サノフィ株式会社

サークリサ点滴静注 100mg／同点滴静注 500mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.4 非臨床試験の概括評価

Total number of pages: 22

目　　次

2.4 非臨床試験の概括評価 1

目　　次 2

表　目　次 3

略号と用語の定義 4

1　　非臨床試験計画概略 6

2　　薬理試験 10

3　　薬物動態試験 13

4　　毒性試験 15

5　　総括及び結論 16

6　　参考文献一覧 20

7　　別表 21

7.1　　別表 1 – 試験を実施していない理由 21

表　目　次

表 1 - 毒性試験計画概要.....8

表 2 - 新鮮凍結正常ヒト組織におけるイサツキシマブ結合（リンパ組織以外）.....12

表 3 - サル（TSK0154）及びヒト（EFC14335）にイサツキシマブを投与後の動物／ヒト曝露比の要約.19

略号と用語の定義

ACTH:	副腎皮質刺激ホルモン（Adrenocorticotropic hormone）
ADA:	抗薬物抗体（Anti-drug antibody）
ADCC:	抗体依存性細胞傷害（Antibody-dependent cellular cytotoxicity）
ADCP:	抗体依存性細胞貪食（Antibody-dependent cellular phagocytosis）
AE:	有害事象（Adverse event）
AUC:	血漿中濃度－時間曲線下面積（Area under the concentration-time curve）
BBB:	脳血液関門（Blood brain barrier）
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
CDC:	補体依存性細胞傷害（Complement-dependent cytotoxicity）
C_{max}:	最高血漿中濃度（Maximum plasma concentration）
Da:	ダルトン（Dalton）
ECG:	心電図（Electrocardiogram）
FIH:	ヒト初回投与（First in human）
FSH:	卵胞刺激ホルモン（Follicle stimulating hormone）
GH:	成長ホルモン（Growth hormone）
IA:	動脈内（Intra-arterial）
GLP:	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practices）
ICH:	医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use）
IgG1:	免疫グロブリン G1（Immunoglobulin G1）
IM:	筋肉内（Intramuscular）
IMiDs:	免疫調節薬（Immunomodulatory imide drugs）
INN:	国際一般名（International nonproprietary name）
IV:	静脈内（Intravenous）
LH:	黄体ホルモン（Luteinizing hormone）
mAb:	モノクローナル抗体（Monoclonal antibody）
MABEL:	推定最小薬理作用量（Minimal anticipated biological effect level）
MM:	多発性骨髄腫（Multiple myeloma）

NK:	ナチュラルキラー（Natural killer）
NOAEL:	無毒性量（No-observed adverse effect level）
PBMC:	末梢血単核球（Peripheral blood mononuclear cell）
PD:	薬力学（Pharmacodynamics）
PK:	薬物動態（Pharmacokinetics）
PSA:	前立腺特異抗原（Prostate specific antigen）
PV:	静脈周囲（Paravenous）
QW:	1 週に 1 回（Every week）
Q2W:	2 週に 1 回（Every 2 weeks）
SC:	皮下（Subcutaneous）
SCID:	重症複合免疫不全（Severe combined immunodeficient）
T/C:	腫瘍増殖抑制率（Tumor growth inhibition）
TK:	トキシコキネティクス（Toxicokinetics）
Treg:	制御性 T 細胞（Regulatory T cells）
TSH:	甲状腺刺激ホルモン（Thyroid stimulating hormone）

1　非臨床試験計画概略

本文書では、多発性骨髄腫（MM）患者の治療にイサツキシマブを使用することを支持し、イサツキシマブの薬理学、薬物動態学、及び非臨床安全性プロファイルを評価及び特徴づけるため、イサツキシマブについて実施された非臨床プログラム及び全体的な非臨床試験戦略を要約する。薬理試験、薬物動態試験、毒性試験の詳細な結果を Module 2.6.2 薬理試験の概要文、Module 2.6.4 薬物動態試験の概要文 及び Module 2.6.6 毒性試験の概要文にそれぞれ示し、考察する。本文書全体を通じて国際一般名（INN）に準じてイサツキシマブを使用しているが、試験報告書等では SAR650984 も用いた。

イサツキシマブ（別名 SAR650984）は免疫グロブリン G1（IgG1）モノクローナル抗体（mAb）で、MM 細胞の表面に高レベルで発現する CD38 蛋白質に選択的に結合する。イサツキシマブは、様々なレベルで CD38 を発現する正常な免疫細胞にも結合することができる。CD38 蛋白質は細胞外酵素活性を含む多くの機能を有している。

イサツキシマブの CD38 を発現する MM 細胞に対する補体依存性細胞傷害（CDC）、抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び抗体依存性細胞貪食（ADCP）を含む Fc 介在性メカニズムを介して腫瘍細胞殺傷を誘導する能力について試験を実施した（[Module 2.6.2 の 2.2.1 項] [Module 2.6.2 の 2.2.2 項] [Module 2.6.2 の 2.2.3 項]）。また、イサツキシマブが直接アポトーシスを誘導する能力についても評価した（[Module 2.6.2 の 2.2.4 項] [Module 2.6.2 の 2.3 項]）。

イサツキシマブ／ポマリドミド併用療法での抗 MM 活性を、*in vitro* 及び *in vivo* で試験し、両化合物の併用療法が MM 細胞の死滅又は増殖阻害に優れているかどうかを明らかにした（[Module 2.6.2 の 2.4 項]）。また、イサツキシマブが CD38 を発現する正常な免疫集団（ナチュラルキラー [NK]、単球及び制御性 T 細胞 [Treg] を含む）に対する機能的作用についても試験した（[Module 2.6.2 の 2.5 項]）。

