ポートラーザ点滴静注液 800mg

2.6.1　緒言

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.1　緒言 2

略語一覧

%T/C	腫瘍体積比
ADCC	抗体依存性細胞傷害
$AUC_{0\text{-last}}$	投与後 0 時間から最終濃度測定時点までの血清中濃度–時間曲線下面積
C_{max}	最高血清中濃度
C_{min}	最小血清中濃度
EC_{50}	50%有効濃度
ECL	Electrochemiluminescence
EGF	上皮成長因子
EGFR	上皮成長因子受容体
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法
ErbB	赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ
Erk	細胞外シグナル制御キナーゼ
EU	欧州連合
FcγR	Fcγ受容体
FITC	fluorescein isotiocyanate
GFP	緑色蛍光タンパク質
GLP	Good Laboratory Practice
GLUT	グルコース輸送体
HB-EGF	ヘパリン結合性上皮成長因子
IC_{50}	50%阻害濃度
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
Ig	免疫グロブリン
IMC-11F8	ネシツムマブ
K_d	解離定数
k_{off}	解離速度
k_{on}	結合速度
LDH	乳酸脱水素酵素
NOAEL	無毒性量
NSCLC	非小細胞肺癌
[redacted]	[redacted]細胞
PK	ファーマコキネティクス
Repeated Measures ANOVA	反復測定分散分析
S/N 比	シグナル/ベースラインノイズ比
Sq CLC	肺癌（扁平上皮癌）、扁平上皮非小細胞肺癌
$t_{1/2}$	半減期
TGFα	形質転換増殖因子α
TK	トキシコキネティクス

2.6.1　緒言

ネシツムマブは、ヒト上皮成長因子受容体（EGFR）に対する遺伝子組換えヒト免疫グロブリン G1 モノクローナル抗体である。

ネシツムマブの EGFR に対する親和性は高く、リガンドによる受容体のリン酸化及びシグナル伝達を遮断する。In vitro 試験において、ネシツムマブは EGFR 依存性の腫瘍細胞増殖を阻害し、また腫瘍細胞に対する抗体依存性細胞傷害作用を示した。

ネシツムマブの臨床開発は、外国人進行固形癌患者を対象とした第 1 相試験である I4X-IE-JFCE 試験（JFCE 試験）から開始した。JFCE 試験の薬物動態データを用いたシミュレーション及び腫瘍異種移植モデルで得られた結果より、ネシツムマブ 800 mg を 3 週間サイクルの Day 1 及び Day 8 に投与することで抗腫瘍活性が期待できることが示唆された。

第 3 相試験としては、外国人肺癌（扁平上皮癌）（扁平上皮非小細胞肺癌、Sq CLC）患者を対象に SQUIRE 試験［I4X-IE-JFCC（JFCC 試験）］を実施した。JFCC 試験では、化学療法未治療の進行又は再発の Sq CLC 患者を対象に、ネシツムマブと標準治療として確立している化学療法（ゲムシタビン＋シスプラチン）を併用し、その有効性及び安全性を検討した。ネシツムマブと化学療法（ゲムシタビン＋シスプラチン）の併用群は化学療法（ゲムシタビン＋シスプラチン）投与群と比較し、主要評価項目である全生存期間について統計学的に有意な延長が示された。また、認められた有害事象は管理可能であり、良好なベネフィット・リスクプロファイルが示された。

JFCC 試験の結果に基づき、ネシツムマブと化学療法（ゲムシタビン＋シスプラチン）の併用療法は、化学療法未治療の Sq CLC 患者に対して、2015 年に米国で、2016 年に欧州連合（EU）で承認された。

国内では、進行固形癌患者を対象に、第 1 相試験である I4X-IE-JFCA 試験（JFCA 試験）を実施し、ネシツムマブ 800 mg の 2 週間ごとの投与、及び 800 mg の 3 週間ごとの投与（Day 1 及び Day 8）の忍容性が確認された。

JFCA 試験終了後、医薬品[redacted]相談（20[redacted]年[redacted]月[redacted]日実施、[redacted]）で得られた独立行政法人医薬品医療機器総合機構の助言を踏まえ、国内第 1b/2 相試験である I4X-JE-JFCM 試験（JFCM 試験）を実施した。JFCM 試験でも、ネシツムマブと化学療法（ゲムシタビン＋シスプラチン）を併用することにより、化学療法（ゲムシタビン＋シスプラチン）のみと比較して臨床的に意味のある全生存期間の延長が示された。また、JFCM 試験でも認められた有害事象は管理可能であった。

以上の試験成績から、ネシツムマブの化学療法未治療の進行又は再発の Sq CLC に対する良好なベネフィット・リスクプロファイルが得られたことから、本医薬品製造販売承認申請の実施に至った。

ポートラーザ点滴静注液 800mg

2.6.2　薬理試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.2　薬理試験の概要文 1
2.6.2.1　まとめ 1
2.6.2.2　効力を裏付ける試験 2
2.6.2.2.1　In vitro 薬効薬理試験 2
2.6.2.2.1.1　In vitro におけるネシツムマブの結合能 3
2.6.2.2.1.2　ネシツムマブの受容体選択性及び種交差反応性 5
2.6.2.2.1.3　EGFR 介在性シグナル伝達及び腫瘍細胞生存に対するネシツムマブの作用 6
2.6.2.2.1.4　ネシツムマブの EGFR 内在化及び分解作用 7
2.6.2.2.1.5　ネシツムマブの抗体依存性細胞傷害活性 9
2.6.2.2.2　In vivo 薬効薬理試験 10
2.6.2.2.2.1　ヒト癌のマウス異種移植モデルにおけるネシツムマブの抗腫瘍効果 10
2.6.2.2.2.1.1　試験方法及びデザインの概要 10
2.6.2.2.2.1.2　種々の異種移植腫瘍モデルを用いたネシツムマブの Proof-of-Concept 試験 11
2.6.2.2.2.1.3　ヒト NSCLC のマウス異種移植モデルにおけるネシツムマブの抗腫瘍効果 14
2.6.2.2.2.1.4　ヒト Sq CLC のマウス異種移植モデルにおけるネシツムマブの抗腫瘍効果（プラチナダブレットとの併用投与試験） 16
2.6.2.2.2.1.5　ネシツムマブとプラチナダブレットとの併用投与時の抗腫瘍効果の作用機序 19
2.6.2.3　副次的薬理試験 21
2.6.2.4　安全性薬理試験 21
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用 21
2.6.2.6　考察及び結論 21
2.6.2.7　参考文献 22

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

ネシツムマブ（LY3012211 又は IMC-11F8 とも表記）はヒト上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する完全ヒト免疫グロブリン G1（IgG1）モノクローナル抗体であり、上皮成長因子（EGF）、形質転換増殖因子α（TGFα）、ヘパリン結合性上皮成長因子（HB-EGF）、ベータセルリン、アンフィレグリン、エピレグリン及びエピゲンといった EGFR リガンドの結合に拮抗する。ネシツムマブは、4 本のポリペプチド鎖［各々2 本の同一重鎖（451 アミノ酸）及び軽鎖（214 アミノ酸）］から構成され、Fc 領域に 1 ヵ所、*N*-結合型グリコシル化部位を有する。ネシツムマブは進行・再発の肺癌（扁平上皮癌）（扁平上皮非小細胞肺癌、Sq CLC）患者の治療を目的として開発中である。

ネシツムマブの EGFR に対する結合能、並びにリガンド刺激による EGFR 活性化及びその下流シグナル伝達に対する阻害能を各種 in vitro 試験で評価した。また、ネシツムマブの抗腫瘍効果及びその作用機序をマウス担癌モデルで評価した。得られた主な成績を以下に示す。

［In vitro 薬効薬理試験］

- 表面プラズモン共鳴法を用いた試験において、ネシツムマブはヒト EGFR に高い親和性で結合し［解離定数（K_d）：0.32 nM］、また、ヒト扁平上皮癌細胞（A431 細胞）に発現した EGFR への ^{125}I-EGF の結合を阻害した［50%阻害濃度（IC_{50}）= 1～2 nM］。
- 酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を用いた試験において、ネシツムマブはヒトとカニクイザル（以下、サルと表記）の EGFR に同程度の親和性で結合［50%有効濃度（EC_{50}）= 0.006～0.007 nM］したが、ウサギ EGFR への結合親和性は約 300 倍低く、マウス及びラットの EGFR にはほとんど結合しなかった。
- ネシツムマブは EGFR に選択的に結合し、他の赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ（ErbB）ファミリーとは交差反応しなかった。
- ネシツムマブは EGFR リガンドにより誘導される EGFR チロシンリン酸化を阻害した。
- ネシツムマブはヒト扁平上皮癌細胞（A431 細胞）におけるリガンド誘導性の EGFR 及び細胞外シグナル制御キナーゼ（Erk）1/2 のリン酸化を濃度依存的に阻害した（IC_{50} = 0.80 nM）。
- ネシツムマブはヒト結腸直腸癌細胞（NCI-H508 及び DiFi 細胞）の生存を著しく抑制した（IC_{50}：それぞれ 0.04 及び 1.2 nM）。
- ネシツムマブは EGFR の内在化及び分解を促進した。
- ネシツムマブは抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘導した。

［In vivo 薬効薬理試験］

- ヒト非小細胞肺癌（NSCLC）細胞をマウスに異種移植した試験において、ネシツムマブは単独投与で統計学的に有意な抗腫瘍効果を示した。
- ヒト Sq CLC 細胞をマウスに異種移植した試験において、プラチナダブレット（ゲムシタビン及びシスプラチン）の単独投与時と比較して、ネシツムマブとの併用投与による統計学的に有意な相加作用が抗腫瘍効果に認められた。

- ヒト NSCLC 異種移植モデルにおいて、ネシツムマブとプラチナダブレットの併用投与により、腫瘍細胞増殖の抑制、腫瘍微小血管密度の減少及びアポトーシスの増加が増強された。

以上、ネシツムマブはヒト EGFR に特異的に高い親和性で結合したが、マウス EGFR やその他の ErbB ファミリーにはほとんど結合しなかった。また、ネシツムマブは、リガンド刺激による EGFR の活性化及びその下流シグナル伝達を阻害した。この阻害作用によりネシツムマブは癌細胞の細胞周期の進行、有糸分裂、生存、遊走及び浸潤を抑制すると考えられる。ヒト Sq CLC 細胞をマウスに異種移植した試験では、ネシツムマブはプラチナダブレットの抗腫瘍効果を有意に増強させた。これらの成績は、Sq CLC 患者にネシツムマブをプラチナダブレットと併用投与することの妥当性を支持するものであった。

ネシツムマブの安全性薬理評価を、サルを用いた反復投与毒性試験において実施した結果、心血管系、呼吸系及び中枢神経系に変化は認められなかった。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　In vitro 薬効薬理試験

EGFR を発現するヒト扁平上皮癌細胞（A431 細胞）を用いてヒト Fab ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングした後、得られたクローンを EGFR キナーゼ活性化アッセイに供し、EGFR リン酸化阻害能を示した完全長ヒト IgG1 抗体 IMC-11F8（ネシツムマブ）を単離した（報告書 IMC11F8-01）。

ネシツムマブを用いた in vitro 薬効薬理試験の一覧を表 2.6.2-1 に示す。細胞を用いた試験では、その生物活性が EGFR のシグナル伝達に依存する細胞を用いた。

