

CTD 第 2 部

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

MSD 株式会社

目次

	頁
2.6.1 緒言	2

2.6.1 緒言

Clostridium difficile (*C. difficile*) は芽胞を形成する嫌気性のグラム陽性菌であり、広域スペクトル抗菌薬の投与により正常な腸内細菌叢が破壊された患者では、*C. difficile* の定着及び感染を引き起こす[資料4.3: 1]。 *C. difficile* 感染症 (CDI) は抗菌薬治療後に再発することが多く、CDI の再発を抑制する既承認の薬剤がないため、CDI の再発予防はアンメットメディカルニーズと考えられる。

CDI の初回感染及び再発の症状の原因は、2種類の外毒素 *C. difficile* トキシン A (TcdA) 及び *C. difficile* トキシン B (TcdB) であり、宿主動物種に依存して各トキシンによる症状への影響が認められる。TcdB 又は TcdA を標的とする静脈内投与モノクローナル抗体を抗菌薬治療に対する補助療法として用いることは、CDI 再発抑制の新規アプローチである。MK-3415 (旧名称: CDA1、GS-CDA1) は TcdA に対する完全ヒトモノクローナル抗体であり、MK-6072 (旧名称: MDX-1388、CDB1) は TcdB に対する完全ヒトモノクローナル抗体である。MK-3415A は、MK-3415及びMK-6072の併用投与時の名称である。

MK-3415及びMK-6072の開発では、CDI の初回感染又は再発で出現した症状に対して標準治療である抗菌薬が投与された被験者を対象に、個々のモノクローナル抗体を単独投与 (MK-3415又はMK-6072の単独投与)、あるいは併用投与 (MK-3415+MK-6072) したときの CDI 再発抑制について評価する試験が行われた。[2.7.3.2.2 項]で詳述するように、主要な第Ⅲ相試験 (001試験[資料5.3.5.1.3: P001]及び002試験[資料5.3.5.1.4: P002]) では、プラセボと比較して MK-6072単独投与により CDI 再発率が有意に低下すること、また2種類のモノクローナル抗体 (MK-3415+MK-6072) の併用投与から MK-6072単独投与を超える安全性又は有効性のベネフィットが得られないことが示された。さらに、2つの臨床試験 (018試験[資料5.3.5.1.2: P018]及び001試験[資料5.3.5.1.3: P001] [2.7.3.2.1.1項]及び[2.7.3.2.2.2項]) では、MK-3415単独投与では有効性が認められないことが示された。したがって、製造販売承認申請時には最終製剤として MK-6072単独を選択した。

MK-6072は、トキシンの combined repetitive oligopeptide (CROP) 領域にある受容体の推定結合ポケットと一部重なる部分に結合することにより、トキシンとそれらの標的細胞との結合を阻害する。これら抗体の結合は、トキシンの細胞内侵入カスケードを最初の段階で遮断することになり、通常であれば疾患の発現につながる損傷及び炎症が回避される。MK-6072による阻害効果は、in vitro TcdB 中和アッセイ、並びにマウス及びハムスターの CDI モデルを用いた非臨床試験 (げっ歯類モデルでは MK-6072単独による有効性が不十分であるため MK-3415と併用) において認められている。

MK-6072の開発で実施した非臨床薬理試験、薬物動態試験、及び毒性試験を本 Module 2.6の後続の項に纏めて記載した。非臨床データは好ましい安全性及び有効性のプロファイルを示しており、CDI の再発抑制を目的とした MK-6072の製造販売承認申請を支持するものである。

CTD 第 2 部

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

MSD 株式会社

目次

	頁
表一覧.....	2
図一覧.....	3
略号及び用語の定義.....	4
2.6.2 薬理試験の概要文.....	5
2.6.2.1 まとめ.....	5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....	10
2.6.2.2.1 In vitro 薬理試験.....	10
2.6.2.2.1.1 MK-3415及び MK-6072と TcdA 及び TcdB との結合	10
2.6.2.2.1.2 MK-3415及び MK-6072の in vitro 機能活性.....	11
2.6.2.2.1.3 TcdA 及び TcdB 上の MK-3415及び MK-6072のエピトープマッピング	16
2.6.2.2.1.4 MK-3415/MK-6072と TcdA/TcdB との結合の化学量論.....	18
2.6.2.2.1.5 TcdA 及び TcdB とほ乳類細胞との結合に及ぼすMK-3415及びMK-6072 の影響.....	19
2.6.2.2.1.6 遺伝的に異なる <i>C. difficile</i> 株由来 TcdA 及び TcdB の MK-3415及び MK-6072による阻害	20
2.6.2.2.2 In vivo 薬理試験	23
2.6.2.2.2.1 マウスでの全身性毒素曝露に対する MK-3415及び MK-6072の有 効性.....	23
2.6.2.2.2.2 マウスの回腸ループモデルでの TcdA 及び TcdB による腸管毒性に対す る MK-3415+MK-6072の有効性.....	23
2.6.2.2.2.3 <i>C. difficile</i> 感染症モデルでの MK-3415+MK-6072の有効性.....	24
2.6.2.2.2.4 MK-3415+MK-6072の有効性における Fc 介在性機能の役割.....	41
2.6.2.2.2.5 ノトバイオートの仔ブタ <i>C. difficile</i> 感染モデルでの MK-3415+ MK-6072の有効性	42
2.6.2.3 副次的薬理試験.....	42
2.6.2.4 安全性薬理試験.....	43
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	43
2.6.2.6 考察及び結論.....	43
2.6.2.7 参考文献.....	46

表一覧

	頁
表 2.6.2-1 MK-6072の非臨床薬理試験の一覧表.....	7
表 2.6.2-2 非臨床薬理試験に使用した MK-3415及び MK-6072のロット番号一覧.....	8
表 2.6.2-3 MK-3415と TcdA との結合及び MK-6072と TcdB との結合の会合／解離速度 及び親和性	11
表 2.6.2-4 ハムスター <i>C. difficile</i> 感染症モデルを用いて実施した試験一覧	26
表 2.6.2-5 マウス <i>C. difficile</i> 感染症モデルを用いた試験一覧	35

図一覧

	頁
図 2.6.2-1 TcdA 及び TcdB の Rac1 グルコシル化に対する MK-3415 及び MK-6072 の阻害	12
図 2.6.2-2 TcdA 及び TcdB の Vero 細胞質量再分布に対する MK-3415 及び MK-6072 の阻害	13
図 2.6.2-3 Caco-2 二次元単層の完全性に及ぼす TcdA/TcdB 及び MK-3415/MK-6072 の影響	14
図 2.6.2-4 TcdA 及び TcdB の Vero 細胞生存に及ぼす影響、並びに MK-3415 及び MK-6072 による阻害作用	15
図 2.6.2-5 <i>C. difficile</i> と Caco-2 細胞との接着に及ぼす TcdA/TcdB、並びに MK-3415/MK-6072 の影響	16
図 2.6.2-6 TcdB の CROP 領域と MK-6072 の結合モデル	18
図 2.6.2-7 TcdA と HT-29 細胞との結合阻害のフローサイトメトリーによる評価、及び TcdB と Vero 細胞との結合阻害のウエスタンブロットによる評価	20
図 2.6.2-8 Vero 細胞の増殖及び生存に及ぼす TcdA 及び TcdB の影響に対する MK-3415 及び MK-6072 による阻害作用	21
図 2.6.2-9 <i>C. difficile</i> 臨床分離株 81 株の培養上清由来 TcdA 及び TcdB の MK-3415 及び MK-6072 による阻害作用	22
図 2.6.2-10 ハムスター CDI モデルでの生存率に及ぼす MK-3415+MK-6072 の影響	28
図 2.6.2-11 ハムスター CDI モデルの腸の肉眼所見に及ぼす MK-3415+MK-6072 投与の影響	30
図 2.6.2-12 ハムスター CDI モデルの腸での <i>C. difficile</i> 量に及ぼす MK-3415+MK-6072 の影響	32
図 2.6.2-13 盲腸内容物の一部試料間の UniFrac 距離に基づく主座標分析	33
図 2.6.2-14 マウス CDI モデルでの生存率に及ぼす MK-3415+MK-6072 の影響	37
図 2.6.2-15 マウス CDI モデルでの腸の病変に及ぼす MK-3415+MK-6072 の影響	39
図 2.6.2-16 マウス CDI モデルでの腸の <i>C. difficile</i> 量に及ぼす MK-3415+MK-6072 の影響	41

略号及び用語の定義

略号	定義	
Acto/bezlo	MK-3415+MK-6072	MK-3415 + MK-6072
CDA1	MK-3415	MK-3415
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CDI	<i>C. difficile</i> infection	<i>C. difficile</i> 感染症
CFU	Colony-forming unit	コロニー形成単位
CPE	Cytopathic effect	細胞変性効果
CROP	Combined repetitive oligopeptide	combined repetitive oligopeptide
EC ₅₀	Half-maximal effective concentration	50%有効濃度
EC ₉₀	90% effective concentration	90%有効濃度
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid	エチレングリコール四酢酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
Fab	Fragment antibody-binding	抗体の結合領域
FcγR	Fc gamma receptor	Fc ガンマ受容体
HDX-MS	Hydrogen/deuterium exchange coupled with mass spectrometry	水素重水素交換質量分析
IP	Intraperitoneal/intraperitoneally	腹腔内
K _d	Equilibrium dissociation constant	平衡解離定数
k _{off}	Dissociation binding constant	解離結合定数
k _{on}	Association binding constant	会合結合定数
LC ₉₀	90% lethal concentration	90%致死濃度
LR	Long repeat	long repeat
mAb	Monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MDX-1388	MK-6072	MK-6072
MK-3415A	A combination of 2 human mAbs of the IgG1 isotype, MK-3415 and MK-6072, that target and neutralize TcdA and TcdB, respectively	TcdA 及び TcdB をそれぞれ標的にして中和する2種類のヒトモノクローナル抗体 IgG1アイソタイプ MK-3415及び MK-6072の配合剤
NA	Not applicable	該当せず
NM	Not measured	測定せず
No.	Number	数
OTU	Operational taxonomic unit	操作的分類単位
PCoA1	Principal coordinate A1	主座標分析の第1成分
SEC-MALLS	Size-exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering	多角度光散乱検出器付サイズ排除クロマトグラフィー
SPR	Surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
SRB	Sulforhodamine B	スルホローダミン B
TcdA	<i>C. difficile</i> toxin A	<i>C. difficile</i> トキシン A
TcdB	<i>C. difficile</i> toxin B	<i>C. difficile</i> トキシン B
TER	Transepithelial electrical resistance	経上皮電気抵抗
Vanco	Vancomycin	バンコマイシン
2-D	2-dimensional	2次元

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

Clostridium difficile (*C. difficile*) は芽胞を形成する嫌気性グラム陽性桿菌であり、2種類の強力な外毒素である *C. difficile* トキシン A (TcdA) 及び *C. difficile* トキシン B (TcdB) を産生する。*C. difficile* 感染症 (CDI) の機序について現在考えられていることは、正常な結腸常在細菌叢の破壊後、結腸内に内因性又は体外獲得された *C. difficile* の毒素産生株が繁茂し、疾患を引き起こすというものである。このとき、正常な腸内細菌叢を変化させる抗菌薬の曝露が、*C. difficile* の定着とやがて生じる感染の主要な要因の1つとされている[資料4.3: 1]。また、抗菌薬による治療成功後も腸内細菌叢の攪乱が持続するため、CDI の再発が多く認められている。現在、CDI の再発を抑制する既承認の薬剤がないため、CDI の再発を抑制することはアンメットメディカルニーズとされている。

CDI 症状の原因は TcdA 及び TcdB であるが、以下に述べるように宿主動物種に依存して各トキシンによる症状への影響が認められる。両トキシンとも腸管上皮細胞を標的とするため、形態学的変化、細胞脱分極、及び正常腸管機能に必要な経上皮抵抗の消失を生じる[資料4.3: 19]、[資料4.3: 35]。さらに、感染した細胞は好中球及び単球を誘引するインターロイキン8などの炎症性メディエーターを放出し、損傷を更に増悪させる[資料4.3: 20]、[資料4.3: 36]。CDI の発症における TcdA 及び TcdB の重要な役割に着目すると、病原性 *C. difficile* 株に曝露された動物において、受動又は能動免疫は抑制効果があると考えられる[資料4.3: 2]、[資料4.3: 22]、[資料4.3: 25]、[資料4.3: 26]、[資料4.3: 34]。加えて、循環血中の抗トキシン中和抗体と CDI の低発症率とに関連性のあることが示され、抗体による抑制作用が臨床疾患に対しても適用できることも言及された[資料4.3: 21]、[資料4.3: 23]、[資料4.3: 24]。こうして、CDI においてトキシンの中和により抑制効果が得られるという考え方が、疾患の治療及び抑制に中和抗体を用いる根拠となった。

CDI 再発抑制を目的として、2種類のヒトモノクローナル抗体が開発された。MK-3415 (旧名称: CDA1、GS-CDA1) は TcdA に対するモノクローナル抗体であり、MK-6072 (旧名称: MDX-1388、CDB1) は TcdB に対するモノクローナル抗体である。MK-3415A は、MK-3415及び MK-6072の併用投与時の名称である。これらのモノクローナル抗体は、トキシンの combined repetitive oligopeptide (CROP) 領域にある受容体の推定結合ポケットと一部重なる部分に結合することにより、TcdA 及び TcdB とそれらの標的細胞との結合を阻害する。これら抗体の結合は、トキシンの細胞内侵入カスケードを最初の段階で遮断することになり、通常であれば疾患の発現につながる損傷及び炎症が回避される。

MK-3415及び MK-6072の開発では、CDI の初回感染又は再発で出現した症状に対して標準治療である抗菌薬が投与された被験者を対象に、個々のモノクローナル抗体を単独投与 (MK-3415又は MK-6072の単独投与)、あるいは併用投与 (MK-3415+MK-6072) したときの CDI 再発抑制について評価する試験が行われた。[2.7.3.2.2 項]で詳述するように、主要な第Ⅲ相試験 (001試験[資料5.3.5.1.3: P001]及び002試験[資料5.3.5.1.4: P002]) では、プラセボと比較して MK-6072単独投与により CDI 再発率が有意に低下すること、また2種類のモノクローナル抗体 (MK-3415+MK-6072) の併用投与から MK-6072単独投与を超える安全性又は有効性のベネフィットが得られないこと

が示された。さらに、2つの臨床試験（018試験[資料5.3.5.1.2: P018]及び001試験[資料5.3.5.1.3: P001]、[2.7.3.2.1.1 項]及び[2.7.3.2.2.2 項]）では、MK-3415単独投与による有効性が認められないことが示された。これらより、製造販売承認申請時には最終製剤として MK-6072を選択した。しかしながら、非臨床のげっ歯類 CDI モデルでは、症状の完全抑制に両トキシンによる阻害が必要であった。このようなモデルを用いた種々の薬理試験では、2種類のモノクローナル抗体（MK-3415＋MK-6072）を併用投与した場合のみに有効性が認められ、MK-6072単独投与ではみられない場合もあった。そのため、非臨床（in vitro 及び in vivo）薬理試験として、MK-3415及びMK-6072の単独投与並びに併用投与（MK-3415＋MK-6072）での作用の特徴を解明するため、以下の試験を実施した。

- MK-3415及びMK-6072の TcdA 及び TcdB それぞれに対する親和性の検討
- 細胞アッセイでの MK-3415及びMK-6072の機能活性の評価
- MK-3415及びMK-6072のエピトープの検討
- TcdA 及び TcdB とは乳類細胞の結合に対する MK-3415及びMK-6072の影響の評価
- 临床上意義のあるリボタイプ／トキシノタイプの *C. difficile* 由来 TcdA 及び TcdB に対する MK-3415及びMK-6072の親和性及び機能活性の比較
- マウスのトキシン曝露モデルにおける MK-3415＋MK-6072の in vivo 有効性評価
- マウス及びハムスターの *C. difficile* 芽胞曝露モデルにおける MK-3415＋MK-6072の in vivo 有効性評価
- MK-3415＋MK-6072の有効性における Fc 介在性機能の役割の評価

MK-6072の非臨床薬理試験の一覧表を[表 2.6.2-1]に示す。また、非臨床薬理試験に用いた MK-3415及びMK-6072のロット番号の一覧表を[表 2.6.2-2]に示す。

表 2.6.2-1 MK-6072 の非臨床薬理試験の一覧表

Report no.	Study title	Species	Testing facility	GLP
PD001	CDA1 Binding to Toxin A as Determined by ELISA and Biacore	In vitro	[REDACTED]	No
PD002	CDB1 Binding to Toxin B as Determined by ELISA and Biacore	In vitro	[REDACTED]	No
PD003	CDA1 In Vitro Neutralization of Toxin A	In vitro	[REDACTED]	No
PD004	CDB1 In Vitro Neutralization of Toxin B	In vitro	[REDACTED]	No
PD005	Combination of CDA1 and CDB1 Protects Hamsters from Disease Associated with <i>Clostridium difficile</i>	Hamster	[REDACTED]	No
PD008	CDA1 Epitope Mapping	In vitro	[REDACTED]	No
PD009	CDB1 Epitope Mapping	In vitro	[REDACTED]	No
PD010	CDA1 and CDB1 Neutralization of Toxins Produced by Toxinotype III <i>Clostridium difficile</i>	In vitro	[REDACTED]	No
PD011	CDA1, But Not CDB1 Protects Mice from Challenge with <i>Clostridium difficile</i> Toxin	Mouse	[REDACTED]	No
PD012	CDA1 Neutralizes Toxin A in the Mouse Ileal Loop Model	Mouse	[REDACTED]	No
PD013	Assessment of the Ability of Actoxumab and Bezlotoxumab to Prevent Binding of <i>Clostridium difficile</i> Toxins A and B to HT-29 and Vero Cells	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No
PD014	Assessment of Binding of Actoxumab and Bezlotoxumab to <i>Clostridium difficile</i> Toxins A and B	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No
PD015	Assessment of Binding Kinetics of Actoxumab and Bezlotoxumab to <i>Clostridium difficile</i> Toxins A and B	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No
PD016	Assessment of the Affinity and Neutralization Potencies of Actoxumab and Bezlotoxumab Against Toxins from Various Strains of <i>Clostridium difficile</i>	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No
PD017	Assessment of the Effects of Actoxumab and Bezlotoxumab on <i>Clostridium difficile</i> Toxin A- and B-mediated Glucosylation of RAC1 and Subsequent Morphological Changes in Vero Cells	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No
PD018	Assessment of the Effects of <i>Clostridium difficile</i> Toxins A and B and of Actoxumab and Bezlotoxumab on the Integrity of Epithelial Cell Monolayers and on Adhesion of <i>Clostridium difficile</i> to Epithelial Cells	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No
PD019	Determination of the Stoichiometry of Immune Complexes Formed Between Actoxumab and Bezlotoxumab and Their Respective Toxin Antigens	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No
PD020	Mapping of the Epitopes of Bezlotoxumab on <i>Clostridium difficile</i> Toxin B	In vitro	MRL, Palo Alto, CA	No
PD021	Mapping of the Epitopes of Actoxumab on <i>Clostridium difficile</i> Toxin A	In vitro	MRL, Palo Alto, CA	No
PD022	Identification of the Epitopes of Bezlotoxumab on <i>Clostridium difficile</i> Toxin B by X-ray Crystallography	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No
PD023	Assessment of the Impact of Treatment with Actoxumab/Bezlotoxumab in the Hamster <i>Clostridium difficile</i> Infection Model	Hamster	MRL, Kenilworth, NJ	No
PD024	Assessment of Mechanism of Protection by Actoxumab and Bezlotoxumab in Mouse Models of Primary and Recurrent <i>Clostridium difficile</i> Infection	Mouse	MRL, Kenilworth, NJ	No
PD025	Assessment of the Effects of Treatment with Actoxumab/Bezlotoxumab in a Hamster Model of <i>Clostridium difficile</i> Infection	Hamster	[REDACTED], UK	No
PD026	Assessment of the Effects of Treatment with Actoxumab/Bezlotoxumab in a Mouse Model of <i>Clostridium difficile</i> Infection	Mouse	[REDACTED], UK	No

