治癒に対する影響

[Module 4.2.1.3-7] [Module 2.6.3.4.8]

[Module 4.2.1.3-8] [Module 2.6.3.4.9]

ニュージーランドホワイトウサギ切開創傷治癒モデル（雄 12 例／群）を用いて、aflibercept の創傷修復及び治癒に対する影響を評価した。Aflibercept は創傷惹起日（1 日目）を起点として、-2、3、7 及び 11 日目に 30 分間静脈内持続投与した。

Aflibercept を 0.3、3 及び 30 mg/kg 投与したとき、用量依存的で明白な血管密度の低下が認められた。0.3 mg/kg 投与群では、4 日目のみに対照群と比較して血管密度の低下が認められたが、3 及び 30 mg/kg 投与群では 4、8 及び 12 日目において平均血管密度が対照群に比べて低かった。30 mg/kg 投与群における血管密度の最大の低下は 8 及び 12 日目に認められた。

4、8 及び 12 日目の創傷引っ張り強度は、陰性対照群と比較して、すべての用量で低下した。Aflibercept 投与群のすべてのウサギで初回投与後 96 時間にわたり血液中に遊離形 aflibercept が検出された（誤投与が起こった 0.3 mg/kg 投与群のウサギ 1 例の 1～3 日目を除く）。しかし、遊離形 aflibercept 濃度が結合形（複合体）濃度を上回っていたのは、0.3 mg/kg 投与群の場合、投与後最初の 24～48 時間だけであったのに対して、3 及び 30 mg/kg 投与群では、すべての評価時点で平均遊離形 aflibercept 濃度は結合形濃度に比べて 3～50 倍高かった。各用量群について、初回投与 24 時間後の血中遊離形 aflibercept 濃度は、その後の 3、7 及び 11 日目の投与 24 時間後に検出された濃度と同程度であった。抗 aflibercept 抗体が検出されたのは、30 mg/kg 投与群の投与終了時のウサギ 1 例のみであり、その結果として、この動物の遊離形及び結合形 aflibercept 濃度は低下した。

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

ニュージーランドホワイトウサギ切除創傷治癒モデル（雄 9 例／群）を用いて、aflibercept の創傷修復及び治癒に対する影響も評価した。Aflibercept は創傷惹起日（1 日目）を起点として、-2、5、11 及び 17 日目に 30 分間静脈内持続投与した。

Aflibercept を 0.3、3 及び 30 mg/kg 投与したとき、切除創傷治癒及び関連するパラメータに用量依存的な影響が誘発された。対照群と比較して、0.3 mg/kg 投与群では、主に 8 日目に、線維化反応及び血管新生の抑制を特徴とする創傷修復及び治癒障害が認められた。対照的に、3 及び 30 mg/kg 投与群では、検討したすべての時点（8、14 及び 20 日目）で血管新生がほぼ検出されなくなり、線維化反応及び上皮過形成も顕著に抑制された。結果として、aflibercept を 3 及び 30 mg/kg の用量で静脈内投与したとき、対照群に比べて、14 及び 20 日目の創傷面積が大きくなり、20 日目の開放創の発現の割合が高かった。すべての aflibercept 投与群のウサギで初回投与 144 時間後まで、遊離形及び結合形 aflibercept が検出された。しかし、0.3 mg/kg 投与群では、遊離形 aflibercept 濃度が結合形（複合体）濃度を上回っていたのは、投与後最初の 24～48 時間だけであったのに対して、3 及び 30 mg/kg 投与群では、144 時間全体を通して、遊離形濃度平均値は結合形濃度を上回っていた。各用量群について、初回投与 72 時間後の血中遊離形 aflibercept 濃度は、その後の aflibercept 投与 72 時間後の濃度と同程度であった。0.3 mg/kg 投与群のウサギ 2 例及び 30 mg/kg 投与群のウサギ 1 例で投与終了時に抗 aflibercept 抗体が検出され、その結果として、これらの動物の遊離形及び結合形 aflibercept 濃度は低下した。

5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。

6 考察及び結論

Aflibercept は in vitro でヒト VEGF-A₁₆₅ に高い親和性で結合した。Aflibercept はヒト、マウス、ラット及びウサギ VEGF-A に対して、ピコモル濃度以下の K_D 値で結合した。VEGF-A の蛋白質配列は、ヒトとカンクイザルで全く同一である。したがって、ヒト及びサル VEGF と aflibercept の結合相互作用は同じである。また、aflibercept はげっ歯類、ウサギ及びサルの VEGF への結合能を有することから、これらは毒性試験及び薬理試験に適した動物種である。

Aflibercept は高い親和性で VEGF と結合するため、複合体が形成され、VEGF と内皮細胞表面に存在する受容体との相互作用が阻害される。Aflibercept は in vitro で VEGF によって誘導される内皮細胞の増殖を抑制し、ラット大動脈からの微小血管の分岐伸長を強力に阻害した。Aflibercept の活性にエフェクター機能が関与しているかどうか検討するため、ex vivo でセルベースアッセイを実施した。初代培養内皮細胞及び腫瘍細胞株のいずれにおいても、aflibercept は ADCC 活性及び CDC 活性を示さなかった。これらの結果に基づいて、aflibercept は in vivo で CDC 及び ADCC 作用を媒介する可能性は低いと考えられた。

In vivo 薬理試験において、aflibercept はマウスに移植した様々なマウス、ラット及びヒト腫瘍細胞株の増殖を効果的に阻害することが示された。Aflibercept を投与することにより、VEGF 阻害と一致して、数種の株化腫瘍で腫瘍血管密度が急速に低下した。Aflibercept は広範な抗腫瘍効果を示し、検討した 30 種類のモデルのうち 25 種類で活性が認められた（表 22 参照）。Aflibercept と広く使用されている数種の化学療法剤（オキサリプラチン、5-FU、イリノテカン、パクリタキセル及びドセタキセル）を併用投与したときにも効果が認められた。非臨床腫瘍モデルにおける aflibercept の忍容性は良好であり、週 2 回 40 mg/kg 投与まで、明白な毒性は認められなかった。Aflibercept と化学療法剤を併用投与しても、ドセタキセルとの併用投与を除き、毒性が増強されることはなかった。

表 22 - Aflibercept 単独皮下投与時の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍の種類	腫瘍モデル	腫瘍増殖遅延 (T-C) * (日)	log cell kill 値 *
卵巣癌	進行期 SK-OV-3	46.3	4.2
	進行期 A2780	13.2	2.3
	進行期 OVCAR-3	44.5	2.0
黒色腫	早期 B16	19.8	5.4
	進行期 B16	8.6	2.6
	進行期 A375	6.2	1.2
	進行期 LOX	5.2	0.6
前立腺癌	進行期 DU 145	54.6	4.7

2.6.2 薬理試験の概要文
AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

腫瘍の種類	腫瘍モデル	腫瘍増殖遅延 (T-C) * (日)	log cell kill 値*
乳癌	進行期 PC-3	3.6	0.3
	進行期 UISO BCA-1	29.9	2.1
	早期 MA13/C	12.7	1.4
膵癌	早期 BxPC3	38.1	1.9
	進行期 BxPC3	25.8	1.3
	進行期 PANC-1	2.9	0.4
胃癌	進行期 MKN-45	38.2	2.8
	進行期 Hs746T	4.1	1.1
	進行期 SNU-5	26.8	2.4
結腸癌	早期 C51	20.7	4.2
	進行期 C51	7.9	2.0
	進行期 HT-29	27.2	2.2
	進行期 COLO 205	27.4	1.6
	早期 HCT 116	25.2	2.5
	進行期 HCT 116	22.1	1.6
肺癌	進行期 NCI-H460	17	3.4
	進行期 A549	19.3	1.7
	進行期 SHP-77	41.1	4.3
神経芽腫	進行期 SK-N-MC	36.6	2.5
	進行期 SK-N-AS	26.7	0.6
	進行期 RH-30	23.7	2.0
横紋筋肉腫	進行期 TC-71	19.6	3.7
ユーイング肉腫	進行期 SK-ES-1	25.5	3.2
	進行期 HT-1080	2.4	0.2
	進行期 NAMALWA	12.7	2.3
線維肉腫	進行期 WSU-DLCL2	13.3	2.0

* 40 mg/kg 投与時の活性

Aflibercept の log cell kill 値が 0.7 未満であった場合、不活性であり、log cell kill 値が 2.8 を超えた場合、活性が高いと判断した。

さらに、様々な腫瘍モデルで aflibercept は明白な用量依存的活性を示し、優れた治療係数が得られた。特に、卵巣腺癌細胞株 SK-OV-3、A2780 及び OVCAR-3、前立腺癌細胞株 DU 145、黒色腫細胞株 B16、膵癌細胞株 BxPC3、胃腺癌細胞株 MKN-45、胃癌細胞株 SNU-5、結腸腺癌細胞株 C51 及び HT-29、並びに結腸癌細胞株 HCT 116 を移植したマウスにおける aflibercept の治療係数は 16 以上であった。

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

組織学的検査から、aflibercept が腫瘍内の血管密度を有意に低下させることが明らかになり、腫瘍によって誘導された血管新生が阻害されることが示された。動物腫瘍モデルにおいて、aflibercept とパクリタキセル又はドセタキセルを併用投与したときにも腫瘍増殖が抑制されることが明らかになり、オキサリプラチン、5-FU 又はイリノテカンとの併用時には相乗効果が認められた。

以上より、aflibercept（AVE0005、VEGF Trap）は、早期及び進行期腫瘍の両方に対して、単独投与及び様々な細胞毒性薬との併用投与で活性を示し、優れた治療係数が認められることが明らかになった。このことから、臨床での多様な癌治療に aflibercept を使用できる可能性が立証された。