表 2.6.2-1 ネシツムマブの in vitro 薬効薬理試験の一覧

試験目的	評価項目	評価系	結果	報告書番号
結合能/阻害能の評価	ヒト EGFR 細胞外ドメインへの結合	SPR	K_d = 0.32 nM	IMC11F8-01
	ヒト EGFR 細胞外ドメインへの結合	ELISA	EC_{50} = 0.08 nM	IMC11F8-01
		ELISA	EC_{50} = 0.015 nM	[redacted]
		ELISA	EC_{50} = 0.007 nM	20[redacted]
	^{125}I-EGF の EGFR 陽性細胞への結合に対する阻害作用	放射性標識体競合アッセイ	IC_{50} = 1～2 nM	IMC11F8-01
	受容体選択性	ELISA	ErbB2、ErbB3 及び ErbB4 には結合せず	[redacted]
	種交差反応性	ELISA	ヒト及びサルの EGFR に同程度の高い親和性で結合。ウサギの EGFR への親和性は低く、マウス及びラットの EGFR には結合せず	20[redacted]
細胞機能の評価	リガンド誘導性 EGFR リン酸化に対する阻害作用	リン酸化アッセイ	既知リガンドによる EGFR リン酸化をいずれも阻害（IC_{50}<0.7 nM）	20[redacted]
	EGFR 及び Erk1/2 リン酸化に対する阻害作用	ウエスタンブロット	IC_{50} = 0.8 nM	IMC11F8-01
	腫瘍細胞の生存に対する抑制作用	細胞増殖アッセイ	IC_{50} = 0.04（NCI-H508 細胞）及び 1.2（DiFi 細胞）nM	20[redacted]
受容体内在化の評価	EGFR 内在化及び分解の作用	レポーターアッセイ	EGFR のリソソームへの移行を促進し、EGFR を 40%減少	20[redacted]
ADCC 活性の評価	CD16a への結合能	SPR 及び細胞結合アッセイ	CD16a に結合	SDR-13049-20
	ADCC 活性誘導能	レポーター遺伝子アッセイ及び[redacted]アッセイ	ADCC 活性を誘導	SDR-13049-20

略語：ADCC = 抗体依存性細胞傷害、EC_{50} = 50%有効濃度、EGF = 上皮成長因子、EGFR = 上皮成長因子受容体、ErbB = 赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ、Erk = 細胞外シグナル制御キナーゼ、ELISA = 酵素結合免疫吸着測定法、IC_{50} = 50%阻害濃度、K_d = 解離定数、[redacted]=[redacted]細胞、SPR = 表面プラズモン共鳴法。

2.6.2.2.1.1 In vitro におけるネシツムマブの結合能

報告書 IMC11F8-01 (4.2.1.1.1)

Biacore を用いた表面プラズモン共鳴法により、ネシツムマブのヒト EGFR に対する結合能を評価した（報告書 IMC11F8-01、表 2.6.2-2）。ネシツムマブ Fab 及びネシツムマブの結合能をそれぞれセツキシマブ Fab 及びセツキシマブの結合能と比較した。EGFR 細胞外ドメインをセンサーチップ上に固相化し、1.5～100 nM の濃度で各 Fab フラグメント又は抗体を処理した。各濃度で得られたセンサーグラムから、結合速度（k_{on}）及び解離速度（k_{off}）を求め、k_{off}/k_{on} の比から解離定数（K_d）を算出した。その結果、ネシツムマブ Fab の結合親和能はセツキシマブ Fab の約 1/3 であり、K_d はネシツムマブ Fab が 1.78 nM、セツキシマブ Fab が 0.53 nM であった。この差はネシツムマブ Fab の k_{off} の方が大きいことに起因する。しかしながら、ネシツムマブ及びセツキシマブの結合能はほぼ同等であり、K_d はそれぞれ 0.32 及び 0.38 nM であった。

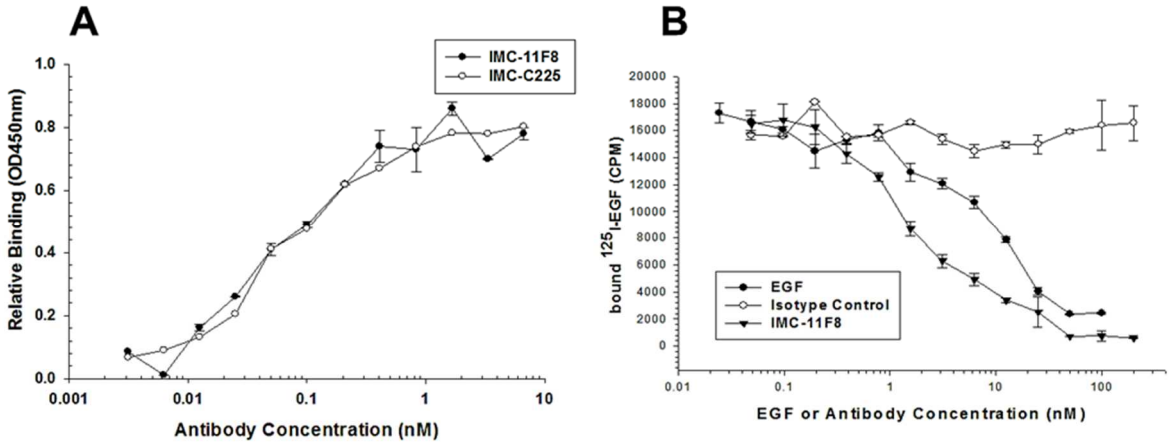
表 2.6.2-2　ネシツムマブのヒト EGFR に対する結合能

抗体	フォーム	k_{on} (10^5 $M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (10^{-4} s^{-1})	K_d (nM)
ネシツムマブ	Fab	22.9 ± 9.9	36.7 ± 8.5	1.78 ± 0.51
	IgG	20.8 ± 7.7	6.5 ± 2.2	0.32 ± 0.05
セツキシマブ	Fab	23.1 ± 4.8	11.7 ± 3.4	0.53 ± 0.17
	IgG	18.2 ± 6.4	6.0 ± 1.1	0.38 ± 0.18

略語：EGFR = 上皮成長因子受容体、K_d = 解離定数、k_{off} = 解離速度、k_{on} = 結合速度。
データは 3 回以上の測定の平均値±標準誤差で示す。
報告書 IMC11F8-01 の表 1 より。

ネシツムマブ及びセツキシマブの固相化ヒト EGFR 細胞外ドメインへの結合を ELISA で評価したところ、ネシツムマブとセツキシマブの結合能はほぼ同程度で、EC_{50} は共に約 0.08 nM であった（報告書 IMC11F8-01、図 2.6.2-1A）。ELISA を用いて評価した別の試験（報告書 [redacted] 20[redacted] 及び報告書 20[redacted]）で得られたネシツムマブの EC_{50} はそれぞれ約 0.015 及び 0.007 nM であった。

ヒト腫瘍細胞に発現した EGFR への EGF の結合に対するネシツムマブの阻害作用を、ヒト扁平上皮癌細胞（A431 細胞）及び ^{125}I-EGF を用いた競合アッセイにより評価した（報告書 IMC11F8-01、図 2.6.2-1B）。その結果、ネシツムマブは ^{125}I-EGF の結合に対して濃度依存的な阻害作用を示し、50 nM 以上の濃度でほぼ完全な阻害が見られた。ネシツムマブの効力（IC_{50}：1～2 nM）は非標識リガンド（EGF）の効果（IC_{50}：10 nM）よりも高かった。一方、対照 IgG1 抗体はリガンド結合に対して明らかな作用を示さなかった。



略語：EGF = 上皮成長因子、EGFR = 上皮成長因子受容体、IMC-11F8 = ネシツムマブ、IMC-C225 = セツキシマブ。
A の縦軸は 450 nM での吸光度を、B の縦軸は放射能カウントをそれぞれ示す（平均値±標準誤差、n = 3）。
報告書 IMC11F8-01 の図 1 及び図 2 より。

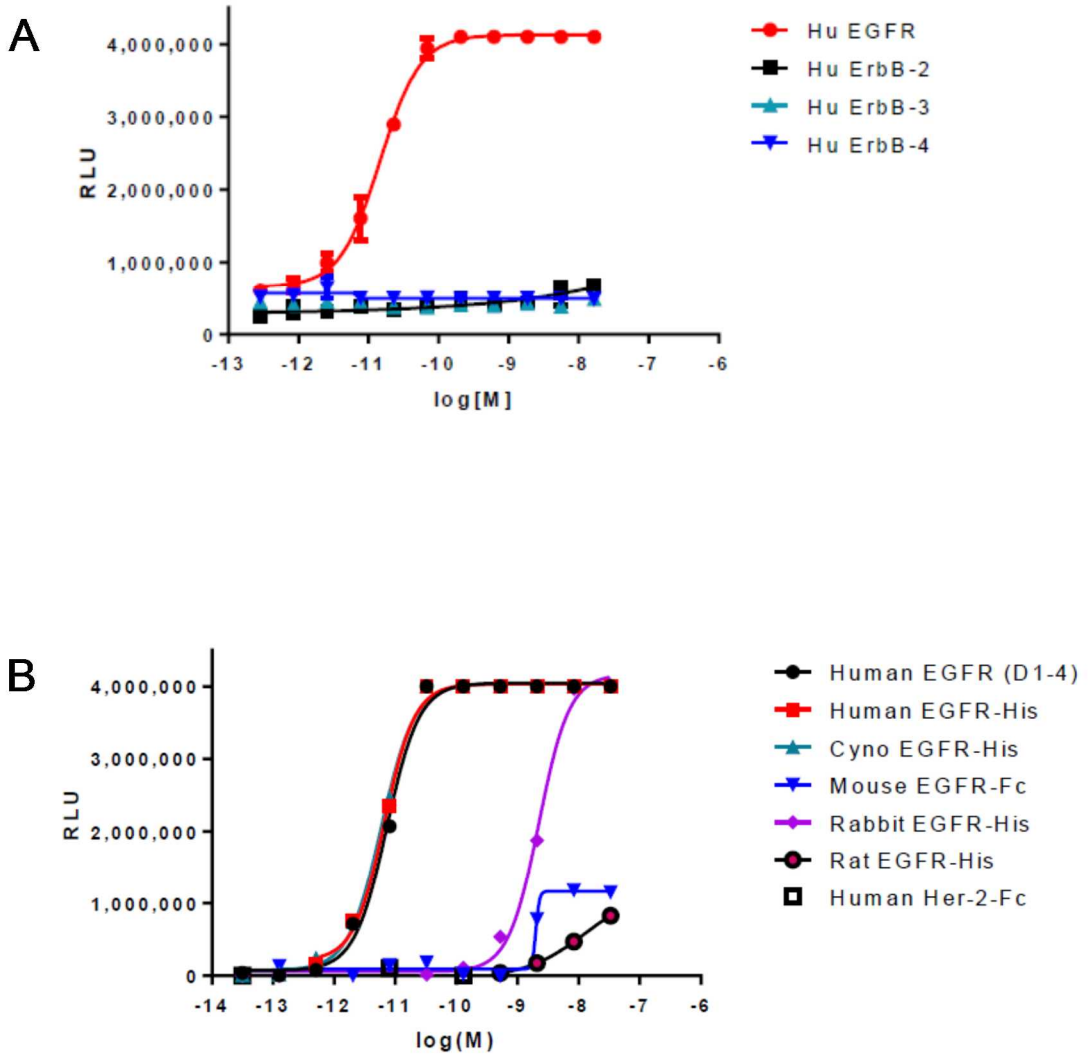
図 2.6.2-1　ネシツムマブのヒト EGFR への結合能（A）及び ^{125}I-EGF の EGFR 陽性 A431 細胞への結合に対する阻害能（B）

以上、一連の試験から、ネシツムマブはヒト EGFR に結合し、EGF との相互作用を強力に阻害することが示された。

2.6.2.2.1.2　ネシツムマブの受容体選択性及び種交差反応性

報告書[redacted]-20[redacted] (4.2.1.1.2), 20[redacted] (4.2.1.1.3)

