アキャルックス点滴静注 250 mg

第 2 部（モジュール 2）CTD の概要（サマリー）

2.4. 非臨床試験の概括評価

楽天メディカルジャパン株式会社

2.4 非臨床試験の概括評価

略号一覧

略称・略号	省略していない表現又は定義	
A431	Human epidermoid carcinoma cell line	ヒト類上皮がん細胞株
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity activity	抗体依存性細胞傷害
ASP-1929	Cetuximab-IRDye®700DX Conjugate	セツキシマブと IRDye 700DX の複合体（[redacted] 社が製造する。申請する薬剤）
AUC	Area under the curve	濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-24}	Area under the curve up to time 24h	投与後 24 時間までの濃度-時間曲線下面積
AUC_{inf}	Area under the curve up to infinity	投与後無限時間までの濃度-時間曲線下面積
AUC_{last}	Area under the curve up to the last quantifiable time	定量可能な最終時点までの濃度-時間曲線下面積
BLOQ	Below limit of quantification	定量下限未満
BxPC3	Pancreatic adenocarcinoma cell line	膵臓腺がん細胞株
BW	Body weight	体重
CL	Clearance	クリアランス
C_{max}	Maximum concentration	最高濃度
DAR	Dye-to-antibody ratio	抗体に対する色素の比率
EC_{50}	Effective concentration to achieve 50% maximal binding	50%最大結合親和性を達成する有効濃度
ECG	Electrocardiogram	心電図
ECM	Extra cellular matrix	細胞外マトリックス
EGFR	Epidermal growth factor receptor	上皮成長因子受容体
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定
FaDu	Human hypopharyngeal tumor cell line	ヒト下咽頭がん細胞株
FDA	Food and Drug Administration	（米国）食品医薬品局
FIH	first-in-human	ヒト初回投与
GFP	Green fluorescent protein	緑色蛍光タンパク質
GLP	Good Laboratory Practices	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
H&E	Hematoxylin and eosin	ヘマトキシリン・エオシン
HED	Human equivalent dose	ヒト等価用量
HNC	Head and neck cancers	頭頸部癌
HPLC-RP	High-performance liquid chromatography-reverse phase chromatography	逆相高速液体クロマトグラフィー
HPLC-SEC	High-performance liquid chromatography-size exclusion chromatography	サイズ排除高速液体クロマトグラフィー
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IHC	Immunohistochemical	免疫組織
IR 700	IRDye®700DX NHS ester	IRDye®700DX NHS エステル
IV	Intravenous	静脈内
LED	Light-emitting diode	発光ダイオード

2.4 非臨床試験の概括評価

略称・略号	省略していない表現又は定義	
K_d	Dissociation constant	解離定数
K_{off}	Dissociation rate constant	解離速度定数
MFD	Maximal feasible dose	投与可能な最大用量
MTD	Maximal tolerated dose	最大耐量
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
RM-1929	Cetuximab-IRDye®700DX Conjugate	セツキシマブと IRDye 700DX の複合体（[redacted] 社が製造する。非臨床試験、臨床試験で使用した薬剤）
SCC-15	Human squamous cell carcinoma cell line	ヒト扁平上皮がん細胞株
SD	Sprague-Dawley	-
$T_{1/2}$	Half-life	半減期
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス

目次

2.4 非臨床試験の概括評価 6
1. 非臨床試験計画の概略 6
2. 薬理試験 12
2.1 効力を裏付ける試験 12
2.1.1 *In vitro* 試験 12
2.1.2 *In vivo* 試験 16
2.2 安全性薬理試験 18
3. 薬物動態試験 19
3.1 トキシコキネティクス 19
3.2 分布 20
3.3 代謝 21
3.4 排泄 21
3.5 薬物動態学的薬物相互作用 21
3.6 ヒトへの外挿及び安全域 21
4. 毒性試験 22
4.1 単回投与毒性 22
4.1.1 SD ラットにおける IR 700 カルボン酸体の単回静脈内投与による毒性試験及び 2 週間回復性試験（GLP 適用） 23
4.1.2 カニクイザルにおける RM-1929 の単回静脈内持続投与による毒性試験及び TK 試験（GLP 適用） 24
4.1.3 ヒト初回用量の選択及び用量コホート 25
4.2 遺伝毒性 26
4.2.1 細菌を用いる復帰突然変異試験 26
4.2.2 *In vitro* 小核試験 27
4.2.3 IR 700-CO_2 の SD ラットへの静脈内（急速）投与による *in vivo* 小核試験 28
4.3 がん原性 30
4.4 生殖発生毒性 30
4.5 光毒性 30
5. 総括及び結論 31

6. 参考文献 32

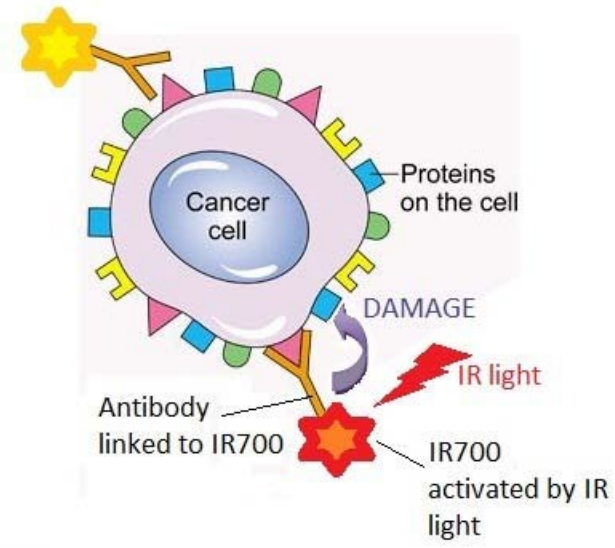
2.4　非臨床試験の概括評価

1.　非臨床試験計画の概略

本申請資料に記載されている治療法は、がんを標的とした新規の光による励起技術である[1)]。本治療は、光による励起型色素 IRDye®700DX NHS エステル（IR 700）を結合したモノクローナル抗体で構成される薬剤、及び腫瘍部位で非熱性赤色光により薬剤を励起するレーザ装置（又は同様の発光装置）を利用した、薬剤と医療機器を組み合わせた治療である。抗体が腫瘍に集積しがん細胞と結合した場合のみ、抗体-色素複合体が光により励起され、光力学的にがん細胞に対する殺細胞作用を誘導する。

本治療の各構成要素、抗体-色素複合体又は光のどちらかのみでは、主要な薬理作用（抗がん活性）が示されない。両者の組み合わせだけが、がん細胞に対する殺細胞作用及び腫瘍破壊を迅速に誘導することが可能である。殺細胞作用の機序は完全に判明されていないが、急速な細胞膜破壊（1.5 時間未満）に関係し、アポトーシスというよりネクローシスのプロセスに準じると考える。

図 1　本治療の構成及び作用機序



This therapy consists of a combination of a drug, a monoclonal antibody conjugated to IRDye 700DX, and a laser device that is used to irradiate the tumor with 690 nm near infrared light to activate the drug (antibody-dye conjugate). Upon light activation, the conjugate induces rapid cellular destruction only at cells expressing the antigen and bound to the antibody.

本治療では 2 段階の治療を必要とする：（i）薬剤の静脈内投与、及び（ii）殺細胞作用を誘導するのに十分なエネルギー（光フルエンス）の 690 nm 波長光の腫瘍部位への照射である。薬剤が腫瘍組織内に集積可能となる、薬剤投与約 24 時間後に光照射が実施される。

2.4 非臨床試験の概括評価

本申請でセツキシマブ　サロタロカンナトリウム（遺伝子組換え）（ASP-1929/RM-1929、本薬）と記載されている薬剤は、モノクローナル抗体セツキシマブ及び色素の IR 700 との複合体である。申請する効能・効果は、再発頭頸部癌（HNC）である。

本薬の構成部分であるセツキシマブは、HNC に高頻度で過剰発現している上皮成長因子受容体（EGFR）抗原を標的としている。本薬を全身投与することにより腫瘍組織へ集積され、がん細胞に発現した EGFR に結合する。本薬投与後、それに続く光照射により、再発 HNC の迅速な腫瘍破壊を誘導し、疾患を治癒する効果的な治療となる。