臨床試験で使用した 2 つのイサツキシマブ製剤（[redacted]、[redacted]、[redacted][製法 I *] 及び[redacted]、[redacted]、[redacted] [申請製法*]）について、*in vitro* 及び *in vivo* 試験で直接比較試験を行い、その同等性／同質性を確認した（[Module 2.6.2 の 2.6 項]）。

最後に、イサツキシマブの生物学的活性を、MM 患者の治療に承認された最初の抗 CD38 抗体であるダラツムマブの生物学的活性と比較した。腫瘍細胞及び非腫瘍細胞への結合、殺傷機構及び CD38 阻害活性を、head to head 試験で比較した（[Module 2.6.2 の 2.7 項]）。

＊新薬承認情報提供時に置換

イサツキシマブは抗悪性腫瘍薬として開発されたバイオ医薬品（mAb）であるため、ICH S6（R1）及び ICH S9 のガイドラインに従って本化合物の非臨床安全性試験が実施されている(1)(2)。

バイオ医薬品の *in vivo* での非臨床安全性試験の先行条件は、適切な動物種の同定である。したがって、イサツキシマブの非臨床安全性評価のための適切な動物種を特定するための、いくつかの試験が実施された（[Module 2.6.2 の 3.4 項]）。これらの試験には、ヒトと様々な動物種間のイサツキシマブ標的配列相同性の比較、並びに定性的（免疫組織化学）及び定量的（フローサイトメトリー）に種間比較を行うための細胞ベースのアッセイが含まれた。非臨床安全性試験に適切な種を特定することができなかったため、トランスジェニックマウスモデル又は適切な代用抗体を用いることについて評価した（[Module 2.6.2 の 3.4 項])。

さらに、潜在的な意図しない標的臓器を特定するために、イサツキシマブ - ジゴキシゲニンを用いた交差反応性試験（GLP 適用 1 試験及び GLP 非適用 1 試験）を、ヒトの組織を用いて実施した（[Module 2.6.2 の 3.1 項]）。

ヒト血液細胞における CD38 の存在を特徴づけ、異なる種類のヒト血液細胞に対するイサツキシマブの *in vitro* 生物学的効果を評価するための GLP 非適用 *in vitro* 試験も実施した（[Module 2.6.2 の 3.2 項]及び[Module 2.6.2 の 3.3 項]）。

ICH S9 ガイドライン(2) に従い、適切な動物種がなかったことから、イサツキシマブを用いた特定の *in vitro* 又は *in vivo* の安全性薬理試験は実施しなかった。しかし、カニクイザルは薬理作用がみられなかった動物種であったとしても、イサツキシマブを用いて実施されたカニクイザルの週 1 回反復静脈内投与毒性試験（GLP）において、いくつかの安全性薬理学的エンドポイントを評価した（[Module 2.6.2 の 4 項]）。

イサツキシマブの薬物動態（PK）特性を、薬理試験（非担がん重症複合免疫不全［SCID］マウス及びヒト SU-DHL-8 腫瘍を異種移植した SCID マウス）並びに毒性試験（カニクイザル）で使用した動物種及び系統において検討した。イサツキシマブの PK パラメータは、臨床プログラムで使用された 2 つの異なる製剤（製法 I＊及び 申請製法*）を非担がん SCID マウスに単回静脈内投与した後、及び製法 I＊製剤を担がん SCID マウスに反復投与した後に得られたデータより算出した（[Module 2.6.4 の 3 項]及び[Module 2.6.4 の 4 項]）。また、サルにおける PK パラメータを、市販予定の 申請製法* 製剤の反復静脈内投与した後に得られたデータより算出した（簡単な要約については [Module 2.6.4 の 4 項]、詳細な要約については [Module 2.6.6 の 3 項]）。イサツキシマブの分布、代謝、排泄を評価するための特別な試験は実施されていない。

＊新薬承認情報提供時に置換

推定最小薬理作用量（MABEL）に基づく方法によって、ヒト初回投与試験（FIH）の開始用量を推定した。複数の MABEL 値を、*in vivo* 試験系（担がん SCID マウスにおける PK/薬力学［PD］試験）及び種々の *in vitro* 試験系（非腫瘍及び腫瘍細胞株）の両方を用いて決定した（[Module 2.6.4 の 9 項]）。

イサツキシマブ毒性試験は、非標的及び非特異的な一般毒性の可能性を評価するためのカニクイザル（薬理作用がみられない動物種）の 3 週間反復投与毒性試験（小規模な探索的試験含む）（[Module 2.6.6 の 3 項]）、ウサギ（薬理作用がみられない動物種）を用いた局所刺激性試験及びサル反復投与毒性試験での局所刺激評価（[Module 2.6.6 の 7 項]）、並びにヒト全血及び血漿との *in vitro* 適合性試験（[Module 2.6.6 の 8 項]）に限定した。これらの毒性試験を表 1 に示す。

表 1 - 毒性試験計画概要

試験の種類と期間	製剤	投与経路	動物種	GLP 適用
探索的週 1 回 3 週間反復投与毒性試験	申請製法*[a]	IV	カニクイザル	非適用
週 1 回 3 週間反復投与毒性試験	申請製法*[a]	IV	カニクイザル	適用
局所刺激性試験	製法 I *[b]	IV, IA, IM, SC, PV	ウサギ	適用
ヒト血液及び血漿を用いた血液適合性及び溶血性試験	製法 I *[b]	*In vitro*	ヒト血液及び血漿	適用

略号: IV: 静脈内, IA: 動脈内, IM: 筋肉内, SC: 皮下, PV: 静脈周囲, GLP: 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準

a : 20 mg/mL 濃度の持続静脈内投与用溶液。溶液の pH は約 5.7～6.3。溶液は以下の添加剤を含有する: 注射用水、ショ糖、ヒスチジン（塩基及び塩酸塩として）、ポリソルベート 80。

b : [redacted]mg/mL 濃度の持続静脈内投与用溶液。溶液の pH は約 [redacted]。溶液は以下の添加剤を含有する: [redacted]。