EGFR ファミリー（EGFR 及び ErbB2～4）並びにヒト、サル、ウサギ、マウス及びラット EGFR の細胞外ドメインへのネシツムマブの結合を ELISA により評価した。その結果、ネシツムマブはヒト EGFR に高い親和性で結合し（EC_{50} = 0.015 nM）、他の受容体（ErbB2、ErbB3 及び ErbB4）には交差反応しなかった（報告書 [redacted]-20[redacted]、図 2.6.2-2A）。また、ネシツムマブはヒトとサルの EGFR に同程度の親和性で結合（EC_{50}：ヒト及びサルでそれぞれ 0.007 及び 0.006 nM）したが、ウサギ EGFR への親和性は約 300 倍低く、マウス及びラットの EGFR にはほとんど結合しなかった（報告書 20[redacted]、図 2.6.2-2B）。



略語：Cyno = カニクイザル、D1-4 = Domain 1-4、EGFR = 上皮成長因子受容体、ErbB = 赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ、Fc = Fc tag、Her-2 = human EGFR-related 2 (ErbB-2)、His = ポリヒスチジンタグ、Hu = ヒト。
縦軸は相対蛍光強度（RLU）を示す（平均値±標準誤差、n = 2）。
A：報告書[redacted]-20[redacted]の図 1、B：報告書 20[redacted]の図 2。

図 2.6.2-2　ネシツムマブの受容体選択性（A）及び種交差反応性（B）

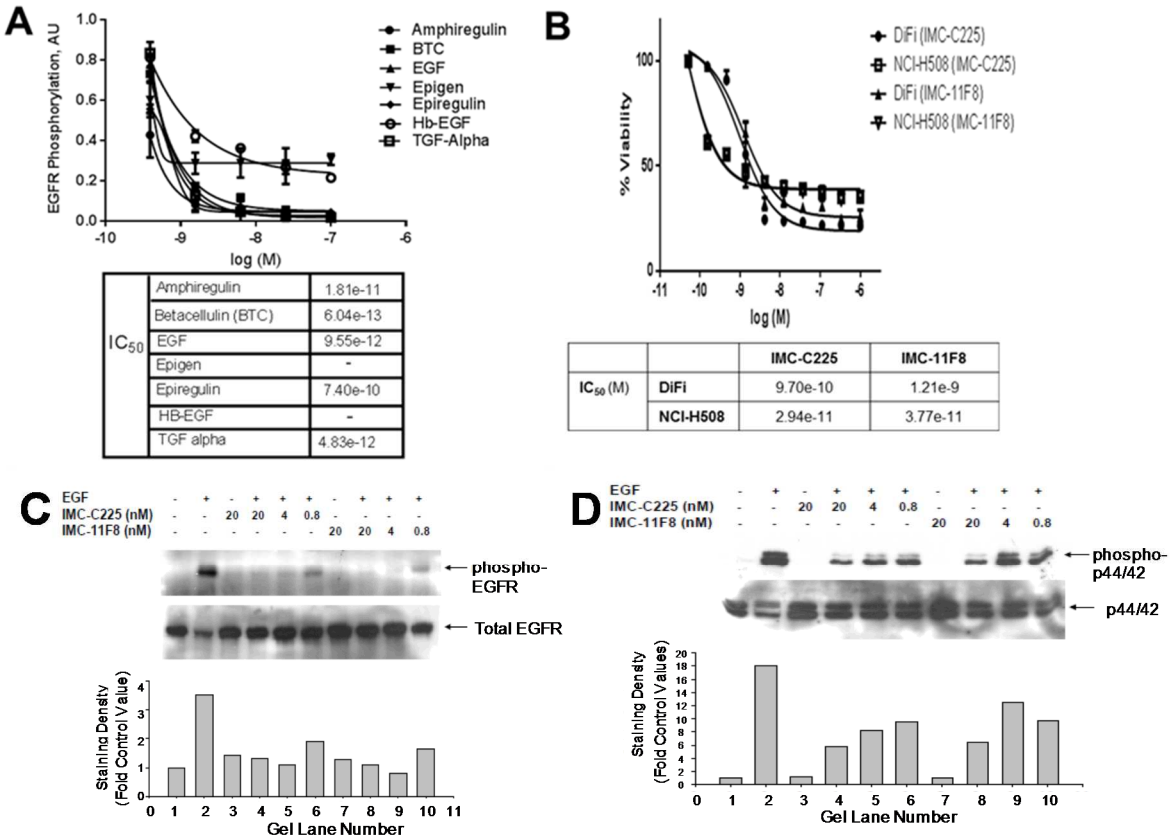
2.6.2.2.1.3　EGFR 介在性シグナル伝達及び腫瘍細胞生存に対するネシツムマブの作用

報告書 20[redacted] (4.2.1.1.4), IMC11F8-01 (4.2.1.1.1), 20[redacted] (4.2.1.1.5)

EGFR は 7 種類のリガンド（EGF、TGFα、HB-EGF、ベータセルリン、アンフィレグリン、エピレグリン及びエピゲン）によって活性化される。リガンド刺激時の EGFR チロシン残基のリン酸化及びその下流シグナル伝達、並びに EGFR 依存性癌細胞の生存に対するネシツムマブの作用を評価した。

野生型 EGFR を過剰発現しているヒト扁平上皮肺癌細胞（LK-2 細胞）をネシツムマブの存在下及び非存在下で培養後、ヒト EGF、TGFα、HB-EGF、ベータセルリン、アンフィレグリン、エピレグリン及びエピゲンで刺激した。細胞を溶解し、溶解液中の EGFR チロシンリン酸化を磁気ビーズに結合させたリン酸化 EGFR 特異的抗体を用いて定量した。その結果、ネシツムマブは上述のリガンドにより誘導される EGFR チロシンリン酸化を強力かつ濃度依存的に阻害し、それらの IC_{50} は 0.74 nM 以下であった（報告書 20[redacted]、図 2.6.2-3A）。

ヒト扁平上皮癌細胞（A431 細胞）の増殖及び生存は EGFR 及び Erk1/2 のリン酸化に依存する。ウエスタンブロット解析により、これらのリン酸化に及ぼすネシツムマブの影響を評価したところ、概して濃度依存的な阻害が見られ、それらの IC_{50} はいずれも約 0.8 nM であった（報告書 IMC11F8-01、図 2.6.2-3C 及び D）。ヒト結腸癌細胞（DiFi 及び NCI-H508 細胞）の増殖に対するネシツムマブ及びセツキシマブの作用を評価したところ、いずれも腫瘍細胞の生存を著しく阻害し、それらの IC_{50} は同程度であり、NCI-H508 細胞及び DiFi 細胞でそれぞれ約 0.04 及び 1.2 nM であった（報告書 20[redacted]、図 2.6.2-3B）。



IC_{50}	Amphiregulin	1.81e-11
	Betacellulin (BTC)	6.04e-13
	EGF	9.55e-12
	Epigen	-
	Epiregulin	7.40e-10
	HB-EGF	-
	TGF alpha	4.83e-12

		IMC-C225	IMC-11F8
IC_{50} (M)	DiFi	9.70e-10	1.21e-9
	NCI-H508	2.94e-11	3.77e-11

略語：BTC＝ベータセルリン、EGF＝上皮成長因子、EGFR＝上皮成長因子受容体、Erk＝細胞外シグナル制御キナーゼ、HB-EGF ＝ヘパリン結合性上皮成長因子、IC_{50}＝50%阻害濃度、IMC-11F8＝ネシツムマブ、IMC-C225＝セツキシマブ、TGF-Alpha＝形質転換増殖因子α。
縦軸は EGFR のリン酸化レベル（A 及び C）、Erk1/2（p44/42）のリン酸化レベル（D）又は細胞の生存率（B）をそれぞれ示す。
A の縦軸は平均値±標準誤差（n＝2）。データの一部欠損のため、Epigen 及び HB-EGF の IC_{50} は正確に算出できず。
A：報告書 20[redacted]の図 2、B：報告書 20[redacted]の図 1、C：報告書 IMC11F8-01 の図 4、D：報告書 IMC11F8-01 の図 7。

図 2.6.2-3　LK-2 細胞のリガンド誘導性 EGFR リン酸化（A）、DiFi 及び NCI-H508 細胞の生存（B）並びに A431 細胞の EGFR（C）及び Erk1/2（D）リン酸化に対するネシツムマブの作用

2.6.2.2.1.4　ネシツムマブの EGFR 内在化及び分解作用

報告書 20[redacted] (4.2.1.1.6)

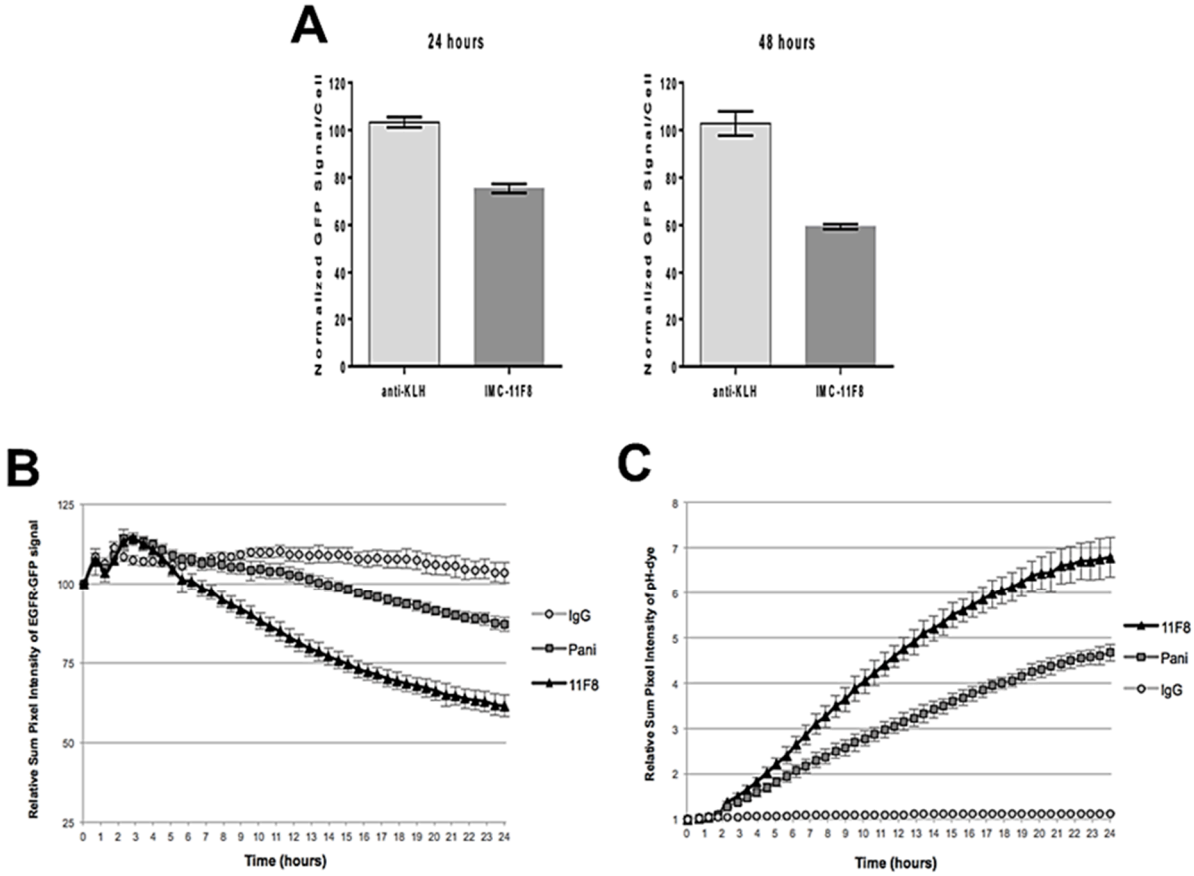
がん治療に用いられる抗体製剤には、その抗腫瘍効果に標的分子の内在化及び分解作用が寄与しているものがある。EGFR 融合タンパク質を異所的に発現させた HeLa 細胞を用いたレポーターアッセイにより、ネシツムマブの EGFR 内在化及び分解作用を評価した（報告書 20[redacted]）。