GLP = Good Laboratory Practice; [REDACTED]; MRL = Merck Research Laboratories;
no. = number. [Sec. 2.6.3.1]

表 2.6.2-2 非臨床薬理試験に使用した MK-3415 及び MK-6072 のロット番号一覧

Study/report no.	Test article	Lot no.	Type of batch	Manufacturing site	Scale (L)
PD001	MK-3415 (CDA1)	NA	Laboratory-scale mAb preparation		NA
	MK-6072	Not used	NA	NA	NA
PD002	MK-3415	Not used	NA	NA	NA
	MK-6072 (CDB1)	NA	Laboratory-scale mAb preparation		NA
PD003	MK-3415 (CDA1)	NA	Laboratory-scale mAb preparation		NA
	MK-6072	Not used	NA	NA	NA
PD004	MK-3415	Not used	NA	NA	NA
	MK-6072 (CDB1)	NA	Laboratory-scale mAb preparation		NA
PD005	MK-3415	NA	Laboratory-scale mAb preparation		NA
	MK-6072				
PD008	MK-3415 (CDA1)	NA	Laboratory-scale mAb preparation		NA
	MK-6072	Not used	NA	NA	NA
PD009	MK-3415	Not used	NA	NA	NA
	MK-6072 (CDB1)	NA	Laboratory-scale mAb preparation		NA
PD010	MK-3415 (CDA1)	NA	Laboratory-scale mAb preparation		NA
	MK-6072 (CDB1)				
PD011	MK-3415 (CDA1)	NA	Laboratory-scale mAb preparation		NA
	MK-6072 (CDB1)				
PD012	MK-3415 (CDA1)	NA	Laboratory-scale mAb preparation		NA
	MK-6072	Not used	NA	NA	NA
PD013	MK-3415		GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500
	MK-6072				
PD014	MK-3415		GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500
	MK-6072				
PD015	MK-3415		GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500
	MK-6072				
PD016	MK-3415		GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500
	MK-6072				
PD017	MK-3415		GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500
	MK-6072				
PD018	MK-3415		GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500
	MK-6072				
PD019	MK-3415		GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500
	MK-6072				
PD020	MK-3415	Not used	NA	NA	NA
	MK-6072		GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500
PD021	MK-3415		GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500
	MK-6072	Not used	NA	NA	NA
PD022	MK-3415	Not used	NA	NA	NA
	MK-6072		GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

Study/report no.	Test article	Lot no.	Type of batch	Manufacturing site	Scale (L)
PD023	MK-3415	[REDACTED]	GMP	[REDACTED]	98.9
		[REDACTED]		Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500
		[REDACTED]		[REDACTED]	5,000
	MK-6072	[REDACTED]	GMP	[REDACTED]	188.8
		[REDACTED]		Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500
		[REDACTED]		[REDACTED]	5,000
PD024	MK-3415	[REDACTED]	GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	2,500
	MK-6072				
PD025	MK-3415	[REDACTED]	GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	5,000
	MK-6072	[REDACTED]		Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	
PD026	MK-3415	[REDACTED]	GMP	Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	5,000
	MK-6072	[REDACTED]		Sterile Liquid Pilot Plant, West Point, PA	

GMP = Good Manufacturing Practice; mAb = monoclonal antibody; [REDACTED]; NA = not applicable; no. = number.

[Sec. 2.6.3.1]

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 In vitro 薬理試験

2.6.2.2.1.1 MK-3415及び MK-6072と TcdA 及び TcdB との結合

2.6.2.2.1.1.1 MK-3415と TcdA との結合

[資料4.2.1.1.1: PD001]、[資料4.2.1.1.6: PD008]、[資料4.2.1.1.12: PD014]、[資料4.2.1.1.13: PD015]、
[資料4.2.1.1.14: PD016]

MK-3415と TcdA との結合を以下に記載した試験方法を用いて評価した（方法の詳細はそれぞれの参照先に記載）。なお、これらの試験では、*C. difficile* 株 VPI 10463（リボタイプ087）由来の TcdA を用いた。

- TcdA でコーティングしたプレートを用いた酵素免疫測定法（ELISA）：[資料4.2.1.1.1: PD001]参照
- 競合 ELISA 法：[資料4.2.1.1.14: PD016]、[2.6.2.2.1.6 項]、[2.6.3.1 項]参照
- ウェスタンブロット：[資料4.2.1.1.6: PD008]、[資料4.2.1.1.12: PD014]、[2.6.2.2.1.3 項]、[2.6.3.1 項]参照
- 表面プラズモン共鳴（SPR）：[資料4.2.1.1.1: PD001]、[資料4.2.1.1.13: PD015]、[資料4.2.1.1.14: PD016]、[2.6.2.2.1.6 項]、[2.6.3.1 項]参照

SPR を用いた初期の試験では、MK-3415が TcdA の CROP 領域からなる組換えペプチドに高い親和性で結合することが示された {平衡解離定数 (K_d) = 1.46×10^{-9} M} [資料4.2.1.1.1: PD001]。また、後期に実施した試験でも MK-3415が精製天然型 TcdA に高い親和性で結合することが確認された [表 2.6.2-3]、[資料4.2.1.1.13: PD015]、[2.6.3.1 項]。MK-3415は TcdA に選択的であり、MK-3415と TcdB の結合はウェスタンブロット[資料4.2.1.1.12: PD014]、[2.6.3.1 項]及び SPR[資料4.2.1.1.13: PD015]、[2.6.3.1 項]では認められなかった。

2.6.2.2.1.1.2 MK-6072と TcdB との結合

[資料4.2.1.1.2: PD002]、[資料4.2.1.1.7: PD009]、[資料4.2.1.1.12: PD014]、[資料4.2.1.1.13: PD015]、
[資料4.2.1.1.14: PD016]

MK-6072と TcdB との結合を以下の方法を用いて評価した（方法の詳細はそれぞれの参照先に記載）。なお、これらの試験では、*C. difficile* VPI 10463株（リボタイプ087）由来の TcdB を用いた。

- TcdB でコーティングしたプレートを用いた ELISA：[資料4.2.1.1.2: PD002]、[2.6.3.1 項]参照
- 競合 ELISA 法：[資料4.2.1.1.14: PD016]、[2.6.2.2.1.6 項]、[2.6.3.1 項]参照
- ウェスタンブロット：[資料4.2.1.1.7: PD009]、[資料4.2.1.1.12: PD014]、[2.6.2.2.1.3 項]、[2.6.3.1 項]参照
- SPR：[資料4.2.1.1.2: PD002]、[資料4.2.1.1.13: PD015]、[資料4.2.1.1.14: PD016]、[2.6.2.2.1.6 項]参照

項]、[2.6.3.1 項]参照

SPR を用いた初期の試験では、MK-6072は、TcdB の CROP 領域からなる組換えペプチドに高い親和性で結合した ($K_d = 1.64 \times 10^{-10}$ M) [資料4.2.1.1.2: PD002]、[2.6.3.1 項]。SPR を用いたその後の試験でも、MK-6072が精製天然型 TcdB に高い親和性で結合することが確認された[表 2.6.2-3]、[資料4.2.1.1.13: PD015]、[2.6.3.1 項]。さらに、MK-6072の TcdB との結合速度から2部位結合モデルに最もフィットすると判断されたことより、TcdB には少なくとも2つの異なるエピトープが存在することが示された。

MK-6072は TcdB に選択的であり、MK-6072と TcdA の結合はウエスタンブロット[資料4.2.1.1.12: PD014]、[2.6.3.1 項]又は SPR[資料4.2.1.1.13: PD015]、[2.6.3.1 項]では認められなかった。

表 2.6.2-3 MK-3415 と TcdA との結合及び MK-6072 と TcdB との結合の会合／解離速度及び親和性

Toxin/ fragment	Experiment number	High affinity binding site			Low affinity binding site		
		k_{on} ($M^{-1}sec^{-1}$)	k_{off} (sec^{-1})	K_d (pM)	k_{on} ($M^{-1}sec^{-1}$)	k_{off} (sec^{-1})	K_d (pM)
TcdA	1	1.91×10^5	1.04×10^{-4}	543	NM	NM	NM
	2	1.82×10^5	1.22×10^{-4}	669	NM	NM	NM
	Avg $\pm$ SD	1.87×10^5 $\pm 6.36 \times 10^3$	1.13×10^{-4} $\pm 1.27 \times 10^{-5}$	610 ± 90	NA	NA	NA
TcdB	1	1.20×10^6	2.75×10^{-5}	23.0	1.47×10^7	8.67×10^{-3}	588
	2	1.83×10^6	2.90×10^{-5}	15.8	1.61×10^7	2.51×10^{-3}	155
	Avg $\pm$ SD	1.52×10^6 $\pm 0.45 \times 10^6$	2.83×10^{-5} $\pm 0.11 \times 10^{-5}$	19 ± 5	1.54×10^7 $\pm 0.10 \times 10^7$	5.59×10^{-3} $\pm 4.36 \times 10^{-3}$	370 ± 310

Avg = average; k_{off} = dissociation binding constant; k_{on} = association binding constant; K_d = equilibrium dissociation constant; NA = not applicable; NM = not measured because the data were fit to a single-site binding model; SD = standard deviation; TcdA = *C. difficile* toxin A; TcdB = *C. difficile* toxin B.
 [資料4.2.1.1.13: PD015]、[Sec. 2.6.3.1].

2.6.2.2.1.2 MK-3415及び MK-6072の in vitro 機能活性

TcdA 及び TcdB のほ乳類細胞への影響に対する MK-3415及び MK-6072の効果を、数種の細胞株を用いて評価した。トキシンによる以下の作用を指標に評価した。

- rac グルコシル化
- 細胞形態学的変化
- 経上皮抵抗の消失
- 細胞死
- *C. difficile* の結腸上皮細胞との接着

すべての試験を *C. difficile* VPI 10463株（リボタイプ087／トキシノタイプ0）由来の精製天然型 TcdA 及び TcdB を用いて実施した。その結果、MK-3415及び MK-6072は評価した全てのパラメータにおいて TcdA 及び TcdB による影響を阻害することが明らかにされた。結果を以下の項に示す。

2.6.2.2.1.2.1 Vero 細胞での TcdA 及び TcdB による Rac1 グルコシル化に及ぼす MK-3415 及び MK-6072 の影響

[資料4.2.1.1.15: PD017]

ほ乳類細胞内への TcdA 及び TcdB の取り込みについての最初のイベントの1つは、Rac1 など Rho-type GTPase の共有結合性グルコシル化である[資料4.3: 19]。Rho-type GTPase のグルコシル化は細胞に形態学的変化をもたらし、やがて細胞死が誘導される。TcdA 及び TcdB による Rac1 グルコシル化に対する MK-3415 及び MK-6072 による阻害能を、それぞれアフリカミドリザル腎上皮細胞株 Vero を用いた In-Cell Western アッセイにより評価した[資料4.2.1.1.15: PD017]、[2.6.3.1 項]。本アッセイでは、Vero 細胞を TcdA 又は TcdB の存在下、MK-3415 若しくは MK-6072 の存在下又は非存在下にインキュベートし、トータル及びグルコシル化された Rac1 のレベルを測定する。

TcdA 及び TcdB は濃度依存的にグルコシル化 Rac1 を増加させたが、全体の Rac1 レベルへの影響はごくわずかであった。TcdA 及び TcdB による Rac1 グルコシル化は MK-3415 及び MK-6072 により阻害された [図 2.6.2-1]。

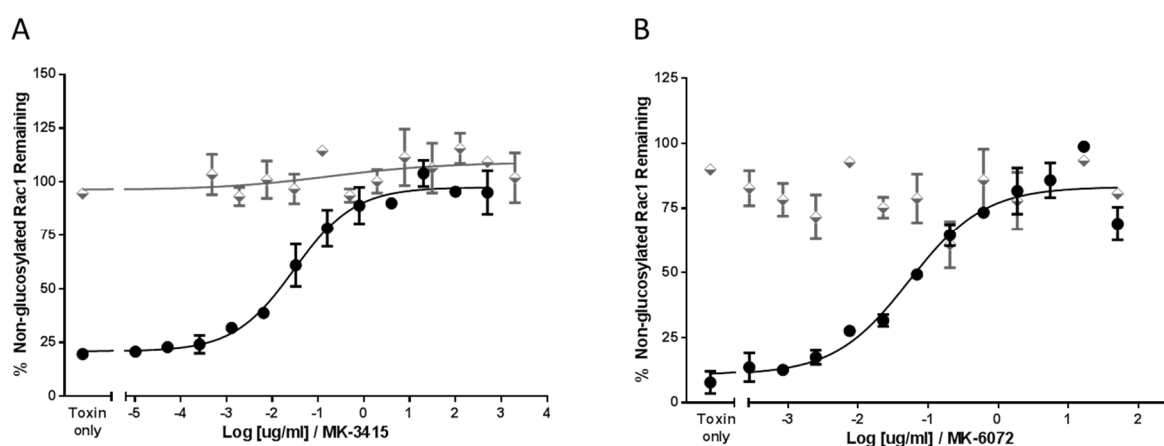


図 2.6.2-1 TcdA 及び TcdB の Rac1 グルコシル化に対する MK-3415 及び MK-6072 の阻害

*C. difficile*株 VPI 10463 (リボタイプ087)由来 TcdA 及び TcdB による Vero 細胞中 Rac1 グルコシル化を In-Cell Western アッセイを用いて評価した。MK-3415 (パネル A) 及び MK-6072 (パネル B) の Rac1 グルコシル化に及ぼす阻害作用を評価するために、Vero 細胞を、MK-3415 (濃度0.0005～2000 µg/mL) 又は MK-6072 (濃度0.0003～50 µg/mL) とそれぞれ TcdA (15 ng/mL) 又は TcdB (1 ng/mL) を同時に処理した。合計 Rac1 (◇) 及び非グルコシル化 Rac1 (●) レベルを測定した。TcdA 及び TcdB は、非グルコシル化 Rac1 レベルの約90%減少を起こす濃度で用いた。各データポイントは測定値の平均 ± 標準偏差を示す (n=3)。3回の独立した試験の代表例を図示した。

2.6.2.2.1.2.2 TcdA 及び TcdB によるほ乳類細胞の細胞形態学的変化に及ぼす MK-3415 及び MK-6072 の影響

[資料4.2.1.1.3: PD003]、[資料4.2.1.1.4: PD004]、[資料4.2.1.1.15: PD017]

TcdA 及び TcdB による形態学的影響(細胞円形化)に対する MK-3415 及び MK-6072 の阻害能を、初期には目視による細胞変形スコアアッセイにより評価した。線維芽細胞株 IMR-90 では MK-3415 及び MK-6072 を、また、結腸上皮細胞株 T-84 では MK-3415 のみを評価した[資料4.3: 2]、[資料4.2.1.1.3: PD003]、[資料4.2.1.1.4: PD004]、[2.6.3.1 項]。本アッセイでは、トキシンによって誘導

される細胞変形（CPE：細胞の円形化を指す）を目視により評価した。高いCPEでは円形化細胞の割合が高い。TcdA又はTcdBを単独でインキュベートしたとき、細胞円形化が全細胞で認められ、これらはそれぞれMK-3415及びMK-6072により回復した。

CPEは、TcdA又はTcdBによる細胞形態学的変化の半定量的指標に過ぎない。そこで、TcdA及びTcdBによる細胞形態学的変化を、Epic[®] BT装置により、リアルタイムに細胞内で発生する形態学的変化を捉える細胞内の質量再分布（mass-redistribution）を計測することでより正確に定量した[資料4.2.1.1.15: PD017]、[2.6.3.1 項]。Vero細胞を用いてこれらの試験を実施した。TcdA及びTcdBはVero細胞中の質量再分布に濃度依存的に影響を及ぼし、その影響はそれぞれMK-3415及びMK-6072により阻害された[図 2.6.2-2]。

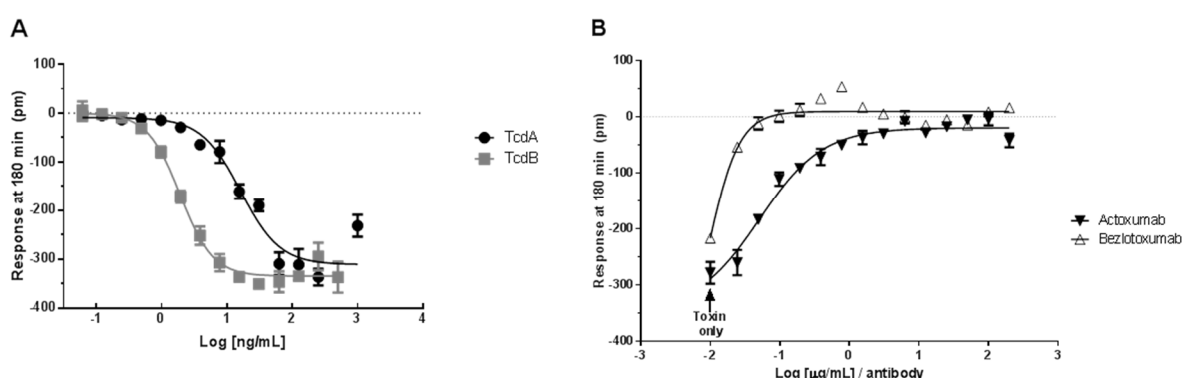


図 2.6.2-2 TcdA 及び TcdB の Vero 細胞質量再分布に対する MK-3415 及び MK-6072 の阻害

C. difficile 株 VPI 10463（リボタイプ087）由来 TcdA 及び TcdB による Vero 細胞中の質量再分布を動的質量再分布アッセイにより評価した。

パネル A：細胞円形化に必要な TcdA 及び TcdB の90%有効濃度（EC₉₀）を決定するために、Vero細胞をTcdA又はTcdB（濃度0.1～1000 ng/mL）で処理した。濃度依存的な効果を検討するために、180分における質量再分布動態を収集した。各データポイントは3回の測定の平均 ± 標準偏差を示す。3回の独立した測定の代表例を図示した。パネル B：Vero細胞円形化に対するMK-3415及びMK-6072の阻害作用を評価するため、細胞を、MK-3415又はMK-6072（濃度0.020～200 μg/mL）とそれぞれTcdA（105 ng/mL）又はTcdB（5 ng/mL）を同時に処理した。TcdA及びTcdBの使用濃度は、細胞円形化の平均EC₉₀値に相当した。濃度依存的な効果を検討するために、180分における質量再分布の動態を収集した。各データポイントは測定値の平均 ± 標準偏差を示す（n=3）。3回の独立した測定の代表例を図示した。

2.6.2.2.1.2.3 TcdA 及び TcdB による極性化上皮細胞の経上皮抵抗破壊に及ぼす MK-3415 及び MK-6072の影響

[資料4.2.1.1.16: PD018]

上皮細胞の形態への TcdA 及び TcdB の影響は、正常な上皮の破壊につながることである。MK-3415及びMK-6072がTcdA及びTcdBによる正常な上皮の破壊に及ぼす影響を、2次元の極性化細胞培養系を用いて評価した[資料4.3: 2]、[資料4.3: 3]、[資料4.2.1.1.16: PD018]、[2.6.3.1 項]。これらの試験ではヒト結腸上皮細胞株 Caco-2を使用した。天然の腸管上皮の状態を模倣した極性化単層上皮細胞を得るために、Caco-2細胞を透過性トランスウェルインサート上に培養して極性化させた[資料4.3: 27]。経上皮電気抵抗（TER）を測定して2次元 Caco-2細胞単層での完全性を評