非臨床試験において、本薬の薬理学的、薬力学的、及び毒性学的特性を定めた上で、他の試験成績と共に本剤の製造販売承認申請を行うものである。

以下に述べる非臨床試験を、医薬品規制調和国際会議（ICH）M3 及び適応可能なガイドラインに従い実施し、本薬の薬理、薬物動態及び毒性を評価、検討した。なお、ASP-1929 製剤は製造販売承認申請をする薬剤であるが、一部を除き非臨床試験は RM-1929 を用いて実施している。RM-1929 は ASP-1929 と同じくセツキシマブと IR 700 の複合体であるが、[redacted] 社ではなく [redacted] 社が製造するセツキシマブを用いて製造されたものである。RM-1929 と ASP-1929 の同等性は、物理化学的試験で確立しており、ASP-1929 を用いた試験は繰り返し実施していない。

本薬を介した本治療は、EGFR 発現した腫瘍を局所治療コントロールする、腫瘍に対する治療法である。非臨床薬理及び薬力学試験では、HNC 細胞株を含む多様ながん細胞株を用いて、薬力学的応答を制御するパラメータの決定に焦点を当てた。試験では、抗原発現、投与用量及び光フルエンスの用量依存性及び相互依存性を評価した。EGFR との結合はがん細胞特異性を決定するプロセスであることから、本薬が薬効を発揮するのに必要な EGFR との結合を検討した。

本薬は色素 IR 700 とモノクローナル抗体セツシキマブの複合体である。非臨床薬理試験では、結合した色素が抗体の生化学的及び機能的性質に及ぼす色素複合体の影響を検証する多数の試験が含まれている。EGFR を介した細胞内シグナル伝達、がん細胞増殖、及び抗体依存性細胞傷害（ADCC）の調節能だけではなく、生化学的 EGFR 結合親和性の特徴づけのため、RM-1929 及びセツキシマブの比較試験を実施した。

多数の同所性及び皮下の異種移植マウスで RM-1929 を介した本治療における *in vivo* の抗がん活性の試験を実施した。腫瘍への光照射は、690 nm の単色光レーザを使用する臨床試験と同様の光フルエンスで実施した。これには臨床試験で使用するレーザ及びフロンタルディフューザー又はシリンドリカルディフューザーが含まれた。*In vivo* 異種移植マウス試験では、処置した腫瘍の組織学的検査並びに腫瘍及び周囲の正常組織（筋肉、脂肪組織、及び皮膚等）に生じた組織傷害の検討によるがん特異性の評価をした。

2.4 非臨床試験の概括評価

690 nm 光の生体内透過性の検討のために、正常組織の光吸収及び光散乱を再現した多数の「ファントム組織」が種々の組織深度での 690 nm 光の線形光伝達測定に使用された。

臨床試験で使用した光フルエンスにおいて、RM-1929 ががん細胞に対して殺細胞作用を発揮するために有効な光透過性の範囲が設定された。本試験結果により処置する腫瘍量全てを照射するのに有効な深度の光透過性が示された。腫瘍の深度及びディフューザーの設定位置に基づいて表面又は組織内を照射するための特定のガイダンスも併せて設定した。

毒性試験として、GLP 適用試験及び GLP 非適用試験を実施した。

- カニクイザルにおける RM-1929 の単回投与毒性試験（GLP 適用）
- ASP-1929 の単回投与後に臨床用レーザで 690 nm 非熱性赤色光照射したカニクイザルにおける皮膚光毒性試験（GLP 適用）
- ラットにおける遊離色素 IR 700 の単回投与毒性試験（GLP 適用）
- 遊離色素 IR 700 の *in vitro* 遺伝毒性試験として小核試験及び復帰突然変異試験（Ames 試験）
- 遊離色素 IR 700 の *in vivo* 遺伝毒性試験としてラットにおける小核試験（GLP 適用）

ヒトとカニクイザルの EGFR が 99%の配列相同性を示すこと、抗体セツキシマブがヒトの EGFR と同等の力価でサルの EGFR に結合することから、RM-1929 の非臨床安全性評価のためにカニクイザルを選択した。また、FDA より遊離色素 IR 700 の毒性試験に用いる動物として要求されたラットも使用した。

RM-1929 の安全性薬理試験はカニクイザル単回投与 GLP 適用毒性試験の安全性評価項目の一部として組み込み、目視による呼吸数、心電図（ECG）、及び神経行動の変化（運動及び行動等の症状観察）を測定した。

IR 700 のラットにおける毒性試験は、無毒性量（NOAEL）の推定及び毒性発現量を含めるように計画した。IR 700 の NOAEL における曝露量に基づき、RM-1929 をヒトに投与する場合に対して、色素に関連する毒性から安全域を求めた。RM-1929 のカニクイザルにおける毒性試験は投与可能な最大用量（MFD）までの用量漸増で実施し、RM-1929 と抗体（セツキシマブ）の毒性及び薬物動態（PK）の比較解析を行うため、色素に結合していないセツキシマブの単独投与による比較対照群を設けた。ヒト初回投与（FIH）量は、抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（ICH S9 ガイドライン、薬食審査発 0604 第 1 号［平成 22 年 6 月 4 日］）に従い、サルの GLP 適用試験における NOAEL

の 1/6 量を設定した。トキシコキネティクス（TK）解析は、RM-1929 の PK プロファイルを推定するため、並びにヒト曝露量推定のアロメトリックスケーリングを使用するために実施された。第 I 相臨床試験（パート 1）の漸増用量コホートについても、薬効の最適化のため、及びカニクイザルの NOAEL での曝露量に基づく良好な安全域の範囲内で、腫瘍細胞の EGFR の受容体占有を飽和させるのに必要な薬物の曝露量に到達するように選択した。

IR 700 カルボン酸体（IR 700-CO_2）の遺伝毒性は *in vitro* 小核試験及び Ames 試験、並びにラットにおける *in vivo* 小核試験で評価した。

In vitro 小核試験では、IR 700-CO_2 を外来性代謝活性化系存在下及び非存在下でヒト末梢血リンパ球と短時間（4 時間）及び長時間（24 時間）インキュベートしたとき、小核誘発性について検討した。細菌を用いる Ames 試験では、試験菌株としてネズミチフス菌株 TA1537、TA98、TA100 及び TA1535、並びに大腸菌株 WP2 *uvrA* を用いて IR 700-CO_2 の変異原性を検討した。光による励起状態でない場合の変異原性試験は、IR 700-CO_2 を 100～5000 μg/plate の用量範囲で実施し、光による励起状態での変異原性試験は、IR 700-CO_2 の 2.5～500 μg/plate の用量で実施した。光照射されたプレートは（患者が光に一日中曝露した条件を想定し）LED 照明を 30 分間照射した場合に 5000 K の色温度から約 37,000 ルクスの光に曝露された。Aroclor™ 1254 で誘導したラット肝臓の S9 代謝活性化系の存在下及び非存在下で各用量 3 回実施した。

In vivo 小核試験では、IR 700-CO_2 を 2 日間静脈内（急速緩徐）投与した後、ラット骨髄における多染性赤血球の小核誘発性について評価した。小核試験における評価試験の投与条件を決めるために用量設定試験を実施した。評価試験では骨髄穿刺液を採取し、多染性赤血球での IR 700-CO_2 の小核誘発性を検討した。また、評価試験では TK 評価群を追加した。

EGFR の発現パターンと RM-1929 の組織分布が一致するか検討するために、カニクイザルを用いた GLP 適用毒性試験に投与後 3 及び 15 日の組織内分布試験を含めた。遊離体の IR 700 及び RM-1929 に結合している IR 700 の両方を検出するために蛍光発色を基礎とした測定法を開発した。これらの測定法は、採取した組織中、組織ホモジネート、無処理組織切片標本における薬物の評価に適用した。組織内分布試験により、投与後の組織への蓄積性を理解することができ、EGFR との相互作用に基づく分布予想との違いを確認することができる。

ASP-1929 をカニクイザルに単回投与し、光照射したときの皮膚光毒性を検討した。皮膚への光照射による皮膚光毒性を評価するため、ASP-1929 の臨床試験で使われたレーザ（Omicron Laserage; PIT690.4-2500）と同一のレーザを用いて、臨床試験での光フルエン

スと同一のもので波長 690 nm の非熱性赤色光で 50 J/cm^2 の光量を、剃毛した動物の正常な皮膚の一画に照射した。評価項目は、TK、臨床徴候の観察、動物の生死及び切迫屠殺の確認、体重、摂餌量、眼科検査、血清生化学的検査、血液検査、凝固系検査、尿検査、並びに光照射した皮膚の観察とした。加えて、光照射及び非照射の皮膚の生検で病理組織学的検査を十分に行った。加えて、セツキシマブと IR 700 との結合物及び IR 700 の濃度測定のため、バリデートされた蛍光 HPLC-SEC アッセイを用いて TK 評価を実施した。