ICH S6(R1)ガイドライン(1)では、通常、低分子医薬品で実施されている標準的な遺伝毒性試験はバイオテクノロジー応用医薬品には適用されないとされている。イサツキシマブなどの mAb はデオキシリボ核酸（DNA）や他の染色体成分と直接相互作用するとは考えられていない。したがって、イサツキシマブを用いた遺伝毒性試験は実施しなかった（[Module 2.6.6 の 4 項]）。

イサツキシマブは進行がん患者の治療を目的としたバイオ医薬品であるため、ICH S9 ガイドライン(2)に従いがん原性試験は実施しなかった（[Module 2.6.6 の 5 項]）。また、生殖発生毒性試験は胚・胎児毒性試験が必要とされるが、イサツキシマブに対して非臨床安全性評価のための適切な動物種が存在しないため、胚・胎児毒性試験は実施しなかった（[Module 2.6.6 の 6 項]）。

＊新薬承認情報提供時に置換

なお、特に CD38$^{-/-}$ マウスについて文献を精査しレビューを行った（[Module 2.6.6 の 8.3 項]）。

2　薬理試験

イサツキシマブは、CD38 の触媒部位の反対側に位置するアミノ酸を含む CD38 上の不連続なエピトープに結合する(3)。イサツキシマブが MM 細胞上の CD38 に結合すると、標的がん細胞の死につながる複数の機序が引き起こされる。これらの機序のいくつかは本抗体の Fc 部分によって媒介され、ヒト補体が結合することで CDC を誘発し、またエフェクターNK 細胞及びマクロファージ上に発現する Fcγ 受容体に結合することで ADCC 及び ADCP を誘発する。イサツキシマブはまた、Fc 非依存的に直接的な細胞殺傷を誘導することができる。

上記のメカニズムに加えて、イサツキシマブは *in vitro* で免疫細胞の活性を調節することができる。例えば、イサツキシマブは、CD38 を発現する標的細胞の非存在下で NK 細胞及び単球を活性化し、その溶解活性及び貪食活性を増加させることができる。イサツキシマブは、おそらく制御性 T 細胞（Treg）によって伝えられる免疫抑制シグナルを遮断することによって、T 細胞の活性を増加させることもできる。

イサツキシマブは、レナリドミドやポマリドミドなどの免疫調節薬（IMiDs）を含む MM 標準治療の活性を高めることができる。MOLP-8 MM マウス異種移植モデルを用いた *in vivo* 試験において、イサツキシマブとポマリドミドの併用は、イサツキシマブ単独（T/C=56%）及びポマリドミド単独（T/C=46%）の活性と比較して、体重に影響することなく抗腫瘍活性の増強をもたらす（腫瘍増殖抑制率 [T/C] =22%）ことが実証されている。

2 つのイサツキシマブ臨床製剤 製法 I＊と 申請製法＊ の *in vitro* 及び *in vivo* 比較で生物活性に差は認められなかった。製法 I＊及び 申請製法＊ 製剤は、細胞株を用いた *in vitro* 試験で、同等の CDC、ADCC、ADCP、アポトーシス促進活性及び CD38 酵素阻害活性を示した。SU-DHL-8 異種移植モデルにおいて、製法 I＊と 申請製法＊ との間に有意な抗腫瘍活性の差は観察されなかった。両製剤とも忍容性が良好で同じ効果プロファイルを示し、10、20 及び 40 mg/kg で抗腫瘍活性を示し、2.5 mg/kg では生物活性を示さなかった。

イサツキシマブとダラツムマブを *in vitro* で比較したところ、CD38 上の結合エピトープが異なることに起因すると思われるいくつかの機序的差異が明らかになった。*In vitro* 試験で両抗体を head to head で比較した場合、直接アポトーシスを誘導し、CD38 の外酵素活性を遮断する能力の差が観察された。CD38 を発現するがん細胞のアポトーシス／死細胞の増大に基づくと、イサツキシマブはダラツムマブよりも強力な直接殺傷活性を示していた。さらに、イサツキシマブは CD38 酵素活性の用量

＊新薬承認情報提供時に置換

依存的阻害をもたらしたが、同じ実験条件下で、ダラツムマブによる阻害は用量反応が明らかでなく、限定的なものであった。

イサツキシマブの非臨床安全性評価に適した動物種を特定するためいくつかの試験を実施した。ヒト CD38 配列との相同性が高かったのはチンパンジー、アカゲザル及びカニクイザルであったが（92～99%）、イサツキシマブの評価に用いる非臨床試験動物種を特定するための標的結合試験（フローサイトメトリー）及び組織交差反応性試験（免疫組織化学法）では、チンパンジーのみが可能性のある適切な動物種であると特定された。しかし、一般的にチンパンジーは毒性試験に適切な動物種ではないとされているため、ICH S6(R1)ガイダンス(1)で推奨されているように、イサツキシマブの非臨床安全性評価のために他の代替法、すなわち、トランスジェニック動物の使用、又は 1 つの動物種で安全性情報を得るために適切なサロゲート mAb を使用することを検討した。

イサツキシマブの非臨床開発時には、適切なトランスジェニックマウスモデルは得られていなかった。したがって、そのようなモデルを用いた非臨床安全性試験は実施されていない。

2 つのサルサロゲート mAb 候補（ch38SB25 及び chOKT10）を作製した。どちらのサロゲート mAb もカニクイザル $CD38^+$細胞に結合し、ヒト $CD38^+$細胞に対するイサツキシマブの親和性と同様の親和性を示した。しかし、ch38SB25 及び chOKT10 を用いた試験で、ヒトの細胞及び組織において組織交差反応性の様式がイサツキシマブで観察された様式と同等ではないことが示された（ヒトでは観察されない血管の染色がサルの複数の組織で観察された）。これらの抗体の生物学的活性を試験するためのサル由来 $CD38^+$腫瘍細胞株を得られなかったため、$CD38^+$ヒト細胞株に対して試験を実施した。そのデータは、両サロゲート mAb は ADCC 及び CDC の生物学的活性を有するが、イサツキシマブがヒト腫瘍細胞株に示すアポトーシス促進活性を両サロゲート mAb では欠いていることを示していた。