C 末端に緑色蛍光タンパク質（GFP）を融合した EGFR を過剰発現させた HeLa 細胞（HeLa-EGFR-GFP 細胞）をネシツムマブ、陰性対照 IgG、又はパニツムマブ（抗 EGFR 抗体）で処理し、生細胞共焦点顕微鏡観察又はフローサイトメトリーに供した。共焦点顕微鏡観察では、Fab-pHrodo（蛍光標識したヤギ抗ヒト IgG Fab フラグメント）存在下での評価も実施した。Fab-pHrodo はリソソームなどの低 pH 細胞内画分のみで蛍光を発することから、抗体のリソソーム局在化を可視化する目的で使用される。共焦点顕微鏡でプレートを 30 分ごとに 24 時間、連続撮影

し、蛍光強度を解析した。選択した画像範囲の総ピクセル強度の平均値（4 ウェルの平均値）を 0 時間時点の値で補正し、時間に対してプロットした。

フローサイトメトリー（図 2.6.2-4A）及び共焦点顕微鏡観察（図 2.6.2-4B）において、ネシツムマブ（それぞれ 100 nM 及び 10 μg/mL）を 24～48 時間処理すると GFP 標識 EGFR の発現量が約 40%減少することが示された。また、ネシツムマブは時間依存的に EGFR のリソソーム画分への移行を増加させたことから（図 2.6.2-4C）、ネシツムマブがリソソーム介在性の EGFR 分解を促進させることが示唆された。

以上、ネシツムマブは EGFR の内在化及び分解を誘導することが示され、これらがネシツムマブの抗腫瘍効果に寄与する可能性が示された。



略語：HeLa-EGFR-GFP 細胞＝C 末端に緑色蛍光タンパク質を融合した上皮成長因子受容体（EGFR）を安定的に過剰発現させた HeLa 細胞、anti-KLH＝抗キーホールリンペットヘモシアニン抗体（陰性対照 IgG）、IMC-11F8＝ネシツムマブ、Pani＝パニツムマブ（抗 EGFR 抗体）。
A：フローサイトメトリーの結果。平均値±標準誤差で示す（n＝6）。
B 及び C：生細胞共焦点顕微鏡観察の結果。平均値±標準誤差を示す（n＝4）。
A：報告書 20[redacted]の図 3、B：同報告書の図 2、C：同報告書の図 6。

図 2.6.2-4　HeLa-EGFR-GFP 細胞における EGFR の発現レベル（A、B）及びリソソーム移行（C）に対するネシツムマブの作用

2.6.2.2.1.5 ネシツムマブの抗体依存性細胞傷害活性

報告書 SDR-13049-20 (4.2.1.1.7)

ヒト IgG1 の Fc 領域がナチュラルキラー細胞などの様々な免疫細胞に発現する Fcγ受容体（FcγR）と相互作用することにより、抗腫瘍活性に寄与する免疫エフェクター活性が誘導されることがある。ネシツムマブの FcγRIII（CD16a）への結合能及び EGFR 陽性腫瘍細胞株（[redacted]肺腺癌細胞）に対する ADCC 誘導能を評価した（報告書 SDR-13049-20）。

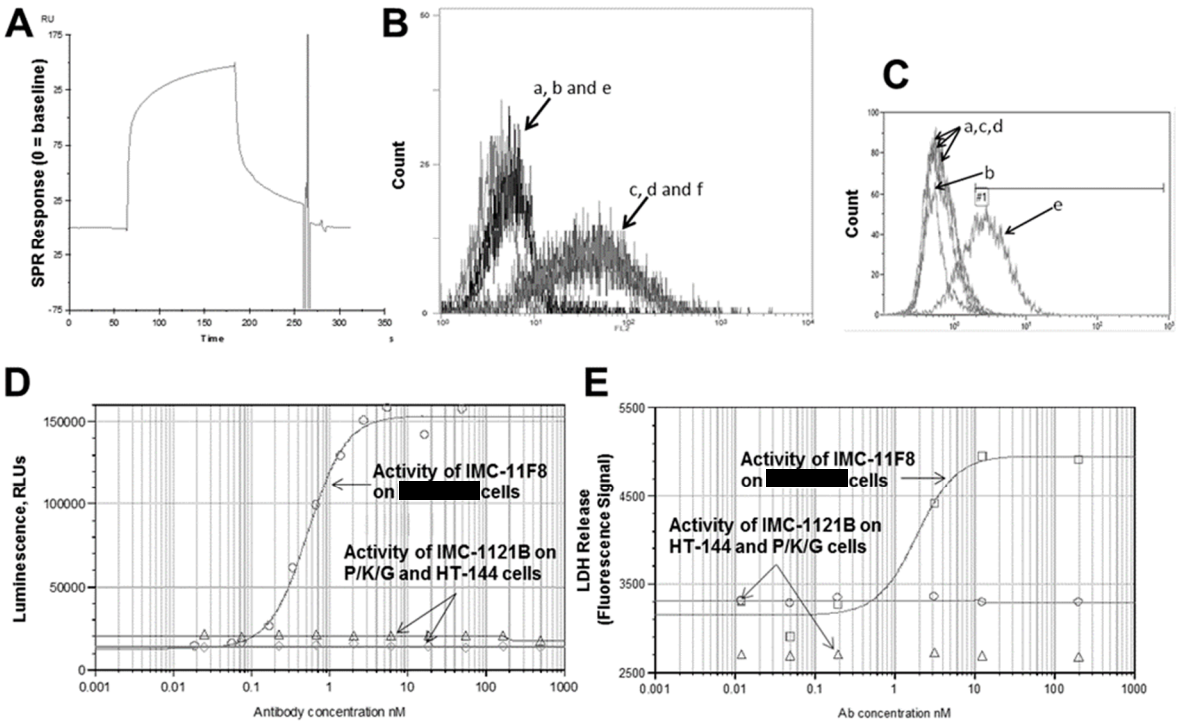
ネシツムマブの CD16a への結合は、Biacore を用いた表面プラズモン共鳴法により評価した。また、細胞を用いた検討として、CD16a を安定的に発現する[redacted]細胞（[redacted]細胞）へのネシツムマブの結合をフローサイトメトリーで測定した。さらに、ネシツムマブが EGFR と CD16a に同時に結合するか否かをブリッジングアッセイにより検討した。即ち、ブリッジングアッセイでは EGFR を発現する[redacted]細胞にネシツムマブを処理した後に、CD16a を添加し、EGFR-ネシツムマブ複合体への CD16a の結合を蛍光標識した抗 CD16a 抗体を用いてフローサイトメトリーで評価した。

その結果、ネシツムマブのセンサーグラムにおいて経時的に結合反応が増加したことから、ネシツムマブが in vitro で CD16a に結合することが示された（図 2.6.2-5A）。また、ネシツムマブは、CD16a を発現している[redacted]細胞の細胞表面にも結合した（図 2.6.2-5B）。ブリッジングアッセイにおいて、[redacted]細胞にネシツムマブ、CD16a 及び蛍光標識抗 CD16a 抗体を処理した際に蛍光シグナルの増強が認められた（図 2.6.2-5C）。ネシツムマブを処理しなかった試料ではシフトが見られなかったことから、CD16a と[redacted]細胞の結合がネシツムマブを介したものであることが示唆された。

ネシツムマブの ADCC 活性は、[redacted]細胞を標的細胞としたレポーター遺伝子アッセイ及び[redacted]細胞（[redacted]）アッセイで評価した。レポーター遺伝子アッセイでは、高親和性 CD16a-171VV 及びルシフェラーゼを導入した[redacted]細胞（[redacted]）をエフェクター細胞として用いた。この細胞は CD16a-171VV を細胞表面に発現しており、CD16a の活性化により転写因子 NFAT が活性化され、その結果、ルシフェラーゼの発現が誘導される。そのため、本アッセイにおけるルシフェラーゼ活性は、エフェクター細胞の活性化及びその結果生じる ADCC 活性に比例するとされている。[redacted]アッセイでは、[redacted]をエフェクター細胞とし、ADCC によって標的細胞（[redacted]細胞）が傷害を受けた際に放出される乳酸脱水素酵素（LDH）を ADCC 活性の指標とした。

その結果、ネシツムマブは、レポーター遺伝子アッセイ及び[redacted]アッセイの両方において[redacted]細胞に対する ADCC 活性を示した（図 2.6.2-5D 及び E）。

以上、ネシツムマブが CD16a に結合し、EGFR 陽性腫瘍細胞株に対する ADCC 活性を誘導することが示され、これがヒトでの抗腫瘍効果に寄与している可能性が示された。



略語：ADCC = 抗体依存性細胞傷害、LDH = 乳酸脱水素酵素、[redacted]、P/K/G = PAE-KDR-GFP、RLU = 相対蛍光強度、SPR = 表面プラズモン共鳴、IMC-11F8 = ネシツムマブ、IMC-1121B = ラムシルマブ。

A：表面プラズモン共鳴法で評価した精製 CD16a に対する結合能。

B：[redacted]細胞を用いたフローサイトメトリーで評価した CD16a に対する結合能。横軸は蛍光強度を示す。a: [redacted]細胞のみ、b: 二次抗体のみを処理した細胞、c: ネシツムマブを処理した細胞、d: ラムシルマブ（抗 VEGFR2 抗体）を処理した細胞、e: 脱グリコシル化ラムシルマブを処理した細胞、f: 脱グリコシル化対照ラムシルマブ（脱グリコシル化酵素の非存在下で脱グリコシル化処理と同じ処理を施したラムシルマブ）を処理した細胞。

C：EGFR-CD16a ブリッジングアッセイで評価した CD16a に対する結合能。横軸は蛍光強度を示す。a: 標的細胞のみ、b: 抗 CD16a 抗体のみを処理した細胞、c: ネシツムマブを処理した細胞、d: CD16a 及び抗 CD16a 抗体を処理した細胞、e: ネシツムマブ、CD16a 及び抗 CD16a 抗体を処理した細胞。

D：レポーター遺伝子アッセイで評価した ADCC 誘導能。

E：[redacted]アッセイで評価した ADCC 誘導能。

A：報告書 SDR-13049-00 の図 1A、B：同報告書の図 12、C：同報告書の図 13、D：同報告書の図 9、E：同報告書の図 10。

図 2.6.2-5 ネシツムマブの CD16a への結合能（A、B、C）並びに ADCC 誘導能（D、E）

2.6.2.2.2 In vivo 薬効薬理試験

2.6.2.2.2.1 ヒト癌のマウス異種移植モデルにおけるネシツムマブの抗腫瘍効果

2.6.2.2.2.1.1 試験方法及びデザインの概要

ネシツムマブの臨床開発及び承認申請の裏付けとなる in vivo 薬効薬理試験を以下に要約する方法に従い実施した。

ヒト NSCLC 細胞を異種移植した試験では、癌細胞の懸濁液を Matrigel と 1：1 で混合し、雌の免疫不全（胸腺欠損）マウスの左側腹部皮下に移植した。あらかじめ、細胞株ごとに増殖曲線を求め、腫瘍移植に関する標準手順書を作成した。腫瘍体積が所定のサイズに達したときに担癌マウス（8～12/群）を腫瘍体積で各投与群に無作為割り付けした。ネシツムマブを C57BL/6 マウスに静脈内及び腹腔内投与した際の半減期及び曝露量は同程度であったこと（報告書 2089-03）、