安全性薬理試験から、aflibercept が呼吸系及び血栓形成に有害な影響を及ぼさないことが明らかになった。また、毒性試験で得られた結果に基づいて、中枢神経系及び心血管系機能に重大な影響を及ぼさないことが示された。Aflibercept 投与により、少数の正常組織の血管密度、血圧、創傷修復及び治癒に対する影響が認められた。Aflibercept の作用機序に関連して、肝臓、脾臓及び甲状腺濾胞内の微小血管密度が低下したことに加えて、これより程度は小さいものの、下垂体及び脂肪組織でも血管密度が低下した。これまでに、主に脾臓及び甲状腺など、一部の毛細血管は成熟期まで VEGF 依存性に伸長することがマウスで明らかになっている(14)。この他にも、毛細血管の一部が VEGF 依存性に伸長する組織として、肝臓、下垂体及び脂肪組織など、数種の組織が特定されている。薬物投与により VEGF が阻害されると、内皮細胞厚が増加し、数種の内分泌器官の毛細血管の細孔数が減少することが明らかになっている(14)。これまでにあらゆるタイプの VEGF 阻害剤を用いた検討により、VEGF 阻害の影響を受けやすい毛細血管では VEGF の阻害機序に関係なく構造的変化が誘発されたことから、毛細血管の変化は VEGF/VEGFR シグナル伝達経路の阻害に起因するクラス効果であることが明らかになっている。

創傷治癒及び組織修復の重要な要素である血管新生において VEGF が重要な役割を果たしていることから、aflibercept によって誘発された創傷修復及び治癒の遅延は、本薬の作用機序と一致している。市販されている抗 VEGF モノクローナル抗体である Avastin®を投与したウサギでも、創傷治癒の遅延が認められている(15)。

げっ歯類（マウス及びラット）において、aflibercept は、患者における治療量と同程度の用量で、血圧を中等度ではあるが、持続的に上昇させることが明らかになった。この作用の持続時間は、血清中の遊離形 aflibercept 濃度と密接に関連していた。両動物種において、血清中の遊離形 aflibercept 濃度が約 1 µg/mL 未満に低下すると、血圧はベースライン値に回復した。Aflibercept によって誘発された血圧に対する影響は、高用量（25 mg/kg）でも、完全に回復した。VEGF 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤であるセジラニブを単回投与したラットでも、血圧に対する同様の影響が認められている(16)。高血圧はベバシズマブを投与した患者で初めて報告され、抗 VEGF 療法で予想される主な副作用である(17)。このクラスの薬剤によって誘発される高血圧は、血圧の恒常性維持における VEGF/VEGFR シグナル伝達経路の役割と関連している(18)。VEGFR シグナル伝達経路が遮断されると、内皮細胞からの血管弛緩因子（一酸化窒素及びプロスタサイクリン）の分泌が低下するとともに、血管収縮因子（エンドセリン-1）の分泌が亢進する結果、末梢血管抵抗及び血圧が上昇する(18)(19)。また、VEGF は内皮圧受容器シグナル伝達カスケードを介して血圧を低下させる作用を有することから、VEGF 経

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

路が阻害されると、圧受容器反応の障害を介して、高血圧が誘発される可能性がある(19)。さらに、血管新生阻害剤では、毛細血管及び細動脈の密度が低下することにより、高血圧が誘発される可能性がある(19)。

Afliberceptを前投与したラットを用いて、様々な種類の降圧薬のスクリーニングを行った結果、ACE阻害薬、カルシウムチャネル拮抗薬、 α アドレナリン受容体拮抗薬及び一酸化窒素供与剤は、afliberceptによって誘発された高血圧を効果的に軽減させることが明らかになった。また、 β アドレナリン受容体作動薬もこのような状況で血圧を低下させた。

これらの結果から、健康な成熟げっ歯動物において、様々な種類の降圧剤が VEGF 阻害により無効になることはないと考えられた。 β アドレナリン受容体拮抗薬も血圧を低下させたが、この方法は、現在の標準的な高血圧治療法ではない(20)。

以上より、aflibercept (AVE0005、VEGF Trap) は、早期及び進行期腫瘍に対して、単独投与及び様々な細胞毒性薬との併用投与で有効であり、高い治療係数が認められることが明らかになった。非臨床モデルにおいて、様々な状況の癌に対して aflibercept を使用できる可能性が明らかになっている。本薬の安全性薬理プロファイルは、VEGF 経路の阻害に関連する正常組織の血管密度、血圧、創傷修復及び治癒に対する影響など、よく知られたクラス効果に限られる。

7 図表

図表は、本文中の適切な場所に記載した。

参 考 文 献

1. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russel M, et al. VEGF Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:11393-8.
2. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin L. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res*. 2002;62:2749-52.
3. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer*. 2008;8:942-56.
4. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21:154-65.
5. Hanahan D. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature*. 1985;315:115-22.
6. Kim ES, Serur A, Huang J, Manley CA, McCrudden KW, Frischer JS, et al. Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99:11399-404.
7. Byrne AT, Ross L, Holash J, Nakanishi M, Hu L, Hofmann JI, et al. Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5721-8.
8. Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM, Schumacher AM, Abbott BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (third edition). *Cancer Chemother. Rep*. 1972;3:1-103.
9. Schabel FM Jr., Griswold DP Jr., Corbett TH, Laster WR Jr., Mayo JG, Llyod, H.H. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. *Pharmac Ther. A*. 1977;1:411-35.
10. Corbett TH, Leopold WR, Dykes DJ, Roberts BJ, Griswold DP, Jr., Schabel FM, Jr. Toxicity and anticancer activity of a new triazine antifolate (NSC 127755). *Cancer Res*. 1982;42:1707-15.
11. Chiron M, Vrignaud P, Lejeune P, Muller J, Hercend T, Bissery MC. In vivo evaluation of the antiangiogenic agent VEGF Trap, alone and in combination with 5-fluorouracil. *Proc Am. Assoc. Cancer Res*. 2005; 46, Abstract 547.
12. Chiron M, Vrignaud P, Lejeune P, Demers B, Leopold D, Bissery MC. Synergistic activity of aflibercept (VEGF Trap) in combination with 5-fluorouracil and irinotecan in preclinical tumor models. AACR-NCI-EORTC - 19th Symposium. *Molecular Targets and Cancer Therapeutics*. 2007; Abstract A13.
13. Hu L, Hofmann J, Holash J, Yancopoulos GD, Sood AK, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor Trap combined with paclitaxel strikingly inhibits tumor and ascites, prolonging survival in a human ovarian cancer model. *Clin Cancer Res*. 2005;11:6966-71.

2.6.2 薬理試験の概要文

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ（遺伝子組換え）

14. Kamba T, Tam BYY, Hashizume H, Haskell A, Sennino B, Mancuso MR, et al. VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;H560-76.
15. European Public Assessment Report on Avastin. EMEA. 2005;1-96.
16. Curwen JO, Musgrove HL, Kendrew J, Richmond GHP, Ogilvie DJ, Wedge SR. Inhibition of vascular endothelial growth factor-A signaling induces hypertension: Examining the effect of cediranib (Recentin; AZD2171) treatment on blood pressure in rat and the use of concomitant antihypertensive therapy. *Clin Cancer Res*. 2008;14:3124-31.
17. Launay-Vacher V, Deray G. Hypertension and proteinuria: a class-effect of antiangiogenic therapies. *Anti-cancer drugs*. 2009;20:81-2.
18. Roodhart JM, Langenberg MH, Witteveen E, Voest EE. The molecular basis of class side effects due to treatment with inhibitors of the VEGF/VEGFR pathway. *Current Clin Pharm*. 2008;3:132-43.
19. Verheul HM, Pinedo HM. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nature Rev. Cancer* 2007;7:475-85.
20. Kappers MH, van Esch JH, Sleijfer S, Jan Danser AH, van der Meiracker AH. Cardiovascular and renal toxicity during angiogenesis inhibition: clinical and mechanistic aspects. *J Hypertens*. 2009;27:2297-309.



サノフィ株式会社

ザルトラップ点滴静注 100mg／同 200mg

CTD 第二部 – 非臨床概要

2.6.3 薬理試験概要表

Total number of pages: 47

目 次

表 目 次.....	3
1 薬理試験一覧表.....	4
2 効力を裏付ける試験	14
3 副次的薬理試験.....	27
4 安全性薬理試験.....	28
5 薬力学的薬物相互作用試験	47

表 目 次

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program	4
表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings.....	14
表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology overview – noteworthy findings	28
表 2.6.3.4.2 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - vessel density in normal tissues.....	30
表 2.6.3.4.3 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - blood pressure and heart rate (rodents)	33
表 2.6.3.4.4 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - blood pressure (rat).....	37
表 2.6.3.4.5 - Safety pharmacology - thrombosis – rabbits.....	39
表 2.6.3.4.6 - Safety pharmacology - respiratory system - plethysmography	40
表 2.6.3.4.7 - Safety pharmacology - renal function - mice.....	42
表 2.6.3.4.8 - Safety pharmacology - wound healing - incisional model	43
表 2.6.3.4.9 - Safety pharmacology - wound healing – excisional model	45

1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program

Test Article: aflibercept

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics					
Binding affinities of aflibercept to VEGF-A	Surface plasmon resonance (Biacore)	NA (in vitro)	██████████ ██████████ USA	IVT0044 IVT0044EXT	[4.2.1.1-1] [4.2.1.1-2]
Binding affinities of aflibercept to PIGF	Surface plasmon resonance (Biacore)	NA (in vitro)	██████████ ██████████ USA	IVT0044 IVT0044EXT	[4.2.1.1-1] [4.2.1.1-2]
Binding affinity of aflibercept to VEGF-B	Surface plasmon resonance (Biacore)	NA (in vitro)	██████████ ██████████ USA	ONVT0015 ONVT0015E XT	[4.2.1.1-3] [4.2.1.1-4]
Inhibition of VEGF-A ₁₆₅ dependent VEGFR-2 receptor phosphorylation in HUVE cells	HUVECs	NA (in vitro)	██████████ ██████████ USA	IVT0043 IVT0043EXT	[4.2.1.1-5] [4.2.1.1-6]
Effect on VEGFR-2 phosphorylation induced by VEGF-A and VEGF-C	PAEC-VEGFR-2 cells	NA (in vitro)	Sanofi-aventis recherche et developpement - Toulouse -France	HVT0136	[4.2.1.1-7]
Inhibition of VEGF induced calcium mobilization	HUVECs	NA (in vitro)	██████████ ██████████ USA	IVT0043 IVT0043EXT	[4.2.1.1-5] [4.2.1.1-6]

Abbreviations: HUVECs: human umbilical vein endothelial cells, NA: non applicable, PAEC-VEGFR-2: porcine aortic endothelial cells expressing VEGFR-2.