全ての主な試験は GLP に準拠して実施された。表 1 に RM-1929、ASP-1929 及び遊離色素 IR 700 を用いた非臨床試験の概要を示す。

表 1　実施した RM-1929 の非臨床試験概要

Study Number	Type of Study	Test System	Method of Administration	GLP
Pharmacology				
SR-RM1929-P001	ELISA binding assay human EGFR	Recombinant human EGFR (extracellular domain)	*In Vitro*	No
SR-RM1929-P002	Microscopic observation of PIT killing with RM-1929	A431 cells (human epidermoid carcinoma) NIH 3T3 mouse embryo fibroblast cell line	*In Vitro*	No
SR-RM1929-P003	RM-1929 interaction with EGFR in cells	BxPC3 (human pancreas adenocarcinoma)	*In Vitro*	No
SR-RM1929-P004	PIT therapeutic window: RM-1929 bound and unbound to cellular EGFR	BxPC3 (human pancreas adenocarcinoma)	*In Vitro*	No
SR-RM1929-P005	RM-1929 mediated PIT: dose dependence on light fluence and power	BxPC3 (human pancreas adenocarcinoma)	*In Vitro*	No
SR-RM1929-P006	RM-1929 mediated PIT: dose dependence on light energy and drug concentration	BxPC3 (human pancreas adenocarcinoma)	*In Vitro*	No
SR-RM1929-P007	RM-1929 mediated PIT: dependence on antigen levels and cell killing of Head and Neck cancer cells	A431 cells (human epidermoid carcinoma) BxPC3 (human pancreas adenocarcinoma) FaDu (human hypopharyngeal tumor cells) SCC-15 (human squamous cell carcinomas)	*In Vitro*	No
SR-RM1929-P008	RM-1929 mediated PIT: dependence on dye: antibody ratio (DAR)	BxPC3 (human pancreas adenocarcinoma)	*In Vitro*	No
SR-RM1929-P009	RM-1929 Binding K_d to Human and Monkey EGFR	Recombinant human and Rhesus EGFR (extracellular domain)	*In Vitro*	No

2.4 非臨床試験の概括評価

Study Number	Type of Study	Test System	Method of Administration	GLP
SR-RM1929-P010	RM-1929 activation of ADCC activity	A431 cells (human epidermoid carcinoma)	*In Vitro*	No
SR-RM1929-P011	RM-1929 inhibition of EGFR mediated cell proliferation	FaDu (human hypopharyngeal tumor cells)	*In Vitro*	No
SR-RM1929-P012	RM-1929 inhibition of EGFR signaling	FaDu (human hypopharyngeal tumor cells) A431 cells (human epidermoid carcinoma)	*In Vitro*	No
SR-RM1929-P013	RM-1929 mediated PIT: anticancer activity in mouse Xenografts	*In vivo*, orthotopic, pancreas, mouse Xenograft BxPC3 (human pancreas adenocarcinoma)	IV injection as solution in PBS	No
SR-RM1929-P014	RM-1929 mediated PIT as adjuvant to surgery in mouse Xenografts	*In vivo*, orthotopic, pancreas, mouse Xenograft BxPC3 (human pancreas adenocarcinoma)	IV injection as solution in PBS	No
SR-RM1929-P015	RM-1929 mediated PIT utilizing the clinical laser (ML7710-690-ASP): anticancer activity in mouse Xenografts	*In vivo*, subcutaneous, pancreas, mouse Xenograft BxPC3 (human pancreas adenocarcinoma)	IV injection as solution in PBS	No
SR-RM1929-P016	Evaluation of 690 nm light penetration through “phantom” tissue	Phantom Tissues	NA	No
11286	Safety Pharmacology	Monkey / Cynomolgus	IV infusion	Yes
Pharmacokinetics				
EB10-039-016C	Toxicokinetics	Rat / Sprague Dawley	IV	No
20065734/ASPY-0927A	Toxicokinetics	Rat / Sprague Dawley	IV	Yes
11108	Toxicokinetics	Monkey / Cynomolgus	IV infusion	No
11286	Toxicokinetics	Monkey / Cynomolgus	IV infusion	Yes
11286	Biodistribution	Monkey / Cynomolgus	IV infusion	No
Toxicology				
EB10-039-016C	Single-dose toxicity	Rat / Sprague Dawley	IV	No
20065734/ASPY-0927A	Single-dose toxicity	Rat / Sprague Dawley	IV	Yes
11108	Single-dose toxicity	Monkey / Cynomolgus	IV infusion	No
11286	Single-dose toxicity	Monkey / Cynomolgus	IV infusion	Yes
01302001	*In vitro* Ames bacterial reverse mutation assay	Four tester strains of Salmonella typhimurium (TA1537, TA98, TA100, and TA1535) and 1 *Escherichia coli* strain (WP2 *uvrA*)	N/A	Yes
01302002	*In vitro* micronucleus assay	Cultured human peripheral blood lymphocytes	N/A	Yes
01302003	*In vivo* micronucleus assay	Rat / Sprague Dawley	IV (Bolus)	Yes

2.4 非臨床試験の概括評価

Study Number	Type of Study	Test System	Method of Administration	GLP
1119-5883	Single-dose skin phototoxicity	Monkey / Cynomolgus	IV infusion	Yes

2. 薬理試験

2.1 効力を裏付ける試験

2.1.1 *In vitro* 試験

In vitro 薬理試験は、参考標準としてのロット及びサル GLP 適用毒性試験で使用したロットを含む、ミリグラムから数グラムの種々の製造スケール及び製剤ロットの RM-1929 で実施した。*In vitro* 薬理試験は、FaDu（ヒト下咽頭がん細胞株）及び SCC-15（ヒト扁平上皮がん細胞株）といったヒト HNC 細胞株、A431（ヒト類上皮がん細胞株）、並びに BxPC3（膵臓腺がん細胞株）を含む、EGFR を発現している ATCC®から入手した種々のがん細胞株を使用した。*In vitro* 試験の光照射は、細胞培養液の表面照射にフロンタルディフューザーを介して 690 nm の単色発光ダイオード（LED）及びレーザ装置を使用して実施した。

2.1.1.1 セツキシマブと比較した場合の EGFR に対する結合親和性及び機能調節

一連の *in vitro* 試験では、EGFR の相互作用及びその調節に関係していると考えるセツキシマブと IR 700 色素の複合体の潜在的影響を評価した。これらの試験からは、セツキシマブと IR 700 色素の複合体が抗原である EGFR と結合する抗体の親和性を顕著に変化させず、EGFR に関係した機能調節の効果又は効能にも影響を及ぼさないことが明らかとなった。

精製ヒト細胞外ドメイン EGFR への結合を測定する酵素結合免疫吸着測定（ELISA）法、及び K_d 値を測定するために抗原-IgG 相互作用の *in vitro* 結合キネティクスが得られる ForteBio Octet プラットフォームを用いて結合試験を実施した。また、ヒト及びアカゲザルの両方の細胞外 EGFR タンパク質を用いて実施した。ELISA 法を用いた試験では、参考標準としてのロット及びサル GLP 適用毒性試験で使用したロットを含めた 3 ロットの RM-1929 及びセツキシマブは実質的に同一の 50%最大結合親和性を達成する有効濃度（EC_{50}）値を示した（RM-1929：22.5、21.4、及び 19.6 ng/mL、セツキシマブ：22.7 ng/mL）。

ForteBio 試験で測定した結果、参考標準としてのロット及びサル GLP 適用毒性試験で使用したロット及び臨床治験用を含めた 3 ロットの RM-1929 は実質的に同一の解離定数（K_d）を示し、それぞれ、149 ± 46、107 ± 20、及び 150 ± 0.6 pM であった。このことから、ロット間での優れた一貫性が示された。セツキシマブの親和性は僅かに低く、K_d 値は 582 ± 112 pM であった。しかし、解離速度定数（K_{off}）は 3 ロットの RM-1929（それ

ぞれ、4.95 ± 1.02、3.31 ± 0.93、及び 4.10 ± 0.33 1/s ×10^{-4}）及びセツキシマブ（5.17 ± 3.49 1/s ×10^{-4}）で基本的に同一であった。こうした結果から、抗体に対する色素の結合は、ヒト EGFR との相互作用において顕著な熱力学的変更を行わないことが示された。

セツキシマブに結合した IR 700 が EGFR 依存性の細胞シグナル伝達を阻害する活性を有するかを評価するために、EGF による EGFR 自己リン酸化に対する阻害作用を測定した。A431 細胞及び FaDu 細胞を用いた ELISA 試験で、EGFR 自己リン酸化を妨げる RM-1929 の活性強度及び有効性はセツキシマブと比較して同一であることが示された。RM-1929 は 500 ng/mL の濃度で A431 細胞及び FaDu 細胞に対し、それぞれ、～50%及び～70%の阻害活性を示し、セツキシマブはそれぞれ、～30%及び～70%の阻害活性を示した。同様に、RM-1929 は FaDu 細胞の EGFR を介した細胞増殖を阻害し、その EC_{50} 値は 35.7 ng/mL であり、セツキシマブは 42.7 ng/mL であった。