価した。TER の低下は上皮単層の完全性が損なわれたことを示す。

Caco-2細胞の2次元単層への TcdA 及び TcdB の添加により、TER は濃度及び時間依存的に減少した。極性化 Caco-2細胞単層の同じ極側への MK-3415及びMK-6072の添加により、それぞれ TcdA 及び TcdB に対する濃度依存的な阻害作用がみられた[図 2.6.2-3]。

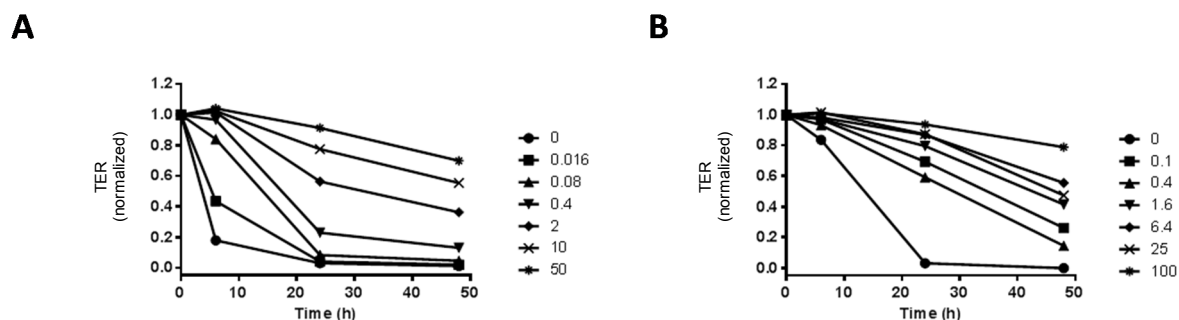


図 2.6.2-3 Caco-2 二次元単層の完全性に及ぼす TcdA/TcdB 及び MK-3415/MK-6072 の影響

正常な2次元 Caco-2細胞単層に及ぼす TcdA 及び TcdB、並びに MK-3415及び MK-6072の影響を経上皮電気抵抗 (TER) を測定することにより観測した。TcdA 及び TcdB それぞれに対する阻害能を評価するために、TcdA 又は TcdB を apical chamber に添加する直前に、MK-3415又は MK-6072を apical chamber に添加した。TcdA 濃度は 10 ng/mL、MK-3415濃度は0、0.016、0.08、0.4、2、10、及び50 µg/mLとした (パネル A)。TcdB 濃度は100 ng/mL、MK-6072濃度は0、0.1、0.4、1.6、6.4、25、及び100 µg/mLとした (パネル B)。TER の測定は、トキシン/抗体を apical chamber に添加する直前及び添加後6、24、及び48時間に行った。TER の各測定は、時間によるわずかなばらつきを考慮し、各時点にトキシン非存在下で得られた値に対して標準化した。3回以上の独立した測定の代表例を図示した。

2.6.2.2.1.2.4 TcdA 及び TcdB による Vero 細胞への細胞毒性に及ぼす MK-3415及び MK-6072 の影響

[資料4.2.1.1.14: PD016]

TcdA 及び TcdB に曝露されたほ乳類細胞は、形態学的変化を起こし、やがて細胞死に至る。TcdA 及び TcdB による細胞毒性に対する MK-3415及び MK-6072の阻害能を、精製天然型トキシンとインキュベートした Vero 細胞を用いて評価した[資料4.2.1.1.14: PD016]、[2.6.3.1 項]。評価には、スルホローダミン B (SRB) アッセイを用いた。本アッセイでは、Vero 細胞を TcdA 及び TcdB に24時間曝露後に洗浄し、更に48時間増殖させた。細胞数のサロゲートである残存細胞の総たん白質レベルを SRB 染色により定量した[資料4.2.1.1.14: PD016]、[2.6.3.1 項]。

TcdA 及び TcdB のそれぞれ ng/mL レベル及び pg/mL レベルの濃度により完全な細胞死がみられた [図 2.6.2-4] (パネル A)。TcdA 及び TcdB の90%致死濃度 (LC₉₀) において、MK-3415及び MK-6072によりそれぞれ濃度依存的に回復した[図 2.6.2-4] (パネル B)。

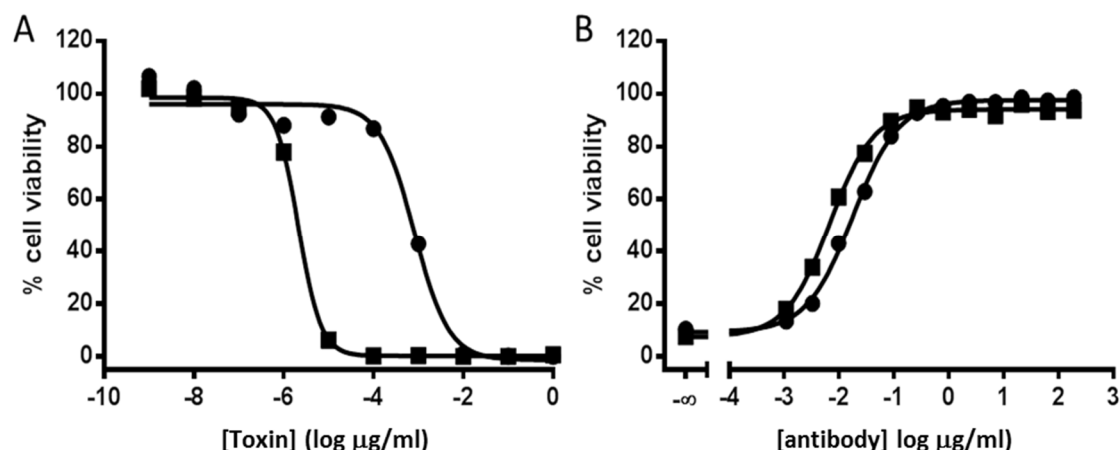


図 2.6.2-4 TcdA 及び TcdB の Vero 細胞生存に及ぼす影響、並びに MK-3415 及び MK-6072 による阻害作用

TcdA 及び TcdB による細胞毒性に対する MK-3415 及び MK-6072 の阻害能について、精製天然型トキシンとインキュベートした Vero 細胞を用いて評価した。これらの作用はスルホローダミン B (SRB) アッセイにより評価した。本アッセイでは、Vero 細胞を TcdA 及び TcdB に 24 時間曝露し、洗浄後、更に 48 時間増殖させた。残存細胞の総たん白質レベルを、細胞数のサロゲートとして、SRB 染色により定量した。

パネル A : TcdA (●) 及び TcdB (■) が Vero 細胞の生存率に及ぼす影響を示す。TcdA 及び TcdB は 0.001 pg/mL ~ 1 µg/mL の濃度で用いた。4 回以上の独立した測定の結果を代表例として示した。

パネル B : TcdA が Vero 細胞の生存率に及ぼす影響の MK-3415 (●) による阻害及び TcdB が Vero 細胞の生存率に及ぼす影響の MK-6072 (■) による阻害を示す。試験は、約 90% 致死濃度 (LC₉₀) の TcdA (5 ng/mL) 及び TcdB (10 pg/mL) で実施した。MK-3415 及び MK-6072 は 1 ng/mL ~ 192 µg/mL の濃度で用いた。5 回以上の独立した測定の結果を代表例として示した。

2.6.2.2.1.2.5 TcdB による *C. difficile* と Caco-2 細胞との接着増加に及ぼす MK-6072 の影響

[資料 4.2.1.1.16: PD018]

TcdA 及び TcdB による上皮細胞の脱分極により *C. difficile* と細胞との接着が増強することが示されている[資料 4.3: 2]。これは、通常では上皮細胞基底外側にのみに発現されていると考えられる受容体が曝露されることによって起こると考えられている[資料 4.3: 2]。そこで、TcdA 及び TcdB の *C. difficile* と Caco-2 細胞との接着に及ぼす MK-3415 及び MK-6072 の影響を評価した[資料 4.2.1.1.16: PD018]、[2.6.3.1 項]。これらの試験は、[2.6.2.2.1.2.3 項]に示したのと同じ 2 次元細胞培養系を用いて実施した。Caco-2 細胞を複数の濃度の TcdA 又は TcdB と種々の時間プレインキュベートし、洗浄後、本細胞に *C. difficile* を 90 分間添加した。90 分間のインキュベーション後、Caco-2 細胞を洗浄して溶解した。一定量の細胞溶解物を *C. difficile* 選択的な付着菌定量用寒天培地に播種し、接着を定量するため、細胞溶解物中のコロニー形成単位 (CFU) を測定した。

TcdB とのインキュベーションにより *C. difficile* と Caco-2 細胞の接着が増強し [図 2.6.2-5]、この作用は MK-6072 によって完全に阻害された。これに対し、TcdA とのインキュベーションでは *C. difficile* の接着は増強しなかった [図 2.6.2-5]。

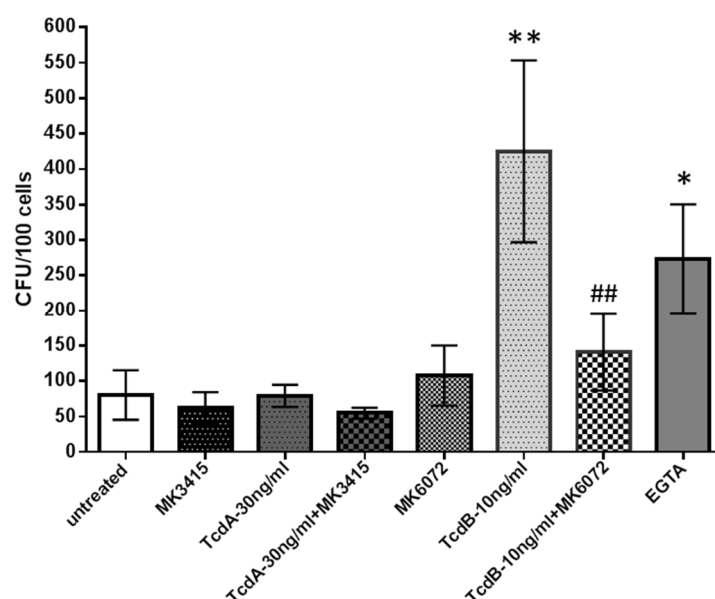


図 2.6.2-5 *C. difficile* と Caco-2 細胞との接着に及ぼす TcdA/TcdB、並びに MK-3415/MK-6072 の影響

トランスウェルプレートに増殖させた完全に極性化した Caco-2細胞を、TcdA (30 ng/mL) と MK-3415 (100 µg/mL) の存在下又は非存在下で3時間、あるいは TcdB (10 ng/mL) と MK-6072 (100 µg/mL) の存在下又は非存在下で18時間、あるいは MK-3415 (100 µg/mL) 又は MK-6072単独とそれぞれ3又は18時間のいずれかで処理した。陽性対照として、細胞を4 mM エチレンジアミン四酢酸 (EGTA) と40分間インキュベートした。処理した細胞に *C. difficile* を添加し、嫌気性チャンバー中でインキュベートした。Caco-2細胞に接着した *C. difficile* 数をコロニー形成単位 (CFU) 数/100細胞として測定した。値は各3ウェルの平均 ± 標準偏差を示す (* P<0.05及び** P<0.001 vs 未処理の細胞、## P<0.001 vs TcdB 処理の細胞)。3回の独立した試験の代表例を図示した。

2.6.2.2.1.3 TcdA 及び TcdB 上の MK-3415及び MK-6072のエピトープマッピング

[資料4.2.1.1.1: PD001]、[資料4.2.1.1.2: PD002]、[資料4.2.1.1.6: PD008]、[資料4.2.1.1.7: PD009]、
 [資料4.2.1.1.12: PD014]、[資料4.2.1.1.13: PD015]、[資料4.2.1.1.18: PD020]、[資料4.2.1.1.19: PD021]、
 [資料4.2.1.1.20: PD022]

MK-3415及び MK-6072は、それぞれ TcdA 及び TcdB の CROP 領域にある特異的な部分に結合する。これを CROP 領域全体又はそのフラグメントに相当するペプチドを用いてウェスタンブロット及び SPR により明らかにした[資料4.2.1.1.1: PD001]、[資料4.2.1.1.2: PD002]、[資料4.2.1.1.6: PD008]、[資料4.2.1.1.7: PD009]、[資料4.2.1.1.12: PD014]、[資料4.2.1.1.13: PD015]、[2.6.3.1 項]。TcdA 及び TcdB 上のそれぞれ MK-3415及び MK-6072のエピトープを、水素重水素交換質量分析 (HDX-MS) を用いて詳細に決定した[資料4.2.1.1.18: PD020]、[資料4.2.1.1.19: PD021]、[2.6.3.1 項]。本測定法は、抗原を重水中で単独又は抗体存在下で様々な時間インキュベートした際の、抗原による重水素取り込み程度を正確に測定・比較することに基づいている。重水素は曝露エリアにあるたん白質のアミド骨格上の水素と交換される。これに対し、抗原と抗体との結合部分はこの交換から保護されており、交換が少ない又は全く認められない。抗原と結合又は非結合の抗原をプロテアーゼで分解し、重水素結合領域の質量スペクトルを既知の3次元構造に基づく分子モデリン

グと組み合わせて解析することにより、エピトープの位置に関する詳細な情報を得ることができる。

評価の結果、MK-3415は TcdA の CROP 領域内の相同ではあるが同一ではない最大4つの結合部位に結合し[資料4.2.1.1.19: PD021]、[2.6.3.1 項]、MK-6072は TcdB の CROP 領域内の2つの相同部位に結合することが明らかとなった[資料4.2.1.1.18: PD020]、[2.6.3.1 項]。HDX-MS により同定された MK-3415及び MK-6072の推定エピトープは、CROP 領域のいわゆる「long-repeat」(LR)を中心とする部分に存在しており、これらの部分に受容体の推定結合ポケットが含まれると考えられた[資料4.3: 5]。MK-6072の推定エピトープは、TcdB の CROP 領域の N 末端側半分を完全に占めていたが、これに対して、MK-3415の推定エピトープは TcdA の CROP 領域中に散在していた。

TcdB 内の MK-6072のエピトープを詳細に決定するために、CROP 領域の N 末端側半分に相当するペプチド（ペプチド B2）を MK-6072の Fab フラグメントと共結晶化させた[資料4.2.1.1.20: PD022]、[2.6.3.1 項]。結晶構造から、Fab フラグメントは CROP 領域内の高度に相同な2つのエピトープに隣接して結合することが明らかとなり、MK-6072と TcdB 間で相互作用する正確なアミノ酸残基が同定された。Fab フラグメントの方向性は、1分子の MK-6072が2つの Fab 領域を介して TcdB の CROP 領域と結合するモデルに適合する。このため、完全な MK-6072に結合する TcdB の全長 CROP 領域のモデル（アミノ酸残基1836～2367）を構築した[図 2.6.2-6]。TcdB の CROP 領域は、U 字形の細長い構造を形成しており、これまで報告されたモデルと一致していた[資料4.3: 28]、[資料4.3: 29]、[資料4.3: 30]。MK-6072は、4つの推定糖鎖相互作用ポケットのうちの、主に CROP 領域の凸面に沿って局在している2つと部分的に重なる部位で CROP 領域の湾曲に垂直に結合している。

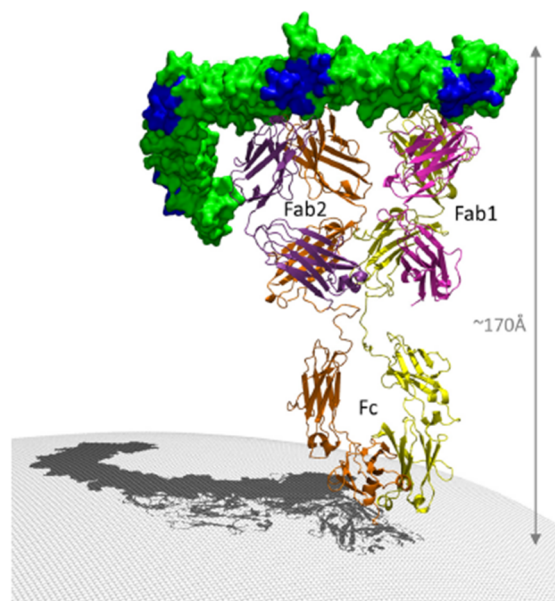


図 2.6.2-6 TcdB の CROP 領域と MK-6072 の結合モデル

Combined repetitive oligopeptide (CROP) 領域と結合した TcdB の C 末端側（左）半分をペプチド B2 の構造に基づいてモデリングした。MK-6072 の Fc 領域は、公表されているヒト IgG1 の高分解能構造に基づいている。TcdB の CROP 領域のうち4つの推定糖鎖結合部分は濃い青色、それ以外は緑色で示す。Fab1 及び Fab2 は、それぞれ MK-6072 の抗原結合フラグメント1及び2を指す。

2.6.2.2.1.4 MK-3415/MK-6072 と TcdA/TcdB との結合の化学量論

[資料4.2.1.1.17: PD019]

[2.6.2.2.1.3 項]に記載した試験結果より、TcdA 及び TcdB 内にいずれも複数のエпитープが存在することが示唆された。したがって、溶液中では複数の抗体が単独のトキシンに結合し、トキシンの架橋結合（数珠つなぎ）を起こす可能性がある。MK-3415又は MK-6072とそれぞれ TcdA 又は TcdB との間で形成される免疫複合体の化学量論について、多角度光散乱検出器付サイズ排除クロマトグラフィー（SEC-MALLS）により検討した[資料4.2.1.1.17: PD019]、[2.6.3.1 項]。これらの試験もトキシンの精製 CROP 領域（ペプチド A1及び B1）を用いて実施した。全長の TcdA 及び TcdB を用いた試験からは *in vivo* で生じる免疫複合体に関する知見が得られ、また、精製 CROP 領域を用いた試験からはトキシンの他の領域に関係する分子内及び分子間相互作用がない状態での抗体結合に関する情報が得られる。

MK-3415と TcdA から形成される免疫複合体の分子量は、2141 kDa（MK-3415と TcdA のモル比 1 : 1）及び2090 kDa（MK-3415と TcdA のモル比5 : 1）であった。これは5分子の TcdA と4又は5分子の MK-3415の会合に一致する。MK-3415とペプチド A1間に形成される免疫複合体は359～1453 kDa であり、これはモル比が高いと増大した（MK-3415とペプチド A1の比1 : 5、1 : 1、2 : 1、及び5 : 1で検討）。これらの結果から、MK-3415の Fab と TcdA 又はペプチド A1中の別々の2分子のエピトープとの結合を介した、MK-3415による TcdA 又はペプチド A1分子の免疫架橋結合

（数珠つなぎ）を反映していることが示唆された。

MK-6072と TcdB から形成される免疫複合体の分子量は、689 kDa（MK-6072と TcdB のモル比1：1）及び682 kDa（MK-6072と TcdB のモル比5：1）であった。これは2分子の TcdB と1分子の MK-6072 の会合に一致する。これらの試験では、TcdB 単独で二量体を形成したことから、別々の2分子の TcdB の会合に MK-6072が関与しない。MK-6072とペプチド B1間に形成される免疫複合体は205～209 kDa であり、MK-6072とペプチド B1のモル比に依存しなかった（MK-6072とペプチド B1 の比1：5、1：1、2：1、及び5：1で検討）。MK-6072のエピトープマッピングの結果と併せると[2.6.2.2.1.3 項]、これらの結果から、MK-6072の2つの Fab が1分子の TcdB 又はペプチド B1内の両エピトープに結合して複数のトキシン分子の架橋結合が阻害されることが示唆される。

2.6.2.2.1.5 TcdA 及び TcdB とほ乳類細胞との結合に及ぼす MK-3415及び MK-6072の影響

[資料4.2.1.1.11: PD013]、[資料4.2.1.1.18: PD020]、[資料4.2.1.1.19: PD021]、[資料4.2.1.1.20: PD022]