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ペータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Inhibition of VEGF-induced proliferation of human dermal microvascular endothelial cells	HDMECs	NA (in vitro)	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVT0042	[4.2.1.1-8]
Microvessel sprouting in rat aortic ring model : Change in number of vessels in aortic rings	Rat aorta	NA (in vitro)	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	1104	[4.2.1.1-9]
Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC) and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC). Assays using viability assays in the presence of human NK cells and human complement serum	Tumor and endothelial cells	NA (in vitro)	██████████ USA	IVT0037 IVT0037EXT	[4.2.1.1-10] [4.2.1.1-11]
Effects on tumor blood vessel density	Male SCID mice	subcutaneous once	██████████ USA	IVV0066 IVV0066EXT	[4.2.1.1-12] [4.2.1.1-13]

Abbreviations: HDMECs: human dermal microvascular endothelial cells, NA: non applicable, SCID: severe combined immunodeficient

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ペータ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Rat C6 glioma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Male SCID mice	subcutaneous 3 times	[REDACTED] USA	IVV0064 IVV0064EXT	[4.2.1.1-14] [4.2.1.1-15]
Human A673 rhabdomyosarcoma subcutaneous tumor xenografts (advanced stage)	Male SCID mice	subcutaneous twice over 1 week	[REDACTED] USA	IVV0065 IVV0065EXT	[4.2.1.1-16] [4.2.1.1-17]
Murine renal cell carcinoma RENCA transplanted orthotopically in the kidney	Female BALB/C nude and SCID mice	subcutaneous 3 times	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0091	[4.2.1.1-18]
Genetically engineered pancreatic tumor model Rip1Tag2 mice	Female Rip1 Tag2 mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks in 10 week old mice and, for 4 weeks in 12 week old mice	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0052	[4.2.1.1-19]
Human SK-OV-3 ovarian adenocarcinoma subcutaneous xenografts	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 20	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human A2780 ovarian adenocarcinoma subcutaneous xenografts	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 11	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ペータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Human H1h-OVCAR-3 ovarian adenocarcinoma subcutaneous xenografts	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 21	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Mouse B16 melanoma subcutaneous xenografts (early stage)	Female Swiss nude mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 3	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Mouse B16 melanoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female BALB/c nude mice	subcutaneous 3 times (on days 7, 10 and 13)	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human LOX melanoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female BALB/c nude mice	subcutaneous 3 times (on days 7, 10 and 14)	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human A-375 melanoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female BALB/C nude mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 10	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human DU 145 prostate carcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 18	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human PC-3 prostate adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 13	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ペータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Mouse MA13/C mammary adenocarcinoma subcutaneous xenografts (early stage)	Female Swiss nude mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 4	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	1119	[4.2.1.1-21]
Human UISO BCA-1 mammary adenocarcinoma subcutaneous xenografts	Female BALB/c nude mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 19	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human BxPC-3 pancreatic adenocarcinoma subcutaneous xenografts (early stage)	Female BALB/c nude mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 3	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human BxPC-3 pancreatic adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female BALB/c nude mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 10	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human PANC-1 pancreatic carcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 10	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human MKN-45 gastric adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 8	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ペータ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Human Hs746T gastric adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 10	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human SNU-5 gastric adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 10	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Murine C51 colon adenocarcinoma subcutaneous xenografts (early stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 3	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Murine C51 colon adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous on days 9 and 14	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human HT-29 colon adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 10	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human COLO 205 colon carcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female ICR SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 13	██████████ USA	IVV0080 IVV0080EXT	[4.2.1.1-22] [4.2.1.1-23]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ペータ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Human HCT 116 colon carcinoma subcutaneous xenografts (early stage)	Female Swiss mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 4	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human HCT 116 colon carcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female ICR SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 11	[REDACTED] USA	IVV0081 IVV0081EXT	[4.2.1.1-24] [4.2.1.1-25]
Human NCI-H460 non small cell lung cancer subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 7	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0109	[4.2.1.1-26]
Human A549 lung carcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week from day 13 to 27	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0109	[4.2.1.1-26]
Human SHP-77 small cell lung carcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 17	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0109	[4.2.1.1-26]
Human SK-N-MC neuroblastoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 2.5 weeks starting on day 14	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human SK-N-AS neuroblastoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 17	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ペータ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Human RH-30 rhabdomyosarcoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 14	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human TC-71 Ewing's sarcoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous 3 times (on days 10, 13 and 17)	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human SK-ES-1 Ewing's sarcoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 11	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human HT-1080 fibrosarcoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous thrice the first week (days 11, 14, 17) and twice the second week (days 20 and 23)	██████████ USA	IVV0082 IVV0082EXT	[4.2.1.1-27] [4.2.1.1-28]
Human NAMALWA Burkitt lymphoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 10	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human WSU-DLCL-2 diffuse large lymphoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	Female SCID mice	subcutaneous 3 times (on days 15, 19 and 23)	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0051	[4.2.1.1-20]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリベルセプト ペータ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Combination treatment of aflibercept and oxaliplatin in mice bearing subcutaneous colon adenocarcinoma C51	Female SCID mice	subcutaneous aflibercept at 40 mg/kg on days 10 and 13 and/or oxaliplatin intravenous at 4.8 to 12.6 mg/kg on days 10 and 13	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	IVV0103	[4.2.1.1-29]
Combination treatment of aflibercept and 5-fluorouracil in mice bearing subcutaneous mammary adenocarcinoma MA13/C	Female Swiss nude mice	subcutaneous aflibercept at 2.5 to 40 mg/kg twice weekly for 3 weeks and/or 5-FU intravenous at 34.6 to 145 mg/kg once a week for 3 weeks	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	1119	[4.2.1.1-21]
Combination treatment of aflibercept and docetaxel in mice bearing subcutaneous B16 melanoma	Female BALB/c nude mice	subcutaneous aflibercept at 2.5 to 40 mg/kg and/or intravenous docetaxel 5.8 to 24.2 mg/kg on days 3, 6 and 9	Sanofi-aventis recherche et developpement - Vitry-sur-seine - France	1119	[4.2.1.1-21]
Combination treatment of aflibercept and irinotecan in mice bearing subcutaneous colon carcinoma HCT 116	Female NCR nude mice	subcutaneous aflibercept at 2.5 to 40 mg/kg and/or intravenous irinotecan 12.5 to 52.4 mg/kg on days 12, 15 and 18	██████████ USA	IVV0043 IVV0043EXT	[4.2.1.1-30] [4.2.1.1-31]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ペータ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: aflibercept

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	GLP Compliance	Study Number	Location
Safety Pharmacology						
Cardiovascular In vivo	mice	subcutaneous	[REDACTED] - USA	No	VGFT-MX-08019	[4.2.1.3-1]
	mice and rats	subcutaneous	[REDACTED] - USA	No	VGFT-MX-08018	[4.2.1.3-2]
	rats	subcutaneous	[REDACTED] - USA	No	VGFT-MX-08025	[4.2.1.3-3]
Thrombosis	rabbits	intravenous	[REDACTED] USA	Yes	PMA00017	[4.2.1.3-4]
Respiratory	rats	intravenous	[REDACTED] France	Yes	RCV0115	[4.2.1.3-5]
Renal function	mice	subcutaneous	[REDACTED] - USA	No	VGFT-MX-08020	[4.2.1.3-6]
Wound healing	rabbits	intravenous	[REDACTED] USA	Yes	PMA00018	[4.2.1.3-7]
Wound healing	rabbits	intravenous	[REDACTED] USA	Yes	PMA00019	[4.2.1.3-8]

Abbreviations: GLP: good laboratory practices

2 効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings

Test Article: aflibercept

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Binding affinities of aflibercept to VEGF-A	Surface plasmon resonance (BiaCore)	In vitro	NA	NA	The equilibrium dissociation constants (K_D) for ligand/aflibercept interaction are as follows: human VEGF-A ₁₆₅ (0.497 pM), human VEGF-A ₁₂₁ (0.360 pM), murine VEGF-A ₁₆₄ (0.585 pM), murine VEGF-A ₁₂₀ (0.571 pM), rat VEGF-A ₁₆₄ (0.471 pM) and rabbit VEGF-A ₁₆₅ (0.775 pM).	IVT0044 IVT0044EXT	[4.2.1.1-1] [4.2.1.1-2]
Binding affinities of aflibercept to PIGF	Surface plasmon resonance (BiaCore)	In vitro	NA	NA	The equilibrium dissociation constants (K_D) for ligand/aflibercept interaction are as follows: human PIGF-1 (392 pM), human PIGF-2 (38.8 pM), murine PIGF-2 (3.33 pM).	IVT0044 IVT0044EXT	[4.2.1.1-1] [4.2.1.1-2]
Binding affinity of aflibercept to VEGF-B	Surface plasmon resonance (BiaCore)	In vitro	NA	NA	The equilibrium dissociation constant (K_D) for VEGF-B / aflibercept interaction is 1.92 pM	ONVT0015 ONVT0015EXT	[4.2.1.1-3] [4.2.1.1-4]

Abbreviations: NA: non applicable, VEGF: vascular endothelial growth factor, PIGF: placental growth factor

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Inhibition of VEGF-A ₁₆₅ dependent VEGFR-2 receptor phosphorylation in HUVE cells	HUVECs	In vitro	0.5 nM to 3 nM aflibercept at 1 nM VEGF-A ₁₆₅	NA	At a 1:1 molar ratio or greater of aflibercept to VEGF-A ₁₆₅ , complete inhibition of VEGFR-2 receptor phosphorylation was observed.	IVT0043 IVT0043EXT	[4.2.1.1-5] [4.2.1.1-6]
Inhibition of VEGF induced calcium mobilization	HUVECs	In vitro	55 pM to 40 nM aflibercept at 50 pM VEGF-A ₁₆₅	3 replicates / group	Aflibercept inhibits VEGF induced calcium mobilisation with an IC ₅₀ of 1.2 to 1.7 nM.	IVT0043 IVT0043EXT	[4.2.1.1-5] [4.2.1.1-6]
Effect on VEGFR-2 phosphorylation induced by VEGF-A and VEGF-C	PAEC-VEGFR-2 cells	In vitro	0.03 µg/mL to 1 µg/mL aflibercept at 200 ng/mL VEGF-A or 300 ng/mL VEGF-C	duplicates /group	Aflibercept inhibits VEGF-A induced VEGFR-2 phosphorylation with IC ₅₀ of 360 ng/mL (3.15 nM) but not VEGF-C induced phosphorylation.	HVT0136	[4.2.1.1-7]
Inhibition of VEGF-induced proliferation of human dermal microvascular endothelial cells	HDMECs	In vitro	1 pM to 1 nM of aflibercept with 238 pM of rhVEGF-A ₁₆₅	3 replicates / group	IC ₅₀ = 192 pM	IVT0042	[4.2.1.1-8]
Microvessel sprouting in rat aortic ring model : Change in number of vessels in aortic rings	Rat aorta	In vitro	10 pM to 1 nM	5-8 aortas /group	IC ₅₀ = 121 pM in presence of VEGF at 10 ng/mL IC ₅₀ = 42 pM in absence of VEGF	1104	[4.2.1.1-9]