RM-1929 は ADCC 活性を示したが、細胞毒性作用はセツキシマブ抗体単独と比較して顕著ではなかった；このことは恐らく、セツキシマブの Fc ドメインに色素が結合していることにより T 細胞との相互作用が減弱していることが原因と思われる。サル GLP 適用毒性試験で使用したロットを含めた 3 ロットで試験を実施した結果、最大効果はセツキシマブの 56～65%しか到達しなかったが、実質的に同一の EC_{50} 値であった（RM-1929：14.1、16.1、15.5 ng/mL、セツキシマブ：10.9 ng/mL）。

全体として、RM-1929 製剤は、セツキシマブの有効性と機能性を維持し、その差は非常に僅かであった。RM-1929 の *in vivo* 薬理作用は、EGFR との相互作用に関与しており、セツキシマブと同程度であることが期待される。

2.1.1.2 作用機序及び薬理作用

がん細胞に対する殺細胞作用を誘導する RM-1929 を介した本治療の作用機序及び *in vitro* 薬理作用を解析するために *in vitro* 試験を実施した。本試験では以下の点を評価した：（i）細胞死を誘導する機序として抗原 EGFR を発現する細胞に対する作用特異性及び細胞膜に対する作用特異性の評価、（ii）光照射の光フルエンス及び出力密度の用量依存性、（iii）690 nm の光照射時に殺細胞作用を誘導するのに細胞上の EGFR と RM-1929 の結合の必要性、及び RM-1929 が細胞に結合していない場合と比較して結合している場合の RM-1929 の薬理作用の相対強度、（iv）RM-1929 濃度及び光フルエンスの用量依存性及び相互依存性、（v）HNC 細胞株に殺細胞作用を誘導させる用量効果と最大効果の分析を含む活性強度と抗原発現レベルとの相関、及び（vi）本治療における RM-1929 の最大活性を誘導するのに、抗体に対する色素の最適な比率の評価。

2.4 非臨床試験の概括評価

EGFR を発現している細胞（A431）及び発現していない細胞（NIH/3T3-HER2^{+}）を混合培養した結果、RM-1929 は EGFR を発現している細胞にのみ結合し、690 nm の光照射は RM-1929 の結合した A431 細胞にのみ殺細胞作用を誘導し、NIH/3T3-HER2^{+}細胞は無傷の状態を維持していることが判明した。本試験結果から、RM-1929 を介した本治療には EGFR を発現している細胞にのみ作用を及ぼす特異的な活性が示された。また、本治療による細胞死は、RM-1929 が結合した細胞にのみ誘導される光照射時細胞膜破壊と相関していること、及びその細胞死のプロセスは光照射後 1.5 時間未満に速やかに広範に伝達されることも示された。

RM-1929 を介した本治療は光フルエンス（J/cm^2）の用量依存性に EGFR を発現している細胞に対して殺細胞作用を誘導したが、光出力／光フルエンス比率（mW/cm^2）には依存しなかった。その比率値が 50、150、及び 200 mW/cm^2 の場合の ED_{50} 値は、それぞれ、7.7、8.9、及び 9.3 J/cm^2 であった。

比較的高い EGFR 発現レベルの細胞では殺細胞作用を誘導するのに比較的低いレベルの光フルエンスしか必要としない傾向が認められるので、RM-1929 を介した本治療の相対活性強度は EGFR の発現レベルに依存すると考えた。例えば、A431 細胞は高レベルの EGFR（～140 万の結合部位）を細胞表面に発現していて、50%の殺細胞効果を達成するのに 1.4 J/cm^2 の光フルエンスが必要となる一方、40 万から 60 万の結合部位を発現している細胞（BxPC3、FaDu、及び SCC-15）ではそれぞれ、7.8、7.0、及び 13.8 J/cm^2 の光フルエンスが必要となる。この結果から、殺細胞作用を達成するのに必要な光フルエンスは細胞表面に結合している RM-1929 量に依存することが示された。本コンセプトは RM-1929 濃度に応じた本治療の作用の用量依存性で確認された。細胞表面の EGFR が RM-1929 により完全に占有された場合に本治療の作用は最大（活性が強いほど、50%の殺細胞作用に必要な光フルエンスレベルは低下）となる。

こうした試験結果から、RM-1929 を介した本治療の作用を最適化するのに重要な 2 つのパラメータは薬剤用量及び光フルエンスであることが明確に示された。最適な薬剤用量は腫瘍内での EGFR が RM-1929 により完全に占有されることが必要であり、同時に完全な殺細胞作用を誘導するのに光フルエンスは最適化される必要がある。そして、最適な薬剤用量はがん細胞での EGFR 発現レベルに依存し、その発現レベルは腫瘍ごとに固有であるため、細胞種によって変動するため最適化できないと考える。こうしたコンセプトは第 I 相臨床試験に組み込まれ、そのパート 1 では MFD に到達する RM-1929 の用量を測定した。MFD とはヒトにおいて EGFR が完全に占有され得る予想曝露範囲（投与後無限時間までの濃度-時間曲線下面積［AUC_{inf}］レベルが 12,000 μg·h/mL と 24,000 μg·h/mL の間）と定義され、ヒトにおいて EGFR が完全に占有されるのに必要なセ

ツキシマブの曝露量から決定された[2]。第 I 相臨床試験のパート 2 では、効果的な腫瘍破壊に必要な光フルエンスを最適化した。

追加の *in vitro* 薬理試験結果から、RM-1929 を介した本治療の作用機序は細胞表面の EGFR との結合に依存していることが示された。非標識のセツキシマブ又は他の抗 EGFR 抗体（パニツムマブ）は、がん細胞との結合で RM-1929 と完全に置き換わることが可能で、本治療による殺細胞作用を完全に妨げることが可能である。これに反し、EGFR に結合しない、他の IgG1 モノクローナル抗体には RM-1929 を介した本治療による殺細胞作用を妨げる作用は認められなかった。重要なことは、本試験は RM-1929 が細胞に結合した場合と結合していないが細胞周囲の細胞培養媒体中に存在する場合の RM-1929 の相対強度を評価するために実施された点である。細胞に結合した場合又は結合していない場合に本治療による殺細胞作用を発揮するのに必要な RM-1929 の相対量を滴定した結果、その活性強度に 10,000 倍（4 ログ）を超える活性シフトが認められ、結合している場合の EC_{50} 値は 14 及び 23 ng/mL（それぞれ 32 及び 16 J/cm^2 の条件で）を示し、結合せずに細胞培養媒体中に存在する場合の EC_{50} 値は 177,600 及び 351,900 ng/mL（それぞれ 32 及び 16 J/cm^2 の条件で）を示した。本試験結果から、細胞の EGFR に結合している RM-1929 と比較して結合していない RM-1929 は本治療の活性が非常に弱いこと及びこのことが RM-1929 の殺細胞作用の特異性をもたらしていることが示された。このコンセプトは異種移植された腫瘍及びその周囲の組織を、RM-1929 を介した本治療処置を実施した動物から採取して組織検査を用いて *in vivo* で確認された（後述）。

2.1.1.3 RM-1929：本治療のための抗体に対する色素の最適な比率

1 抗体当たり、1.3、2.7、3.8 の色素の比率といった、抗体に対する色素の種々の比率（DAR）を有する RM-1929 複合体を用いて本試験を実施した。これら複合体の相対強度から、1 抗体当たり 2 から 3 の色素の比率が最適の範囲であることが示唆された。例えば、DAR レベルを 2 より減少させると、DAR が 1.3 では明らかに活性が低下し、EC_{50} 値は 12.4 J/cm^2 であった一方で、DAR が 2.7 及び 3.8 の複合体の BxPC3 細胞を用いた EC_{50} 値は実質的に同一（7.8 及び 7.3 J/cm^2）であることから、結合した色素の比率を 3 より増加しても RM-1929 の活性は増加しないことを示している。

2.1.1.4 組織での 690 nm の光透過性

生体系での 690 nm の光の浸透度の有効範囲を評価するために、タンパク質、脂質、及びヘモグロビンの混合物を含有するファントム組織サンプルを本試験で使用し、生体組織で予想される、光の吸収と分散を再現した。ファントム組織サンプルは厚さ最大 1 cm となるように設定された。予期されたように、光透過性は指数関数的に組織の深度に応