MK-3415及び MK-6072のそれぞれ TcdA 及び TcdB に対する阻害作用から[2.6.2.2.1.2 項]、抗体の各トキシンとの結合が細胞変形／細胞毒性を抑制していることが示される。さらに、エピトープマッピングの結果から、TcdA の CROP 領域の MK-3415が結合する部分と、TcdA の細胞受容体となると考えられているガラクトース含有糖鎖との結合に関与する残基[資料4.3: 5]との間に重なりがあることが示されている[資料4.2.1.1.19: PD021]、[2.6.2.2.1.3 項]、[2.6.3.1 項]。同様に、TcdB の CROP 領域内の MK-6072のエピトープは、TcdA 内の糖鎖結合ポケットに相同な部分と部分的に重なる[資料4.2.1.1.18: PD020]、[資料4.2.1.1.20: PD022]、[2.6.3.1 項]。このことから、MK-3415 及び MK-6072とそれぞれ TcdA 及び TcdB との結合により、トキシンがほ乳類細胞の表面にある受容体に結合する能力が阻害されることが示唆される。これについて、Vero 細胞及びヒト結腸上皮細胞株 HT-29を用い、それぞれフローサイトメトリー及びウエスタンブロットにより評価した[資料4.2.1.1.11: PD013]、[2.6.3.1 項]。HT-29細胞は腸管上皮が *C. difficile* トキシンの主要な標的であり、Vero 細胞は TcdB に対して高感度であるため、それぞれ用いた[資料4.3: 4]。

フローサイトメトリーによる評価により、蛍光標識した TcdA（TcdA-Atto488）と HT-29細胞の結合が認められた [図 2.6.2-7]（パネル A）。この結合は MK-3415により阻害されたが、MK-6072では阻害されなかった。TcdA-Atto488と Vero 細胞の結合も認められ（ただし、程度は HT-29細胞より低い）、この結合も MK-3415により阻害された。

蛍光標識した TcdB（TcdB-Atto488）と Vero 細胞との結合が、フローサイトメトリーにより検出された。しかし、TcdB-Atto488と HT-29細胞との結合はごくわずかであり、これらの細胞が TcdB に対して低感受性であることと一致している[資料4.3: 4]。MK-6072は、試験条件下で TcdB-Atto488 と Vero 細胞との結合を有意には阻害しなかった。これは TcdB-Atto の非特異的結合レベルが高かったことによるものと考えられる。フローサイトメトリー法では特異的結合と非特異的結合との区別ができなかったため、TcdB と Vero 細胞との結合をウエスタンブロットにより評価した。Vero 細胞を TcdB の存在下、MK-6072若しくは MK-3415の存在下又は非存在下でインキュベートした。MK-6072は TcdB と Vero 細胞との結合を阻害したが MK-3415は阻害しなかった [図 2.6.2-7]（パネル B）。

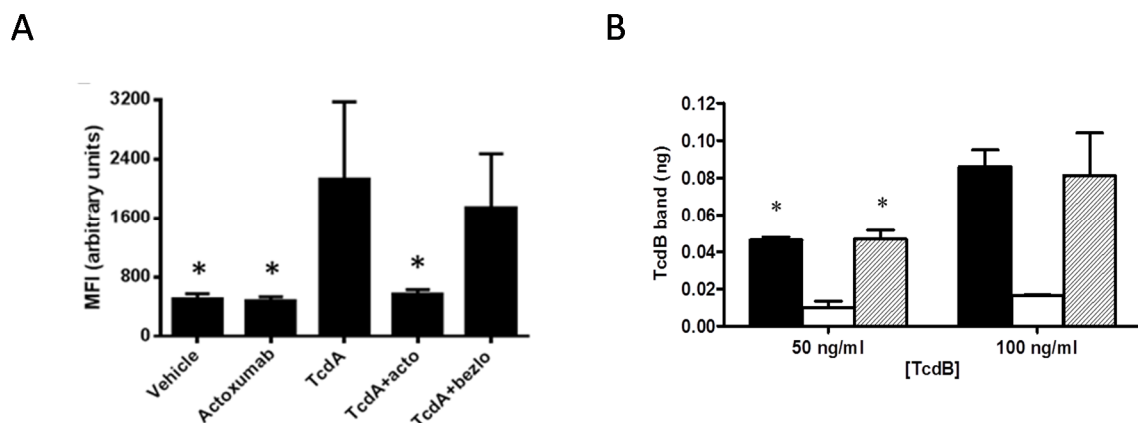


図 2.6.2-7 TcdA と HT-29 細胞との結合阻害のフローサイトメトリーによる評価、及び TcdB と Vero 細胞との結合阻害のウェスタンブロットによる評価

パネル A : HT-29細胞を溶媒、MK-3415 (200 µg/mL)、TcdA-Atto488 (800 ng/mL)、TcdA-Atto488 (800 ng/mL) 及び MK-3415 (200 µg/mL)、TcdA-Atto488 (800 ng/mL) 及び MK-6072 (200 µg/mL) とインキュベートした。インキュベーション後、平均蛍光強度 (MFI) を励起波長488 nm、発光波長530 nm で測定した。異なる投与群の平均蛍光強度を対応のある両側 t 検定により比較した (* P<0.05 vs TcdA 単独とのインキュベーション)。値は2~5回の独立した試験の平均 ± 標準偏差を示す。

Acto = MK-3415、bezlo = MK-6072、TcdA-Atto488 = Atto488標識 TcdA

パネル B : Vero 細胞を TcdB (50又は100 ng/mL) と MK-6072又は MK-3415 (200 µg/mL) の非存在下又は存在下でインキュベートした。試験はエンドサイトーシス阻害剤であるクロロプロマジンの固定濃度14 µM の存在下、37°C で実施した。回収した膜標品よりたん白質を分離し、ウェスタンブロットにより視覚化した。TcdB と Vero 細胞の結合は Odyssey のアプリケーションソフトウェアを用いて定量した。値は、TcdB (1 ng) をロードした対照のレーン及びロード対照して使用されるカドヘリンに対して標準化した。黒色は TcdB 単独とインキュベートした Vero 細胞、白色は MK-6072存在下、TcdB とインキュベートした Vero 細胞、灰色は MK-3415の存在下、TcdB とインキュベートした Vero 細胞を示す。値は2回の独立した測定の平均 ± 標準偏差として示す。バンドの平均蛍光強度を対応のある両側 t 検定により比較した (* P<0.05 : MK-6072を単独処理した群との比較)。

2.6.2.2.1.6 遺伝的に異なる *C. difficile* 株由来 TcdA 及び TcdB の MK-3415及び MK-6072による阻害

[資料4.2.1.1.8: PD010]、[資料4.2.1.1.14: PD016]、[資料4.2.1.1.15: PD017]、[資料4.2.1.1.20: PD022]

遺伝的に異なる臨床的に重要な種々の *C. difficile* 株由来のトキシンに対する MK-3415及び MK-6072の結合親和性及び阻害活性を検討した。初期の試験では、TcdA 及び TcdB に対する MK-3415及び MK-6072の阻害作用をそれぞれ赤血球凝集抑制試験及び IMR-90を用いた CPE 阻害アッセイ[2.6.2.2.1.2.2 項]を用いて評価した。これらの試験では、*C. difficile* リボタイプ027/トキシノタイプⅢ株由来の TcdA 及び TcdB を用いた[資料4.2.1.1.8: PD010]。MK-3415は、2種の *C. difficile* リボタイプ027/トキシノタイプⅢ (BI8及び6335) 株由来の TcdA (CROP 領域に対応) によるウサギ赤血球凝集反応を抑制した。また、MK-6072は、IMR-90細胞を用いた CPE 阻害アッセイにおいて *C. difficile* トキシノタイプⅢ由来 TcdB を阻害した。リボタイプ027/トキシノタイプⅢ株 (027/NAP1/BI と呼ばれる) については、一部の地域における流行状況から、また重度の疾患及び高い再発リスクとの関連性から特に注目すべきである[資料5.4: 11]。

その後の試験では、遺伝的に異なるリボタイプ001、002、014、017、027、036、078、及び106

を含む多様な *C. difficile* 株について、MK-3415及びMK-6072の各トキシンに対する見かけの結合親和性を検討した[資料4.2.1.1.14: PD016]、[2.6.3.1 項]。競合 ELISA 法によりすべての株由来のトキシンについて、また SPR によりリボタイプ087、027、及び078のトキシンについて、見かけの親和性を検討した。参考株として *C. difficile* 株 VPI 10463（リボタイプ087）を用いた。

リボタイプ027及び078（別の流行性のおそらく強毒性株、ただし重要性は027より低い）由来 TcdA との結合について、MK-3415の見かけの親和性はリボタイプ087と比較して有意に低かった（ $P < 0.0001$ ）。同様に、リボタイプ027、036、及び078の TcdB との結合についても、MK-6072の見かけの親和性はリボタイプ087と比較して有意に低かった（ $P < 0.0001$ ）。また、MK-3415及びMK-6072のそれぞれ TcdA 及び TcdB に対する阻害活性（ EC_{50} 値で表す）を、Vero 細胞を用いたトキシン誘導細胞死アッセイによっても測定した。上述の低い親和性と一致して、MK-3415及びMK-6072のリボタイプ027及び078のそれぞれ TcdA 及び TcdB に対する阻害活性は、リボタイプ087と比較して低かった（高い EC_{50} 値を反映）[図 2.6.2-8]。リボタイプ027及び078の精製トキシンに対する MK-3415及び MK-6072の低い活性が、Vero 細胞を用いた質量再分布アッセイにより確認された[資料4.2.1.1.15: PD017]、[2.6.3.1 項]。重要なことは、リボタイプ027及び078株で認められた高い EC_{50} 値は、第Ⅱ相試験及び第Ⅲ相試験に組み入れられた被験者の血清中薬物濃度より低かったことである[資料4.3: 6]、[2.7.3.2.1.2 項]。

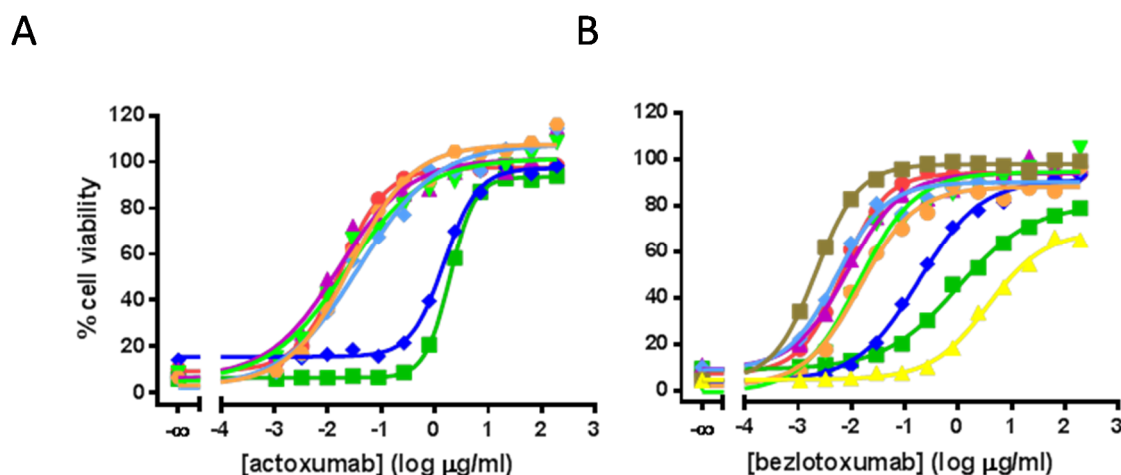


図 2.6.2-8 Vero 細胞の増殖及び生存に及ぼす TcdA 及び TcdB の影響に対する MK-3415 及び MK-6072 による阻害作用

Vero 細胞の増殖及び生存に及ぼす TcdA 及び TcdB の影響に対するそれぞれ MK-3415（パネル A）及び MK-6072（パネル B）による阻害作用を示す。TcdA 及び TcdB は以下のリボタイプの株から精製した：087（赤色の○）、027（濃い緑色の□）、078（濃い青色の◇）、001（紫色の△）、002（薄い緑色の▽）、014（薄い青色の◇）、106（オレンジ色の○）、017（茶色の□）、及び036（黄色の△）。TcdA 及び TcdB は細胞増殖が85%～95%減少する濃度で用い、MK-3415及びMK-6072は1 ng/mL～192 µg/mL の濃度で用いた。3回以上の独立した測定の代表例を図示した。

これらの結果と臨床分離株とを関連づけるため、米国、カナダ、西ヨーロッパ、及び日本から得た81の *C. difficile* 臨床分離株由来トキシンについて、MK-3415及び MK-6072の阻害能を T-84

（MK-3415及び TcdA）及び Vero 細胞（MK-6072及び TcdB）を用いて評価した[資料4.2.1.1.14: PD016]、[2.6.3.1 項]。リボタイプ027／トキシノタイプⅢ及びリボタイプ078／トキシノタイプⅤの流行株の多様な分離株を含む検討したすべての臨床分離株について、MK-3415及び MK-6072は培養上清中のそれぞれ TcdA 及び TcdB を完全に阻害した。MK-3415及び MK-6072の EC_{50} 値は、トキシノタイプ0の株より一部の *C. difficile* 株、注目すべきはリボタイプ027／トキシノタイプⅢ及びリボタイプ078／トキシノタイプⅤ株に対し、有意に高かったことである（ $P < 0.0001$ ）。トキシノタイプ0は最もよくみられるトキシノタイプで、このタイプの株には従来より用いられてきた対照株である *C. difficile* 株 VPI 10463（リボタイプ087）が含まれる[図 2.6.2-9]。精製 TcdA 及び TcdB で得られた結果と同様、これらの高い EC_{50} 値は第Ⅱ相試験及び第Ⅲ相試験に組み入れられた被験者の血清中薬物濃度より低かった[資料4.3: 6]、[2.7.3.2.1.2 項]。

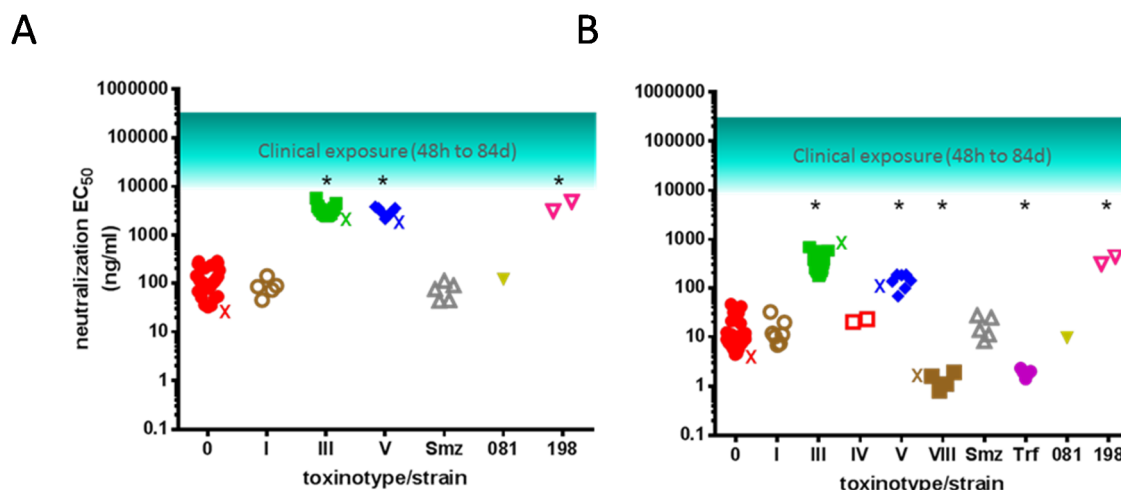


図 2.6.2-9 *C. difficile* 臨床分離株 81 株の培養上清由来 TcdA 及び TcdB の MK-3415 及び MK-6072 による阻害作用

検討した臨床分離株81株について、培養上清中のトキシンに対する MK-3415（パネル A）及び MK-6072（パネル B）の50%有効濃度（ EC_{50} ）値を示す。結果はトキシノタイプ別（ただしリボタイプ smz、trf、081、及び198は、同等のトキシノタイプは報告されていないためリボタイプ別）に分類し、各群を異なる記号及び色により表示した。MK-3415及び MK-6072それぞれの血清中濃度は、第Ⅱ相試験[資料4.3: 6]、[2.7.3.2.1.2 項]に参加した患者を対象に測定し、そのおよその範囲を各図上部の青緑色網掛けの長方形で表す（* $P < 0.0001$ vs トキシノタイプ0）。X =各トキシノタイプに対応する精製トキシンの EC_{50} 値[図 2.6.2-8]。

リボタイプ027、036、及び078の TcdB に対する MK-6072の低い親和性／活性に関する構造的基礎を理解するために、TcdB の2つの異なるエピトープに結合した MK-6072の Fab 構造に基づいて、MK-6072と TcdB の相互作用のモデリングを実施した[資料4.2.1.1.20: PD022]、[図 2.6.2-6]、[2.6.3.1 項]。その結果、リボタイプ027、036、及び078株の TcdB に対する MK-6072の EC_{50} 値の上昇は、TcdB にある MK-6072のエピトープ内の重要な位置のアミノ酸置換により生じることが示された[資料4.2.1.1.14: PD016]、[2.6.3.1 項]。

2.6.2.2.2 In vivo 薬理試験

MK-3415及びMK-6072（単独又は併用投与）の in vivo 薬理試験として、以下の有効性評価を行った。

- ・ マウスでの全身性トキシン曝露に対する有効性
- ・ マウスの回腸ループモデルにおける TcdA 及び TcdB による腸管毒性に対する有効性
- ・ ハムスター及びマウスの CDI モデルにおける有効性

2.6.2.2.2.1 マウスでの全身性トキシン曝露に対する MK-3415及びMK-6072の有効性

[資料4.2.1.1.9: PD011]、[資料4.2.1.1.22: PD024]

マウスに TcdA 又は TcdB を全身曝露した際の（通常72時間以内に死亡）、MK-3415及びMK-6072による阻害能を in vivo で評価した[資料4.3: 2]。マウスを用いた初期の試験では、TcdA の100 ng 腹腔内曝露24時間前に MK-3415を最高250 µg 腹腔内投与すると、曝露72時間後の動物の生存率が有意に上昇した ($P < 0.01$) [資料4.2.1.1.9: PD011]、[2.6.3.1 項]。同一用量の抗体及びトキシンを用いた同様の試験では、TcdB に曝露された動物の生存率に対する MK-6072の有意な影響はなかった。

後期の試験では、マウスに MK-3415+MK-6072（1回あたりの投与量として各抗体3、30、又は300 µg）を予防的に投与し、1時間後 TcdA 及び TcdB 各25 ng を曝露し、最長72時間まで評価した[資料4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。MK-3415+MK-6072の予防的投与により、曝露後72時間までの動物の生存率が有意かつ用量依存的に上昇した（用量に応じてそれぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ）。なお、これらの試験では、*C. difficile* 株 VPI 10463（リボタイプ087）由来の精製 TcdA 及び TcdB を用いた。

2.6.2.2.2.2 マウスの回腸ループモデルでの TcdA 及び TcdB による腸管毒性に対する MK-3415+MK-6072の有効性

[資料4.2.1.1.10: PD012]、[資料4.2.1.1.22: PD024]

CDI は主として腸管の疾患であるため、マウスの回腸ループモデルを用いて腸管内腔に直接投与したトキシンの影響を評価した。本モデルでは TcdA 又は TcdB 若しくはその両方によるマウス回腸中の液体貯留を測定した。これらの試験では、マウス回腸を露出し、回腸ループの両端を二重結紮し、*C. difficile* 株 VPI 10463（リボタイプ087）由来 TcdA 及び／又は TcdB を注入した。次に、回腸ループを腹腔に戻した後、縫合し、動物を回復させた。4時間の回復期間に続いて、動物を安楽死させ、ループを摘出した。各セグメントの長さ及びループの重量を測定し、ループごとに重量と長さの比（W:L：液体貯留の指標）を計算した。