Abbreviations: HUVECs: human umbilical vein endothelial cells, HDMECs: human dermal microvascular endothelial cells, NA: non applicable, VEGF: vascular endothelial growth factor, VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC) and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC). Assays using viability assays in the presence of human NK cells and human complement serum	Tumor and endothelial cells	In vitro	0.85 pM to 50 nM	3 to 5 replicates/group	No CDC or ADCC activities of aflibercept	IVT0037 IVT0037EXT	[4.2.1.1-10] [4.2.1.1-11]

2.6.3 薬理試験概要表
AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Effects on tumor blood vessel density	SCID mice	subcutaneous once	25 mg/kg	3 to 10 mice per group, M	Reduction of vessel density in C6 glioma (80%), U87 glioblastoma (57%) and 786-0 renal cell carcinoma (60%)	IVV0066 IVV0066EXT	[4.2.1.1-12] [4.2.1.1-13]
Rat C6 glioma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous 3 times	0.5, 1, 2.5, 10 and 25 mg/kg	5 to 6 mice per group, M	Significant reduction of tumor burden (p<0.01 from 1 to 25 mg/kg)	IVV0064 IVV0064EXT	[4.2.1.1-14] [4.2.1.1-15]
Human A673 rhabdomyosarcoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice over 1 week	0.5, 1, 2.5, 10 and 25 mg/kg	4 to 6 mice per group, M	Significant reduction of tumor burden (p<0.01 from 10 to 25 mg/kg)	IVV0065 IVV0065EXT	[4.2.1.1-16] [4.2.1.1-17]
Murine renal cell carcinoma RENCA transplanted orthotopically in the kidney	BALB/c nude and SCID mice	subcutaneous 3 times	1, 2.5, 10, 25, and 40 mg/kg	10-13 mice per group, F	Significant inhibition of ascites formation and tumor growth from 10 to 40 mg/kg	IVV0091	[4.2.1.1-18]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient, M: male, F: female

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Genetically engineered pancreatic tumor model Rip1Tag2 mice	Rip1 Tag2 Mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks in 10 week old mice and subcutaneous twice a week for 4 weeks in 12 week old mice	4, 10 and 40 mg/kg	7 to 22 mice per group, F	In 12 week old mice Rip1 Tag2 mice: significant increase life span (ILS = 229% and 312 % at 10 and 40 mg/kg) In 10 week old mice Rip1 Tag2 mice: Significant reduction of tumor nodules in the pancreas (p<0.0001 at 10 and 40 mg/kg and p=0.0091 at 4 mg/kg) Significant reduction of tumor vessels (p<0.01 at 4, 10 and 40 mg/kg) Significant decrease in tumor proliferation (p<0.05 at 4 and 10 mg/kg, p<0.01 at 40 mg/kg)	IVV0052	[4.2.1.1-19]
Human SK-OV-3 ovarian adenocarcinoma subcutaneous xenografts	SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 20	2.5, 10 and 40 mg/kg	5 to 9 mice per group, F	Active from 2.5 to 40 mg/kg (3.8 to 4.2 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient, ILS: increase in life span, M: male, F: female

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Human A2780 ovarian adenocarcinoma subcutaneous xenografts	SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 11	2.5, 10 and 40 mg/kg	5 to 7 mice per group, F	Active from 2.5 to 40 mg/kg (1.4 to 2.3 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human NIH OVCAR-3 ovarian adenocarcinoma subcutaneous xenografts	SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 21	2.5, 10 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active from 2.5 to 40 mg/kg (0.9 to 2 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Mouse B16 melanoma subcutaneous xenografts (early stage)	Swiss nude mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 3	2.5, 10, 25 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active from 2.5 to 40 mg/kg (2.4 to 5.4 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Mouse B16 melanoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	BALB/c nude mice	subcutaneous 3 times (on days 7, 10 and 13)	2.5, 10, 25 and 40 mg/kg	5 to 9 mice per group, F	Active from 2.5 to 40 mg/kg (0.9 to 2.6 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human LOX melanoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	BALB/c nude mice	subcutaneous 3 times (on days 7, 10 and 14)	40 mg/kg	9 to 10 mice per group, F	Inactive (0.6 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human A375 melanoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	BALB/c nude mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 10	4, 10, 40 and 120 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active at 120 and 40 mg/kg (1.9 and 1.2 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient, M: male, F: female

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Human DU 145 prostate carcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 18	2.5, 10, 25 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active from 2.5 to 40 mg/kg (1.1 to 4.7 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human PC-3 prostate adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 13	40 mg/kg	5 to 7 mice per group, F	Inactive (0.3 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Mouse MA13/C mammary adenocarcinoma subcutaneous xenografts (early stage)	Swiss nude mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 4	2.5, 10, 25 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active from 10 to 40 mg/kg (1.3 to 1.5 log cell kill)	1119	[4.2.1.1-21]
Human UIISO BCA-1 mammary adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	BALB/c nude mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 19	2.5, 10, 25 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active from 10 to 40 mg/kg (1.1 to 2.1 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human BxPC-3 pancreatic subcutaneous tumor xenografts (early stage)	BALB/c nude mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 3	2.5, 10, 25 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active from 2.5 to 40 mg/kg (1.1 to 2.1 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient, M: male, F: female

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Human BxPC-3 pancreatic subcutaneous tumor xenografts (advanced stage)	BALB/c nude mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 10	40 mg/kg	5 to 9 mice per group, F	Active (with 1.3 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human PANC-1 pancreatic carcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 10	2.5, 10 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Inactive from 2.5 to 40 mg/kg (0.2 to 0.4 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human MKN-45 gastric adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 8	2.5, 10 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active from 2.5 to 40 mg/kg (1.1 to 2.8 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human Hs746T gastric adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 10	2.5, 10 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active at 10 and 40 mg/kg (1.3 and 1.1 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human SNU-5 gastric adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 10	2.5, 10 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active from 2.5 to 40 mg/kg (1.4 to 2.5 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient, M: male, F: female

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Murine C51 colon adenocarcinoma subcutaneous xenografts (early stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 3	2.5, 10 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active from 2.5 to 40 mg/kg (1.1 to 4.2 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Murine C51 colon adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous on days 9 and 14	2.5, 10, 25 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active at 25 and 40 mg/kg (1.2 and 2.0 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human HT-29 colon adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 10	2.5, 10 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active from 2.5 to 40 mg/kg (0.7 to 2.2 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human COLO 205 colon carcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	ICR SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 13	10, 25 and 40 mg/kg	8 mice per group, F	Active from 10 to 40 mg/kg (0.9 to 1.6 log cell kill)	IVV0080 IVV0080EXT	[4.2.1.1-22] [4.2.1.1-23]
Human HCT 116 colon adenocarcinoma subcutaneous xenografts (early stage)	Swiss nude mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 4	2.5, 10, 25 and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active from 2.5 to 40 mg/kg (1.3 to 2.5 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient, M: male, F: female

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Human HCT 116 colon adenocarcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	ICR SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 11	4, 10, 25 and 40 mg/kg	8 to 10 mice per group, F	Active from 10 to 40 mg/kg (0.9 to 1.6 log cell kill)	IVV0081 IVV0081EXT	[4.2.1.1-24] [4.2.1.1-25]
Human NCI-H460 non small cell lung cancer subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 7	2.5, 10, and 40 mg/kg	6 to 10 mice per group, F	Active from 10 to 40 mg/kg (2.7 to 3.4 log cell kill)	IVV0109	[4.2.1.1-26]
Human A549 lung carcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week from day 13 to day 27	2.5, 10, and 40 mg/kg	6 to 10 mice per group, F	Active from 10 to 40 mg/kg (1.4 to 1.7 log cell kill)	IVV0109	[4.2.1.1-26]
Human SHP-77 small cell lung carcinoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 17	2.5, 10, and 40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active from 10 to 40 mg/kg (3.7 to 4.3 log cell kill)	IVV0109	[4.2.1.1-26]
Human SK-N-MC neuroblastoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 3 weeks starting on day 14	40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active (2.5 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient, M: male, F: female

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Human SK-N-AS neuroblastoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 17	40 mg/kg	10 mice per group, F	Inactive (0.6 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human RH-30 rhabdomyosarcoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 14	40 mg/kg	6 to 10 mice per group, F	Active (2.0 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human TC-71 Ewing's sarcoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous 3 times (on days 10, 13 and 17)	40 mg/kg	6 to 10 mice per group, F	Active (3.7 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human SK-ES-1 Ewing's sarcoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 11	40 mg/kg	6 to 10 mice per group, F	Active (3.2 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human HT-1080 fibrosarcoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous thrice the first week (days 11, 14, 17) and twice the second week (days 20 and 23)	4, 10, 25 and 40 mg/kg	8 to 10 mice per group, F	Inactive from 4 to 40 mg/kg (0 to 0.2 log cell kill)	IVV0082 IVV0082EXT	[4.2.1.1-27] [4.2.1.1-28]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient, M: male, F: female