じて減衰した。また、1 cm の深度で 690 nm の線形な光透過性はメトグロブリン及びアジ化物-メトグロブリンを含有するサンプルに対して、それぞれ 8%及び 6%であった。

光源から 250 J/cm^2 の光が照射されるときに 1 cm の深度で光フルエンスは約 15～20 J/cm^2 に達し得る。RM-1929 を介した本治療によるがん細胞株に対する薬理作用に基づいて、こうした光フルエンスの範囲で広範ながん細胞に対しての殺細胞作用を示し得る。

2.1.2 *In vivo* 試験

In vivo 薬理試験では、免疫不全マウスである、nu/nu、BALB/c 系統マウスに BxPC3 腫瘍を同所性に皮下へ異種移植するモデルを使用して実施した。がん細胞及び腫瘍への光照射は、690 nm の LED 及び単色レーザ装置を使用して実施した。単色レーザ装置には表面及び組織内照射用にシリンドリカルディフューザー及びフロンタルディフューザーを装着した。

BxPC3 膵臓腺がん細胞は HNC（例えば、FaDu 及び SCC-15）由来のヒトがん細胞で検出されるレベルと類似の EGFR を発現しており、RM-1929 を介した本治療により容易に殺細胞作用を受けるが、その細胞増殖は *in vitro* で EGFR 阻害の影響を受けないため本試験用に選択された。腫瘍量を測定するために、緑色蛍光タンパク質（GFP）が発現するように BxPC3 細胞を改変し、*in vivo* での蛍光表示を利用して検出した。

異種移植モデルマウスに同所性に BxPC3 膵臓腺がん細胞を移植して、RM-1929 を単回投与して腫瘍に単回光照射した場合の本治療抗がん活性を評価するため試験を実施した。

処置群の動物には 100 µg の RM-1929 を投与し、対照群の動物には媒体を投与した。光照射は薬剤投与 24 時間後に 250 J/cm^2 の 690 nm 光表面照射を 150 mW/cm^2 で実施した。

本治療処置の有効性は対照群と比較して処置後の腫瘍退縮及び 8 週間の腫瘍増殖の減少として評価した。対照群の動物と比較して、RM-1929 を投与した動物には本治療処置 1 週間後（処置後最初の測定時点）に迅速な腫瘍の縮小が認められ、腫瘍の増殖は投与後 8 週間まで大幅に遅延した。本試験結果から、1 サイクルの薬剤投与及び光照射には、腫瘍縮小及び腫瘍増殖に対して顕著な抗がん作用が認められた。

本治療処置に対する抗がん作用が非常に強力であった場合でも、マウスの異種移植片内での BxPC3 細胞の増殖がとても速いので、処置数週間後に腫瘍の再発が観察された。

本治療を用いて腫瘍を完全に根絶するためには 2 サイクル以上の処置が必要であると想定するのは合理的である。実際、第 I 相臨床試験のパート 2 実施中に、初回の光照射

で根絶されなかったがん遺残細胞に対する殺細胞作用を亢進させるために、2 サイクル以上の治療を行った。

外科的切除に対するアジュバントとしても RM-1929 を介した本治療の *in vivo* 抗がん作用の試験を実施した。本試験の根拠は、外科的切除直後に本治療処置を併用することにより、がん遺残細胞を根絶して腫瘍の再発が防止されるかを示すことである。マウス同所性膵臓異種移植モデルは BxPC3 細胞を免疫不全胸腺欠損（nu/nu）マウスの膵臓に移植して確立した。このマウスに 50 µg の RM-1929（処置群）又は媒体（対照群）を投与した。薬剤投与 24 時間後腫瘍を外科的に切除し、切除後に残った組織に表面照射を利用して 250 J/cm^2 で 690 nm の光を 150 mW/cm^2 で照射した。腫瘍の再発は手術 8 週間後まで GFP 蛍光表示を用いて追跡した。手術と溶媒のみで処置した動物には広範な腫瘍再発が認められたが、手術と本治療（RM-1929 を投与）で処置された動物は手術 8 週間後まで検出限界ぎりぎり又は検出できないほどの腫瘍再発しか認められなかった。本試験結果により、局所に限定したがんに対する処置の効果を最大化するために外科的切除に本治療を併用することの潜在的医療価値が例示された。

組織内照射で使用されるシリンドリカルディフューザーを接続した、臨床用レーザ装置 ML7710-690-ASP を評価するために皮下異種移植モデルを用いて追加の *in vivo* 試験を実施した。本治療処置した腫瘍及び周囲の正常組織の病理組織学的検査により、*in vivo* での殺細胞作用及び非腫瘍組織への影響の可能性を測定して、本治療処置のがん特異性も本試験において評価した。BxPC3 から誘導された腫瘍は、胸腺欠損（nu/nu）マウスの左右の横腹に生着した。腫瘍は処置した日にカリバスで測定して 10 mm の長さにまで拡大していた。各マウスに 100 µg の RM-1929 を静脈内投与した。光照射を予定している時間である、薬剤投与 24 時間後に RM-1929 が適切に腫瘍を標的としていることを保障するため、薬剤投与 24 時間後の RM-1929 の腫瘍への集積はセツキシマブに接合した IR 700 の蛍光をモニターすることにより確認した。RM-1929 投与約 24 時間後、右横腹の腫瘍に 690 nm の光を 300 J/cm 又は 100 J/cm の光フルエンスで、また 400 mW/cm の出力密度で組織内照射した。左横腹の腫瘍には光を照射せず、対照群として用いた。RM-1929 投与だけでは、腫瘍量（すなわち、GFP 蛍光）に影響を及ぼさなかったが、光照射直後には強力な抗がん作用が、いずれの光フルエンスで照射された全腫瘍に対しても確認された。GFP レベルの減少は、光照射 3 日後に動物を処分するまで維持された。処分後、腫瘍及び隣接した組織（皮膚及び筋肉）を切除し、ホルマリンで固定した。GFP 免疫組織（IHC）染色及び標準的なヘマトキシリン・エオシン（H&E）組織染色を実施するため、固定化したパラフィン包埋切片をスライドガラスに貼付した。H&E 組織染色はネクローシス及び損傷を受けた組織の形態を示すために実施した。ヘマトキシリン色素は細胞核を青色に染め、エオシン色素は、血球細胞、皮膚及び筋肉といった他の組織構造

をそれぞれピンク色、オレンジ色及び赤色に染めた。本治療処置後に BxPC3 がん細胞が根絶されているかを評価するために GFP 染色を実施した。

全体的に、対照群（左腫瘍）と比較して本治療（右腫瘍）処置後に腫瘍細胞及び細胞外マトリックス（ECM）に対する損傷が試験で確認された。本結果は、腫瘍内で光毒性薬剤を活性化することで想定される組織損傷と一致していた。

本治療処置した腫瘍の H&E 染色切片からは、対照群の腫瘍と比較して ECM の断片化及び分離、ECM の空胞化、細胞質膜及び細胞の円形度の欠損が認められた。IHC 染色切片からは、対照群の腫瘍と比較して ECM の断片化及び分離、細胞の円形度及び細胞質膜の欠損、及び GFP 茶色染色の顕著な欠損が確認された。皮膚及び筋肉を含む周囲の組織の形態が対照（左横腹）及び処置された腫瘍（右横腹）の両方とも無傷であったことから、本治療処置後の周囲の組織に損傷は認められないことが示された。

より詳細には、左の対照の腫瘍と比較して、300 J/cm で本治療により処置した右の腫瘍では GFP の茶色染色は完全に消失し、このことから BxPC3-GFP^{+}がん細胞が完全に根絶されたことが示された。壊死の特徴が右の腫瘍で確認されたが、皮膚及び筋肉の構成要素に組織学的な変化は示されず、損傷は確認されなかった。100 J/cm 処置群の腫瘍は処置後に壊死の特徴を示したが、皮膚や脂肪組織又は筋肉といった周辺組織では損傷は確認されなかった。この低光フルエンスでは、円形細胞集塊及び GFP の茶色染色が明示されているように、腫瘍組織内で生存がん細胞が 40%維持されていた。

300 J/cm の光フルエンスは以下のことが想定される光フルエンス範囲であることが本試験結果から示唆された：非がん性正常組織には検出され得るような損傷は及ぼさず、がん特異性を維持しながら、広範な腫瘍に対する殺細胞作用を 1 cm の深度まで発揮する。低光フルエンスの 100 J/cm では、腫瘍に対して発揮する殺細胞作用は部分的であることから、本光フルエンスでは組織内光照射に最適のフルエンスレベルを下回ることが示された。