まず、MK-3415が TcdA による回腸内の液体貯留に及ぼす影響を評価した[資料4.2.1.1.10: PD012]、[2.6.3.1 項]。動物には TcdA 曝露の24時間前に MK-3415（1回あたりの投与量500 µg～2 mg）を腹腔内投与した。TcdA 曝露24時間前の MK-3415投与により、TcdA による回腸内の液体貯留が減少した。

次に、*C. difficile* は TcdA のみならず TcdB も発現しており *C. difficile* による感染を模擬するた

め、両トキシンを用いた試験を実施した[資料4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。精製 TcdA 及び TcdB（各2.5 µg）の曝露による回腸内の液体貯留に及ぼす MK-3415+MK-6072（各抗体50 mg/kg）腹腔内投与の影響を評価した。MK-3415+MK-6072投与により液体貯留が有意に減少した（ $P < 0.01$ ）。さらに、MK-3415+MK-6072投与により、腸壁切片の病理組織学的評価を基に判定した上皮の損傷及び炎症が減少した[資料4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。

2.6.2.2.2.3 C. difficile 感染症モデルでの MK-3415+MK-6072の有効性

ハムスター及びマウスの CDI 芽胞曝露モデルにおける MK-3415、MK-6072、又は MK-3415+MK-6072の有効性を評価した。

2.6.2.2.2.3.1 ハムスターC. difficile 感染症モデルでの MK-3415+MK-6072の有効性

[資料4.2.1.1.5: PD005]、[資料4.2.1.1.21: PD023]、[資料4.2.1.1.23: PD025]

Golden Syrian ハムスターの芽胞曝露モデルは、ハムスターの感染でみられる病理がヒトの感染の様々な臨床的特徴を反映するため、従来より CDI モデルとして標準的に利用されてきた[資料4.3: 7]、[資料4.3: 8]。ヒトと同様、ハムスターも広域スペクトル抗菌薬の投与後に CDI を発症しやすくなる。本モデルでは、クリンダマイシンを用いてハムスターの細菌叢を破壊し、*C. difficile* の感染を可能にしている[資料4.3: 8]、[資料4.3: 9]。ヒトの疾患と同様、ハムスターモデルにおける病変も、主に大腸（盲腸及び結腸を含む）に局在してみられる[資料4.3: 8]、[資料4.3: 10]。しかし、ハムスターモデルでの疾患進行はヒトの患者よりはるかに重篤であり、通常、ハムスターは感染後24～72時間以内に死亡する。

ハムスターの CDI モデルにおいて、MK-3415+MK-6072の in vivo での有効性を以下の試験で評価した[表 2.6.2-4]。

- 試験1及び2では、動物の生存率に及ぼす MK-3415+MK-6072（腹腔内投与）の影響を評価した[資料4.2.1.1.5: PD005]、[2.6.3.1 項]。
 - 試験1の動物には感染曝露前の4日間 MK-3415（50 mg/kg/day）+MK-6072（5.6～50 mg/kg/day）を予防的に腹腔内投与した（初回感染のパラダイム）。
 - 試験2の動物には感染曝露時から3日間バンコマイシンを治療的に投与した。感染曝露後48時間より、MK-3415（60 mg/kg/day）+MK-6072（20 mg/kg/day）を治療的に1日2回5日間、腹腔内投与した（感染再発のパラダイム）。
- 試験3、4、及び5では、動物の生存率、罹病率、盲腸の肉眼所見、盲腸及び糞中の *C. difficile* 量並びに TcdA 及び TcdB のレベル、及び盲腸の細菌叢構成に及ぼす MK-3415+MK-6072（腹腔内投与）の影響を評価した[資料4.2.1.1.21: PD023]、[2.6.3.1 項]。
 - 試験3（Study 12）では、初回感染モデルにおいて感染曝露後 Day 0、1、2、及び3に、MK-3415+MK-6072（各用量0.5～50 mg/kg）を治療的に腹腔内投与した。
 - 試験4（Study 39）では、MK-3415+MK-6072（各用量50 mg/kg）を治療的に至適用量以下のバンコマイシンと併用投与した。MK-3415+MK-6072は感染曝露後 Day 0、1、2、及び3に皮下投与し、バンコマイシンは感染曝露後 Day 0、1、2、3、及び4に投与

した。

- 試験5 (Study 47) では、初回感染モデルにおいて感染曝露前 Day -3、-2、-1、及び0に、MK-3415+MK-6072（各用量50 mg/kg）を予防的に皮下投与した。エンドポイントは曝露後48時間までの時点に評価した。
- 試験6では、動物の生存率、罹病率、盲腸の肉眼所見、盲腸及び糞中の *C. difficile* 量並びに TcdA 及び TcdB レベルに及ぼす MK-3415+MK-6072（各用量50 mg/kg）の影響を皮下投与により評価した。さらに、感染後に生存した動物を対象に CDI の進行及び最終的な消失を評価した[資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。

試験1、2、3、4、及び5では、*C. difficile* 株 B1（リボタイプ053／トキシノタイプ0）を用いた。試験6では、*C. difficile* 株630（リボタイプ012／トキシノタイプ I）を用いた。

表 2.6.2-4 ハムスター*C. difficile* 感染症モデルを用いて実施した試験一覧

Experiment no.	1	2	3 (Study 12)	4 (Study 39)	5 (Study 47)	6
Report	PD005		PD023			PD025
Infection model	Primary	Relapse	Primary			Primary
Dosing	Prophylactic	Therapeutic	Therapeutic		Prophylactic	Prophylactic
Route	Intraperitoneal	Intraperitoneal	Intraperitoneal	Subcutaneous	Subcutaneous	Subcutaneous
Treatments	- Vehicle - MK-3415 - MK-6072 - Acto/bezlo	- Vehicle + vanco - MK-3415 + vanco - MK-6072 + vanco - Acto/bezlo + vanco	- Non-specific human IgG - Vancomycin - Acto/bezlo	- None (infected control animals) - Vancomycin - Acto/bezlo + vanco	- Vehicle - Acto/bezlo	- Vehicle - Vancomycin - Acto/bezlo - Acto/bezlo + vanco
Endpoints assessed	Survival		Survival (dose response)	- Survival - Morbidity - Gross pathology of the cecum - <i>C. difficile</i> burden in the cecum contents - Concentrations of TcdA and TcdB in the cecum contents - Microbiome in the cecum contents (in a subgroup of animals)	- Survival - Morbidity - Gross pathology of small intestine, cecum, and colon - <i>C. difficile</i> burden in small intestine, cecum, colon, and feces - Concentrations of TcdA and TcdB in small intestine, cecum, colon, and feces	
Time points assessed (following infectious challenge)	Days 1 to 11	Days 1 to 10	Days 1 to 11	Days 1 to 14	Up to 48 hours	Days 1 to 28
<i>C. difficile</i> strain	B1					630

Acto/bezlo=MK-3415+MK-6072; no. = number; TcdA = *C. difficile* toxin A; TcdB = *C. difficile* toxin B; Vanco = vancomycin.

[Sec. 2.6.3.1]

ハムスター*C. difficile* 感染症モデルでの死亡率及び罹病率に及ぼす MK-3415+MK-6072の影響

[資料4.2.1.1.5: PD005]、[資料4.2.1.1.21: PD023]、[資料4.2.1.1.23: PD025]

MK-3415+MK-6072投与により、CDI の初回感染及び再発モデルの両方でハムスターの生存率が改善し、罹病率が低下した。試験1、2、3、4、及び6で *C. difficile* に曝露された動物[表 2.6.2-4]、[資料4.2.1.1.5: PD005]、[資料4.2.1.1.21: PD023]、[資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]の生存曲線を[図 2.6.2-10]に示す。

長期生存率に対して MK-3415又は MK-6072それぞれ単独投与による改善にはほとんど効果がみられなかった（CDI 初回感染モデルは Day 2以降、CDI 再発モデルは Day 6以降）[図 2.6.2-10]（パネル A 及び B）。CDI 初回感染及び再発の両モデルにおいて、MK-3415+MK-6072の予防的又は治療的な投与により、動物の生存率が著しく改善された[図 2.6.2-10]（パネル A、B、C、D、及び E）。

生存率の上昇に加えて、MK-3415+MK-6072の投与により動物の罹病率が著しく低下した。感染曝露を受けた溶媒投与対照群のハムスターでは、概して、体温低下、20%を超える体重減少、腹部膨満、及び重度の下痢（wet tail）が認められ、曝露後24～72時間以内に死亡した[資料4.2.1.1.21: PD023]、[資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。これに対し、MK-3415+MK-6072を投与した動物では症状が軽度であり、主要な所見は体重減少であった。MK-3415+MK-6072の投与にもかかわらず死亡した動物は、概して、疾患の直接的な影響によるのではなく、倫理的エンドポイントである20%を超える体重減少に到達後の安楽殺によるものであった。さらに、初期の疾患急性期を生存した動物では徐々に体重が回復し始め、最終的に臨床徴候は完全に消失した[資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。

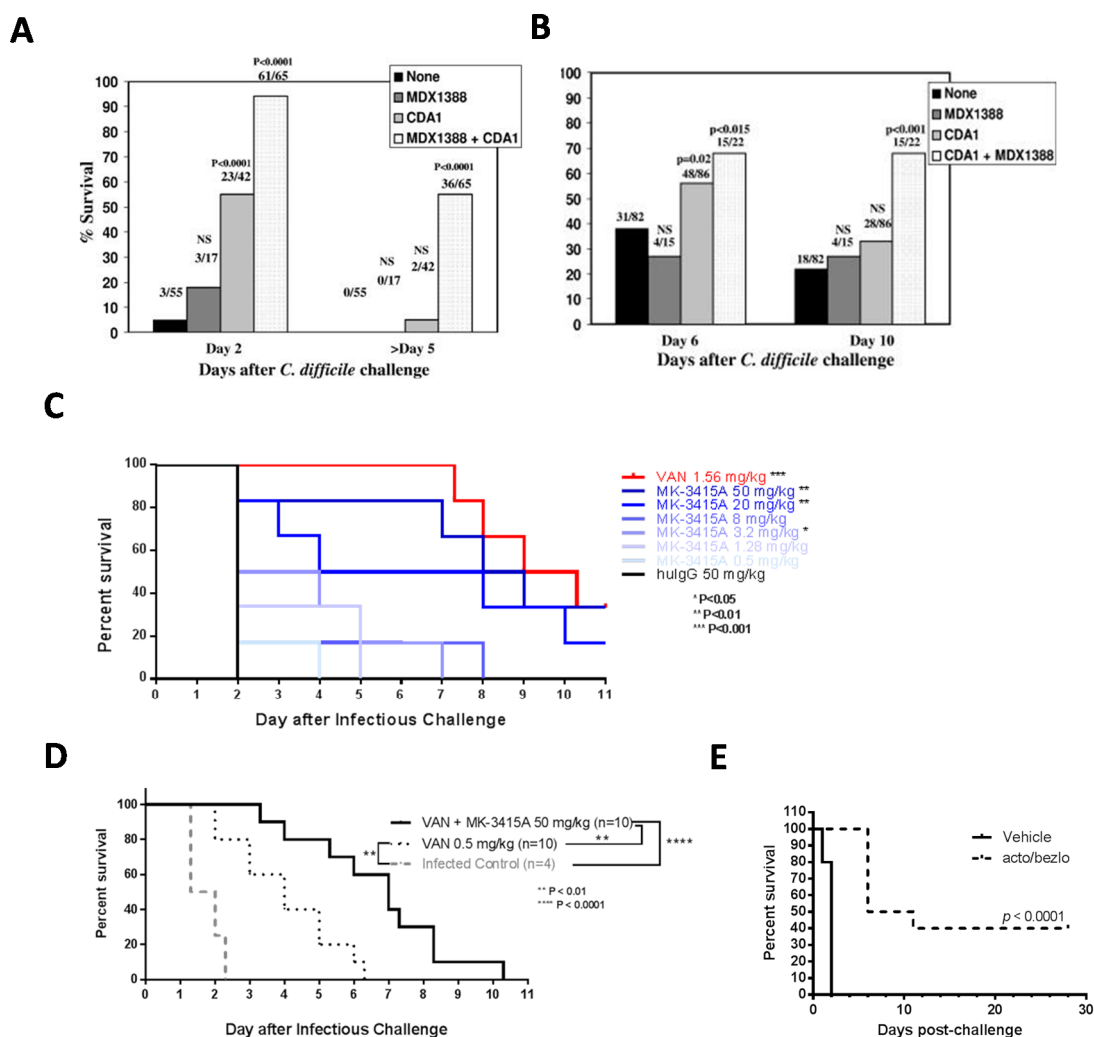


図 2.6.2-10 ハムスターCDI モデルでの生存率に及ぼす MK-3415+MK-6072 の影響

パネル A : *C. difficile* 感染症 (CDI) 初回感染モデル。溶媒、MK-3415、MK-6072、又は MK-3415+MK-6072 の予防的投与後の動物の生存率を示す ([表 2.6.2-4] の試験1) [資料4.2.1.1.5: PD005]、[2.6.3.1 項]。溶媒を投与した動物の生存率と比較した。

パネル B : CDI 再発モデル。バンコマイシンを溶媒、MK-3415、MK-6072、又は MK-3415+MK-6072 の治療的投与後の動物の生存率を示す ([表 2.6.2-4] の試験2) [資料4.2.1.1.5: PD005]、[2.6.3.1 項]。バンコマイシン及び溶媒を投与した動物の生存率と比較した。

パネル C : CDI 初回感染モデル。溶媒又は MK-3415+MK-6072 の治療的投与後の動物の生存率を示す ([表 2.6.2-4] の試験3) [資料4.2.1.1.21: PD023]、[2.6.3.1 項]。非特異的ヒト IgG (hulIgG) を投与した動物の生存率との比較した。

パネル D : CDI 初回感染モデルでの、バンコマイシンなし (感染対照) 又は至適用量以下のバンコマイシン単独投与若しくは MK-3415+MK-6072 との併用投与にて治療的投与後の動物の生存率を示す ([表 2.6.2-4] の試験4) [資料4.2.1.1.21: PD023]、[2.6.3.1 項]。

パネル E : CDI 初回感染モデル。溶媒又は MK-3415+MK-6072 の予防的投与後の動物の生存率を示す ([表 2.6.2-4] の試験6) [資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。

acto/bezlo = MK-3415+MK-6072、CDA1 = MK-3415、MDX-1388 = MK-6072、MK-3415A = MK-3415+MK-6072、VAN = バンコマイシン

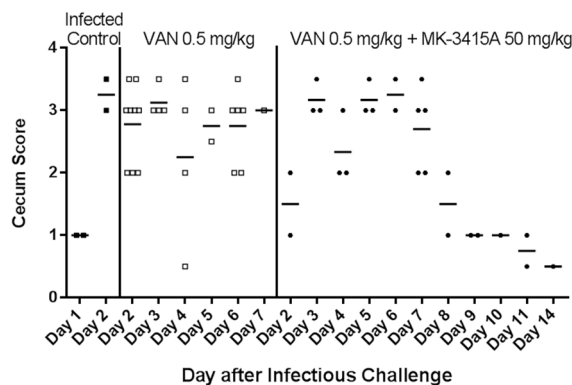
ハムスターの *C. difficile* 感染症モデルでの腸の肉眼所見に及ぼす MK-3415+MK-6072の影響

[資料4.2.1.1.21: PD023]、[資料4.2.1.1.23: PD025]

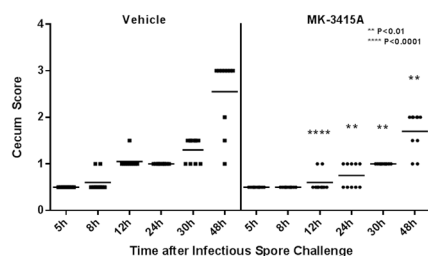
ハムスターでの *C. difficile* 感染症の特徴の1つは、腸の腫脹及び出血が認められることである。試験4、5、及び6では、ハムスターCDIモデルにおける腸病変を評価した[表 2.6.2-4]、[資料4.2.1.1.21: PD023]、[資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。腸病変の程度を、0～4[資料4.2.1.1.21: PD023]、[2.6.3.1 項]又は0～5[資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]のスコアリングにより定量化した。スコア0を健康な腸、スコア4（又は5）を明らかな出血徴候を伴う高度な炎症と腫脹した腸とした。

MK-3415+MK-6072を投与した動物は、肉眼所見上、腸での CDI の影響が部分的に軽減されており[図 2.6.2-11]、この効果は特に早期において認められた。さらに、初期の疾患急性期を生存した動物では、病理所見の緩やかな消失が経時的に認められた。

A



B



C

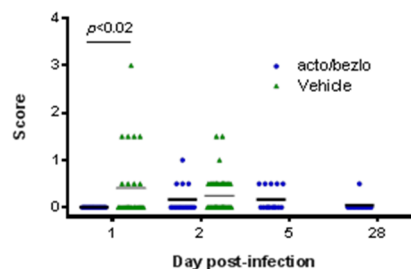


図 2.6.2-11 ハムスターCDIモデルの腸の肉眼所見に及ぼす MK-3415+MK-6072 投与の影響

パネル A: *C. difficile* 感染症 (CDI) 初回感染モデル。溶媒 (感染対照) 又はバンコマイシン単独若しくは MK-3415 + MK-6072 との併用を治療的に投与した動物の盲腸の肉眼所見スコアを示す ([表 2.6.2-4] の試験4) [資料4.2.1.1.21: PD023]、[2.6.3.1 項]。各カラムの横線は平均値を示す。

パネル B: CDI 初回感染モデル。溶媒又は MK-3415 + MK-6072 を予防的に投与した動物の盲腸の肉眼所見スコアを示す ([表 2.6.2-4] の試験5) [資料4.2.1.1.21: PD023]、[2.6.3.1 項]。各カラムの横線は平均値を示す。P 値は溶媒と比較した有意性を示す。