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Human NAMALWA Burkitt lymphoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous twice a week for 2 weeks starting on day 10	10, 25 and 40 mg/kg	5 to 8 mice per group, F	Active from 10 to 40 mg/kg (2.1 to 2.3 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Human WSU-DLCL-2 diffuse large lymphoma subcutaneous xenografts (advanced stage)	SCID mice	subcutaneous 3 times (on days 15, 19 and 23)	40 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active (2.0 log cell kill)	IVV0051	[4.2.1.1-20]
Combination treatment of aflibercept and oxaliplatin in mice bearing subcutaneous colon adenocarcinoma C51	SCID mice	subcutaneous aflibercept at 40 mg/kg on days 10 and 13 and/or oxaliplatin intravenous at 4.8 to 12.6 mg/kg on days 10 and 13	Aflibercept at 40 mg/kg and/ or oxaliplatin from 4.8 to 12.6 mg/kg	6 to 10 mice per group, F	Synergistic combination (4.6 log cell kill for the HNTD of the combination versus 3.4 log cell kill for the HNTD of oxaliplatin and 1.5 log cell kill for the HDT of aflibercept)	IVV0103	[4.2.1.1-29]
Combination treatment of aflibercept and 5-fluorouracil in mice bearing subcutaneous mammary adenocarcinoma MA13/C	Swiss nude mice	subcutaneous aflibercept twice weekly for 3 weeks and/or intravenous 5-FU once a week for 3 weeks	Aflibercept from 2.5 to 40 mg/kg and/ or 5-FU from 34.6 to 145 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Synergistic combination (2.7 log cell kill for the HDT of the combination versus 1.4 log cell kill for the HDT of aflibercept and 1.3 log cell kill for the HNTD of 5-FU)	1119	[4.2.1.1-21]

Abbreviations: SCID: severe combined immunodeficient, M: male, F: female, HDT: highest dose tested, HNTD: highest non-toxic dose, 5-FU: 5-fluorouracil

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.2 - Primary Pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Combination treatment of aflibercept and docetaxel in mice bearing subcutaneous B16 melanoma	BALB/C nude mice	subcutaneous aflibercept and/or intravenous docetaxel on days 3, 6, and 9	Aflibercept from 2.5 to 40 mg/kg and/or docetaxel from 5.8 to 24.2 mg/kg	5 to 10 mice per group, F	Active combination (5 log cell kill for the HNTD of the combination versus 4.2 log cell kill for the HDT of aflibercept and 1.5 log cell kill for the HNTD of docetaxel)	1119	[4.2.1.1-21]
Combination treatment of aflibercept and irinotecan in mice bearing subcutaneous colon carcinoma HCT 116	NCR nude mice	subcutaneous aflibercept and/or intravenous irinotecan on days 12, 15, and 18	aflibercept from 2.5 to 40 mg/kg and/or irinotecan from 12.5 to 52.4 mg/kg	8 to 10 mice per group, F	Synergistic combination (3.0 log cell kill for the HNTD of the combination versus 1.8 log cell kill for the HNTD of irinotecan and 1.7 log cell kill for the HDT of aflibercept)	IVV0043 IVV0043EXT	[4.2.1.1-30] [4.2.1.1-31]

Abbreviations: M: male, F: female, HDT: highest dose tested, HNTD: highest non-toxic dose

2.6.3 薬理試験概要表
AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

3 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

4 安全性薬理試験

表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology overview – noteworthy findings

Test Article: aflibercept

Organ System Evaluated	Test System	Method of Administration	Dose	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location
Cardiovascular (in vivo)	mice	subcutaneous	0, 2.5, 12.5 and 25 mg/kg/adm	4 to 6 M	Reduction in microvessel density mainly in the pancreas islets, thyroid follicles and liver at all doses	No	VGFT-MX-08019	[4.2.1.3-1]
	mice and rats	subcutaneous	0, 0.05, 0.15, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 and 25 mg/kg for rats 0, 2.5 and 25 mg/kg for mice	3 to 9 M	Dose-related increases in blood pressure from 0.5 mg/kg in rats and at 2.5 and 25 mg/kg in mice. This effect was closely tied to circulating levels of free aflibercept.	No	VGFT-MX-08018	[4.2.1.3-2]
	rats	subcutaneous	25 mg/kg per week	4 to 6 M	Multiple classes of anti-hypertensives were found to be effective in lowering blood pressure in rats treated with aflibercept.	No	VGFT-MX-08025	[4.2.1.3-3]
Thrombosis	rabbits	intravenous	0, 0.3, 3 and 30 mg/kg/adm	6 to 11 M	No compound-related effects on venous and arterial thrombus formation	Yes	PMA00017	[4.2.1.3-4]

Abbreviations: GLP: good laboratory practices, adm: administration, M: male, F: Female

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology overview – noteworthy findings (continued)

Organ System Evaluated	Test System	Method of Administration	Dose	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location
Respiratory	rats	intravenous	0, 10, 50 and 250 mg/kg	8 M	No compound-related effects on the respiratory parameters at any dose level	Yes	RCV0115	[4.2.1.3-5]
Renal function	mice	subcutaneous	0 and 25 mg/kg/adm	6 M	No compound-related effects on the renal function	No	VGFT-MX-08 020	[4.2.1.3-6]
Wound healing (incisional)	rabbits	intravenous	0, 0.3, 3 and 30 mg/kg/adm	12 M	Inhibition of wound healing and repair (reduction in blood vessel density and in tensile strength) at all doses	Yes	PMA00018	[4.2.1.3-7]
Wound healing (excisional)	rabbits	intravenous	0, 0.3, 3 and 30 mg/kg/adm	9 M	Impairment of wound healing and repair (minimal fibrous response, neovascularisation and/or epidermal hyperplasia and increased incidence of open wounds) at all doses	Yes	PMA00019	[4.2.1.3-8]

Abbreviations: GLP: good laboratory practices, adm: administration, M: male, F: Female

表 2.6.3.4.2 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - vessel density in normal tissues

Test Article: aflibercept

Title: Effect of VEGF Trap administration on capillary density in normal murine tissues					
Species/Strain: C57BL/6 mice		Test Article (Batch): [REDACTED]		Study No.: VGFT-MX-08019	
No. per Group/Gender: 4 or 6 males		Vehicle/Formulation: Aqueous solution of [REDACTED] mM phosphate, [REDACTED] mM citrate, [REDACTED] mM [REDACTED] % (w/v) sucrose, [REDACTED] % (w/v) polysorbate 20, pH [REDACTED]		Location: [4.2.1.3-1]	
Weight/Age: 9 weeks of age				Start Date: [REDACTED]	
		Method of Administration: subcutaneous administration twice a week for 2 or 4 weeks		GLP Compliance: No	
Observation Period/Times: The first subgroup of mice was treated for 2 weeks (total of 5 injections). The second subgroup of mice was treated for 2 or 4 weeks.					
Tissues ^a	Vehicle	Human Fc	AVE0005 (mg/kg)		
			2.5	12.5	25
Adipose (epididymal)					
2 weeks of dosing	7.9 ± 0.7	7.2 ± 0.5	NE	6.3 ± 0.8	6.9 ± 1.4
2 weeks of dosing	11.6 ± 0.5	NE	9.1 ± 0.7	NE	7.8 ± 1.0**
4 weeks of dosing	9.4 ± 0.4	NE	5.5 ± 1.1**	NE	5.3 ± 0.5**
Adrenal gland					
2 weeks of dosing (medulla)	15.1 ± 1.3	14.0 ± 1.6	NE	12.1 ± 1.2	13.5 ± 1.4
2 weeks of dosing (cortex)					
4 weeks of dosing (cortex)	23.4 ± 3.4	NE	22.7 ± 1.1	NE	24.8 ± 2.8
	NE	NE	NE	NE	NE
Duodenum					
2 weeks of dosing	8.5 ± 1.1	7.2 ± 0.4	NE	8.3 ± 0.3	8.2 ± 1.3
2 weeks of dosing	NE	NE	NE	NE	NE
4 weeks of dosing	NE	NE	NE	NE	NE

Abbreviations: NE: not evaluated, GLP: good laboratory practices

Statistical significance: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01 (one-way ANOVA and Dunnett's post-hoc comparison)

^a Mean vascular density ± SEM.

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.4.2 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - vessel density in normal tissues (continued)

Title: Effect of VEGF Trap administration on capillary density in normal murine tissues (VGFT-MX-08019) (continued)					
Tissues ^a	Vehicle	Human Fc	AVE0005 (mg/kg)		
			2.5	12.5	25
Liver					
2 weeks of dosing	18.4 ± 1.1	19.7 ± 0.7	NE	15.2 ± 1.4	11.7 ± 1.5**
2 weeks of dosing	31.2 ± 1.5	NE	21.5 ± 1.0**	NE	20.8 ± 1.5**
4 weeks of dosing	34.6 ± 0.9	NE	22.8 ± 0.9**	NE	17.4 ± 1.3**
Pancreas (islets)					
2 weeks of dosing	23.7 ± 0.7	21.4 ± 2.0	NE	14.2 ± 0.8**	12.8 ± 1.0**
2 weeks of dosing	18.7 ± 0.2	NE	14.3 ± 0.5**	NE	10.1 ± 0.4**
4 weeks of dosing	18.9 ± 0.3	NE	14.9 ± 0.6**	NE	9.1 ± 0.3**
Pancreas (exocrine)					
2 weeks of dosing	8.2 ± 0.5	7.7 ± 0.4	NE	8.1 ± 0.5	7.8 ± 0.3
2 weeks of dosing	8.0 ± 0.4	NE	8.4 ± 0.4	NE	7.6 ± 0.3
4 weeks of dosing	8.0 ± 0.3	NE	8.2 ± 0.3	NE	7.0 ± 0.3
Pituitary gland (anterior)					
2 weeks of dosing	15.1 ± 0.4	13.1 ± 0.6	NE	12.5 ± 0.8*	12.2 ± 0.5*
2 weeks of dosing	11.7 ± 0.6	NE	10.5 ± 0.2	NE	10.7 ± 0.5
4 weeks of dosing	11.2 ± 0.4	NE	9.9 ± 0.4	NE	10.2 ± 0.3
Pituitary gland (posterior)					
2 weeks of dosing	16.2 ± 0.8	15.0 ± 0.5	NE	12.4 ± 0.5**	14.0 ± 0.8
2 weeks of dosing	14.3 ± 0.2	NE	12.7 ± 0.4*	NE	11.6 ± 0.4**
4 weeks of dosing	12.6 ± 0.5	NE	11.8 ± 0.7	NE	9.9 ± 0.3**
Retina					
2 weeks of dosing	11.9 ± 0.5	12.7 ± 0.1	NE	12.3 ± 0.3	11.6 ± 0.3
2 weeks of dosing	13.2 ± 0.5	NE	13.5 ± 0.2	NE	13.6 ± 0.2
4 weeks of dosing	13.5 ± 0.5	NE	13.2 ± 0.2	NE	13.6 ± 0.3

Abbreviations: NE: not evaluated, SEM: standard error of the mean

Statistical significance: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01 (one-way ANOVA and Dunnett's post-hoc comparison)

^a Mean vascular density ± SEM.