潜在的標的器官を特定するため、正常ヒト組織を用いた GLP 適用組織交差反応性試験を実施した結果、イサツキシマブに特異的な結合が予想どおりリンパ組織（脾臓、胸腺、リンパ節及び扁桃）及び骨髄に検出されるとともに、下垂体（内皮細胞）及び前立腺（腺上皮細胞）にも検出された。また、イサツキシマブに特異的な結合は、多くの組織の浸潤又は常在円形細胞（肝臓のクッパー細胞を含む）にも検出された。イサツキシマブの別のバッチを用いた過去の GLP 非適用組織交差反応性試験では、脳（星状膠細胞）及び肺（気管支上皮）にも染色が認められたが、この GLP 試験では再現されなかった。試験間で認められた結果の違いは、2 つの試験で用いられたイサツキシマブバッチ間の差、又は GLP 試験ではバックグラウンドの染色が最適となるように、より高濃度のアイソタイプ対照抗体が用いられたことによるものと考えられる。また、気管支上皮の染色について追加試験を実施したところ、染色が認められたものの全てのドナーにではなく、CD38 蛋白質は主に腫瘍又は炎症環境で発

現することが示唆された。これらの異なる試験で観察された染色の大部分は、ヒトにおける既知のCD38 蛋白質発現と全体的に一致していた(4)(5) 。非リンパ組織成分の染色は交差反応性を示す証拠と解釈され、意図しない標的部位が存在する可能性が示唆された。これらの組織を表 2 に要約する.

表 2 - 新鮮凍結正常ヒト組織におけるイサツキシマブ結合（リンパ組織以外）

ヒト組織	結合部位
前立腺	腺上皮細胞
下垂体	類洞内皮細胞
肺*	気管支上皮細胞
脳*	星状膠細胞

* GLP 適用組織交差反応性試験では認められなかった

正常ヒト末梢血単核球（PBMC）を用いた *in vitro* アッセイにおいて、イサツキシマブはサイトカイン放出、細胞活性化及び細胞減少に対して有意な作用を示さなかった（ただし、検討した 3 名の健康ドナーのうち 2 名で精製 NK 細胞のアポトーシスを若干誘導した）。したがって、患者にイサツキシマブを投与しても深刻なサイトカイン放出症候群あるいは細胞減少が引き起こされる可能性は低いと考えられる。

最後に、カニクイザルは薬理反応を示す動物種ではないものの、一部の安全性薬理評価項目は、カニクイザルを用いたイサツキシマブの GLP 適用週 1 回反復静脈内投与毒性試験で評価した。この試験において、イサツキシマブに関連する心電図（ECG）パラメータ、血圧、肉眼的行動プロファイル（体温を含む）及び呼吸機能の変化は、試験最高用量の 100 mg/kg/週まで認められなかった。

3　薬物動態試験

マウス及びサルの血漿中イサツキシマブ濃度を測定するための生体試料分析法を構築し、サルの血漿中イサツキシマブ濃度の測定法についてはバリデーションを実施した。また、サル血漿中の抗イサツキシマブ抗体（ADA）を検出し、抗体価を測定するためのバリデーション済みの分析法を構築した。さらに、複数の異なる細胞（腫瘍由来細胞株及び健康ドナー由来リンパ球）を用いて、イサツキシマブの標的分子である CD38 の発現量及びイサツキシマブによる標的分子占有率を定量的フローサイトメトリーにより測定するための分析法を構築した[Module 2.6.4 の 2 項]。

イサツキシマブを単回及び反復静脈内投与する種々の試験を実施し、薬物動態を評価した。

イサツキシマブの薬物動態試験は、腫瘍細胞を異種移植した担がん SCID マウス、非担がん SCID マウス及びカニクイザルを用いて実施した。ただし、カニクイザルを用いた試験は、毒性試験の一環でトキシコキネティクス（TK）を評価するために実施した。また、イサツキシマブの臨床開発を進めるうえで必要な情報を提供するために、非担がん SCID マウスを用いて 2 種の異なるイサツキシマブ製剤を投与したときの曝露量の比較を行うこと目的とした試験、及びイサツキシマブ製剤の保存条件の違いによる影響を評価することを目的とした試験をそれぞれ実施した[Module 2.6.4 の 3 項][Module 2.6.4 の 4 項]。蛋白質であるイサツキシマブの分布、代謝及び排泄を評価するための特別な試験は実施しなかった。

概して、イサツキシマブを単回又は反復投与したときの血漿中曝露量は、マウス及びサルのいずれにおいても高用量になるにつれて増加した。サルにおいては用量に比例した血漿中曝露量の増加がみられた一方で、担がんマウスにおいては用量比例性を上回る増加がみられた。マウス及びサルのいずれにおいても、イサツキシマブを反復投与することにより、初回投与に比べて高い血漿中曝露量がみられた。モデル解析により、イサツキシマブを 2 週に 1 回マウスに反復投与したときの血漿中曝露量は、初回投与に比べて 3～4 倍と見積もられた[Module 2.6.4 の 4 項]。

イサツキシマブを週 1 回サルに反復投与したときの血漿中曝露量は、TK 試験のデータから、初回投与に比べて約 2 倍と見積もられた[Module 2.6.6 の 3 項]。