パネル C: CDI 初回感染モデル。溶媒又は MK-3415 + MK-6072 を予防的に投与した動物の腸の肉眼所見スコアを示す ([表 2.6.2-4] の試験6) [資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。データは小腸、盲腸、及び結腸のすべてのスコアを含む。溶媒を投与した動物は Day 2 までに死亡したため、Day 5 及び Day 28 のデータはない。各カラムの横線は平均値を示す。P 値は溶媒と比較した有意性を示す [資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。

acto/bezlo = MK-3415 + MK-6072、MK-3415A = MK-3415 + MK-6072、VAN = バンコマイシン

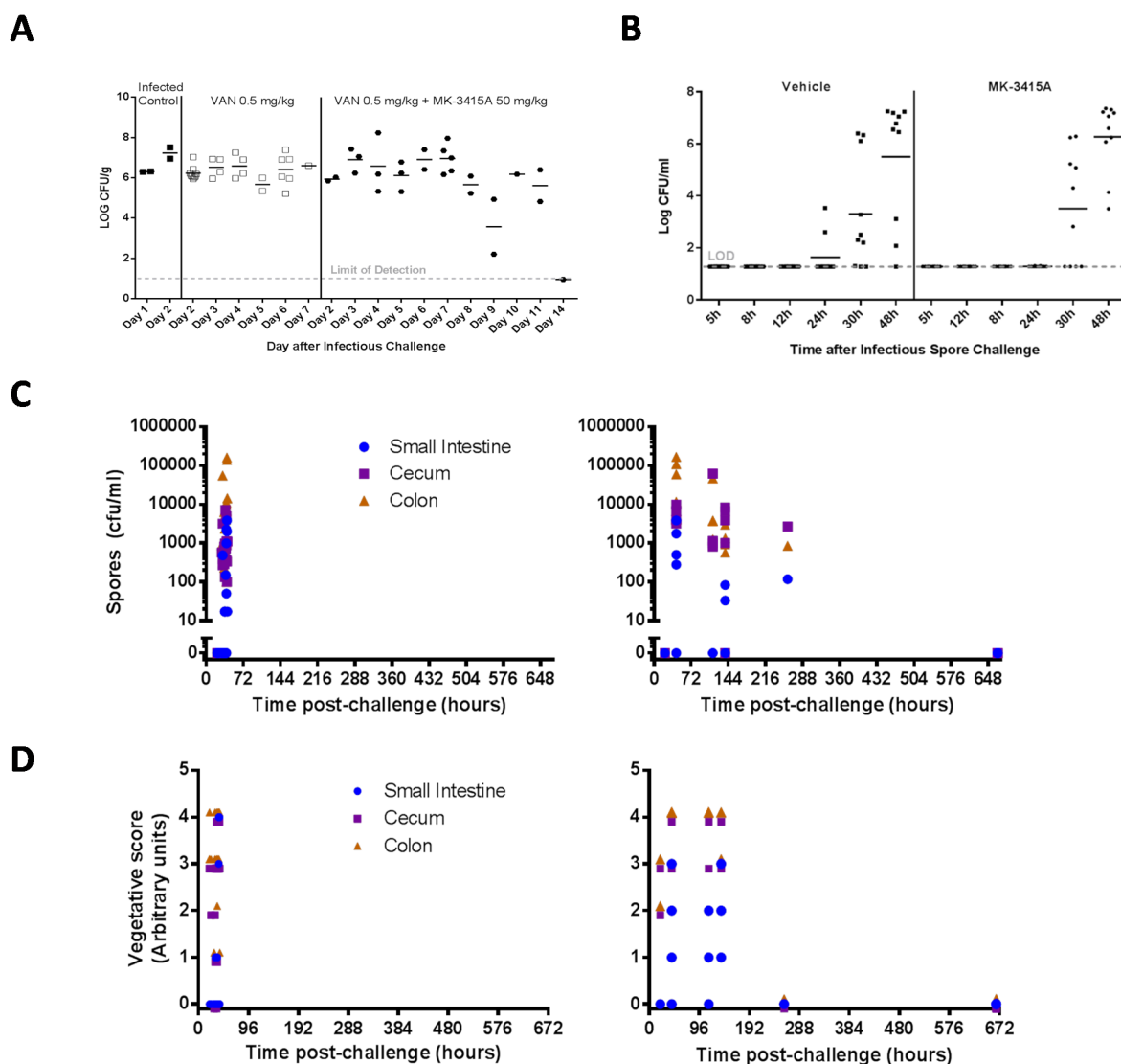
ハムスター*C. difficile* 感染症モデルの腸及び糞便中の *C. difficile* 量並びに *C. difficile* トキシン A 及び B レベルに及ぼす MK-3415+MK-6072の影響

[資料4.2.1.1.21: PD023]、[資料4.2.1.1.23: PD025]

試験4、5、及び6において、腸内の *C. difficile* 量を、ハムスターの腸又は糞便中若しくはその両方に存在する芽胞又は栄養細胞を定量することにより評価した [表 2.6.2-4]、[資料4.2.1.1.21: PD023]、[資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。

C. difficile の芽胞及び栄養細胞は、動物の腸の内容物中では感染曝露後24～30時間以内に初めて検出可能となり、少なくとも Day 7まで高いレベルでみとめられた[図 2.6.2-12]。CDI 急性期を生存した動物では Day 7以降、*C. difficile* 量が減少し始めた。MK-3415+MK-6072を投与し生存した動物では、感染曝露後 Day 28までに腸の内容物から *C. difficile* が完全消失していた。*C. difficile* 量は、MK-3415+MK-6072投与の影響を受けなかった。糞便中の *C. difficile* 芽胞レベルも同様であった[資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。

試験4、5、及び6において、腸及び糞便中の TcdA 及び TcdB レベルを評価した [表 2.6.2-4]、[資料4.2.1.1.21: PD023]、[資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。TcdA 及び TcdB レベルは概して *C. difficile* 量に従っており、MK-3415+MK-6072投与の影響を受けなかった[資料4.2.1.1.21: PD023]、[資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。

図 2.6.2-12 ハムスターCDI モデルの腸での *C. difficile* 量に及ぼす MK-3415+MK-6072 の影響

パネル A : *C. difficile* 感染症 (CDI) 初回感染モデル。溶媒 (感染対照) 又は至適用量以下のバンコマイシン単独若しくは MK-3415+MK-6072 との併用を治療的に投与した動物の盲腸中 *C. difficile* 芽胞量を示す ([表 2.6.2-4] の試験4) [資料4.2.1.1.21: PD023]、[2.6.3.1 項]。各カラムの横線は平均値を示す。

パネル B : CDI 初回感染モデル。溶媒又は MK-3415+MK-6072 を予防的に投与した動物の盲腸中 *C. difficile* 芽胞量を示す ([表 2.6.2-4] の試験5) [資料4.2.1.1.21: PD023]、[2.6.3.1 項]。各カラムの横線は平均値を示す。

パネル C : CDI 初回感染モデル。溶媒 (左のパネル) 又は MK-3415+MK-6072 (右のパネル) を予防的に投与した動物の腸中 *C. difficile* 芽胞量を示す ([表 2.6.2-4] の試験6) [資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。データは小腸、盲腸、及び結腸の値を含む[資料4.2.1.1.23: PD025]。

パネル D : CDI 初回感染モデル。溶媒 (左のパネル) 又は MK-3415+MK-6072 (右のパネル) を予防的に投与した動物の腸中 *C. difficile* 栄養細胞量を示す ([表 2.6.2-4] の試験6) [資料4.2.1.1.23: PD025]、[2.6.3.1 項]。栄養細胞量は半定量化スコアとして測定した。データは小腸、盲腸、及び結腸の値を含む。違いを明確にするために、盲腸の値は下方に0.1、結腸の値は上方に0.1移動させている[資料4.2.1.1.23: PD025]。

CFU = コロニー形成単位、LOD = 検出限界、3415A = MK-3415+MK-6072、VAN = バンコマイシン

ハムスターの腸内細菌叢に及ぼすクリンダマイシン及び MK-3415+MK-6072の影響

[資料4.2.1.1.21: PD023]

CDI の特徴の一つは、あらかじめ広域スペクトル抗菌薬投与により正常な腸内細菌叢が破壊され、*C. difficile* の定着及び感染がみられることである[資料4.3: 11]、[資料4.3: 12]。ハムスターでは、感染曝露5日前のクリンダマイシン投与処置により、この破壊が惹起される。クリンダマイシンがハムスター盲腸の細菌叢構成に及ぼす影響を、細菌叢の経時的回復とともに Second Genome 社の Microbiome Discovery Services G3 Phylochip™ Assay を用いて評価した[資料4.2.1.1.21: PD023]、[2.6.3.1 項]。試験4及び5の一部動物 [表 2.6.2-4]、[資料4.2.1.1.21: PD023]の試料を本評価の対象とした。細菌叢構成の差異は主座標分析を用いて定量した。データを簡略化して1次元に表示したものを[図 2.6.2-13]に示す。ここでは、主座標分析の第1成分 (PCoA1、変動の44%を表示) を *C. difficile* 感染曝露 (Day 0) と比較した各試料回収までの時間に対してプロットしている。

クリンダマイシン投与動物では、盲腸の細菌叢構成が大きく変化した (*Firmicutes* 菌数の減少及び *Proteobacteria* 菌数の増加などを特徴とする) [図 2.6.2-13]、[資料4.2.1.1.21: PD023]、[2.6.3.1 項]。また、MK-3415+MK-6072を投与し、CDI の急性期を生存した動物の細菌叢構成は、徐々にベースライン (クリンダマイシン投与前) まで回復した。

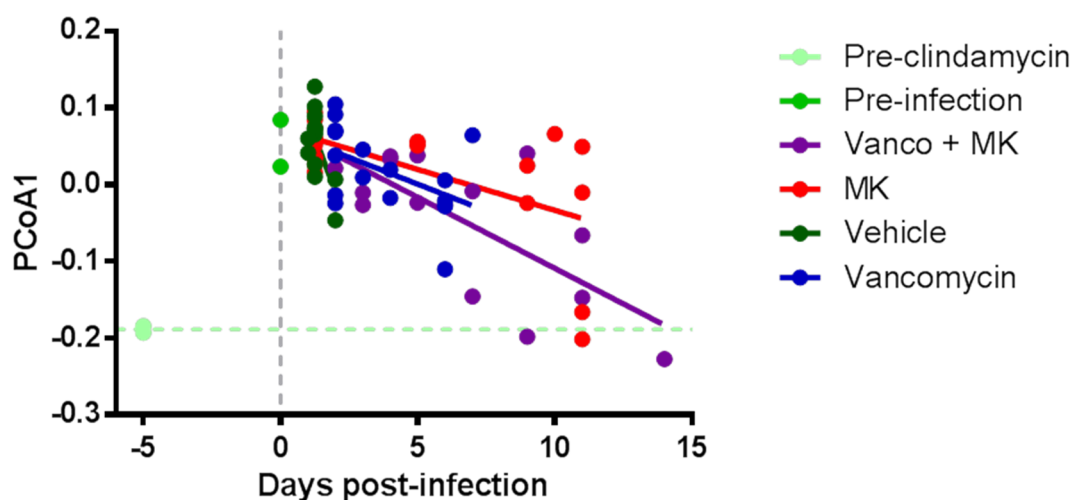


図 2.6.2-13 盲腸内容物の一部試料間の UniFrac 距離に基づく主座標分析

細菌叢構成について、試験4及び5の一部のハムスターからの盲腸内容物試料を評価した[表 2.6.2-4]、[資料4.2.1.1.21: PD023]、[2.6.3.1 項]。評価した1,994分類単位 (OTU) の数量データをもとに、試料間の Weighted UniFrac 距離を、変動の大半を説明できる主座標 (PCoA1、変動の44%を表示) により示す。主座標分析の第1成分を *C. difficile* 感染曝露 (時間0) と比較した各試料回収までの時間に対してプロットしている。
MK = MK-3415+MK-6072、Vanco = バンコマイシン

2.6.2.2.2.3.2 マウス *C. difficile* 感染症芽胞曝露モデルでの MK-3415+MK-6072の有効性

[資料4.2.1.1.22: PD024]、[資料4.2.1.1.24: PD026]、[資料4.2.2.3.2: PK002]

マウス CDI モデルは、より幅広く入手可能なマウス特異的試薬が利用できることや、遺伝子操

作により疾患における宿主遺伝子の役割が検討可能なことなどいくつかの利点があるため、ハムスターモデルの代替モデルとして注目されている[資料4.3: 8]、[資料4.3: 13]。さらに、マウスモデルの方が、概して重症度が低く、そのため（溶媒を投与した動物でも）死亡率が低いことから、被験薬を投与した動物と溶媒を投与した動物を様々な時点で直接比較することが可能になる。ヒト及びハムスターと同様、マウスも広域スペクトル抗菌薬の投与後に CDI を発症しやすくなる。ただし、マウスではハムスターと比較して強力な抗菌薬治療を必要とする[資料4.3: 13]、[資料4.2.1.1.22: PD024]、[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。

マウス CDI モデルを用いて MK-3415+MK-6072の in vivo での有効性を以下の試験で評価した[表 2.6.2-5]。

- 試験1では、CDI 初回感染又は再発のモデルにおいて、動物の生存率に及ぼす MK-3415、MK-6072、又は MK-3415+MK-6072（いずれも腹腔内投与）の影響を評価した[資料4.3: 31]、[資料4.2.2.3.2: PK002]、[2.6.3.1 項]。
 - CDI 初回感染モデルの動物に、MK-3415、MK-6072、又は MK-3415+MK-6072（各 250 µg：約10 mg/kg に相当）を感染曝露の24時間前に1回投与した。
 - CDI 再発モデルの動物に、バンコマイシン（50 mg/kg、経口）を感染曝露後5日間1日1回投与した。その後、動物は再曝露することなく CDI の疾患症状を示し始めた。このパラダイムにおいて、MK-3415+MK-6072（各250 µg：約10 mg/kg に相当）を感染曝露の24時間前に投与し、バンコマイシン投与中止の1日後に再投与した。
- 試験2では、CDI 初回感染又は再発モデルにおいて、動物の生存率、罹病率、並びに腸の肉眼及び顕微鏡的所見に及ぼす MK-3415+MK-6072（腹腔内投与）の影響を評価した[資料4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。
 - CDI 初回感染モデルには、MK-3415+MK-6072を2～50 mg/kg の用量で予防的又は治療的に投与した。予防的レジメンでは、MK-3415+MK-6072を感染曝露の1日前に単回投与した。治療的レジメンでは、MK-3415+MK-6072を感染曝露の1日後に単回投与した。
 - CDI 再発モデルでは、初回感染曝露で生存した動物を14日間回復させた後、2回目の抗菌薬を2回目の感染曝露前に投与した。MK-3415+MK-6072を初回感染曝露の1日前に1回投与し、2回目の感染曝露の1日前に再投与した。
- 試験3では、CDI 初回感染モデルにおいて、動物の生存率、罹病率、腸の肉眼所見、腸の *C. difficile* 量並びに TcdA 及び TcdB レベルを評価した[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。
 - 感染曝露前となる Day -2及び-1に MK-3415+MK-6072の50 mg/kg を予防的に皮下投与した。本試験の動物は、*C. difficile* の低接種量（ 1.8×10^6 cfu/マウス）又は高接種量（ 4.7×10^6 cfu/マウス）により曝露した。

試験1及び3では、*C. difficile* 株 VPI 10463（リボタイプ087／トキシノタイプ0）を用いた。試験2では、*C. difficile* 株 UK1（リボタイプ027／トキシノタイプⅢ）を用いた。

表 2.6.2-5 マウス *C. difficile* 感染症モデルを用いた試験一覧

Experiment no.	1		2		3
Report	PK002		PD024		PD026
Infection model	Primary	Recurrent	Primary	Recurrent	Primary with a low or high <i>C. difficile</i> inoculum
Dosing	Prophylactic	Prophylactic and therapeutic	Prophylactic or therapeutic	Prophylactic	Prophylactic
Treatments	- Vehicle - MK-3415 - MK-6072 - Acto/bezlo	- Vehicle - Acto/bezlo	- Vehicle - Acto/bezlo	- Vehicle - Acto/bezlo	- Vehicle - Acto/bezlo
Endpoints assessed	- Survival		- Survival - Morbidity - Gross intestinal pathology - Microscopic intestinal pathology		- Survival - Morbidity - Gross intestinal pathology - <i>C. difficile</i> burden in intestine - Concentrations of TcdA and TcdB in intestine
Time points assessed (following infectious challenge)	Days 1 to 12		Days 1 to 7		Days 1 to 30
<i>C. difficile</i> strain	VPI 10463		UK1		VPI 10463

Acto/bezlo=MK-3415+MK-6072; no. = number; TcdA = *C. difficile* toxin A; TcdB = *C. difficile* toxin B.

[Sec. 2.6.3.1]

マウス *C. difficile* 感染症モデルでの死亡率及び罹病率に及ぼす MK-3415+MK-6072の影響

[資料4.2.1.1.22: PD024]、[資料4.2.1.1.24: PD026]、[資料4.2.2.3.2: PK002]

CDI の初回感染及び再発モデルの両方において、MK-3415+MK-6072の予防的又は治療的投与により、動物の生存率が改善し、罹病率が低下した[資料4.2.2.3.2: PK002]、[資料4.2.1.1.22: PD024]、[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。MK-3415単独又は MK-6072単独の投与では部分的にしか阻害されなかった。

広域スペクトル抗菌薬投与による腸内細菌叢の破壊後に *C. difficile* を曝露した動物では、概して、まず軽度の発熱がみられ、続いて体温低下、体重減少、及び下痢が発現し、曝露後1～4日以内の死亡率は50%～100%であった[資料4.2.1.1.22: PD024]、[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。これに対し、有効用量の MK-3415+MK-6072を投与した動物では、軽度の発熱及び軽微な体重減少以外の症状はほとんど認められなかった。生存率は、MK-3415+MK-6072を投与した動物で67%～100%、MK-3415単独又は MK-6072単独を投与した動物で33%～40%であった[資料4.2.2.3.2: PK002]、[資料4.2.1.1.22: PD024]、[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。初期の疾患急性期を生存した動物は、MK-3415+MK-6072の投与の有無にかかわらず、徐々に体重が回復し始め、臨床徴候は最終的に完全に消失した[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。動物の生存曲線を[図 2.6.2-14]に示す。

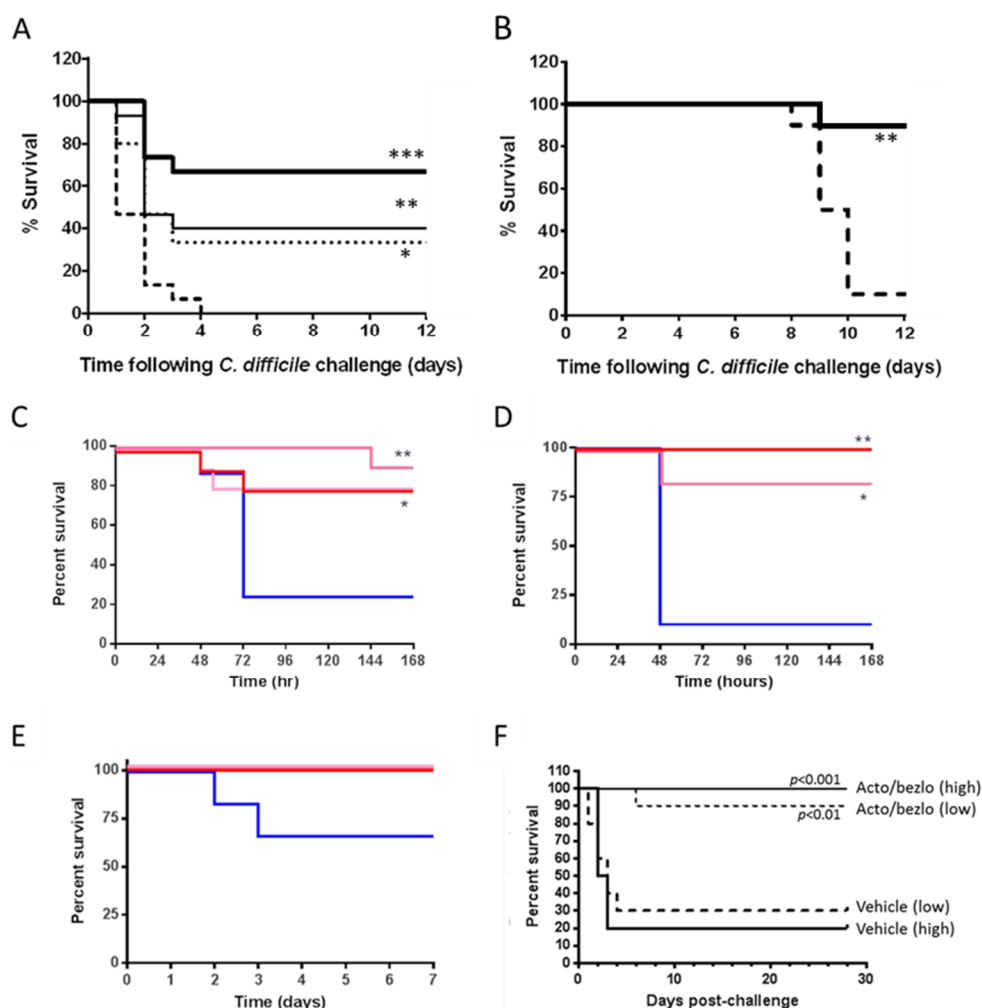


図 2.6.2-14 マウス CDI モデルでの生存率に及ぼす MK-3415+MK-6072 の影響

パネル A : *C. difficile* 感染症 (CDI) 初回感染モデル。溶媒 (太い破線)、MK-3415 (細い点線)、MK-6072 (細い実線)、又は MK-3415+MK-6072 (太い実線) (各抗体250 µg) を予防的に投与した動物の生存率を示す ([表 2.6.2-5] の試験1) [資料4.2.2.3.2: PK002]、[2.6.5 項]。(* P ≤ 0.02、** P ≤ 0.001、及び*** P ≤ 0.0001 vs 溶媒)