2.2 安全性薬理試験

安全性薬理試験のパラメータをサル単回投与 GLP 適用毒性試験に組み込んで実施した（4.1.2）。神経行動機能（運動及び行動の変化について毎日症状観察）、心血管機能（ECG 検査）、及び呼吸機能（目測による呼吸数）に対する RM-1929 の潜在的効果について評価した。ECG（3 誘導）及び呼吸数は試験 1 日目の投与約 1～2 時間後、試験 15 日目、及び試験終了日の 28 日目に評価した：症状観察時に一般神経行動機能における変化を確認した。神経行動機能（運動、行動及び理学的検査により測定）、ECG 及び呼吸数

には処置に関連した影響を示す証跡は認められず、いずれの用量においても皮膚への影響は認められなかった。

3. 薬物動態試験

3.1 トキシコキネティクス

RM-1929 の非臨床試験は、臨床試験における単回静脈内（IV）投与をサポートするために計画された。RM-1929 の TK は、カニクイザルに単回 IV 投与して検討し、遊離色素 IR 700 の TK は、Sprague-Dawley（SD）ラットに単回 IV 投与して検討した。血清中の RM-1929、遊離色素 IR 700 又はセツキシマブを測定するために多くのバリデートした測定法を用いた。RM-1929 は、ELISA 法及びセツキシマブが結合した色素 IR 700 の内因性蛍光 700 nm を検出波長とするサイズ排除高速液体クロマトグラフィー（HPLC-SEC）法で定量した。セツキシマブは ELISA 法で定量し、遊離色素 IR 700 はサルにおいて 700 nm を検出波長とする HPLC-SEC 法で、ラットでは 700 nm を検出波長とする逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC-RP）法で定量した。

全般的に、サル単回 GLP 試験において、投与量 40～80 mg/kg で RM-1929 の曝露（AUC_{inf}）は僅かに投与量比例性を上回る増加を示し、半減期（$T_{1/2}$）は中程度（約 30～57 時間）であった。ELISA 法及び HPLC-SEC 法で求めた RM-1929 の TK パラメータは類似していた。雄性及び雌性動物において、RM-1929 の投与量が 40 から 80 mg/kg に増加したとき C_{max}（最高濃度）はそれぞれ 1.7 及び 1.3 倍に増加した。投与後 24 時間までの濃度-時間曲線下面積（AUC_{0-24}）は雌雄動物で 1.9～2. 0 倍であった。しかし、定量可能な最終時点までの濃度-時間曲線下面積（AUC_{last}）及び AUC_{inf} は雌雄動物でそれぞれ 2.7 及び 2.9 倍、並びに 2.5 及び 2. 7 倍であった。クリアランス（CL）は試験した投与量範囲において雌雄動物で類似しており、80 mg/kg 投与時の CL は、40 mg/kg 投与時の推定 CL より僅かに減少する傾向がみられた。

セツキシマブを 16 mg/kg 単回 IV 投与したとき、雌雄動物の TK プロファイル（ELISA 法で測定）は類似していた。RM-1929 の低及び高投与量群と比べると、この投与群におけるセツキシマブの CL は、緩徐（雄性及び雌性動物でそれぞれ 0.47 及び 0.54 mL/h/kg）であるため、RM-1929 の低及び高投与量群と比べると長い $T_{1/2}$ 及び大きな曝露量を示した。RM-1929 の低及び高投与量群と比べ、セツキシマブ 16 mg/kg 投与群の分布容積は小さかった。まとめると、雌雄動物のカニクイザルにおいて、セツキシマブ投与群に比較して RM-1929 投与群では検討した投与量において、大きな CL、大きな分布容積、短い $T_{1/2}$ 及び小さい総曝露量（濃度-時間曲線下面積［AUC］）を示し、雌雄動物のカニクイ

ザルにおける GLP 適用 TK 解析において RM-1929 とセツキシマブで異なった TK パラメータが示された。

40 mg/kg 投与後 4 時間を超えると血清中遊離色素 IR 700 濃度は定量下限未満（BLOQ）となり、80 mg/kg 投与後では 4 から 8 時間を超えると BLOQ であった。測定可能な遊離色素濃度が低いため、得られた TK プロファイルは限定的であった。一般に、遊離色素は大きな分布容積と迅速な CL を持ち、測定された遊離色素の濃度は非常に低く投与後の早い時間に測定された。

遊離色素の迅速な CL は、ラットに IR 700-CO_2 を単回 IV 投与した TK 試験でも示されている。IR 700-CO_2 濃度は投与後 1 分から 6 時間まで検出された。IR 700-CO_2 の曝露量（AUC_{inf}）は一般的に投与量 10 から 100 mg/kg の間でほぼ投与量相関的に増加し、C_{max} は 10 から 100 mg/kg の間で投与量比例性を下回る増加を示した。血清中最高濃度に達した後、IR 700-CO_2 は $T_{1/2}$ 1.3～1.7 時間で双指数関数的に減少した。CL と分布容積はそれぞれ 117～169 mL/h/kg、283～356 mL/kg であった。C_{max} 及び AUC_{inf} に雌雄差は無かった。

このデータより、RM-1929 複合体から色素が遊離し体内に放出されたとき、曝露量は低く CL は速く腎クリアランスが排泄経路となることが示された。

3.2 分布

RM-1929 を用いて分布試験を実施した。RM-1929 の組織内分布は、GLP サル単回投与試験（4.1.2 項）の 1 部として実施した。組織内分布試験は GLP 非適用試験であるが、試験は実施計画書と測定用コントロールが完成した後に行った。

雌雄動物各 2 匹で 40 mg/kg 投与は投与後 3 日まで、80 mg/kg 投与では投与後 15 日まで RM-1929 の組織内分布試験を検討した。遊離色素 IR 700 及び RM-1929 の分布及び濃度は、以下の 3 種の測定法で測定した：1）組織の無処置断片の 700 nm での蛍光分析；2）同じ組織断片のホモジネート試料のゲル電気泳動後の 700 nm の蛍光スキャン；3）組織切片の 700 nm の蛍光イメージング。既知濃度の RM-1929 と蛍光レベルをプロットした検量線は、組織中蛍光強度を RM-1929 の μg 量に換算するために使用し、その際、組織重量補正（～20 mg）及び RM-1929 の総投与量補正（単位重量当たりの投与量パーセントを得るため）をした。

要約すると、蛍光のレベル及び局在は無処置組織で検出可能であり、カニクイザルに RM-1929（40 又は 80 mg/kg）単回投与後 3 日及び 15 日の組織の無処置断片、同じ組織に対応するホモジネート試料及び組織切片間で相関していた。全体的に、検出された蛍光の分布は予想される EGFR 発現組織パターンと一致し、蛍光の生体内分布は RM-1929 の EGFR 発現組織への分布に関連していると考えられる。このことは、ゲル電気泳動で組織

に未変化 RM-1929 が検出されることから裏付けられる。検出された RM-1929 の蛍光強度は、既知の EGFR 発現組織レベルと相関した [3), 4), 5), 6), 7)]。

3.3 代謝

RM-1929、セツキシマブ及び IR 700 の代謝試験は実施していない。

3.4 排泄

RM-1929 及びセツキシマブの排泄試験は実施していない。しかし、IR 700-CO_2 を単回投与後の雄性ラットの限られた尿中濃度データ（3 時間）を収集した。この IR 700 のカルボン酸体は、複合体である RM-1929 が血清中のエステラーゼで代謝されたときに体循環中に存在する色素化合物であり、RM-1929 から解離した遊離色素の分布試験にモデル分子として使用された。2.6、7.8 及び 26 mg/kg を単回 IV 投与後の IR 700-CO_2 尿中濃度は、投与量増加と共に増加し、それぞれ 323、659 及び 1979 μg/mL であった。このデータは、腎排泄が遊離色素の排泄に寄与していることを示している。

3.5 薬物動態学的薬物相互作用

RM-1929、セツキシマブ及び IR 700 の薬物動態学的薬物相互作用試験は実施していない。

3.6 ヒトへの外挿及び安全域

GLP 適用下で実施したサル毒性試験の TK 結果は、最初の臨床試験におけるヒトの曝露量推定に用いられた。80 mg/kg を NOAEL とし、ヒトの安全域の計算の基礎を作成する。6 倍の safety margin（mg/kg でスケーリング）としたとき、ヒト等価用量（HED）は 13.33 mg/kg 又は約 540 mg/m^2 である。FIH の用量は、4.1.3 項で示すとおり 12.4 mg/Kg 又は 500 mg/m^2 とした。