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.4.2 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - vessel density in normal tissues (continued)

Title: Effect of VEGF Trap administration on capillary density in normal murine tissues (VGFT-MX-08019) (continued)					
Tissues ^a	Vehicle	Human Fc	AVE0005 (mg/kg)		
			2.5	12.5	25
Thyroid gland					
2 weeks of dosing	25.8 ± 1.2	23.5 ± 1.1	NE	16.8 ± 0.8**	16.3 ± 0.8**
2 weeks of dosing	19.6 ± 0.5	NE	15.2 ± 1.0**	NE	13.2 ± 1.1**
4 weeks of dosing	21.8 ± 0.8	NE	14.2 ± 1.0**	NE	11.0 ± 0.4**
Conclusions: Subcutaneous administrations of aflibercept resulted in statistically significant reductions in microvessel density mainly within the liver, pancreatic islets and thyroid and to a lesser extent, in the pituitary glands and adipose tissue.					

Abbreviations: NE: not evaluated, SEM: standard error of the mean

Statistical significance: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ (one-way ANOVA and Dunnett's post-hoc comparison)

^a Mean vascular density ± SEM.

表 2.6.3.4.3 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - blood pressure and heart rate (rodents)

Test Article: aflibercept

Title: Blood pressure effects of VEGF Trap (AVE0005) in telemetered mice and rats					
Species/Strain: C57BL/6 mouse and Wistar-Kyoto rat		Test Article (Batch): [REDACTED] for mice [REDACTED] for rats		Study No.: VGFT-MX-08018	
No. per Group/Gender: 3 to 9 males/group		Vehicle/Formulation: Aqueous solution of [REDACTED] mM phosphate, [REDACTED] mM citrate, [REDACTED] mM [REDACTED] % (w/v) sucrose, [REDACTED] % (w/v) polysorbate 20, pH [REDACTED] for [REDACTED] Aqueous solution of [REDACTED] mM phosphate, [REDACTED] mM citrate, [REDACTED] mM [REDACTED] % (w/v) polysorbate 20, pH [REDACTED] for [REDACTED]		Location: [4.2.1.3-2]	
Age: 10-20 weeks for both species				Start Date: [REDACTED]	
Weight: 26 to 32 g(mouse) 300 to 400 g(rat)					
		Method of Administration: Single subcutaneous administration		GLP Compliance: No	
Measurement Times: Blood pressure was measured for 10 seconds every 10 minutes, at least 48 hours before treatment and then up to 3 to 4 weeks after the single injection.					
Measured Parameters: SBP: Systolic arterial Blood Pressure, DBP: Diastolic arterial Blood Pressure, HR: Heart Rate					
Mice	Vehicle	AVE0005 2.5 mg/kg		AVE0005 25 mg/kg	
	Baseline (Day -1)	Baseline(Day -1)	E_{max} T_{max}	Baseline (Day -1)	E_{max} T_{max}
Parameter ^a (Unit)	Mean ± SEM	Mean ± SEM	Mean Max elevation	Mean ± SEM	Mean Max elevation
SBP (mmHg)	123.5 ± 3.0	128.5 ± 2.9	+14.2 ± 0.8 Day 2 14.36 ± 0.68***	126.3 ± 4.1	+16.4 ± 1.3 Day 16 17.30 ± 1.07***

Abbreviations: SEM: standard error of the mean, GLP: good laboratory practices

Statistical significance: The treated groups were compared to the control group using a 2-way ANOVA. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (Bonferroni multiple comparison test)

^a For control group, mean ± SEM is shown; for treated groups, mean ± SEM before treatment, maximal changes ($E_{max} \pm SEM$) from pre-treatment values (maximal value of mean changes during the post dosing period), with the time of occurrence (T_{max}) in day, and the mean maximal elevations(maximal individual mean values attained at any time during the post dosing period) are shown.

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ペータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.4.3 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - blood pressure and heart rate (rodents)(continued)

Title: Blood pressure effects of VEGF Trap (AVE0005) in telemetered mice and rats (VGFT-MX-08018) (continued)					
Mice	Vehicle	AVE0005 2.5 mg/kg		AVE0005 25 mg/kg	
	Baseline (Day -1)	Baseline(Day -1)	$E_{\max}$ $T_{\max}$	Baseline (Day -1)	$E_{\max}$ $T_{\max}$
Parameter ^a (Unit)	Mean ± SEM	Mean ± SEM	Mean Max elevation	Mean ± SEM	Mean Max elevation
DBP (mmHg)	97.1 ± 3.0	102.2 ± 0.5	+11.7 ± 0.5 Day 2 11.92 ± 0.35***	98.6 ± 2.9	+12.3 ± 0.5 Day 2 13.47 ± 0.88***
HR (beats/min)	592.3 ± 7.6	588.9 ± 16.0	-21.8 ± 2.5 Day 1	589.8 ± 6.9	-36.9 ± 8.5 Day 10
Cmax free AVE0005 (µg/mL)	NA	11.55		125.2	

Abbreviations: NA: not applicable, SEM: standard error of the mean

Statistical significance: The treated groups were compared to the control group using a 2-way ANOVA. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (Bonferroni multiple comparison test)

^a For control group, mean ± SEM is shown; for treated groups, mean ± SEM before treatment, maximal changes ($E_{\max} \pm \text{SEM}$) from pre-treatment values (maximal value of mean changes during the post dosing period), with the time of occurrence ($T_{\max}$) in day, and the mean maximal elevations(maximal individual mean values attained at any timeduring the post dosing period) are shown.

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ペータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.4.3 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - blood pressure and heart rate (rodents)(continued)

Title: Blood pressure effects of VEGF Trap (AVE0005) in telemetered mice and rats (VGFT-MX-08018) (continued)									
Rats	Human Fc	AVE0005 1 mg/kg		AVE0005 2.5 mg/kg		AVE0005 10 mg/kg		AVE0005 25 mg/kg	
	Baseline	Baseline	$E_{\max}$ $T_{\max}$	Baseline	$E_{\max}$ $T_{\max}$	Baseline	$E_{\max}$ $T_{\max}$	Baseline	$E_{\max}$ $T_{\max}$
Parameter ^a (Unit)	Mean ± SEM	Mean ± SEM	Mean Max elevation	Mean ± SEM	Mean Max elevation	Mean ± SEM	Mean Max elevation	Mean ± SEM	Mean Max elevation
SBP (mmHg)	NA	133.2 ± 1.1	+5.1 ± 1.0 Day 2 5.7± 0.7	132.2 ± 5.7	+11.4 ± 0.8 Day 2 12 ± 1.2	135.0 ± 0.1	+19.4 ± 1.1 Day 4 20 ± 1.2***	133.7 ± 2.4	+19.9 ± 1.7 Day 11 22 ± 1.5***
DBP (mmHg)	NA	91.6 ± 0.6	+5.3 ± 0.7 Day 2 5.4± 0.6	88.0 ± 5.3	+10.1 ± 1.0 Day 2 10.6 ± 1.0	92.1 ± 0.6	+16.0 ± 1.0 Day 4 16.7 ± 1.1***	96.9 ± 2.7	+16.0 ± 1.3 Day 4 17.8 ± 1.0***
HR (beats/min)	NA	324.7 ± 3.2	-12.4 ± 3.6 Day 2	322.7 ± 2.3	-18.7 ± 8.9 Day 2	328.6 ± 8.4	-25.1 ± 4.2 Day 2	343.1 ± 3.7	-22.2 ± 3.5 Day 1
Cmax free AVE0005 (µg/mL)	NA	2.62		7.02		31.6		42.0	

Abbreviations: NA: not applicable, SEM: standard error of the mean

Statistical significance: a 1-way ANOVA was performed amongst treated-groups (no control data). *** $p \leq 0.001$ as compared to the group receiving 1 mg/kg (Bonferroni multiple comparison test)

^a For control group, mean $\pm$ SEM is shown; for treated groups, mean $\pm$ SEM before treatment, maximal changes ($E_{\max} \pm$ SEM) from pre-treatment values (maximal value of mean changes during the post dosing period), with the time of occurrence ($T_{\max}$) in day, and the mean maximal elevations(maximal individual mean values attained at any time during the post dosing period) are shown.

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.4.3 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - blood pressure and heart rate (rodents)(continued)

Title: Blood pressure effects of VEGF Trap (AVE0005) in telemetered mice and rats (VGFT-MX-08018) (continued)									
Rats	Human Fc	AVE0005 0.05 mg/kg		AVE0005 0.15 mg/kg		AVE0005 0.5 mg/kg		AVE0005 5 mg/kg	
	baseline	Baseline	$E_{\max}$ $T_{\max}$	Baseline	$E_{\max}$ $T_{\max}$	Baseline	$E_{\max}$ $T_{\max}$	Baseline	$E_{\max}$ $T_{\max}$
Parameter ^a (Unit)	Mean $\pm$ SEM	Mean $\pm$ SEM	Mean Max elevation	Mean $\pm$ SEM	Mean Max elevation	Mean $\pm$ SEM	Mean Max elevation	Mean $\pm$ SEM	Mean Max elevation
SBP (mmHg)	116.0 $\pm$ 1.9	115.9 $\pm$ 1.8	+2.1 $\pm$ 1.0 Day 12 4.1 $\pm$ 0.8	119.7 $\pm$ 1.9	-1.4 $\pm$ 0.8 Day 9 2.7 $\pm$ 0.4	118.2 $\pm$ 1.5	+4.3 $\pm$ 0.7 Day 3 4.7 $\pm$ 0.6**	117.8 $\pm$ 1.2	+10.0 $\pm$ 3.8 Day 3 11.3 $\pm$ 2.8***
DBP (mmHg)	79.9 $\pm$ 1.4	79.9 $\pm$ 1.7	-1.2 $\pm$ 0.5 Day 2 2.3 $\pm$ 0.5	83.3 $\pm$ 1.6	+2.2 $\pm$ 1.2 Day 16 2.9 $\pm$ 1.0	80.9 $\pm$ 1.9	+3.2 $\pm$ 0.6 Day 3 3.5 $\pm$ 0.5	83.1 $\pm$ 0.5	+9.9 $\pm$ 4.2 Day 3 10.5 $\pm$ 3.7***
HR (beats/min)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Conclusion: The single subcutaneous injection of aflibercept resulted in dose-related increases in blood pressure at 2.5 and 25 mg/kg in mice and from 0.5 mg/kg in rats. This effect was closely tied to circulating levels of free aflibercept. The NOEL in rats was considered to be 0.15 mg/kg.