パネル B : CDI 再発モデル。溶媒 (破線) 又は MK-3415+MK-6072 (実線) (各抗体250 µg) を予防的及び治療的に投与した動物の生存率を示す ([表 2.6.2-5] の試験1) [資料4.2.2.3.2: PK002]、[2.6.5 項]。(** P ≤ 0.001 vs 溶媒)

パネル C : CDI 初回感染モデル。溶媒 (青) 又は MK-3415+MK-6072 の2 mg/kg (薄いピンク)、10 mg/kg (濃いピンク)、又は50 mg/kg (赤) を予防的に投与した動物の生存率を示す ([表 2.6.2-5] の試験2) [資料4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。(* P < 0.05、及び** P < 0.01 vs 溶媒)

パネル D : CDI 初回感染モデル。溶媒 (青) 又は MK-3415+MK-6072 の5 mg/kg (濃いピンク) 又は50 mg/kg (赤) を治療的に投与した動物の生存率を示す ([表 2.6.2-5] の試験2) [資料4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。(* P < 0.01、及び** P < 0.001 vs 溶媒)

パネル E : CDI 再発モデル。溶媒 (青) 又は MK-3415+MK-6072 の2 mg/kg (薄いピンク)、10 mg/kg (濃いピンク)、又は50 mg/kg (赤) を予防的に投与した動物の生存率を示す ([表 2.6.2-5] の試験2) [資料4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。

パネル F : *C. difficile* 低接種量又は高接種量の初回感染モデル。溶媒又は MK-3415+MK-6072 の50 mg/kg を予防的に投与した動物の生存率を示す ([表 2.6.2-5] の試験3)。P 値は溶媒と比較した有意性を示す [資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。

マウス *C. difficile* 感染症モデルでの腸の病変に及ぼす MK-3415+MK-6072の影響

[資料4.2.1.1.22: PD024]、[資料4.2.1.1.24: PD026]

程度はより軽度であるが、ハムスターCDIモデルと同様、マウスの病変としても、腸の腫脹及び出血、軟便又は水様便／無形便が認められた[資料4.2.1.1.22: PD024]、[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。マウス CDI モデルでの腸の損傷及び炎症に及ぼす MK-3415+MK-6072投与の影響を2試験で評価した[資料4.2.1.1.22: PD024]、[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。

マウスの CDI 初回感染モデルにおいて、MK-3415+MK-6072を予防的に投与した動物の腸の肉眼所見変化を評価した[資料4.2.1.1.22: PD024]、[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。[資料4.2.1.1.22: PD024]記載の試験では、溶媒を投与した動物の腸は著しい出血徴候及び液体貯留による腫脹を示し、水様の無形便もみられた。これに対し、MK-3415+MK-6072を投与した動物の腸には特記すべき変化はなく、腫脹又は出血も認められず、固形便であった（[図 2.6.2-15]、パネル A）。

[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]記載の試験では、腸の肉眼所見を0（健康な腸）～5（明らかな出血徴候を伴い高度に炎症を起こし腫脹した腸）でスコアリングした。MK-3415+MK-6072を投与した動物は、溶媒投与動物と比較して低いスコアが示すように、対照群でみられた肉眼所見の変化の多くはみられなかった（[図 2.6.2-15]、パネル B）。さらに、初期の疾患急性期を生存した動物では、用量にかかわらず肉眼所見の変化の緩やかな消失が経時的に認められた。

溶媒を投与した動物では、顕微鏡下に固有層への著しい好中球浸潤と上皮までの著しい損傷が認められた（[図 2.6.2-15]、パネル C）。これらの所見は MK-3415+MK-6072を投与した動物ではほとんど認められなかった。顕微鏡下での損傷及び炎症の程度は、炎症細胞浸潤、粘膜の肥大及び肥厚、血管のうっ血及び滲出液、上皮細胞及び上皮構造の破壊、並びに粘膜下浮腫であり、スコアは0～15であった（[図 2.6.2-15]、パネル D）。このスコアについては、MK-3415+MK-6072を投与した動物より溶媒投与動物の方が高かった[資料4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。

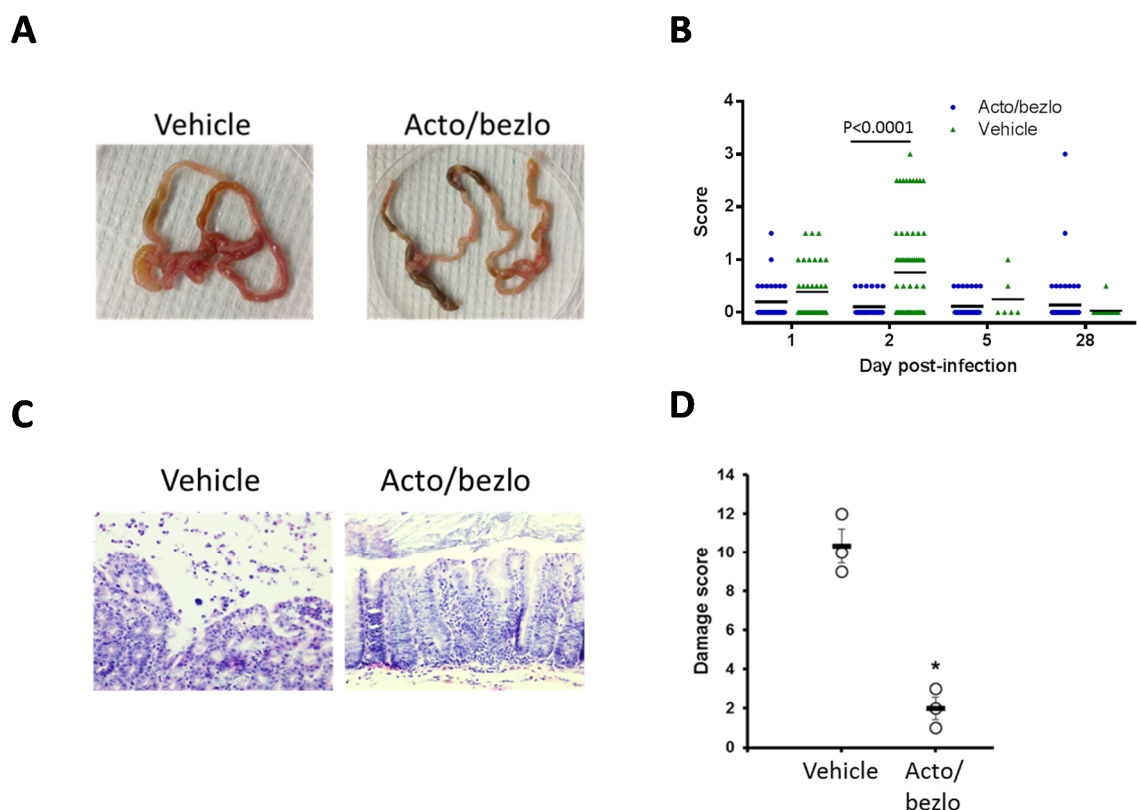


図 2.6.2-15 マウス CDI モデルでの腸の病変に及ぼす MK-3415+MK-6072 の影響

パネル A：CDI 初回感染モデル。溶媒又は MK-3415+MK-6072 の 10 mg/kg を予防的に投与した動物の腸を示す。試料は感染曝露後 Day 2 に採取した（[表 2.6.2-5] の試験 2）[資料 4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。

パネル B：CDI 初回感染モデル。溶媒又は MK-3415+MK-6072 の 50 mg/kg を予防的に投与した動物の腸の肉眼所見スコアを示す（[表 2.6.2-5] の試験 3）。データは、低接種量及び高接種量の *C. difficile* で感染させた動物の小腸、盲腸、及び結腸のすべてのスコアを含む。各カラムの横線は平均値を示す[資料 4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。

パネル C：CDI 初回感染モデル。溶媒又は MK-3415+MK-6072 10 mg/kg を投与した動物の盲腸のヘマトキシリン・エオジン染色切片を示す。試料は感染曝露後 Day 2 に採取した（[表 2.6.2-5] の試験 2）[資料 4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。

パネル D：CDI 初回感染モデル。溶媒又は MK-3415+MK-6072 の 10 mg/kg を投与した動物の盲腸切片の損傷及び炎症スコアを示す。試料は感染曝露後 Day 2 に採取した。各カラムの横線は平均値を示す（* $P < 0.05$ vs 溶媒）（[表 2.6.2-5] の試験 2）[資料 4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。

マウス *C. difficile* 感染症モデルでの腸及び糞便中の *C. difficile* 量及び TcdA 及び TcdB レベルに及ぼす MK-3415+MK-6072の影響

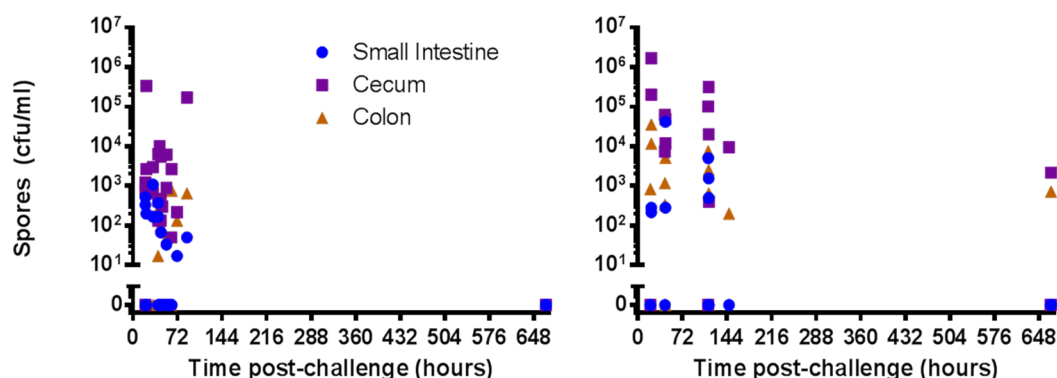
[資料4.2.1.1.24: PD026]

CDI 初回感染モデルのマウス腸中での *C. difficile* 量は、腸の内容物又は糞便中の芽胞を定量することにより評価した[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。動物には MK-3415+MK-6072を予防的に投与した。

C. difficile の芽胞は、感染曝露後20時間以内に動物の腸の内容物中に検出されるようになり、感染曝露後少なくとも Day 5まで高いレベルでみとめられた[図 2.6.2-16]。感染の急性期を生存した動物では、MK-3415+MK-6072投与の有無にかかわらず、感染曝露後 Day 28までに *C. difficile* 芽胞がほとんど又は全く検出されなくなった。MK-3415+MK-6072投与による *C. difficile* 量への影響はほとんどなかった[図 2.6.2-16]。糞便中の *C. difficile* 芽胞レベルも、MK-3415+MK-6072投与動物と比較して溶媒投与動物糞中の芽胞量が Day 1のみ低かったことを除いて、同じ傾向を示した[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。存在しなかった芽胞が Day 1の感染成立後に急激に増加することから、この観察結果は、糞便塊の特定の数時間での採取に起因した、実験群共通の変動を反映している可能性がある。その他の技術的な要因も考慮し、腸内容物中の芽胞レベルにより、腸管での定着／感染のより正確な評価を行った。この評価では、すべての観察時において2群を比較した [図 2.6.2-16]。

腸及び糞便中の TcdA 及び TcdB レベルは、おおむね *C. difficile* 量に対応しており、MK-3415+MK-6072投与の影響を受けなかった[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。

A



B

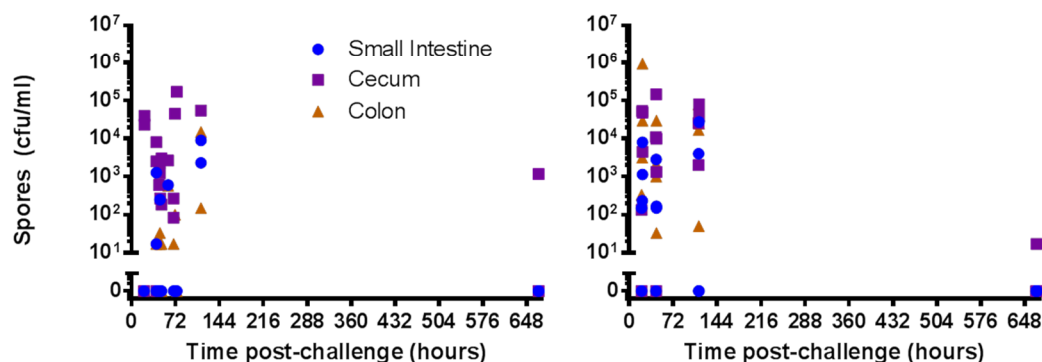


図 2.6.2-16 マウス CDI モデルでの腸の *C. difficile* 量に及ぼす MK-3415+MK-6072 の影響

パネル A : *C. difficile* 感染症 (CDI) 初回感染モデル。溶媒 (左のパネル) 又は MK-3415+MK-6072 50 mg/kg (右のパネル) を予防的に投与した動物の腸における *C. difficile* 芽胞量を示す ([表 2.6.2-5] の試験3)。データは、低接種量の *C. difficile* に曝露された動物の小腸、盲腸、及び結腸の値を示す[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。パネル B : CDI 初回感染モデル。溶媒 (左のパネル) 又は MK-3415+MK-6072 50 mg/kg (右のパネル) を予防的に投与した動物の腸における *C. difficile* 芽胞量を示す ([表 2.6.2-5] の試験3)。データは、高接種量の *C. difficile* に曝露された動物の小腸、盲腸、及び結腸の値を示す[資料4.2.1.1.24: PD026]、[2.6.3.1 項]。

2.6.2.2.2.4 MK-3415+MK-6072の有効性における Fc 介在性機能の役割

[資料4.2.1.1.22: PD024]、[資料4.2.2.3.2: PK002]

MK-3415及び MK-6072の有効性における Fc 介在性活性の役割を検討するため、マウスでは当該変異体にエフェクター機能が欠けているというこれまでの知見に基づき、抗体の N297Q 変異体 (MK-6072では N299Q、MK-3415では N302Q に相当) を作製した[資料4.3: 32]。変異体は様々なヒト及びマウス FcγR に有意に結合しないこと、また細胞死アッセイにより *in vitro* では機能的障害のないことが確認された[資料4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。エフェクター機能が MK-3415及び MK-6072の有効性に関与しているか否かを検討するため、マウス CDI モデルでの野生型と N297Q 変異体との有効性を比較した。初回感染及び再発のマウス CDI モデルにおいて、N297Q

変異体と野生型との有効性は同様であった[資料4.2.1.1.22: PD024]、[2.6.3.1 項]。

また、抗トキシン抗体と関連する Fc 介在性機能は Fc 受容体と結合することで非特異的な IgG との競合により抑制されると考えられるので、ハムスターCDI モデルを用いて MK-3415+MK-6072の有効性を40倍過剰量の非特異的ヒト IgG の併用投与の有無により比較した。過剰量のヒト IgG 同時投与による MK-3415+MK-6072の有効性への影響はなかった[資料4.2.2.3.2: PK002]、[2.6.5 項]。

FcγR 以外では、新生児の免疫グロブリン受容体 FcRn もヒト IgG1に結合するため、他の抗体でこれまでに提唱されているように、IgG 分子の腸壁通過を促進することでモノクローナル抗体の有効性に関与しうるとされている[資料4.3: 14]、[資料4.3: 33]。ハムスターCDI モデルでの MK-3415+MK-6072と過剰の非特異的 IgG との同時投与の結果はこれと異なっているので、FcRn ノックアウトマウスを用いて直接検討した。これらの試験において、MK-3415+MK-6072は CDI から保護しており、FcRn 遺伝子の遺伝的抑制はその保護レベルにさほど影響しなかった[資料4.2.2.3.2: PK002]、[2.6.5 項]。

以上の試験成績より、宿主エフェクター機能の関与や抗体の腸壁通過促進によっても、MK-3415及び MK-6072の Fc 介在性機能は、これら薬物の in vivo での有効性に関与しなかった。

2.6.2.2.2.5 ノトバイオートの仔ブタ *C. difficile* 感染モデルでの MK-3415+MK-6072の有効性

ノトバイオートの仔ブタ *C. difficile* 感染モデルを用いて、MK-3415及び MK-6072の単独又は併用（MK-3415+MK-6072）による作用、さらに、アルパカポリクローナル抗体の作用を評価した[資料4.3: 22]。本 CDI モデルでは強毒性の027型の UK6株を用いた。なお、MK-3415及び MK-6072は、既存の非027型に対するのと比較してやや作用は弱い、027型が産生する TcdA 及び TcdB をそれぞれ完全に阻害することが示されている[資料4.2.1.1.14:PD016]。

試験結果の概略については、消化管及び全身状態の状態観察、死亡例、剖検（腸の肉眼的観察）および組織病理学的検査により評価したところ、MK-3415+MK-6072の予防的投与による防御作用が認められた。MK-6072単独投与により同様な防御作用が認められたが、MK-3415単独投与では対照群（anti-shiga toxin 2抗体投与群）の動物と比較して防御作用が認められなかった[資料4.3: 22]。同様に、アルパカポリクローナルの抗 TcdB 抗血清を処置、または抗 TcdA および抗 TcdB 抗血清を併用処置した仔ブタにおいても、同程度の防御作用が観察されたが、ポリクローナル抗 TcdA 抗血清のみの処置では十分な防御作用は認められなかった。この結果は、MK-3415や MK-6072を用いた種々試験の結果に加えて、ノトバイオートの仔ブタにおいては *C. difficile* 感染における2種類のトキシンの明確な役割を示したものと考えられた[資料4.3: 22]。

2.6.2.3 副次的薬理試験

MK-3415+MK-6072の副次的薬理を評価する特定の試験は実施していない。生物学的活性及び特異性を検討するための in vitro アッセイ、有効性を評価するための in vivo 試験など、「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価、薬食審査発0323 第1号、ICH S6 (R1)」に

記載されている薬理試験の重要な要素はいずれも効力を裏付ける試験の項に記載した。標的以外への MK-3415+MK-6072の結合可能性は、毒性試験の項に含めた組織交差反応性試験で評価した。

2.6.2.4 安全性薬理試験

科学的根拠に基づき、MK-6072の in vitro ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）アッセイは実施しなかった[資料4.3: 16]。すなわち、モノクローナル抗体が hERG チャネルの細胞外又は細胞内（細孔）領域と相互作用する可能性は極めて低いため、hERG チャネル活性を阻害する可能性はほとんどないことは広く知られている。抗体は分子サイズが大きいため拡散により形質膜を通過できないことから、hERG チャネルの内孔を塞ぐ可能性は低いと考えられる。

また、MK-6072は外来性分子（細菌毒素）を標的としていることから、「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価、薬食審査発0323 第1 号、ICH S6 (R1)」に従い、MK-6072を用いた安全性薬理試験を実施していない。以上、MK-6072を用いた安全性薬理試験は実施しておらず、追加試験も予定していない。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

MK-6072を用いた薬力学的薬物相互作用を評価する試験は実施していない。なお、バイオ医薬品及び低分子医薬品の薬物相互作用については、国際的コンソーシアムによるポジションペーパーで同意されているとおり、in vitro 及び in vivo の非臨床試験からヒトの薬力学的薬物相互作用を予測することは困難である[資料4.3: 17]。また、他の薬物との相互作用は、臨床試験でのみ評価可能である。

2.6.2.6 考察及び結論

MK-3415及び MK-6072は、高い親和性でそれぞれ TcdA 及び TcdB に結合し、TcdA 及び TcdB の CROP 領域に存在する受容体結合ポケットを部分的に塞ぐことにより TcdA 及び TcdB と標的細胞の結合を阻害する。この結合は、通常であれば TcdA 及び TcdB と腸上皮細胞の結合により引き起こされる毒素侵入カスケードを阻止し、トキシンの下流への影響を阻止する。これら下流への影響とは、Rho-type GTPase のグルコシル化、細胞形態学的変化／細胞死などであり、上皮のバリアーとしての機能の破壊につながる。また、ヒト末梢血単核球（PBMC）及び結腸移植片において MK-3415及び MK-6072がトキシンのように誘導される炎症性メディエーターの放出を抑制することが示されている[資料4.3: 18]。