イサツキシマブの PK 特性は非担がん SCID マウス及び担がん SCID マウスで評価された。非担がん SCID マウスでの血漿中濃度推移は 2-コンパートメントモデルによって最も良好に表すことができ、消失半減期が約 14 日と長く、全身クリアランスが小さく、分布容積がマウス血液容積と同程度に小さいという特徴がみられた。

イサツキシマブ 10 mg/kg を非担がん SCID マウスに静脈内投与したとき、イサツキシマブの分布容積が血液容積と同程度に小さく、全身クリアランスが小さく、消失半減期が約 14 日と長かったのに対して、担がんマウスでは全身クリアランスは高用量になるにつれて小さくなり、最も低い用量の 2.5 mg/kg での 0.795 mL/day から、最も高用量の 40 mg/kg での 0.171 mL/day までの範囲に含まれる値であった。担がんマウスにイサツキシマブ 10 mg/kg を投与したときの全身クリアランス（0.258 mL/day）は、非担がんマウス（0.161 mL/day）に比べて大きかった。担がんマウスに移植した腫瘍片に発現する CD38 に対してイサツキシマブが高い親和性を有することを踏まえると、これらのデータから、イサツキシマブの担がんマウスでの体内からの消失過程に非線形性がみられることは、標的分子を介した薬物動態に起因することが示唆された。

ADA が検出されたサルにおいて、イサツキシマブ曝露量に対する影響がみられたものの、曝露量の低下は 17%未満であり、その影響は限定的なものであった。

非担がん SCID マウスに 2 種の異なるイサツキシマブ製剤 製法 I＊と 申請製法＊ を静脈内投与したときの曝露量は非常に類似したものであった。さらに、25°C で 3 か月間保存した後、4°C で維持する保存条件と、常に 4°C とする保存条件のそれぞれでイサツキシマブ製剤の曝露量も類似しており、ここで検討した保存条件によるイサツキシマブ PK に対する影響もみられなかった。

イサツキシマブを評価する上で適切な動物モデルが存在しないことから、推定最小薬理作用量（MABEL）及び *in vitro* でのイサツキシマブによる標的分子（CD38）の占有率に基づいて、患者を対象としたヒト初回投与（FIH）試験の開始用量を推定した。*In vitro* 試験での MABEL 算出は、がん細胞及び正常細胞を含む種々の試験系を用いて行い、*in vivo* 試験での MABEL 算出は担がん SCID マウスを用いた PK/PD モデル解析に基づいて行った[Module 2.6.4 の 9 項]。*In vitro* 試験系（がん細胞及び正常細胞）並びに *in vivo* 試験（担がん SCID マウス）及び標的占有率に基づいて算出した MABEL に基づいて予測された用量は 0.000005 mg/kg（*in vitro*）から 0.2 mg/kg（*in vivo*）と幅のある値であった。得られたデータを総合的に評価して、FIH 試験での推奨開始用量を 0.0001 mg/kg とした。この用量では、正常ヒト B 細胞及び T 細胞でのイサツキシマブによる標的分子（CD38）の占有率は約 10%になると予想される。これは *in vivo* 試験での PK/PD 解析に基づく開始用量の 0.2 mg/kg の 1/2000 であった。腫瘍（SU-DHL-8）消失に必要なイサツキシマブの閾値血漿中濃度である 128.8 µg/mL を患者で薬理活性を達成するための指針として使用し、FIH 試験（TED10893 試験）では、用量 20 mg/kg（10 mg/kg 及び 20 mg/kg コホート）まで増量した[Module 2.7.2 の 2.7.1.1 項]。

＊新薬承認情報提供時に置換

4　毒性試験

カニクイザル（薬理作用がみられない動物種）を対象とした反復投与（週 1 回 3 週間）静脈内毒性試験において、イサツキシマブの臨床製剤（申請製法*）は、評価したいずれのパラメータにおいても本薬に関連した変化を生じず、無毒性量は 100 mg/kg/週（試験最高用量）であった。

臨床製剤（製法 I *）を用いたウサギ（薬理作用がみられない動物種）局所刺激性試験により、最大 5 mg/mL（試験最高濃度）のイサツキシマブを、臨床使用目的の投与経路である静脈内、並びに偶発的に起こりうる意図しない投与経路である筋肉内、動脈内、皮下又は静脈周囲に注射した後の忍容性は良好であることが示された。さらに、臨床製剤（申請製法*）を用い、最大 20 mg/mL（試験最高濃度）のイサツキシマブをカニクイザルに週 1 回 3 週間静脈内投与したところ、注射部位に本剤関連の肉眼的又は病理組織学的変化は認められなかった。

イサツキシマブの臨床製剤（製法 I *）は、ヒトの血中又は血漿中最終濃度 2.5 mg/mL（試験最高濃度）まで、ヒト全血の溶血を誘発せず、血漿への適合性が認められた。

CD38$^{-/-}$マウスに関する文献精査に基づくと、これらのノックアウト動物で認められた主な副作用は、液性免疫応答の欠如(6)、耐糖能障害及び血清中インスリン濃度低下(7) 、骨石灰化の低下(8)、学習及び記憶障害(9)、ストレス条件下での出産後の母動物の哺育行動の障害、及び雄の社会的認知障害(10)であった。しかし、これらの遺伝子組換え動物で得られたデータは有害作用の可能性を示唆するものに過ぎず、考察にあたっては注意が必要である(11)。

ヒトにおける潜在的毒性の標的臓器の特定は、イサツキシマブ試験に適切な動物種がないこと及び、適切な動物のサロゲート抗体がないことから実施できなかった。したがって、ヒトにおけるイサツキシマブの潜在的毒性の標的臓器の特定は、前述の薬理学の項に記載したヒト組織を用いた *in vitro* 試験に基づいて行った。これらの *in vitro* 試験では、リンパ組織及び骨髄の染色が予想通りに認められたが、非リンパ組織（前立腺、下垂体、肺、脳）の染色は、意図しない標的部位の可能性を示唆する交差反応性の証拠として解釈された。