Abbreviations: ND: not determined, SEM: standard error of the mean

Statistical significance: The treated groups were compared to the control group using a 2-way ANOVA. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (Bonferroni multiple comparison test)

^a For control group, mean $\pm$ SEM is shown; for treated groups, mean $\pm$ SEM before treatment, maximal changes ($E_{\max} \pm$ SEM) from pre-treatment values (maximal value of mean changes during the post dosing period), with the time of occurrence ($T_{\max}$) in day, and and the mean maximal elevations(maximal individual mean values attained at any timeduring the post dosing period) are shown.

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.4.4 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - blood pressure (rat)

Test Article: aflibercept

Title: Anti-hypertensive screening in VEGF Trap-treated Wistar-Kyoto Rats								
Species/Strain: Rat/ Wistar-Kyoto		Test Article (Batch): [REDACTED]				Study No.: VGFT-MX-08025		
No. per Group/Gender: 4 to 6 males		Vehicle/Formulation: Aqueous solution of [REDACTED] mM phosphate, [REDACTED] mM citrate, [REDACTED] mM [REDACTED] % (w/v) polysorbate 20, pH [REDACTED]				Location: [4.2.1.3-3]		
Age: 10-20 weeks						Start Date: [REDACTED]		
Weight: 300 to 400 g		Method of Administration: Subcutaneous administration of aflibercept at 25 mg/kg once a week for 3 weeks followed 3 days after each injection of aflibercept by a daily administration of vehicle or anti-hypertensive drugs for 3 days				GLP Compliance: No		
Measured or Calculated Parameters: Systolic Blood Pressures (SBP) and Heart rate (HR) were recorded for a period of up to 5 weeks after the 1 st administration of aflibercept								
Parameter ^a (Unit)	AVE0005 (25 mg/kg) P _V ^b	Control (Vehicle) P _V ^b	Captopril (ip administration)			Nifedipine (ip administration)		
			30 mg/kg	70 mg/kg	100 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	15 mg/kg
			E _{max}	E _{max}	E _{max}	E _{max}	E _{max}	E _{max}
Change in SBP from baseline (mmHg)	+15.4 ± 2.6	-7.1 ± 5.3	-2.7 ± 9.8	-18.1 ± 3.2	-20.5 ± 6.2	-30.7 ± 5.1	-34.3 ± 2.3	-41.6 ± 1.4
Change in HR from baseline (beats/min)	-44.8 ± 7.9	+55.3 ± 12.3	+51.8 ± 18.1	+91.8 ± 14.6	+48.6 ± 18.3	+108.1 ± 5.2	+108.7 ± 4.6	+105.8 ± 14.8
Parameter ^a (Unit)	AVE0005 (25 mg/kg) P _V ^b	Control (Vehicle) P _V ^b	Prazosin (ip administration)			Furosemide (oral administration)		
			1 mg/kg	2 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
			E _{max}	E _{max}	E _{max}	E _{max}	E _{max}	E _{max}
Change in SBP from baseline (mmHg)	+14.0 ± 2.2	+7.7 ± 7.4	-24.8 ± 4.8	-28.6 ± 5.5	-20.4 ± 6.5	+11.1 ± 2.1	+9.0 ± 1.8	+7.1 ± 2.1
Change in HR from baseline (beats/min)	-19.2 ± 4.1	+66.0 ± 10.7	+89.6 ± 17.2	+117.5 ± 18.4	+124.5 ± 13.1	No effect		

Abbreviations: ip: intraperitoneal, SEM: standard error of the mean, GLP: good laboratory practices, Pv: pre-treatment value

^a Only modified parameters are presented. For pretreatment values, mean change ± SEM as compared to baseline value is shown; for control and treated groups, maximal change in mm Hg (E_{max}) from pre-treatment values (maximal value of mean changes during the post dosing period) are shown^b Pre-treatment value = last value recorded before administration of anti-hypertensive drugs or control

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ペータ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.4.4 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - blood pressure (rat)(continued)

Title: Anti-hypertensive screening in VEGF Trap-treated Wistar-Kyoto Rats (VGFT-MX-08025) (continued)								
Parameter ^a (Unit)	AVE0005 (25 mg/kg) P _v ^b	Control (Vehicle) P _v ^b	Propanolol (ip administration)			Isoproterenol (ip administration)		
			1 mg/kg	4 mg/kg	10 mg/kg	1 mg/kg	2.5 mg/kg	5 mg/kg
			E _{max}	E _{max}	E _{max}	E _{max}	E _{max}	E _{max}
Change in SBP from baseline (mmHg)	+18.1 ± 3.8	+21.8 ± 1.2	No effect			-48.0 ± 3.7	-40.7 ± 1.6	-19.3 ± 8.4
Change in HR from baseline (beats/min)	+8.6 ± 11.1	+49.4 ± 9.2				+145.5 ± 20.0	+175.1 ± 19.6	+122.0 ± 17.3
Parameter ^a (Unit)	AVE0005 (25 mg/kg) P _v ^b	Control (Vehicle) P _v ^b	Hydralazine (oral administration)			Ramipril (oral administration)		
			10 mg/kg	20 mg/kg	30 mg/kg	10 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
			E _{max}	E _{max}	E _{max}	E _{max}	E _{max}	E _{max}
Change in SBP from baseline (mmHg)	+15.5 ± 3.5	+25.9 ± 6.3	-18.3 ± 3.1	-19.6 ± 5.7	-21.5 ± 4.0	-2.7 ± 5.9	-3.6 ± 1.4	-17.1 ± 8.8
Change in HR from baseline (beats/min)	+3.8 ± 6.3	+61.0 ± 12.6	+84.2 ± 17.1	+106.1 ± 13.4	+108.3 ± 14.2	No effect		
Parameter ^a (Unit)	AVE0005 (25 mg/kg) P _v ^b	Control (Vehicle) P _v ^b	Molsidomine (ip administration)					
			10 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg			
			E _{max}	E _{max}	E _{max}			
Change in SBP from baseline (mmHg)	+18.0 ± 1.6	+26.8 ± 2.7	-12.9 ± 1.4	-30.6 ± 3.5	-35.0 ± 2.9			
Change in HR from baseline (beats/min)	-21.0 ± 12.2	+64.4 ± 7.7	+78.4 ± 21.6	+147.3 ± 15.4	+139.5 ± 9.9			

Abbreviations: ip: intraperitoneal, SEM: standard error of the mean, Pv: pre-treatment value

^a Only modified parameters are presented. For pretreatment values, mean change ± SEM as compared to baseline value is shown; for control and treated groups, maximal change in mm Hg (E_{max}) from pre-treatment values (maximal value of mean changes during the post dosing period) are shown.

^b Pre-treatment value = last value recorded before administration of anti-hypertensive drugs or control.

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.4.5 - Safety pharmacology - thrombosis – rabbits

Test Article: aflibercept

Title: A study to determine the potential effects of VEGF-Trap (AVE0005) on venous and arterial thrombotic formation in an electrolytic injury model in rabbits					
Species/Strain: Rabbit/New Zealand White		Test Article (Batch):		Study No.: PMA00017	
No. per Group/Gender: : 6 to 11 males		Vehicle/Formulation: Aqueous solution of mmol/L sodium phosphate, mmol/L sodium citrate, mmol/L % sucrose and % polysorbate 20, pH		Location: [4.2.1.3-4]	
Weight: 2.9 to 3.2 kg		Method of Admin: 30-minute intravenous infusion on Days -6, -3 and 1		Start Date:	
				GLP Compliance: Yes	
Parameter ^a (Unit)		Control (Vehicle)	AVE0005 (mg/kg)		
			0.3	3	30
Antibody determination		No anti-aflibercept antibodies detected at any time point			
Peak of free aflibercept (µg/mL) on Day -3		0	9.60	104	1220
Heart rate (beats/minute at current initiation)		236 ± 43	No compound-related effects on any parameter		
Mean arterial pressure (mm Hg)		50 ± 20.7			
Mean blood flow (mL/minute)					
- Descending aorta		26.2 ± 6.48			
- Right jugular vein		12.8 ± 6.92			
Time to occlusion (minute)					
- Descending aorta		74 ± 26.2			
- Right jugular vein		73 ± 32.3			
Vessel weight (g)		0.0777 ± 0.1964	No compound-related effects on any parameter		
- Descending aorta		0.0942 ±			
- Right jugular vein		0.03081			
Activated clotting time (second)		251.1 ± 49.1			
Conclusions: Intravenous administration of aflibercept at dose levels of 0.3, 3.0, and 30 mg/kg/administration (3 times, 3 days apart) did not affect venous and arterial thrombus formation in an electrolytic injury model in the rabbit.					

Abbreviations: SD: standard deviation, GLP: good laboratory practices

^a For control group, mean ± SD is shown.

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリベルセプト ベータ (遺伝子組換え)

表 2.6.3.4.6 - Safety pharmacology - respiratory system - plethysmography

Test Article: aflibercept

Title: AVE0005: Effect on the respiratory function after a single 30-minute intravenous infusion in unrestrained conscious rats using whole body plethysmography					
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		Test Article (Batch): [REDACTED]		Study No.: RCV0115	
No. per Group/Gender: 8/M		Vehicle/Formulation: Aqueous solution of [REDACTED] mmol/L sodium phosphate, [REDACTED] mmol/L sodium citrate, [REDACTED] mmol/L [REDACTED] % sucrose and [REDACTED] % polysorbate 20, pH [REDACTED]		Location: [4.2.1.3-5]	
Weight: 200 to 270 g				Start Date: [REDACTED]	
			Method of Admin: 30-minute intravenous infusion	GLP Compliance: Yes	
Measurements: Respiratory Rate (RR), Peak Inspiratory Flow (PIF), Peak Expiratory Flow (PEF), Inspiration Time (IT), Expiration Time (ET), Tidal Volume (TV), Minute Volume (MV), and enhanced pause (Penh) over 7 days after administration of the test article.					
Parameter ^a	Control (Vehicle)	AVE0005 (mg/kg)			Theophylline (mg/kg) ^b
		10	50	250	30
RR	121±8 cycles/min	No compound-related effects on any parameter			+ 187±33% (T= 30 minutes)**
PIF	1896±83 a.u.				+155±21% (T= 15 minutes)***
PEF	1432±38 a.u.				+127±31% (T= 30 minutes)**
IT	208±15 ms				-61±5% (T= 30 minutes)***
ET	302±20 ms				-57±6% (T= 30 minutes)***
TV	276±16 a.u.				-19±5% (T= 60 minutes)*
MV	33272±1302 a.u.				+109±11% (T= 15 minutes)**
Penh	0.62±0.05				-31±6% (T= 90 minutes)
Conclusions: No effects on respiratory parameters were noted in unrestrained rats treated at 10, 50 or 250 mg/kg aflibercept up to 7 days after administration.					