RM-1929 のヒト血清における CL を推定するために、サル血清における CL のアロメトリックスケーリングを行った。文献の前例によると、サルの体重及び CL でのタンパク製剤のスケーリングは、一般にヒト CL の予測値が *in vivo* で観察されたヒトの CL の 2 倍以内の結果であった [8)]。以下の計算式を使用した。

$$CL_{human} = CL_{cyno} \times (BW_{human} / BW_{cyno})^{0.8}$$

ここで、BW_{human} はヒトの平均体重（70 kg）、BW_{cyno} は 2.7 kg（11286 試験のサルの平均体重を基にした；4.1.2 項参照）、CL_{cyno} は 80 mg/kg 投与の平均 CL（5.27 mL/h）である。ヒト投与量 500 mg/m^2 において、推定した AUC_{inf} は 12,180 µg·h/mL であり、安全域が約 3.4 倍となった（表 2）。より高投与量の抗体においても、ヒトにおいて PK に線形性があると推定した。

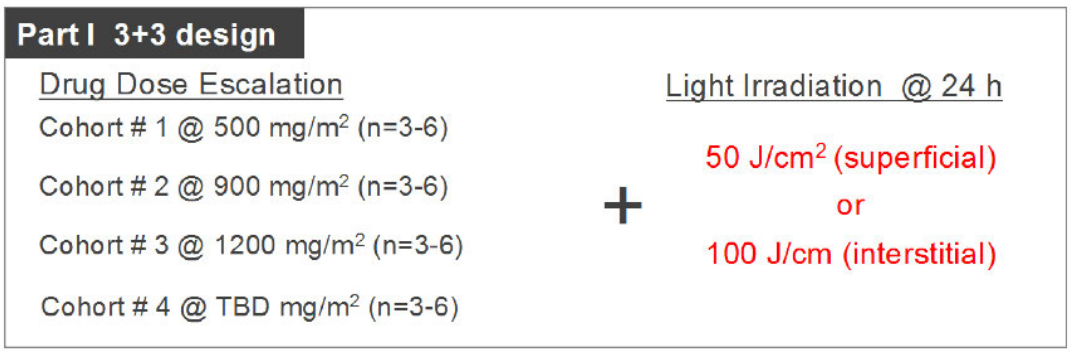
表 2 計画している最初のヒト試験における安全域

Proposed Clinical Human Dose (mg/kg)	Proposed Clinical Human Dose (mg/m^2)[1]	Anticipated Human AUC_{inf} (µg·h/mL)	Safety Margin Based on AUC_{inf} at the Monkey 80 mg/kg Dose
12.4	500	12,180	3.4
22	900	21,873	1.9
30	1200	29,164	1.4

1 Human exposures of RM-1929 are the predicted exposures for a 70-kg human assuming a single dose. Body surface area used 1.73 m^2.

ヒトにおける 12.4 mg/kg 又は 500 mg/m^2 の投与量は、最初のヒト投与量における安全性のいくつかの検討を基にすると、良好な忍容性の認められる投与量であると考えられる。第 I 相臨床試験（パート 1）における用量漸増は図 2 のとおりであった。

図 2 第 1 部コホートの用量漸増計画



4. 毒性試験

4.1 単回投与毒性

ラット及びカニクイザルにおける単回投与毒性試験（GLP 適用及び GLP 非適用）は、計画した臨床試験の実施を裏付けるため、RM-1929 の臨床投与経路である 2 時間の静脈内持続投与で実施した。GLP 適用試験の要約を以下に示す。GLP 非適用試験でも同様な結果が得られた。

4.1.1 SD ラットにおける IR 700 カルボン酸体の単回静脈内投与による毒性試験及び 2 週間回復性試験（GLP 適用）

本 GLP 適用試験では IR 700 のカルボン酸体（IR 700-CO_2）を SD ラットに投与し、色素遊離体の毒性及び TK を評価した。本試験では IR 700-CO_2 を 0（PBS；溶媒対照）、10、30 又は 100 mg/kg の用量で雌雄ラット（雌雄各 10 例）に単回静脈内急速投与し、2 週間の休薬期間を設け回復性試験（雌雄各 5 例）を実施した。高用量（100 mg/kg）は、計画された臨床試験で患者に曝露された IR 700 の最高用量の高倍になるように設定した。全動物の一般状態、体重、摂餌量（定性的）、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査）、器官重量測定、剖検所見及び病理組織学的検査における変化を評価した。加えて、動物の皮膚を連日観察し、投与に関連した皮膚刺激性の徴候を評価した（ケージから動物を取り出し、動物室内光に曝露された剃毛皮膚の観察）。

IR 700-CO_2 を 100 mg/kg の高用量で単回静脈内急速投与した結果、4 例の途中死亡がみられたが（3 例の死亡発見及び 1 例の安楽死）、高用量群 4 例の死因又は早期安楽死の原因は病理組織学的に特定できなかった。投与に関連した変化として、蒼白や青緑色の皮膚及び青色尿が観察されたが、15 日目までに一部又は完全に回復した。活動性低下及び非協調性運動が高用量群の動物にのみ認められたが、回復性試験の動物にこれらの症状は観察されず、完全に回復したことが示唆された。臨床病理学的変化としてアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の上昇のみが認められたが、15 日目までに回復した。病理組織学的変化は高用量群（100 mg/kg 群）の動物のみに観察され、ハーダー腺の炎症及び壊死、眼球後方筋肉の炎症及び変性、褐色脂肪組織の変性、肺静脈炎症及び心筋の炎症及び変性が認められた。回復性試験動物に観察された病理組織学的変化はハーダー腺の再生のみであり（15 日目）、回復過程又はほぼ回復状態であったと考えられ、高用量投与に関連した全ての病理組織学的変化は可逆的又は回復傾向であった。これらの結果より、NOAEL は中間用量の 30 mg/kg であると考えられた。高用量群の動物に途中死亡及び投与に関連する毒性が認められたが、この 100 mg/kg の用量は、計画した臨床試験で患者に曝露された IR 700 の用量をはるかに超えている。実際に、ラットの 100 mg/kg での AUC は、計画した臨床試験における RM-1929 の初回用量 12.4 mg/kg（1.73 m^2 の体表面積からの推定用量の 500 mg/m^2 に相当）での推定最大曝露量より 6,800 倍高いと想定される。すなわち、ラットに IR 700-CO_2 を投与した 100 mg/kg の毒性用量での曝露量は、患者の IR 700 の初回用量における推定最大曝露量をはるかに超えていた。したがって、遊離色素の毒性は RM-1929 のヒト投与及び初回投与量を制限せず、臨床コホートにおける推定安全域は、薬物である RM-1929 の曝露量に基づき推定される。

4.1.2 カニクイザルにおける RM-1929 の単回静脈内持続投与による毒性試験及び TK 試験（GLP 適用）

本試験における RM-1929 の DAR について、セツキシマブ 1 分子に対して IR 700 の色素は 2.9 分子であった。雌雄カニクイザルにリン酸緩衝生理食塩液（PBS、溶媒対照）あるいは RM-1929 を投与量 40 又は 80 mg/kg で単回投与した。投与量 80 mg/kg は、カニクイザルに静脈内持続投与する際に試験施設の動物実験委員会（IACUC）で許容された最大液量（8 mL/kg/h）に基づく投与可能な最高用量であった。加えて、セツキシマブを 16 mg/kg の用量で単回投与し、RM-1929 の毒性プロファイルを（非結合）セツキシマブと比較した。主試験用動物は投与後 15 日目に剖検し、回復性試験用動物（溶媒対照群及び RM-1929 の 80 mg/kg 群のみ）は 28 日目に剖検した。標準的な毒性及び TK の評価項目に加えて、RM-1929 の生体内分布を評価した（3.2 項参照）。試験デザインを表 3 に示す。

表 3　カニクイザルにおける単回投与毒性試験（GLP 適用 [1]）

Group No.	Treatment	Dose (mg/kg)	Approximate Infusion Rate (mL/kg/h)	Animals/Sex Terminated Day 3	Animals/Sex Terminated Day 15	Animals/Sex Terminated Day 28
1	Vehicle Control (PBS)	0	8	—[2]	3M/3F	2M/2F
2	RM-1929	40	4	2M/2F[3]	3M/3F	—[2]
3	RM-1929	80	8	—[2]	3M/3F[4]	2M/2F
4	Cetuximab Alone	16	4	—[2]	3M/3F[4]	—[2]

Note: [1] The biodistribution component of this study was non-GLP.
[2] Dash indicates no animals in this group.
[3] Two animal/sex in Group 2 were designated for biodistribution analysis only and terminated on Day 3 (no safety endpoints were collected from these animals).
[4] Two animals/sex in each Groups 3 and 4 terminated on Day 15 had tissue samples collected for biodistribution analysis and histopathological evaluation. The remaining animals/sex in each group had only tissues for histopathological evaluation taken.