また、マウスに被験薬を週 2 回以上投与する場合は技術上及び被験動物への負担から腹腔内投与が好ましいとされることから、投与経路には腹腔内投与を選択した。ネシツムマブは 0.06～60 mg/kg の用量範囲で週 2 回又は週 3 回腹腔内に投与した。通常、投与液量は 10 mL/kg とした。多くの場合で 40 mg/kg（週 3 回）又は 60 mg/kg（週 2 回）で抗腫瘍効果が見られた。

試験計画書に規定した頻度（通常週 2 回）で腫瘍体積を測径器で測定し体重を記録した。被験薬の投与は、事前に規定した時点（作用機序を評価する試験での組織学的評価終了時、など）、評価項目の評価が完了した時点（腫瘍増殖が統計学的に有意に抑制された、など）あるいは一般状態への顕著な影響が見られた時点（腫瘍体積が動物の福祉及び生存に影響する場合、など）まで継続した。

開発初期に実施した試験では投与又は観察期間終了時点での対照群（C）に対する被験薬群（T）の腫瘍体積比（%T/C）を求め、抗腫瘍効果を評価した。これらの評価では被験薬投与前の腫瘍体積を差し引かなかったため抗腫瘍効果が過小評価された可能性がある。その後に実施した試験では、被験薬投与前の腫瘍体積を差し引く（表 2.6.2-5 の脚注 b 参照）、あるいは評価時の腫瘍体積を投与開始日の腫瘍体積で除して評価した（表 2.6.2-6 の脚注 a 参照）。腫瘍増殖及び体重変化の群間比較には反復測定分散分析（Repeated Measures ANOVA）を用いた。

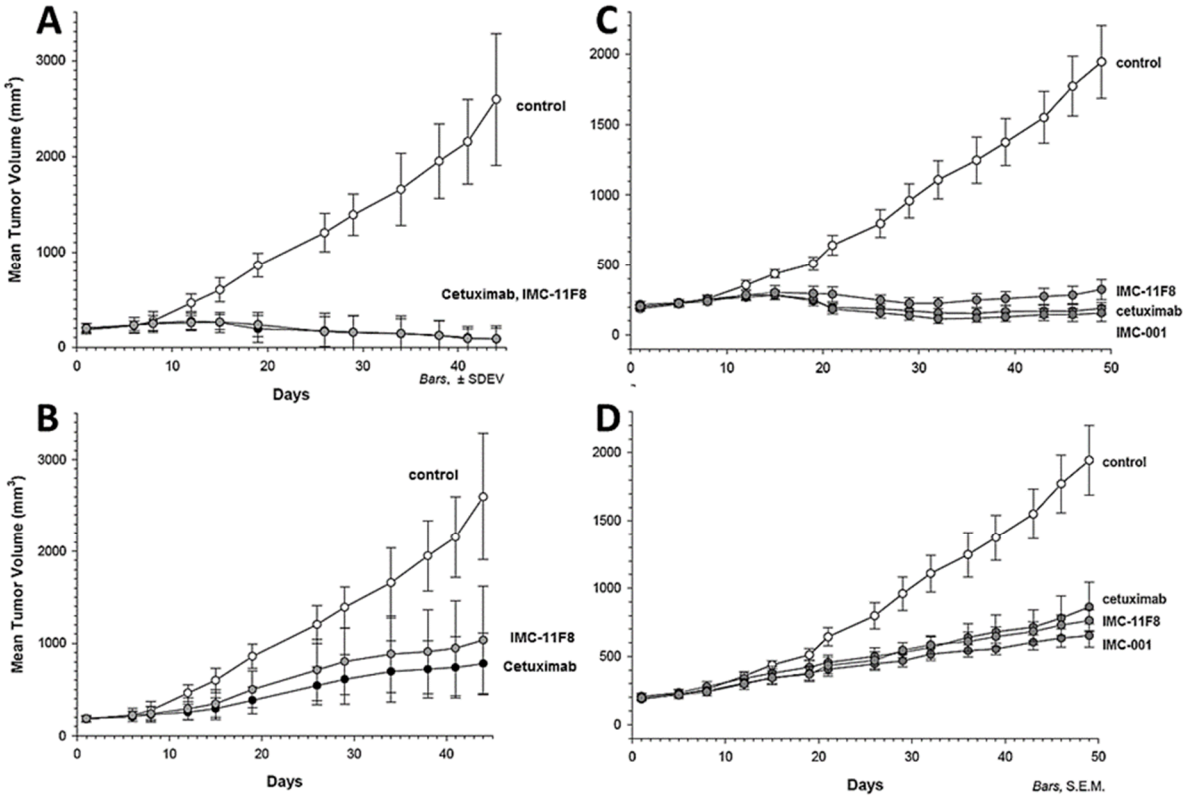
2.6.2.2.2.1.2 種々の異種移植腫瘍モデルを用いたネシツムマブの Proof-of-Concept 試験

報告書 1221-02 (4.2.1.1.8), 1300-02 (4.2.1.1.9), 3708-06 (4.2.1.1.10), 2219-03 (4.2.1.1.11), 2201-03A (4.2.1.1.12)

ネシツムマブの Proof-of-Concept 試験として、ヒト皮膚扁平上皮癌（A431）、ヒト膵臓癌（BxPC-3）又はヒト結腸直腸癌（GEO 及び HT-29）の細胞株をマウスの皮下に異種移植し、ネシツムマブの抗腫瘍効果を評価した。加えて、BxPC-3 細胞異種移植モデルにおける有効用量での血漿中濃度を評価した。

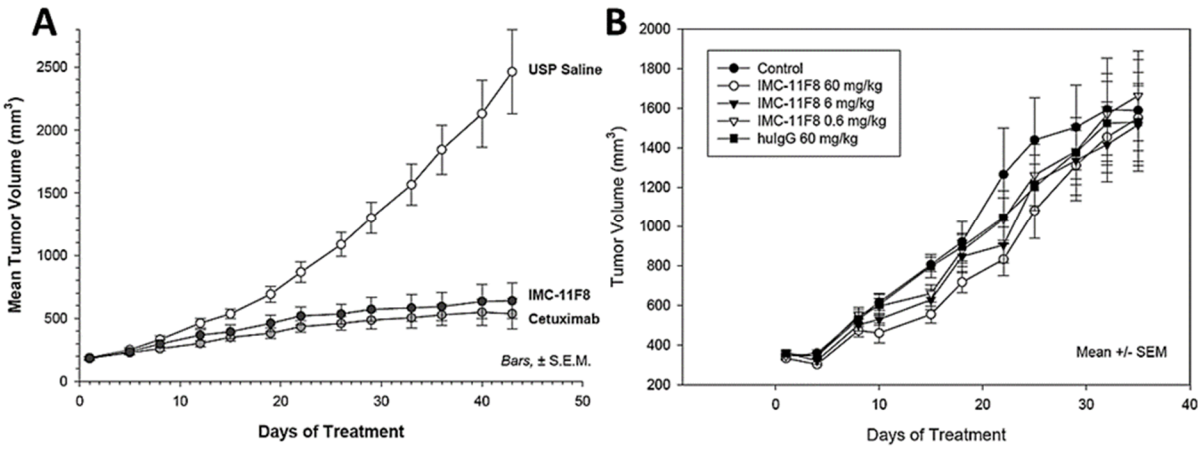
A431 又は BxPC-3 細胞を移植した試験（それぞれ報告書 1221-02 及び報告書 1300-02）では、腫瘍体積が約 200 mm^3 に達した後、マウスを腫瘍体積により生理食塩液、ネシツムマブ又はセツキシマブ（比較対照）の投与群に無作為に割り付け、0.3 又は 1 mg/回の用量（25 g の動物ではそれぞれ 12 及び 40 mg/kg に相当）で週 2 回最長 44 日間（A431 細胞を用いた試験）又は 49 日間（BxPC-3 細胞を用いた試験）腹腔内投与した。GEO 細胞を移植した試験（報告書 3708-06）では、腫瘍体積が約 200 mm^3 に達した後、生理食塩液、セツキシマブ又はネシツムマブを 1 mg/回で週 3 回 42 日間腹腔内投与した。HT-29 細胞を移植した試験（報告書 2219-03）では、腫瘍体積が約 300 mm^3 に達した後、生理食塩液、ヒト IgG 又はネシツムマブを投与した。ネシツムマブは初回負荷用量（1.5、15 及び 150 mg/kg）で投与後、維持用量としてそれぞれ 0.6、6 及び 60 mg/kg を週 2 回 35 日間腹腔内投与した。血漿中濃度を評価した試験（報告書 2201-03A）では、7～8 週齢のヌードマウスに BxPC-3 細胞を皮下移植し、腫瘍体積が約 200 mm^3 に達した後、生理食塩液（10 μL/g）及び 6、20 又は 60 mg/kg のネシツムマブを週 2 回 33 日間腹腔内投与した。ネシツムマブを投与した動物には初回負荷用量としてそれぞれ 16.6、55 及び 166.2 mg/kg を投与した。最終投与後の 0、3、24、72、168 及び 336 時間後に血漿試料を採取し、ネシツムマブ濃度を ELISA で測定した。

その結果、ネシツムマブは A431、BxPC-3 及び GEO 細胞を異種移植したモデルにおいて、評価したすべての用量で腫瘍増殖を顕著に抑制し、その効果はセツキシマブと同程度であった（図 2.6.2-6、図 2.6.2-7、表 2.6.2-3）。しかしながら、ネシツムマブは、v-raf マウス肉腫ウイルス癌遺伝子産物ホモログ B1（BRAF）遺伝子に変異を有する HT-29 結腸直腸癌細胞の異種移植モデルでは明らかな抗腫瘍効果を示さなかった。BxPC-3 細胞異種移植モデルにおける薬物動態解析の結果（表 2.6.2-4）、ネシツムマブの血漿中トラフ濃度が 40 μg/mL を超えて維持されたとき（平均血漿中濃度は 60 μg/mL）、50%を超える腫瘍増殖抑制が認められた。



略語：SDEV = 標準偏差（A 及び B、n=8）、SEM = 標準誤差（C 及び D、n = 8）、IMC-11F8 = ネシツムマブ、IMC-001 = 非グリコシル化抗 EGFR 抗体。
A、B：報告書 1221-02 の図 1
C、D：報告書 1300-02 の図 3

図 2.6.2-6　A431（A、B）及び BxPC-3（C、D）細胞をマウスに異種移植した腫瘍モデルにおけるネシツムマブの抗腫瘍効果［1（A、C）及び 0.3（B、D）mg/回］



略語：SEM = 標準誤差（n = 10～12）、IMC-11F8 = ネシツムマブ。
A：報告書 3708-06 の図 2、B：報告書 2219-03 の図 1。