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ペータ（遺伝子組換え）

Title: AVE0005: Effect on the respiratory function after a single 30-minute intravenous infusion in unrestrained conscious rats using whole body plethysmography

Abbreviations: SEM: standard error of the mean, GLP: good laboratory practices, a.u.:arbitrary unit

Statistical significance: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (Student's t test)

^a Only modified parameters are presented. For control group, mean $\pm$ SEM is shown; for positive control group, maximal percent change ($E_{\max}$) from pre-treatment values, with the time of occurrence ($T_{\max}$) in minutes, are shown. ^b: % from baseline

表 2.6.3.4.7 - Safety pharmacology - renal function - mice

Test Article: aflibercept

Title: Effects of VEGF Trap on renal function in C57BL/6 mice		
Species/Strain: Mice/ C57BL/6	Test Article (Batch): [REDACTED]	Study No.: VGFT-MX-08020
No. per Group/Gender: 6/M	Vehicle/Formulation: Aqueous solution of [REDACTED] mmol/L sodium phosphate, [REDACTED] mmol/L sodium citrate, [REDACTED] mmol/L [REDACTED] and [REDACTED] % polysorbate 20, pH [REDACTED]	Location: [4.2.1.3-6]
Weight: 21 to 27 grams		Start Date: [REDACTED]
	Method of Administration: Subcutaneous	GLP Compliance: No
Dosing and observation period: Mice were treated twice a week for 4 weeks.		
Evaluated Parameters: Investigations were limited to urinalysis on dosing Weeks 2 and 4.		
Parameter ^a (Unit)	Control (Vehicle)	AVE0005 (mg/kg/adm) 25
Glucose (mg/24h)		
Week 2	1.24 ± 0.4	0.30 ± 0.07*
Week 4	0.20 ± 0.04	0.16 ± 0.02
Conclusions: Subcutaneous administration of aflibercept at 25 mg/kg/administration twice a week for 4 weeks did not appreciably alter the renal function in adult mice. A decrease in glucose excretion was noted on dosing Week 2 but no longer observed after 4 weeks of treatment, and thus was considered as an abnormal high level of glucose excretion by some animals in the vehicle group at the 2-week time point, rather than a decrease in glucose excretion associated with VEGF Trap treatment.		

Abbreviations: SEM: standard error of the mean, GLP: good laboratory practices, adm: administration

Statistical significance: * $p \leq 0.05$ (Repeated Measures ANOVA and Bonferroni post-hoc tests)

^a Only modified parameters are presented. Mean ± SEM is shown.

表 2.6.3.4.8 - Safety pharmacology - wound healing - incisional model

Test Article: aflibercept

Title: A study to determine the effects of VEGF Trap on wound healing in an incisional wound model in rabbits					
Species/Strain: Rabbit/New Zealand White		Test Article (Batch): [REDACTED]		Study No.: PMA00018	
No. per Group/Gender: 12/M		Vehicle/Formulation: Aqueous solution of [REDACTED] mmol/L sodium phosphate, [REDACTED] mmol/L sodium citrate, [REDACTED] mmol/L [REDACTED] % sucrose and [REDACTED] % polysorbate 20, pH [REDACTED]		Location: [4.2.1.3-7]	
Weight: 3.0 to 4.0 kg				Start Date: [REDACTED]	
		Method of Admin: 30-minute intravenous infusion		GLP Compliance: Yes	
Dosing and observation period: Aflibercept-treated animals were dosed on Days –2, 3, 7 and 11. Four animals from each treatment group were euthanized on Days 4, 8, and 12.					
Evaluated Parameters: clinical observations, body weights, food consumption, blood samples for antibody and toxicokinetic analyses, evaluation of incisional wounds for erythema and swelling and biomechanical (tensile strength evaluation) or histological evaluation.					
Parameter ^a (Unit)	Control (Vehicle)	AVE0005 (mg/kg/adm)			Dexamethasone (mg/kg/day)
		0.3	3	30	
Antibody determination (incidence)	0/12	0/12	0/12	1/12	-
Peak of free aflibercept (µg/mL) on Day –2	0	6.11	80.2	860	-
Tensile strength (N)					
Day 4	8.75± 8.106	-72%	-75%	-88%	-79%*
Day 8	17.78±10.121	-45%	-40%	-43%	-58%*
Day 12	22.31±12.586	-45%*	-30%	-52%*	-68%*

Abbreviations: SD: standard deviation, GLP: good laboratory practices, adm: administration, -: not applicable

Statistical significance: * $p \leq 0.05$ (one-way ANOVA and post-hoc Dunnett's t Test as compared to the negative control group)

^a Only modified parameters are presented. For vehicle control group, mean ± SD is shown; for treated groups, changes (%) as compared to negative control are shown.

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.4.8 - Safety pharmacology - wound healing - incisional model (continued)

Title: A study to determine the effects of VEGF Trap on wound healing in an incisional wound model in rabbits					
Parameter ^a (Unit)	Control (Vehicle)	AVE0005 (mg/kg/adm)			Dexamethasone (mg/kg/day)
		0.3	3	30	2
Blood vessel density (score)					
Day 4	0.75	-67%	-67%	-33%	0%
Day 8	1.75	+40%	0%	-40%	0%
Day 12	2.00	0%	-29%	-71%	-14%
Conclusions: The repeated intravenous administration of aflibercept at 0.3, 3 and 30 mg/kg/administration resulted in the inhibition of wound repair and healing in the rabbit incisional model.					

Abbreviations: SD: standard deviation, GLP: good laboratory practices, adm: administration, -: not applicable

Statistical significance: * $p \leq 0.05$ (one-way ANOVA and post-hoc Dunnett's t Test as compared to the negative control group);

^a Only modified parameters are presented. For vehicle control group, mean $\pm$ SD is shown; for treated groups, changes (%) as compared to negative control are shown.

表 2.6.3.4.9 - Safety pharmacology - wound healing – excisional model

Test Article: aflibercept

Title: A study to determine the effects of VEGF Trap on wound healing in an excisional wound model in rabbits					
Species/Strain: Rabbit/New Zealand White		Test Article (Batch): [REDACTED]		Study No.: PMA00019	
No. per Group/Gender: 9/M		Vehicle/Formulation: Aqueous solution of [REDACTED] mmol/L sodium phosphate, [REDACTED] mmol/L sodium citrate, [REDACTED] mmol/L [REDACTED] % sucrose and [REDACTED] % polysorbate 20, pH [REDACTED]		Location: [4.2.1.3-8]	
Weight: 2.7 to 3.5 kg				Start Date: [REDACTED]	
		Method of Admin: 30-minute intravenous infusion		GLP Compliance: Yes	
Dosing and observation period: Aflibercept and vehicle-treated animals were dosed on Days-2, 5, 11 and 17. Positive and negative control animals were dosed daily by subcutaneous injection from Day-1 up to necropsy. Three rabbits from each treatment group were necropsied on Days 8, 14 and 20.					
Measured or Calculated Parameters: clinical observations, body weights, food consumption, blood samples for antibody and toxicokinetic analyses, evaluation of excisional wounds for erythema, swelling and dimensions and histological evaluation.					
Parameter ^a (Unit)	Control (Vehicle)	AVE0005 (mg/kg/adm)			Dexamethasone (mg/kg/day)
		0.3	3	30	
Antibody determination (incidence)	0	2/9	0	1/9	-
Peak of free aflibercept (µg/mL) on Day -2	0	8.83	89.7	1020	-
Gross wound measurement(mm²)					
Day 8	19±9.7*	-41%*	-32%*	-46%*	-5%
Day 14	3±8.5*	-33%	+200%*	+300%*	+267%*
Day 20	0±0.2	0%	+∞*	+∞*	+∞*
Fibrous response (score)					
Day 8	2.64	-53%	-63%	-62%	-67%
Day 14	3.86	+0.8%	-41%	-52%	-39%
Day 20	3.69	-1.6%	-15%	-15%	-25%

Abbreviations: SD: standard deviation, GLP: good laboratory practices, adm: administration, -: not applicable

Statistical significance: * p ≤ 0.05 (one-way ANOVA and post-hoc Dunnett's t Test as compared to the negative control group);

^a Only modified parameters are presented. For vehicle control group, mean ± SD is shown; for treated groups, changes (%) as compared to negative control are shown.

2.6.3 薬理試験概要表

AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

表 2.6.3.4.9 - Safety pharmacology - wound healing – excisional model (continued)

Title: A study to determine the effects of VEGF Trap on wound healing in an excisional wound model in rabbits (PMA00019) (continued)					
Parameter ^a (Unit)	Control (Vehicle)	AVE0005 (mg/kg/adm)			Dexamethasone (mg/kg/day)
		0.3	3	30	2
Neovascularization (score)					
Day 8	1.69	-91%	-98%	-100%	-79%
Day 14	0.78	-45%	-87%	-98%	-64%
Day 20	0.08	-18%	+29%	+12%	+112%
Hyperplastic response (score)					
Day 8	2.94	-18%	-49%	-49%	-51%
Day 14	2.97	+17%	-34%	-43%	+33%
Day 20	1.67	-3%	+17%	-2%	+55%
Conclusions: The repeated intravenous administration of aflibercept at 0.3, 3 and 30 mg/kg/administration resulted in an impairment of normal wound repair and healing at all doses on Days 8 and 14 and at 3 and 30 mg/kg/administration on Day 20.					

Abbreviations: SD: standard deviation, adm: administration

Statistical significance: * $p \leq 0.05$ (one-way ANOVA and post-hoc Dunnett's t Test as compared to the negative control group);

^a Only modified parameters are presented. For vehicle control group, mean $\pm$ SD is shown; for treated groups, changes (%) as compared to negative control are shown.

2.6.3 薬理試験概要表
AVE0005 - アフリペルセプト ベータ（遺伝子組換え）

5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。