＊新薬承認情報提供時に置換

5　総括及び結論

イサツキシマブは、MM の非臨床モデル及び患者由来骨髄腫細胞において、多機構な作用機序を示した。Fc 媒介エフェクター機能に加えて、イサツキシマブは CD38 発現腫瘍細胞のアポトーシスを誘導し、細胞の CD38 酵素活性を阻害した。ポマリドミドとイサツキシマブの併用は、各薬物単独と比較して、*in vitro* 及び *in vivo* 活性が増強した。

正常な免疫細胞上の CD38 へのイサツキシマブの結合は、NK 細胞の活性化、単球の M1 表現型への極性化、並びに Treg 細胞による T 細胞増殖阻害作用の回復を含む免疫調節作用をもたらした。

イサツキシマブのバッチ 製法 I＊及び 申請製法＊ を用いた head to head の試験による非臨床評価の結果、*in vitro* での CDC、ADCC、ADCP、アポトーシス、CD38 酵素活性に対する薬理活性、*in vivo* での腫瘍増殖阻害に対する薬理活性が、両バッチで同等であると結論づけられた。

イサツキシマブとダラツムマブを比較したところ、両薬物の作用機序に差があることが明らかになった。直接アポトーシスの誘導及び CD38 外酵素活性を阻害する能力の差は、パラトープが違っていることによる可能性がある。

イサツキシマブの PK は、薬理試験に用いた動物種（担がん及び非担がん SCID マウス）及び毒性試験に用いた動物種（カニクイザル）を用いた。全体として、イサツキシマブの血漿中曝露量は、単回及び反復投与後、両種で用量とともに増加した。血漿中曝露量の増加は、サルでは概して用量に比例しており、担がんマウスでは用量比例より大きかった。イサツキシマブの蓄積は、反復投与後にマウスとサルの両方で観察された。2 種類のイサツキシマブ製剤、製法 I＊及び 申請製法＊ を非担がん SCID マウスに単回静脈内投与した場合の曝露量は同等であることが示された。蛋白質医薬品での基準どおり、イサツキシマブを用いた特別な分布、代謝及び排泄試験は実施されていない。非臨床安全性試験に適切な動物モデルがないことから、MABEL 法及び *in vitro* 試験より得られた標的分子占有率のデータを用いて、FIH 試験の開始用量を推定した。*In vivo* 試験系（担がん SCID マウスにおける PK/PD 試験）及び種々の *in vitro* 試験系（非腫瘍及び腫瘍細胞株）の両方を用い、複数の MABEL 値を求めた。全体的なデータに基づき、ヒトの推奨開始用量は 0.0001 mg/kg であった。腫瘍（SU-DHL-8）消失に必要なイサツキシマブ閾値血漿中濃度（CT）128.8 µg/mL を患者で薬理活性を達成するための指針として使用し、FIH 試験 TED10893 の患者において用量 20 mg/kg まで増量した（[Module 2.7.2 の 2.7.1.1 項] [Module 2.7.2 の 2.7.4.1 項]）。

＊新薬承認情報提供時に置換

イサツキシマブはヒト CD38 蛋白質に特異的である。したがって、毒性試験に適切な動物種又は適切なサロゲート抗体が存在しないことから、イサツキシマブを用いた非臨床安全性評価は限定的なものであった。

カニクイザル（薬理作用がみられない動物種）の静脈内反復投与（週 1 回 3 週間）毒性試験において、イサツキシマブの臨床製剤（申請製法*）は、評価したいずれのパラメータにおいても本剤に関連した変化を生じさせず、無毒性量は 100 mg/kg/週（試験最高用量）であった。

この GLP 適用カニクイザル週 1 回静脈内反復投与毒性試験において、安全性薬理エンドポイントが評価された。ECG パラメータ、血圧、肉眼的行動プロファイル（体温を含む）及び呼吸機能に関して、100 mg/kg/週の最高用量までイサツキシマブに関連した影響は認められなかった。

臨床製剤（製法 I *）を用いたウサギ（薬理作用がみられない動物種）局所刺激性試験において、最高濃度 5 mg/mL のイサツキシマブを臨床投与経路である静脈内、並びに意図せず偶発的に投与されうる筋肉内、動脈内、皮下又は静脈周囲に注射した後の忍容性は良好であることが示された。さらに、臨床製剤（申請製法*）を用い、最高濃度 20 mg/mL のイサツキシマブをカニクイザルに週 1 回 3 週間静脈内投与したところ、注射部位に本剤関連の肉眼的又は病理組織学的な変化は認められなかった。

イサツキシマブ臨床製剤（製法 I *）は、ヒトの血中又は血漿中最終濃度 2.5 mg/mL（試験最高濃度）まで、ヒト全血の溶血を誘発せず、血漿への適合性が認められた。

さらに、ヒト血液細胞に対する CD38 の存在の特徴を明らかにし、サイトカイン放出に対するイサツキシマブの潜在的影響を含め様々な種類のヒト血液細胞に対するイサツキシマブの *in vitro* 生物学的影響を評価するために、種々の *in vitro* 試験を実施した。全体として、精製 NK 細胞におけるいくらかのアポトーシスが誘導されたにもかかわらず、正常ヒト PBMC を用いた *in vitro* アッセイにおいて、イサツキシマブによる重度のサイトカイン放出又は細胞減少は誘導されなかった。

CD38$^{-/-}$マウスに関する文献精査に基づくと、これらのノックアウト動物で認められた主な副作用は、液性免疫応答の欠如、耐糖能障害及び血清中インスリン濃度の低下 、骨石灰化の低下、学習及び記憶障害、ストレス条件下での母動物の出産後哺育行動及び雄の社会的認識の障害であった。しかし、これらの遺伝子組み換え動物で得られたデータは有害作用の可能性を示唆するものに過ぎず、考察にあたっては注意が必要である。