図 2.6.2-7　GEO（A）及び HT-29（B）細胞をマウスに異種移植した腫瘍モデルにおけるネシツムマブの抗腫瘍効果

表 2.6.2-3　皮膚扁平上皮癌、膵臓癌及び結腸直腸癌の異種移植モデルにおけるネシツムマブの抗腫瘍効果

報告書番号	細胞株	匹/群	投与	投与期間	%T/C	p[a]
1221-02	A431（皮膚扁平上皮癌）	8	セツキシマブ（0.3 mg/回、ip、週 2 回）	44 日間	29	<0.001
			セツキシマブ（1 mg/回、ip、週 2 回）		3	<0.001
			ネシツムマブ（0.3 mg/回、ip、週 2 回）		38	<0.001
			ネシツムマブ（1 mg/回、ip、週 2 回）		3	<0.001
1300-02	BxPC-3（膵臓癌）	8	セツキシマブ（0.3 mg/回、ip、週 2 回）	49 日間	24	<0.001
			セツキシマブ（1 mg/回、ip、週 2 回）		9	<0.001
			ネシツムマブ（0.3 mg/回、ip、週 2 回）		38	<0.001
			ネシツムマブ（1 mg/回、ip、週 2 回）		15	<0.001
3708-06	GEO（結腸直腸癌）	10	セツキシマブ（1 mg/回、ip、週 3 回）	42 日間	22	<0.0001
			ネシツムマブ（1 mg/回、ip、週 3 回）		27	<0.0001
2219-03	HT-29（結腸直腸癌）	12	ネシツムマブ（0.6 mg/kg、ip、週 2 回；負荷用量 1.5 mg/kg）	35 日間	NA	NA
			ネシツムマブ（6 mg/kg、ip、週 2 回；負荷用量 15 mg/kg）		NA	NA
			ネシツムマブ（60 mg/kg、ip、週 2 回；負荷用量 150 mg/kg）		NA	NA
2201-03A	BxPC-3（膵臓癌）	12	ネシツムマブ（6 mg/kg、ip、週 2 回；負荷用量 16.6 mg/kg）	33 日間	44	<0.0001
			ネシツムマブ（20 mg/kg、ip、週 2 回；負荷用量 55 mg/kg）		35	<0.0001
			ネシツムマブ（60 mg/kg、ip、週 2 回；負荷用量 166.2 mg/kg）		30	<0.0001

略語：%T/C = 対照群（C）に対する被験薬群（T）の腫瘍体積比、ip = 腹腔内、NA = 該当なし。
[a]　生理食塩液投与群との比較（Repeated Measures ANOVA）

表 2.6.2-4　BxPC-3 膵臓癌細胞を異種移植した無胸腺マウスにおけるネシツムマブの定常状態での薬物動態パラメータ

ネシツムマブの用量 (mg/kg)	投与間の平均血漿中濃度 (μg/mL)	半減期 (日)	最高血漿中濃度 (μg/mL)	T_{max} (時間)	トラフ濃度 (μg/mL)	%T/C
6	59.9	4.5	115	3	40	44
20	542.4	4.4	510	3	100	35
60	1161.4	3.1	1440	24	465	30

略語：%T/C = 対照群（C）に対する被験薬群（T）の腫瘍体積比、T_{max} = 最高濃度到達時間。

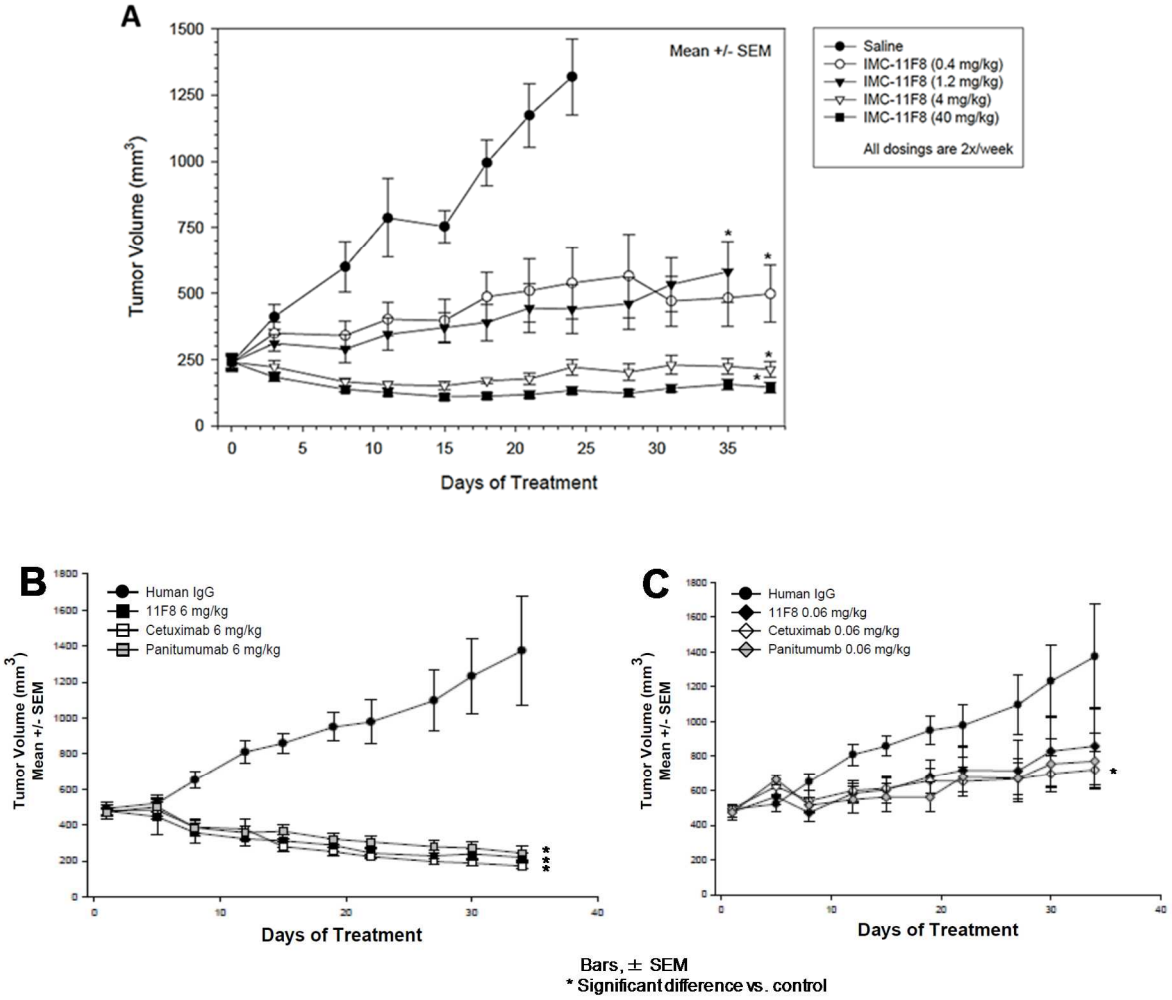
2.6.2.2.2.1.3　ヒト NSCLC のマウス異種移植モデルにおけるネシツムマブの抗腫瘍効果

報告書 3733-06 (4.2.1.1.13), 3732-06 (4.2.1.1.14), 4983-10 (4.2.1.1.15), 5249-11 (4.2.1.1.16), 5227-11 (4.2.1.1.17), 5229-11 (4.2.1.1.18)

野生型 EGFR 遺伝子を有する NSCLC 細胞株（NCI-H292 及び NCI-H441）、活性化 EGFR 変異を有する NSCLC 細胞株（NCI-H1975 及び HCC-827）、あるいは野生型又は変異型（エクソン 19 欠失：Δ746-750）EGFR を過剰発現させた NCI-H441 細胞をマウスの皮下に異種移植し、ネシツムマブのヒト NSCLC 細胞株に対する抗腫瘍効果を評価した。また、HCC-827 細胞異種移植モデルにおける有効用量での血漿中濃度を評価した。

NCI-H292、NCI-H1975 又は HCC-827 細胞を雌ヌードマウスの皮下に移植した試験（それぞれ（報告書 3733-06、3732-06、4983-10）では、腫瘍体積がそれぞれ約 240、210 及び 480 mm^3 に達した後、マウスを腫瘍サイズにより対照群（生理食塩液あるいはヒト IgG 抗体）又はネシツムマブの投与群に無作為に割り付けた。NCI-H292 及び NCI-H1975 細胞を移植した試験では 0.4、1.2、4 及び 40 mg/kg のネシツムマブを、HCC-827 細胞を移植した試験では初回負荷用量（0.15、1.5 及び 15 mg/kg）で投与後、維持用量としてそれぞれ 0.06、0.6 及び 6 mg/kg のネシツムマブを週 2 回腹腔内投与した。HCC-827 細胞を移植した試験では、セツキシマブ及びパニツムマブを対照薬として投与し、また、最終投与日（試験 34 日目）に 4～7 例の動物から血漿試料を採取して、ネシツムマブの定常状態におけるトラフ濃度を ELISA で測定した。NCI-H441 細胞又はその変異型 EGFR 遺伝子発現細胞を移植した試験（報告書 5249-11、5227-11、5229-11）では、マウスに生理食塩液又は 60 mg/kg のネシツムマブを週 2 回 47～53 日間腹腔内投与した。

その結果、ネシツムマブは NCI-H292、NCI-H1975 及び HCC-827 細胞を異種移植したモデルにおいて、EGFR の変異の有無に関わらず、評価したすべての腫瘍細胞の増殖を有意に抑制し、その効果はパニツムマブと同程度であった（図 2.6.2-8、表 2.6.2-5）。ネシツムマブは野生型 EGFR 遺伝子を有する NCI-H441 細胞の異種移植モデルでは明らかな抗腫瘍効果を示さなかった（%T/C：92%）が、野生型又は変異型 EGFR を過剰発現させた NCI-H441 細胞の移植モデルではネシツムマブに対する感受性の増大が見られ（%T/C：それぞれ 48%及び 34%）、変異型 EGFR を過剰発現させた NCI-H441 細胞を用いた評価での効果には統計学的有意差が認められた。HCC-827 細胞異種移植モデルにおける薬物動態解析の結果、ネシツムマブの血漿中濃度が 6 μg/mL を超えて維持されるとき、抗腫瘍効果（腫瘍増殖の停止又は退縮）が得られると考えられた。



略語： SEM = 標準誤差（n = 10）、IMC-11F8 = ネシツムマブ。
A：報告書 3733-06 の図 1、B：報告書 4983-10 の図 1A、C：同報告書の図 1C。

図 2.6.2-8　非小細胞肺癌細胞株（A：NCI-H292、B 及び C：HCC-827）をマウスに異種移植した腫瘍モデルにおけるネシツムマブの抗腫瘍効果

表 2.6.2-5 非小細胞肺癌の異種移植モデルにおけるネシツムマブの抗腫瘍効果

報告書番号	細胞株（EGFR 発現状態）	由来	匹/群	投与	投与期間	%T/C	p
3733-06	NCI-H292（野生型 EGFR）	肺粘表皮癌	10	ネシツムマブ（0.4 mg/kg、ip、週 2 回）	24 日間	41	0.0002[a]
				ネシツムマブ（1.2 mg/kg、ip、週 2 回）		33	<0.0001[a]
				ネシツムマブ（4 mg/kg、ip、週 2 回）		17	<0.0001[a]
				ネシツムマブ（40 mg/kg、ip、週 2 回）		10	<0.0001[a]
3732-06	NCI-H1975（EGFR-L858R/T790M）	肺腺癌	8	ネシツムマブ（0.4 mg/kg、ip、週 2 回）	26 日間	29	0.02[a]
				ネシツムマブ（1.2 mg/kg、ip、週 2 回）		38	0.0013[a]
				ネシツムマブ（4 mg/kg、ip、週 2 回）		13	0.0003[a]
				ネシツムマブ（40 mg/kg、ip、週 2 回）		15	0.0002[a]
4983-10	HCC827（EGFRΔ746-750）	肺腺癌	10	ネシツムマブ（0.06 mg/kg、ip、週 2 回、負荷用量 0.15 mg/kg）	34 日間	43[b]	0.34[c]
				ネシツムマブ（0.6 mg/kg、ip、週 2 回、負荷用量 1.5 mg/kg）		NA	0.001[c]
				ネシツムマブ（6 mg/kg、ip、週 2 回、負荷用量 15 mg/kg）		NA	0.0002[c]
				セツキシマブ（0.06 mg/kg、ip、週 2 回、負荷用量 0.15 mg/kg）		23[b]	0.04[c]
				セツキシマブ（0.6 mg/kg、ip、週 2 回、負荷用量 1.5 mg/kg）		NA	0.002[c]
				セツキシマブ（6 mg/kg、ip、週 2 回、負荷用量 15 mg/kg）		NA	<0.0001[c]
				パニツムマブ（0.06 mg/kg、ip、週 2 回、負荷用量 0.15 mg/kg）		34[b]	0.06[c]
				パニツムマブ（0.6 mg/kg、ip、週 2 回、負荷用量 1.5 mg/kg）		4[b]	0.005[c]
				パニツムマブ（6 mg/kg、ip、週 2 回、負荷用量 15 mg/kg）		NA	0.0003[c]
5249-11	NCI-H441（野生型 EGFR）	肺腺癌	12	ネシツムマブ（60 mg/kg、ip、週 2 回）	47 日間	92[b]	0.8683[a]
5227-11	NCI-H441（野生型 EGFR の過剰発現）	肺腺癌	12	ネシツムマブ（60 mg/kg、ip、週 2 回）	53 日間	48[b]	0.1011[a]
5229-11	NCI-H441（EGFRΔ746-750 の過剰発現）	肺腺癌	12	ネシツムマブ（60 mg/kg、ip、週 2 回）	50 日間	34[b]	0.0104[a]