TcdA 及び TcdB による細胞変性／細胞毒性及び炎症誘発作用を MK-3415+MK-6072が阻害することは、マウス及びハムスターの CDI 初回感染又は再発のモデルでの有効な保護につながっている。MK-3415+MK-6072の投与により、*C. difficile* に曝露されたマウス及びハムスターの生存率が上昇し、これには罹病率の低下及び腸の肉眼所見の減少が伴っていた。マウス CDI モデルにおける死亡率及び罹病率の低下は、通常トキシンにより惹起される腸壁上皮損傷及び宿主の炎症応答の抑制と関連しており、このことは盲腸の病理切片にみられる上皮損傷及び炎症細胞浸潤をほぼ完全に阻害したことから明らかである。

マウス及びハムスターの CDI モデルでは、MK-3415+MK-6072は明確に保護作用を有するが、腸管の *C. difficile* 定着は低減しなかった。感染マウス及びハムスター腸中の *C. difficile* 芽胞量並びに TcdA 及び TcdB の濃度は、MK-3415+MK-6072投与群と溶媒投与群との間で同様であった。このことは、トキシンにより誘導される腸管上皮損傷が原因となる CDI の症状に対し、MK-3415+MK-6072が保護作用を有するが、感染自体を阻止しないという仮説と一致している。他方、マウス及びハムスターの CDI モデル両方において、投与の有無にかかわらず初期の CDI 急性期を生存した動物は最終的には菌を排除する。これらの動物では、感染曝露後14～28日までに腸の *C. difficile* 量がほとんど又は全く検出されなくなる。ハムスターでは、この *C. difficile* 量の減少は、クリンダマイシン投与による破壊後の腸内細菌叢の緩やかな回復と同時に進行する。以上の結果より、MK-3415+MK-6072が CDI 症状の発現を抑制することで、感染に対する抗菌薬の必要性がなくなり、腸内細菌叢 (*C. difficile* に対する身体の自然防御) が緩やかに回復し、最終的に感染が除去されるというモデルが支持された。CDI 再発との関連では、初回感染時に標準治療である抗菌薬と同時に投与すると、正常な腸内細菌叢がその後のエピソードを予防するにはまだ十分に回復していない場合には、MK-3415+MK-6072（又は下記のようにヒトの疾患に対する MK-6072単独）により再発性の感染症状を抑制することで、再発し易い期間中の追加抗菌薬療法を回避できる可能性がある。利用可能な非臨床データから、TcdA 及び TcdB の阻害による *C. difficile* 量への限定的な影響が示唆されるが、腸管での *C. difficile* の定着、芽胞形成、発芽若しくは増殖、又は正常な腸内細菌叢の再構築へのトキシンの直接的又は間接的な影響を完全に否定することはできない。事実、*in vitro* でトキシンによる *C. difficile* と極性化上皮細胞との接着増強が示されているが[資料4.3: 2]、[2.6.2.2.1.2.4 項]、他方、TcdA 及び TcdB が阻害されることは、腸壁での重要な生態的微小環境を無傷のまま維持し、細菌叢の腸管再定着を間接的に促進する可能性がある。

TcdA 及び TcdB は構造的及び機能的に相同であり、CDI におけるそれらの相対的な生物学的重要性は明らかでないが、宿主動物種の性質が関与しているようである。既に示したように、マウス及びハムスター CDI モデルでは MK-3415単独又は MK-6072単独投与での有効性が限定的であったことから、げっ歯類では最大の保護には両トキシンの阻害が必要であることが示された。これに対し、ヒトの第Ⅲ相試験において MK-6072単独投与は MK-3415+MK-6072併用投与と同様の保護が認められた[2.7.3.2.2 項]。これらの結果は、最近ノトバイオートの仔ブタ CDI モデルを用いて報告されたデータと類似している[資料4.3: 22]。しかし、MK-3415+MK-6072について上述したげっ歯類での全般的な作用機序は、ヒトの疾患においても意味のある可能性が高いと考えられる。ただし、ヒト（及び仔ブタ）の疾患における役割の重要度は TcdA の方が低く、恐らく重要ではないと考えられる。

げっ歯類を用いた *in vivo* 有効性試験では、遺伝的に異なる数種の *C. difficile* 株、特に B1（リボタイプ053／トキシノタイプ0）、VPI 10463（リボタイプ087／トキシノタイプ0）、630（リボタイプ012／トキシノタイプⅠ）、及び UK1（リボタイプ027／トキシノタイプⅢ）に対する MK-3415+MK-6072の有効性がみられた。さらに、ノトバイオートの仔ブタでは、リボタイプ027／トキシノタイプⅢ株、UK6に対しても MK-3415+MK-6072の有効性がみられた[資料4.3: 22]。しかし、その他にも数百種類もの臨床意義のある *C. difficile* 株が存在することが知られており、その多

くは異なるトキシン配列を有している。18種類のリボタイプ及び少なくとも7種類のトキシノタイプに及ぶ *C. difficile* 臨床分離株81株を用いた阻害試験において、MK-3415及びMK-6072は全試験株のトキシンを完全に阻害した。リボタイプ027及び078のトキシンに対する MK-3415及びMK-6072の活性はいずれも、その他の株のトキシンに対する活性と比較して低かった。しかし、この2種類のリボタイプに対する MK-3415及びMK-6072の EC_{50} 値は、CDI 患者における投与後84日までの血清中薬物濃度に比べて低値であった[資料4.3: 6]、[2.7.3.2.1.2 項]。

以上をまとめると、非臨床薬理試験の結果、マウス及びハムスターの疾患モデルでは MK-3415 +MK-6072投与により、TcdA 及び TcdB による損傷及び炎症誘発作用を抑制し、CDI から保護されることが示された。

2.6.2.7 参考文献

資料番号	タイトル	著者	掲載誌
[資料4.3: 1]	Epidemiology, diagnosis and treatment of <i>Clostridium difficile</i> infection.	Bassetti M, Villa G, Pecori D, et al.	Expert Rev Anti Infect Ther. 2012;10:1405-23.
[資料4.3: 2]	<i>Clostridium difficile</i> toxins facilitate bacterial colonization by modulating the fence and gate function of colonic epithelium.	Kasendra M, Barrile R, Leuzzi R, et al.	J Infect Dis. 2014;209:1095-104.
[資料4.3: 3]	Binding of <i>Clostridium difficile</i> to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins.	Cerquetti M, Serafino A, Sebastianelli A, et al.	FEMS Immunol Med Microbiol. 2002;32:211-8.
[資料4.3: 4]	Sensitivity in culture of epithelial cells from rhesus monkey kidney and human colon carcinoma to toxins A and B from <i>Clostridium difficile</i> .	Torres J, Camorlinga-Ponce M, Muñoz O.	Toxicon. 1992;30:419-26.
[資料4.3: 5]	Carbohydrate recognition by <i>Clostridium difficile</i> toxin A.	Greco A, Ho JGS, Lin SJ, et al.	Nat Struct Mol Biol. 2006;13:460-1.
[資料4.3: 6]	Treatment with monoclonal antibodies against <i>Clostridium difficile</i> toxins.	Lowy I, Molrine DC, Leav BA, et al.	N Engl J Med. 2010;362:197-205.
[資料4.3: 7]	Morphology of experimental antibiotic-associated enterocolitis in the hamster: a model for human pseudomembranous colitis and antibiotic-associated diarrhoea.	Price AB, Larson HE, Crow J.	Gut. 1979;20:467-75.
[資料4.3: 8]	Small animal models for the study of <i>Clostridium difficile</i> disease pathogenesis.	Hutton ML, Mackin KE, Chakravorty A, et al.	FEMS Microbiol Lett. 2014;352:140-9.
[資料4.3: 9]	An in vitro culture model to study the dynamics of colonic microbiota in Syrian golden hamsters and their susceptibility to infection with <i>Clostridium difficile</i> .	Miezeiewski M, Schnauffer T, Muravsky M, et al.	ISME J. 2015;9:321-32.
[資料4.3: 10]	The comparative pathology of <i>Clostridium difficile</i> -associated disease.	Keel MK, Songer JG.	Vet Pathol. 2006;43:225-40.

資料番号	タイトル	著者	掲載誌
[資料4.3: 11]	Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens.	Buffie CG, Pamer EG.	Nat Rev Immunol. 2013;13:790-801.
[資料4.3: 12]	Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to <i>Clostridium difficile</i> infection	Theriot CM, Koenigskecht MJ, Carlson Jr. PE, et al.	Nat Commun. 2014;5:3114.
[資料4.3: 13]	A mouse model of <i>Clostridium difficile</i> -associated disease.	Chen X, Katchar K, Goldsmith JD, et al.	Gastroenterol. 2008;135:1984-92.
[資料4.3: 14]	Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) expressed in the gastric epithelium regulates bacterial infection in mice.	Ben Suleiman Y, Yoshida M, Nishiumi S, et al.	Mucosal Immunol. 2012;5:87-98.
[資料4.3: 16]	Scientific review and recommendations on preclinical cardiovascular safety evaluation of biologics.	Vargas HM, Bass AS, Breidenbach A, et al.	J Pharmacol Toxicol Methods. 2008;58:72-6.
[資料4.3: 17]	Critical review of preclinical approaches to investigate cytochrome p450-mediated therapeutic protein drug-drug interactions and recommendations for best practices: a white paper.	Evers R, Dallas S, et al.	Drug Metab Dispos. 2013 Sep;41(9): 1598-609
[資料4.3: 18]	Human monoclonal antibodies against <i>Clostridium difficile</i> toxins A and B inhibit inflammatory and histologic responses to the toxins in human colon and peripheral blood monocytes.	Koon HW, Shih DQ, Hing TC, et al.	Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:3214-23.
[資料4.3: 19]	The role of toxin A and toxin B in the virulence of <i>Clostridium difficile</i> .	Carter GP, Rood JJ, Lyras D, et al.	Trends Microbiol. 2012;20:21-9.
[資料4.3: 20]	<i>Clostridium difficile</i> toxins: mediators of inflammation.	Shen A.	J Innate Immun. 2012;4:149-58.
[資料4.3: 21]	Asymptomatic carriage of <i>Clostridium difficile</i> and serum levels of IgG antibody against toxin A.	Kyne L, Warny M, Qamar A, et al.	N Engl J Med. 2000;342:390-7.

資料番号	タイトル	著者	掲載誌
[資料4.3: 22]	Antibody against TcdB, but not TcdA, prevents development of gastrointestinal and systemic <i>Clostridium difficile</i> disease.	Steele J, Mukherjee J, Parry N, et al.	J Infect Dis. 2013;207:323-30.
[資料4.3: 23]	Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent <i>Clostridium difficile</i> diarrhoea.	Kyne L, Warny M, Qamar A, et al.	Lancet. 2001;357:189-93.
[資料4.3: 24]	Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent <i>Clostridium difficile</i> infection (CDI).	Leav BA, Blair B, Leney M, et al.	Vaccine. 2010;28:965-9.
[資料4.3: 25]	Evaluation of formalin-inactivated <i>Clostridium difficile</i> vaccines administered by parenteral and mucosal routes of immunization in hamsters.	Torres JF, Lyerly DM, Hill JE, et al.	Infect Immun. 1995;63:4619-27.
[資料4.3: 26]	Antibodies to recombinant <i>Clostridium difficile</i> toxins A and B are an effective treatment and prevent relapse of <i>C. difficile</i> -associated disease in a hamster model of infection.	Kink JA, Williams JA.	Infect Immun. 1998;66:2018-25.
[資料4.3: 27]	"The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics"	Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, et al.	Cell Biol Toxicol. 2005;21:1-26.
[資料4.3: 28]	Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from <i>Clostridium difficile</i> toxin A.	Ho JGS, Greco A, Rupnik M, et al.	Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:18373-8.
[資料4.3: 29]	Toward a structural understanding of <i>Clostridium difficile</i> toxins A and B.	Pruitt PN, Lacy DB.	Front Cell Infect. Microbiol. 2012;2:1-14.
[資料4.3: 30]	Structural basis for antibody recognition in the receptor-binding domains of toxins A and B from <i>Clostridium difficile</i> .	Murase T, Eugenio L, Schorr M, et al.	J Biol Chem. 2014;289:2331-43.

資料番号	タイトル	著者	掲載誌
[資料4.3: 31]	Toxin-mediated paracellular transport of antitoxin antibodies facilitates protection against <i>Clostridium difficile</i> infection.	Zhang Z, Chen X, Hernandez LD, et al.	Infect Immun. 2015;83:405-16.
[資料4.3: 32]	Crosstalk between human IgG isotypes and murine effector cells.	Overdijk MB, Verploegen S, Ortiz Buijsse A, et al.	J Immunol. 2012;189:3430-8.
[資料4.3: 33]	Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria.	Yoshida M, Kobayashi K, Kuo TT, et al.	J Clin Invest. 2006;116:2142-51.
[資料4.3: 34]	Production of antitoxins to two toxins of <i>Clostridium difficile</i> and immunological comparison of the toxins by cross-neutralization studies.	Libby JM, Wilkins TD.	Infect Immun. 1982;35:374-6.
[資料4.3: 35]	<i>Clostridium difficile</i> infection: new developments in epidemiology and pathogenesis.	Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN.	Nat Rev Microbiol. 2009;7:526-36.
[資料4.3: 36]	Immune responses to <i>Clostridium difficile</i> infection.	Madan R, Petri Jr WA.	Trends Mol Med. 2012;18:658-66.
[資料5.4: 11]	An epidemic, toxin gene-variant strain of <i>Clostridium difficile</i> .	McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al.	N Engl J Med. 2005; 353:2433-41.

CTD 第 2 部

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

MSD 株式会社

目次

	頁
2.6.3.1 薬理試験：一覧表.....	2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験.....	4
2.6.3.3 副次的薬理試験.....	4
2.6.3.4 安全性薬理試験.....	4
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	4

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: bezlotoxumab and/or actoxumab					
<u>Type of study - primary pharmacodynamics</u>	<u>Species</u>	<u>Testing facility</u>	<u>GLP</u>	<u>Study/ report no.</u>	<u>Location Vol. Section</u>
CDA1 Binding to Toxin A as Determined by ELISA and Biacore	In vitro	[REDACTED]	No	PD001	[資料 4.2.1.1.1: PD001]
CDB1 Binding to Toxin B as Determined by ELISA and Biacore	In vitro	[REDACTED]	No	PD002	[資料 4.2.1.1.2: PD002]
CDA1 In Vitro Neutralization of Toxin A	In vitro	[REDACTED]	No	PD003	[資料 4.2.1.1.3: PD003]
CDB1 In Vitro Neutralization of Toxin B	In vitro	[REDACTED]	No	PD004	[資料 4.2.1.1.4: PD004]
Combination of CDA1 and CDB1 Protects Hamsters from Disease Associated with <i>Clostridium difficile</i>	Hamster	[REDACTED]	No	PD005	[資料 4.2.1.1.5: PD005]
CDA1 Epitope Mapping	In vitro	[REDACTED]	No	PD008	[資料 4.2.1.1.6: PD008]
CDB1 Epitope Mapping	In vitro	[REDACTED]	No	PD009	[資料 4.2.1.1.7: PD009]
CDA1 and CDB1 Neutralization of Toxins Produced by Toxinotype III <i>Clostridium difficile</i>	In vitro	[REDACTED]	No	PD010	[資料 4.2.1.1.8: PD010]
CDA1, But Not CDB1 Protects Mice from Challenge with <i>Clostridium difficile</i> Toxin	Mouse	[REDACTED]	No	PD011	[資料 4.2.1.1.9: PD011]
CDA1 Neutralizes Toxin A in the Mouse Ileal Loop Model	Mouse	[REDACTED]	No	PD012	[資料 4.2.1.1.10: PD012]
Assessment of the Ability of Actoxumab and Bezlotoxumab to Prevent Binding of <i>Clostridium difficile</i> Toxins A and B to HT-29 and Vero cells	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No	PD013	[資料 4.2.1.1.11: PD013]
Assessment of Binding of Actoxumab and Bezlotoxumab to <i>Clostridium difficile</i> Toxins A and B	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No	PD014	[資料 4.2.1.1.12: PD014]
Assessment of Binding Kinetics of Actoxumab and Bezlotoxumab to <i>Clostridium difficile</i> Toxins A and B	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No	PD015	[資料 4.2.1.1.13: PD015]

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: bezlotoxumab and/or actoxumab					
<u>Type of study - primary pharmacodynamics</u>	<u>Species</u>	<u>Testing facility</u>	<u>GLP</u>	<u>Study/ report no.</u>	<u>Location Vol. Section</u>
Assessment of the Affinity and Neutralization Potencies of Actoxumab and Bezlotoxumab Against Toxins from Various Strains of <i>Clostridium difficile</i>	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No	PD016	[資料 4.2.1.1.14: PD016]
Assessment of the Effects of Actoxumab and Bezlotoxumab on <i>Clostridium difficile</i> Toxin A- and B-mediated Glucosylation of RAC1 and Subsequent Morphological Changes in Vero Cells	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No	PD017	[資料 4.2.1.1.15: PD017]
Assessment of the Effects of <i>Clostridium difficile</i> Toxins A and B and of Actoxumab and Bezlotoxumab on the Integrity of Epithelial Cell Monolayers and on Adhesion of <i>Clostridium difficile</i> to Epithelial Cells	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No	PD018	[資料 4.2.1.1.16: PD018]
Determination of the Stoichiometry of Immune Complexes Formed Between Actoxumab and Bezlotoxumab and Their Respective Toxin Antigens	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No	PD019	[資料 4.2.1.1.17: PD019]
Mapping of the Epitopes of Bezlotoxumab on <i>Clostridium difficile</i> Toxin B	In vitro	MRL, Palo Alto, CA	No	PD020	[資料 4.2.1.1.18: PD020]
Mapping of the Epitopes of Actoxumab on <i>Clostridium difficile</i> Toxin A	In vitro	MRL, Palo Alto, CA	No	PD021	[資料 4.2.1.1.19: PD021]
Identification of the Epitopes of Bezlotoxumab on <i>Clostridium difficile</i> Toxin B by X-ray Crystallography	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No	PD022	[資料 4.2.1.1.20: PD022]
Assessment of the Impact of Treatment with Actoxumab/Bezlotoxumab in the Hamster <i>Clostridium difficile</i> Infection Model	Hamster	MRL, Kenilworth, NJ	No	PD023	[資料 4.2.1.1.21: PD023]
Assessment of Mechanisms of Protection by Actoxumab and Bezlotoxumab in Mouse Models of Primary and Recurrent <i>Clostridium difficile</i> Infection	In vitro	MRL, Kenilworth, NJ	No	PD024	[資料 4.2.1.1.22: PD024]
Assessment of the Effects of Treatment with Actoxumab/Bezlotoxumab in a Hamster Model of <i>Clostridium difficile</i> Infection	Hamster	██████████, UK	No	PD025	[資料 4.2.1.1.23: PD025]
Assessment of the Effects of Treatment with Actoxumab/Bezlotoxumab in a Mouse Model of <i>Clostridium difficile</i> Infection	Mouse	██████████, UK	No	PD026	[資料 4.2.1.1.24: PD026]

GLP = Good Laboratory Practice; No. = number

ベズロトクスマブ（遺伝子組換え） 注射剤

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

詳細については「効力を裏付ける試験」[2.6.2.2 項]を参照すること。MK-6072 の作用の裏付けとなる「薬理試験の概要」は[2.6.3.1 項]を参照すること。

2.6.3.3 副次的薬理試験

実施していない。詳細については[2.6.2.3 項]を参照すること。

2.6.3.4 安全性薬理試験

実施していない。詳細については[2.6.2.4 項]を参照すること。

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。詳細については[2.6.2.5 項]を参照すること。