ヒトにおける潜在的毒性の標的臓器の特定は、イサツキシマブの試験に適切な動物種がないこと及び、適切な動物のサロゲート抗体が存在しないことから実施できなかった。したがって、ヒトにお

＊新薬承認情報提供時に置換

けるイサツキシマブの潜在的毒性の標的臓器の特定は、ヒト組織を用いた *in vitro* 試験に基づいて行った。正常ヒト組織を用いた GLP 適用組織交差反応性試験では、リンパ組織（脾臓、胸腺、リンパ節、扁桃）及び骨髄の染色が予想通り認められたが、下垂体（内皮細胞）及び前立腺（腺上皮細胞）にもイサツキシマブが特異的に結合することが示された。さらに、イサツキシマブの特異的結合は多くの組織において浸潤又は常在する円形細胞（マクロファージ及びリンパ球）において認められ、それには肝臓のクッパー細胞が含まれていた。過去に実施した異なるバッチのイサツキシマブを用いた GLP 非適用組織交差反応性試験では、脳（星状膠細胞）及び肺（気管支上皮細胞）でも染色が認められたが、これは GLP 試験では再現されなかった。非リンパ組織成分（前立腺、下垂体、肺、脳）の染色は、意図しない標的部位の可能性を示唆する交差反応性の証拠として解釈された。

以上のように、ヒトのいくつかの非リンパ組織成分で特異的染色が認められたことから、予防措置としてヒト初回第 I 相単剤試験（TED10893）での各注入前に、前立腺、下垂体及び呼吸機能の評価を含むイサツキシマブの安全性プロファイルの系統的モニタリングが実施され（[Module 2.7.2 の 2.7.1.1 項]）、前立腺特異抗原（PSA）濃度、下垂体ホルモン濃度（GH、FSH/LH、ACTH、TSH）の測定、肺機能検査（スパイロメトリー、拡散能）及び胸部 X 線検査が実施された。脳に認められた染色に関しては、イサツキシマブはその大きな分子サイズ（分子量が約 150kDa）及び血液脳関門（BBB）の制限的性質に基づくと、BBB を通過する可能性は低いため、患者における特別なモニタリングは行わなかった。

上に記載した検査において、治験薬がこれらの臓器／機能に影響を及ぼしていることを示唆する異常は認められず、関連する有害事象（AE）も報告されなかった。したがって、治験薬投与中のこれらの系統的臨床検査評価は、その後の臨床試験では必要ではないと考えられた（[Module 2.7.4 の 3.1.1 項]及び[Module 2.7.4 の 3.1.4.3.3 項]）。

最後に、カニクイザル（薬理作用がみられない動物種）を用いたイサツキシマブの GLP 反復投与静脈内毒性試験の無毒性量における動物での曝露量と、ヒトにイサツキシマブ 10 mg/kg を週 1 回（QW）にて最初の 1 サイクル（28 日間、すなわち週 1 回にて 4 回投与）静脈内投与した後、2 週に 1 回（Q2W）にて投与（10 mg/kg QW/Q2W）したときの曝露量から得られた動物とヒトでのイサツキシマブの曝露比を表 3 に要約した。ただし、ヒトにおける曝露量は、EFC14335 試験の患者 148 名が、全員イサツキシマブを 10 mg/kg QW/Q2W で投与を受けたと仮定したときに、EFC14335 試験で得られた濃度の実測値及び POH0503 試験[Module 2.7.2 の 2.7.4.4 項]より得られた母集団 PK パラメータを用いて、患者ごとに血漿中濃度推移をシミュレーションして算出した値を用いた。この表より、サルの無毒性量でのイサツキシマブ曝露量は、ヒトでのイサツキシマブ曝露量を上回っていたことが示されている。

表 3 - サル（TSK0154）及びヒト（EFC14335）にイサツキシマブを投与後の動物／ヒト曝露比の要約

サル週 1 回 3 週間静脈内投与無毒性量（mg/kg/週）	試験終了時の無毒性量での平均 C_{max}、雌雄併合（µg/mL）	試験終了時の無毒性量での平均 AUC_{0-3d}[a]、雌雄併合 (µg.day/mL)	10 mg/kg での平均ヒト C_{max} (µg/mL)	10 mg/kg での平均ヒト AUC_{0-7d} 又は AUC_{0-14d} (µg.day/mL)	サル／ヒト C_{max} 比	サル／ヒト AUC 比
100	4305	9480	284[b]-372[c]	1225[b]-3297[c]	11.6-15.1	2.9-7.7

略号: AUC:濃度 - 時間曲線下面積、 C_{max}: 最大血漿中濃度

a ：計画安楽殺のため、TK サンプルは最終投与（週 1 回投与の 3 回目投与後）から 3 日目のみに採取した。

b ：週 1 回投与の 3 回目投与後の simulated C_{max} 及び AUC_{0-7d}

c ：定常状態での simulated C_{max} 及び AUC_{0-14d}

EFC14335（主要な第 3 相試験）における投与スケジュールは、週 1 回 4 週間投与後は 2 週に 1 回投与であったことから、曝露比は週 1 回 3 週間投与後の simulated C_{max}、AUC_{0-7d}、及び定常状態における simulated C_{max}、AUC_{0-14d} を用いて算出した。AUC はヒトでは 3 回目の週 1 回投与後 1 週間にわたって、定常状態では 2 週間にわたって、サルでは 3 日間にわたって計算されたため、サル／ヒトの AUC 比は低く見積もられている可能性があり、実際のサル／ヒトの AUC 比はおそらく表に示した比よりも大きい。

以上のことから、イサツキシマブの非臨床試験は適切な ICH 及び国際ガイドラインに基づいて実施されたものであり、臨床試験実施並びに承認申請において妥当なものであると考えられた。