略語：EGFR = 上皮成長因子受容体、ip = 腹腔内、NA = 報告書で算出されておらず、%T/C = 対照群（C）に対する被験薬群（T）の腫瘍体積比。

a 生理食塩液投与群との比較（Repeated Measures ANOVA）

b 投与開始日の腫瘍体積を差し引いて、%T/C を算出

c ヒト IgG 投与群との比較（Repeated Measures ANOVA）

2.6.2.2.2.1.4 ヒト Sq CLC のマウス異種移植モデルにおけるネシツムマブの抗腫瘍効果（プラチナダブレットとの併用投与試験）

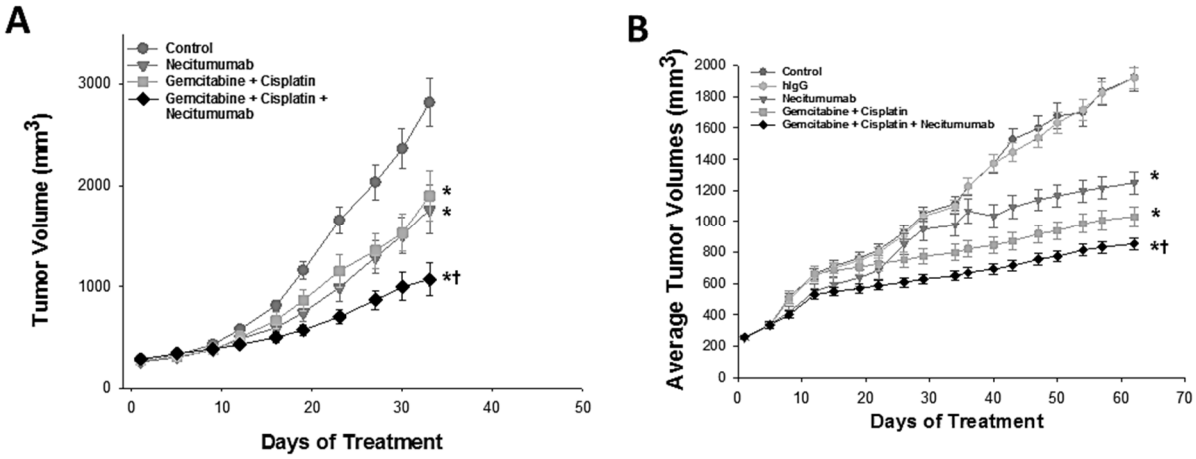
報告書 4972-10 (4.2.1.1.19), 4645-09 (4.2.1.1.20), 4970-10 (4.2.1.1.21)

ヒト Sq CLC 細胞株（NCI-H226、NCI-H520 及び NCI-H2170）をマウスの皮下に異種移植し、ネシツムマブをシスプラチン及びゲムシタビン（プラチナダブレット）と併用投与した際の抗腫瘍効果を評価した。

NCI-H226、NCI-H520 又は NCI-H2170 細胞を雌ヌードマウスの皮下に移植した（それぞれ報告書 4972-10、4645-09、4970-10）。腫瘍体積がそれぞれ約 250、300 及び 270 mm^3 に達した後、マウスを腫瘍サイズが群間で均等になるように投与群に無作為に割り付け、生理食塩液、ネシツムマブ、プラチナダブレット、又はネシツムマブとプラチナダブレットを投与した。ネシツムマブ

は 60 mg/kg の用量で週 2 回腹腔内投与し、シスプラチン及びゲムシタビンはそれぞれ 3 及び 250 mg/kg の用量で週 1 回腹腔内投与した。

その結果、NCI-H226 又は NCI-H2170 細胞を異種移植したモデルにおいて、プラチナダブレットの単独投与時（%T/C：それぞれ 53%及び 64%）と比較して、ネシツムマブとの併用投与による有意な相加作用が認められた（%T/C：それぞれ 44%及び 35%、図 2.6.2-9、表 2.6.2-6）。NCI-H520 細胞を異種移植したモデルでは、プラチナダブレット単独投与時の抗腫瘍効果が比較的高かったため（%T/C：39%）、有意な相加作用は見られなかった（%T/C：34%、表 2.6.2-6）。いずれの試験においても、ネシツムマブとプラチナダブレットを併用した際の体重を指標とする忍容性は良好であった（体重減少は 10%未満）。



平均値±標準誤差で示す（n = 12）。
* 溶媒対照との比較で統計学的有意差あり（Repeated Measures ANOVA）
† プラチナダブレット単独投与時との比較で統計学的有意差あり（Repeated Measures ANOVA）
A：報告書 4970-10 の図 1、B：報告書 4972-10 の図 1。

図 2.6.2-9　扁平上皮非小細胞肺癌細胞株（A：NCI-H2170、B：NCI-H226）をマウスに異種移植した腫瘍モデルにおけるネシツムマブとプラチナダブレット併用投与の抗腫瘍効果

表 2.6.2-6　扁平上皮非小細胞肺癌の異種移植モデルにおけるネシツムマブとプラチナダブレットの併用効果

報告書番号	細胞株	由来	匹/群	投与	投与期間	%T/C[a]	p
4972-10	NCI-H226	肺扁平上皮癌	12	ネシツムマブ（60 mg/kg、ip、週 2 回）	46 日間	66	<0.0001[b]
				ゲムシタビン（250 mg/kg、ip、週 1 回）＋シスプラチン（3 mg/kg、ip、週 1 回）		53	<0.0001[b]
				ゲムシタビン（250 mg/kg、ip、週 1 回）＋シスプラチン（3 mg/kg、ip、週 1 回）＋ネシツムマブ（60 mg/kg、ip、週 2 回）		44	<0.0001[b] 0.0084[c]
4645-09	NCI-H520	肺扁平上皮癌	12	ネシツムマブ（60 mg/kg、ip、週 2 回）	34 日間	50	0.006[b]
				ゲムシタビン（250 mg/kg、ip、週 1 回）＋シスプラチン（3 mg/kg、ip、週 1 回）		39	0.0008[b]
				ゲムシタビン（250 mg/kg、ip、週 1 回）＋シスプラチン（3 mg/kg、ip、週 1 回）＋ネシツムマブ（60 mg/kg、ip、週 2 回）		34	0.0006[b] 0.8132[c]
4970-10	NCI-H2170	肺扁平上皮癌	12	ネシツムマブ（60 mg/kg、ip、週 2 回）	33 日間	64	0.0028[b]
				ゲムシタビン（250 mg/kg、ip、週 1 回）＋シスプラチン（3 mg/kg、ip、週 1 回）		64	0.0077[b]
				ゲムシタビン（250 mg/kg、ip、週 1 回）＋シスプラチン（3 mg/kg、ip、週 1 回）＋ネシツムマブ（60 mg/kg、ip、週 2 回）		35	<0.0001[b] 0.0095[c]

略語：%T/C = 対照群（C）に対する被験薬群（T）の腫瘍体積比、ip = 腹腔内。

a　%T/C は生理食塩液投与群の相対腫瘍体積（評価時の腫瘍体積を投与開始日の腫瘍体積で除した値）に対する百分率として算出

b　生理食塩液投与群との比較（Repeated Measures ANOVA）

c　プラチナダブレット投与群との比較（Repeated Measures ANOVA）

2.6.2.2.2.1.5　ネシツムマブとプラチナダブレットとの併用投与時の抗腫瘍効果の作用機序

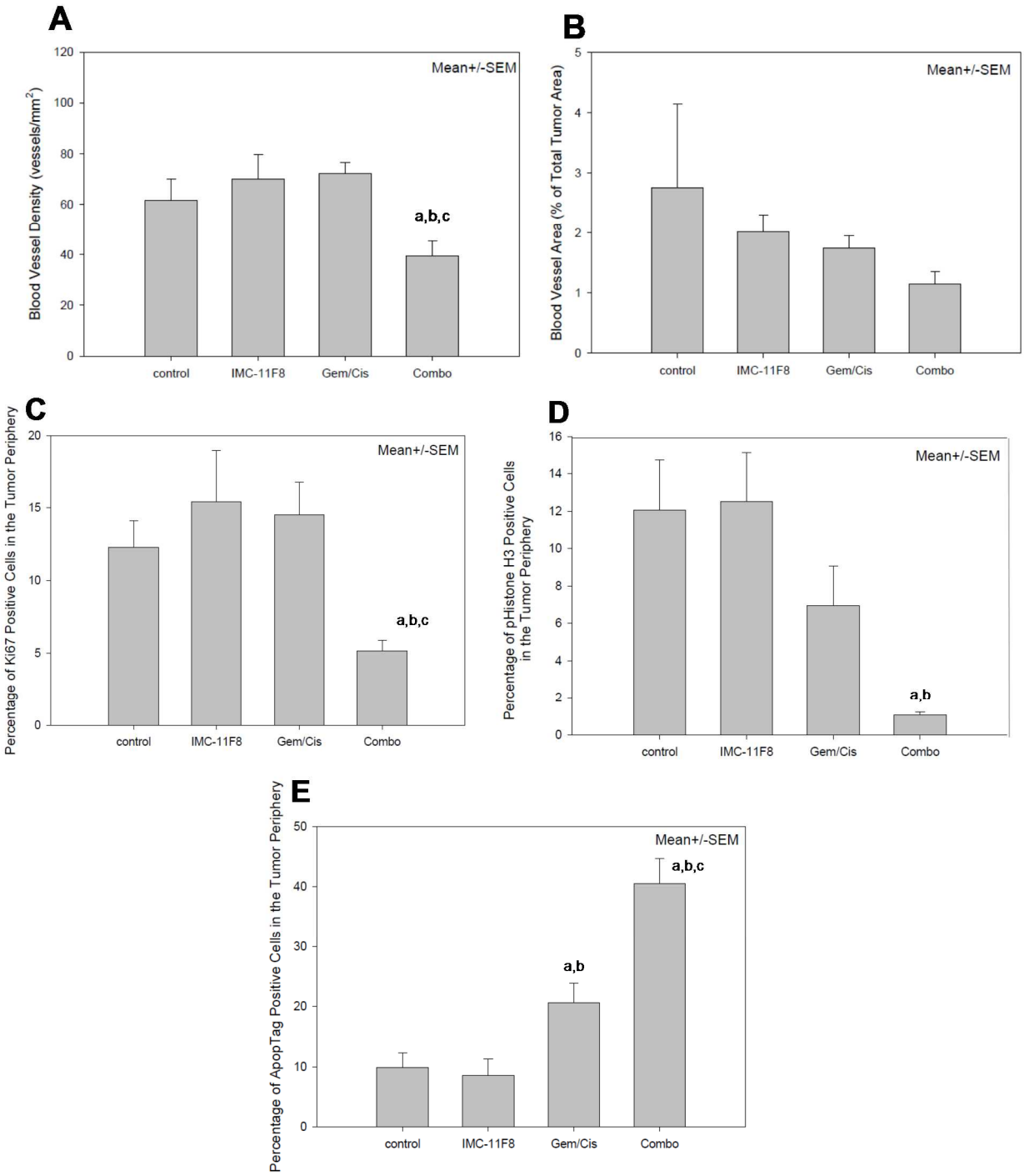
報告書 4430-09 (4.2.1.1.22), 4428-09 (4.2.1.1.23)

ヒト NSCLC 細胞株（A549 及び NCI-H1650）をマウスの皮下に異種移植し、ネシツムマブをプラチナダブレット（ゲムシタビン及びシスプラチン）と併用投与した際の抗腫瘍効果の作用機序を検討した。

A549 及び NCI-H1650 細胞を雌ヌードマウスの皮下に移植した（それぞれ報告書 4430-09、4428-09）。腫瘍体積がそれぞれ約 300 及び 280 mm^3 に達した後、マウスを腫瘍サイズにより投与群に無作為に割り付け、生理食塩液、ネシツムマブ、プラチナダブレット、又はネシツムマブとプラチナダブレットを投与した。ネシツムマブは 60 mg/kg の用量で週 2 回腹腔内投与し、シスプラチン及びゲムシタビンはそれぞれ 3 及び 500 mg/kg の用量で週 1 回腹腔内投与した。試験開始 9 日目（2 回目のプラチナダブレット投与の 24 時間後）にマウスを安楽死させ、腫瘍試料を採取した。ホルマリン固定及びパラフィン包埋後、標本を血管新生（Meca-32）、増殖（Ki-67 及び pHH3）並びにアポトーシス（ApopTag）マーカーの免疫組織学的分析に供した。

その結果、A549 細胞を異種移植したモデルにおいて、ネシツムマブとプラチナダブレットを併用投与したとき、プラチナダブレット単独投与時と比較して Meca-32 陽性の腫瘍血管密度及び Ki-67 陽性の腫瘍細胞数が有意に減少し、ApopTag 陽性の腫瘍細胞数が有意に増加した（図 2.6.2-10）。NCI-H1650 細胞を異種移植したモデルに併用投与したときにも、プラチナダブレット単独投与時と比較して Meca-32 陽性の腫瘍血管面積率が減少し、Ki-67 陽性の腫瘍細胞数が減少する傾向が見られた（統計学的有意差は認められず）。

以上の結果から、ネシツムマブの抗腫瘍効果には腫瘍細胞の増殖、生存及び血管新生を抑制することが関与していることが示唆された。



略語：Cis = シスプラチン、Combo = ネシツムマブ/ゲムシタビン/シスプラチンの併用、Gem = ゲムシタビン、IMC-11F8 = ネシツムマブ、SEM = 標準誤差（n = 6）。

a　溶媒対照との比較で統計学的有意差あり（一元配置 ANOVA 後の Fisher's Least Significant Difference 検定）

b　ネシツムマブとの比較で統計学的有意差あり（一元配置 ANOVA 後の Fisher's Least Significant Difference 検定）

c　ゲムシタビン及びシスプラチンとの比較で統計学的有意差あり（一元配置 ANOVA 後の Fisher's Least Significant Difference 検定）

A：報告書 4430-09 Appendix 1 の図 3、B：同報告書の図 4、C：同報告書の図 7、D：同報告書の図 10、E：同報告書の図 13。

図 2.6.2-10　非小細胞肺癌株（A549）をマウスに異種移植したモデルにネシツムマブ、ゲムシタビン及びシスプラチンを併用投与した際の Meca-32 陽性腫瘍血管密度（A）、Meca-32 陽性腫瘍血管面積率（B）、細胞増殖（C、D）及びアポトーシス（E）に対する作用

2.6.2.3　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

2.6.2.4　安全性薬理試験

報告書 CR0878 (4.2.3.2.1), [redacted]023.07 (4.2.3.2.2)

ネシツムマブの安全性薬理評価は、サルを用いた 5 及び 26 週間反復投与毒性試験［Good Laboratory Practice（GLP）適用］において、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S6(R1)に準拠して実施した。

ネシツムマブを雌雄サルに、0（溶媒対照）、4、12 及び 40 mg/kg の用量で 5 週間（試験 1、15、22 及び 29 日目、計 4 回）静脈内投与し（報告書 CR0878）、試験期間を通して 1 日 1 回、一般状態を観察した。その結果、投与に関連した変化は認められなかった。

ネシツムマブを雌雄サルに、0（溶媒対照）、6、19 及び 60 mg/kg の用量で週 1 回、26 週間（計 26 回）静脈内投与した（報告書[redacted]023.07）。試験期間を通して 1 日 2 回、一般状態を観察したほか、馴化期間及び試験 2、84、86、175、177 及び 237 日目に心電図（ECG）、心拍数、血圧及び呼吸数を測定した。その結果、投与に関連した中枢神経系への影響を示唆する一般状態の変化、心血管系及び呼吸系の変化は認められなかった。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用

ネシツムマブをシスプラチン及びゲムシタビンと併用投与した際の抗腫瘍効果を評価した試験成績を CTD 第 2.6.2.2.2.1.4 項に示した。

2.6.2.6　考察及び結論

一連の in vitro 試験の成績から、ネシツムマブはヒトの EGFR に選択的に高い親和性で結合すること、EGFR へのリガンド結合を強力に阻害することが示された。また、ネシツムマブはリガンド刺激による EGFR の活性化を阻害して Erk1/2 などの下流シグナル伝達を阻害すること、さらに、EGFR の内在化及び分解を軽度に促進し、ADCC のような免疫エフェクター活性を誘導することが示された。

種々の異種移植腫瘍モデルを用いた Proof-of-Concept 試験において、ネシツムマブは有意な抗腫瘍効果を示した。BxPC-3 細胞の異種移植モデルにおいて、ネシツムマブの血漿中トラフ濃度が 40 μg/mL を超えて維持されたとき 50%を超える腫瘍増殖抑制が認められたことから、臨床試験ではこの濃度を維持すると推測される用量を選択し、開発を進めた。その後に実施した、ヒト NSCLC 細胞をマウスに異種移植した試験においてもネシツムマブは単独投与で有意な抗腫瘍効果を示した。ヒト Sq CLC 細胞をマウスに異種移植した試験では、プラチナダブレット（ゲムシタビン及びシスプラチン）の単独投与時と比較して、ネシツムマブとの併用投与による有意な相加作用が認められた。ネシツムマブの抗腫瘍効果には腫瘍細胞の増殖、生存及び血管新生を抑制する作用が関与していることが示唆された。以上の成績は、Sq CLC 患者にネシツムマブをプラチナダブレットと併用投与することの妥当性を支持するものであった。

ネシツムマブの安全性薬理評価を、サルを用いた反復投与毒性試験において実施した結果、心血管系、呼吸系及び中枢神経系に変化は認められなかった。

2.6.2.7　参考文献

なし。

ポートラーザ点滴静注液 800mg

2.6.3　薬理試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary 1
2.6.3.1 Pharmacology: Overview 1
2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics (See the Pharmacology Written Summary, Module 2.6.2) 2
2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics (See the Pharmacology Written Summary, Module 2.6.2) . 2
2.6.3.4 Safety Pharmacology 3
2.6.3.5 Pharmacodynamic Drug Interactions (Not Applicable) 3

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Type of Study	Test System	Route	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Cell-free Binding Study, Cell-Based Functional Study	In vitro	N/A	ImClone Systems, Inc.	IMC11F8-01	4.2.1.1.1
Cell-free Binding Study	In vitro	N/A	ImClone Systems, Inc.	[redacted]-20[redacted]	4.2.1.1.2
Cell-free Binding Study	In vitro	N/A	ImClone Systems, Inc.	20[redacted]	4.2.1.1.3
Cell-based Functional Study	In vitro	N/A	ImClone Systems, Inc.	20[redacted]	4.2.1.1.4
Cell-based Functional Study	In vitro	N/A	ImClone Systems, Inc.	20[redacted]	4.2.1.1.5
Cell-based Functional Study	In vitro	N/A	ImClone Systems, Inc.	20[redacted]	4.2.1.1.6
Cell-based Functional Study	In vitro	N/A	ImClone Systems, Inc.	SDR-13049-20	4.2.1.1.7
Efficacy-Epidermoid, skin	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	1221-02	4.2.1.1.8
Efficacy-Pancreatic	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	1300-02	4.2.1.1.9
Efficacy-Colorectal	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	3708-06	4.2.1.1.10
Efficacy-Colorectal	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	2219-03	4.2.1.1.11
Efficacy and PK-Pancreatic	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	2201-03A	4.2.1.1.12
Efficacy-NSCLC	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	3733-06	4.2.1.1.13
Efficacy-NSCLC	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	3732-06	4.2.1.1.14
Efficacy and PK-NSCLC	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	4983-10	4.2.1.1.15
Efficacy-NSCLC	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	5249-11	4.2.1.1.16
Efficacy-NSCLC	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	5227-11	4.2.1.1.17
Efficacy-NSCLC	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	5229-11	4.2.1.1.18

(Continued)

2.6.3.1 Pharmacology: Overview (Concluded)

Type of Study	Test System	Route	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics (Continued)					
Efficacy-sqNSCLC-Platinum Doublets	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	4972-10	4.2.1.1.19
Efficacy-sqNSCLC-Platinum Doublets	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	4645-09	4.2.1.1.20
Efficacy-sqNSCLC-Platinum Doublets	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	4970-10	4.2.1.1.21
Mechanism of Action-NSCLC-Platinum Doublets	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	4430-09	4.2.1.1.22
Mechanism of Action-NSCLC-Platinum Doublets	Mouse; nu/nu	ip	ImClone Systems, Inc.	4428-09	4.2.1.1.23
Secondary Pharmacodynamics (Not Applicable)					
Safety Pharmacology					
5-week Repeat-dose Toxicity with 6-week recovery	Monkey, Cynomolgus	iv	[redacted]	CR0878	4.2.3.2.1
26-week Repeat-dose Toxicity with 8-week recovery	Monkey, Cynomolgus	iv	[redacted]	[redacted]023.07	4.2.3.2.2
Pharmacodynamic Drug Interactions (Not Applicable)					

Abbreviations: ip = intraperitoneal, iv = intravenous, N/A = not applicable, NSCLC = Non-Small Cell Lung Cancer, sq = squamous, PK = pharmacokinetic.

2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics (See the Pharmacology Written Summary, Module 2.6.2)

2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics (See the Pharmacology Written Summary, Module 2.6.2)

2.6.3.4 Safety Pharmacology

Experimental Parameters Evaluated	Species, Strain	Route	Test article Doses (mg/kg)	#/Group	Noteworthy Findings	GLP	Document ID (Location in CTD)
Clinical sign	Monkey, cynomolgus	Intravenous	0[a], 4, 12, 40	3-6/sex/group	None, NOEL 40 mg/kg	Yes	CR0878 (4.2.3.2.1)
Clinical sign, blood pressure, heart rate, ECG, respiratory rate	Monkey, cynomolgus	Intravenous	0[b], 6, 19, 60	5-6/sex/group	None, safety pharmacology NOEL 60 mg/kg	Yes	[redacted]023.07 (4.2.3.2.2)

Abbreviations: # = number, GLP = Good Laboratory Practice, NOEL = no-observed-effect level.

[a] Phosphate-buffered saline

[b] 10 mM citrate, 40 mM NaCl, 50 mM mannitol, 133 mM glycine, 0.01% Tween 80, pH 6.0.

2.6.3.5 Pharmacodynamic Drug Interactions (Not Applicable)