6　参考文献一覧

1. ICH S6 (R1) guideline: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/731268/1998). June 2011.
2. ICH S9 guideline: Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals; 29 October 2009.
3. Deckert J, Wetzel MC, Bartle LM, Skaletskaya A, Goldmacher VS, Vallee F, et al. SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies. Clin Cancer Res. 2014;20(17):4574-83.
4. The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2018 Feb 22]. Available from:https://www.proteinatlas.org/ENSG00000004468-CD38/tissue. Last access day: 19-Dec-2018.
5. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. Physiol Rev. 2008;88:841-86.
6. Cockayne DA, Muchamuel T, Grimaldi JC, Muller-Steffner H, Randall TD, Lund FE, et al. Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. Blood. 1998;92(4):1324-33.
7. Kato I, Yamamoto Y, Fujimura M, Noguchi N, Takasawa S, Okamoto H. CD38 disruption impairs glucose-induced increases in cyclic ADP-ribose, [Ca2+], and insulin secretion. J Biol Chem. 1999;274(4):1869-72.
8. Sun L, Iqbal J, Dolgilevich S, Yuen T, Wu X-B, Moonga BS, et al. Disordered osteoclast formation and function in a CD38 (ADP-ribosyl cyclase)-deficient mouse establishes an essential role for CD38 in bone resorption. FASEB J. 2003;17(3):369-75.
9. Kim S, Kim T, Lee HR, Jang EH, Ryu HH, Kang M, et al. Impaired learning and memory in CD38 null mutant mice. Mol Brain. 2016;9(1):16.
10. Higashida H, Lopatina O, Yoshihara T, Pichugina YA, Soumarokov AA, Munesue T, et al. Oxytocin signal and social behaviour: comparison among adult and infant oxytocin, oxytocin receptor and CD38 gene knockout mice. J Neuroendocrinol. 2010;22(5):373-9.
11. Bussiere JL, Martin P, Horner M, Couch J, Flaherty M, Andrews L, et al. Alternative strategies for toxicity testing of species-specific biopharmaceuticals. Int J Toxicol. 2009;28(3):230-53.

7 別表

7.1 別表 1 – 試験を実施していない理由

CTD 項目	理由
薬理	
4.2.1.3 安全性薬理	ICH S9 ガイドラインに従い、適切な動物種がなかったことから、イサツキシマブを用いた特定の *in vitro* 又は *in vivo* の安全性薬理試験は実施しなかった。 しかし、カニクイザルが薬理学的に反応性を有する動物種ではなかったものの、イサツキシマブを用いて実施されたカニクイザルの週 1 回反復静脈内投与毒性試験（GLP）において、いくつかの安全薬理学的エンドポイントを評価した。
薬物動態	
4.2.2.3 分布	mAb を含む蛋白質性医薬品に対しては放射性標識体を用いた組織分布試験を実施することを規制当局より要求されていないことから、実施しなかった。
4.2.2.4 代謝	ICH S6(R1)ガイドラインに従い、mAb 抗体を含むバイオ医薬品の期待される代謝は、小さなペプチド及び各アミノ酸への分解であり、その代謝経路は一般によく分かっているため、一般の医薬品で実施される従来の生体内変化を調べる試験は必要ないことから、代謝試験を実施しなかった。 蛋白質であるイサツキシマブは、非飽和性の蛋白分解異化過程により代謝されると予想される。
4.2.2.5 排泄	蛋白質であるイサツキシマブは非飽和性の蛋白分解異化過程により消失すると予想されるため、特別な排泄試験は実施しなかった。
4.2.2.6 薬物動態学的相互作用	モノクローナル抗体であるイサツキシマブはシトクロム P450 及びトランスポーターとの直接的な薬物相互作用は予想されないため、特別な *in vitro* 又は *in vivo* での非臨床試験は実施しなかった。 一方、サイトカインレベルの変化を介してシトクロム P450 の発現が変化することにより、その基質となる併用薬の薬物動態にイサツキシマブが影響する可能性に関する評価は実施済みであり、臨床薬理の概要に結果を示す。

CTD 項目	理由
毒性	
4.2.3.1 単回投与毒性	毒性評価に適切な動物種が存在しないことから、単回投与毒性試験は実施しなかった。
4.2.3.3 遺伝毒性	ICH S6(R1)ガイダンスでは、低分子医薬品について通常に実施されている標準的な遺伝毒性試験はバイオテクノロジー応用医薬品には適用されないとされている。イサツキシマブなどの mAb はデオキシリボ核酸（DNA）や他の染色体成分と直接相互作用するとは考えられていない。したがって、イサツキシマブを用いた遺伝毒性試験は実施しなかった。
4.2.3.4 がん原性	イサツキシマブは後期がん患者の治療を目的としたバイオ医薬品であるため ICH S9 ガイダンスに従いがん原性試験は実施しなかった。
4.2.3.5 生殖発生毒性	イサツキシマブは後期がん患者の治療を目的としたバイオ医薬品であるため、ICH S9 ガイダンスに従うと胚・胎児毒性試験が必要とされるが、イサツキシマブに対して非臨床安全性評価のための適切な動物種が存在しないため、胚・胎児毒性試験は実施しなかった。
4.2.3.7.1 抗原性 4.2.3.7.2 免疫毒性 4.2.3.7.3 毒性機構試験 4.2.3.7.4 依存性 4.2.3.7.5 代謝物 4.2.3.7.6 不純物	これらの試験は以下の理由により実施しなかった。 1. 一般毒性試験の一部として評価が行われていること。 2. 一般毒性試験において毒性を示唆する所見が認められておらず、試験結果解釈を補助する必要がなかったこと。 3. イサツキシマブがバイオ医薬品分子であり、そのような評価は不要と考えられたこと。