3 日目に剖検した第 2 群の動物を除く全例は、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学検査、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査、尿検査）、器官重量、剖検所見及び病理組織学的検査で変化を評価した。3 日目に剖検した第 2 群の動物を除く全例の皮膚を観察し、試験期間中に皮膚刺激性の症状をモニターした。動物前肢の遠位内側約 5 インチの皮膚パッチを観察し（必要に応じて再度剃毛）、皮膚刺激性の徴候（例：紅斑、乾燥又はひび割れた皮膚、膿疱）を記録した。本試験に安全性薬理の検査項目を取り込み、呼吸機能（目測による呼吸数）、心血管系機能（ECG）、中枢神経系機能への影響を示唆する一般状態の変化（例：運動量や一般行動の症状観察等）を観察した（2.2 項参照）。試験期間中に動物から採血し、セツキシマブ、RM-1929 及び遊離 IR 700 の TK 解析を実施した（3.1 項参照）。

RM-1929 を単回投与した結果、良好な忍容性が認められ、全動物が剖検予定時まで生存した。皮膚の観察（一般状態観察、肉眼病理学的検査、病理組織学的検査）を含むいずれの観察・検査でも投与に関連した変化は認められなかった。心臓の絶対及び相対重量の高値は 15 日目に剖検した RM-1929 の高用量群（80 mg/kg 群）の雌でのみ認められたが（溶媒対照群と比較してそれぞれ 25%及び 15%の高値）、低用量群（40 mg/kg 群）の雌雄及び高用量群の雄、28 日目に剖検した回復性試験群の動物については、心臓の絶対及び相対重量が溶媒対照群と同等であった。セツキシマブ投与群の雌でも心臓の絶対及び相対重量の高値が認められたが（溶媒対照群と比較してそれぞれ 11%及び 10%の高値）、同群の雄ではみられなかった。心臓の絶対及び相対重量の高値は高用量群の雌でのみ認められたが、回復性試験の動物ではみられず、加えて、関連する病理組織学的所見及び ECG に基づく心血管系機能にいずれの動物にも影響がみられなかったことから、心臓の絶対及び相対重量の変化は、RM-1929 又はセツキシマブの単回投与による直接的な影響というよりも偶発的変化の可能性があった。したがって、投与に関連すると考えられる毒性変化はみられなかったことから、本試験における NOAEL は 80 mg/kg であった。

4.1.3 ヒト初回用量の選択及び用量コホート

RM-1929 による腫瘍組織の標的受容体（EGFR）の飽和及び治療効果を確保するため、単回投与による用量漸増の第 I 相臨床試験における初回用量として 12.4 mg/kg（500 mg/m^2）を設定した。サルの投与量 80 mg/kg での CL からのアロメトリックスケーリング及びヒトの CL を予測した結果（Module 2.6.4.9 参照）、ヒトの曝露量は 12,180 µg〇h/mL と推定された。この RM-1929 の曝露量は、ヒトの EGFR を飽和させると報告されるセツキシマブの曝露量に相当すると予測されるので（ヒトにおけるセツキシマブの用量 250 mg/m^2）、ヒト組織（例えば腫瘍組織）での EGFR を完全に占有すると考えられる [2)]。

サルの 80 mg/kg での曝露量は、RM-1929 のヒト用量 12.4 mg/kg（500 mg/m^2）での推定曝露量（AUC）の 3.4 倍に相当する。サルの GLP 適用試験では投与に関連する毒性は認められなかったことから、ヒトの初回用量の 12.4 mg/kg が進行がんのような患者集団に対して医療上の利点を与える場合に限り、サルの 80 mg/kg より推定したヒトの 12.4 mg/kg の用量設定により妥当な安全域が得られると考える。ヒト初回用量の 12.4 mg/kg は、サルの試験における無毒性量 80 mg/kg の 1/6 未満である。

4.2 遺伝毒性

4.2.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

Ames 試験において IR 700-CO_2 の変異原性を検討した。本試験成績より、IR 700-CO_2 は本試験条件下において代謝活性化系存在下及び非存在下でネズミチフス菌株及び大腸菌株に変異原性を示さないとの結論に至った。

変異原性試験では 4 つのネズミチフス菌株（TA1537、TA98、TA100 及び TA1535）並びに 1 つの大腸菌株（WP2 *uvrA*）を使用した。変異原性試験及び用量設定試験には Ca/Mg を含まないダルベッコ・PBS に溶解した濃度 12.5 mg/mL の IR 700-CO_2 溶液、確認試験には濃度 1.25 mg/mL の IR 700-CO_2 溶液をストック用として使用した。変異原性試験は、Aroclor™ 1254 で誘導したラット肝臓の S9 代謝活性化系の存在下及び非存在下で各用量 3 回実施した。

用量設定試験では、TA100 及び WP2 *uvrA* の菌株を用いたプレート法により、IR 700-CO_2 の 1.0、5.0、10、50、100、500、1000 及び 5000 µg/plate の用量で 1 回実施した。同一用量のプレートに約 37,000 ルクスの光を 30 分間照射した群も追加した。光による励起に関わりなく、代謝活性化系存在下及び非存在下で沈殿物は認められなかった。光による励起状態でない場合、いずれの菌株でも細胞毒性（例：Background lawn 及び／又は復帰変異平均コロニー数の減少）は観察されなかった。光曝露による励起状態の場合、WP2 *uvrA* の代謝活性化系非存在下で 50 µg/plate 以上の用量及び代謝活性化系存在下で 100 µg/plate 以上の用量、TA100 の代謝活性化系存在下及び非存在下における 500 µg/plate 以上の用量で細胞毒性が観察された。

光による励起状態でない場合の変異原性試験は、IR 700-CO_2 の 100、250、500、1000、2500 及び 5000 µg/plate の用量でプレート法により実施した。代謝活性化系存在下及び非存在下のいずれの菌株でも沈殿物又は細胞毒性は認められなかった。陰性結果の判定基準は、代謝活性化系存在下及び非存在下の全ての試験菌株で陰性結果が得られた場合とした。

光による励起状態での変異原性試験は、IR 700-CO_2 の 2.5、5.0、10、25、50、100、250 及び 500 µg/plate の用量でプレート法により実施した。代謝活性化系存在下及び非存在下のいずれの菌株でも沈殿物は認められなかった。細胞毒性は、代謝活性化系存在下で試験菌株 TA1537 の 25 µg/plate 以上の用量、代謝活性化系非存在下で試験菌株 TA1537 及び TA100 の 50 µg/plate 以上の用量、代謝活性化系存在下及び非存在下で試験菌株 WP2 *urvA* の 50 µg/plate 以上の用量、代謝活性化系非存在下で試験菌株 TA1535 及び TA98 の 100 µg/plate 以上、代謝活性化系存在下で試験菌株 TA98 の 250 µg/plate 以上の用量、並びに代謝活性化系存在下で試験菌株 TA100 及び TA1535 の 500 µg/plate の用量でも観察され

た。光に曝露された溶媒対照の復帰変異コロニー数は、光に曝露されない溶媒対照の復帰変異コロニー数と同等であった。しかし、代謝活性化系存在下で試験菌株 TA100 の溶媒対照プレートのうち 2 プレートには試験菌株が添加されなかったため、再度処置を行った。光による励起状態での試験菌株 TA100 の確認試験では、沈殿物は観察されなかったが、50 µg/plate 以上の用量で細胞毒性が認められた。観察された細胞毒性（光による励起状態と共に被験物質に曝露されたときの Background lawn 及び／又は復帰変異平均コロニー数の減少）により、曝露に限界があることが示された。

いずれの処理でも被験物質曝露による復帰変異コロニー数の平均は、溶媒対照と比較して増加しなかった。陰性結果の判定基準は、光曝露及び非曝露の条件で代謝活性化系存在下及び非存在下の全ての試験菌株に陰性結果が得られた場合とした。

溶媒対照群及び陽性対照群のデータより、代謝活性化系存在下及び非存在下で化学物質の変異原性を検出する本試験系の妥当性と感度が適切であることが示された。

以上のデータより、本試験条件下において IR700-CO_2 は代謝活性化系存在下及び非存在下でネズミチフス菌株 TA1537、TA98、TA100 及び TA1535、並びに大腸菌株 WP2 *uvrA* に変異原性を示さないとの結論に至った。

4.2.2 *In vitro* 小核試験

IR 700-CO_2 を外来性代謝活性化系存在下及び非存在下でヒト末梢血リンパ球と短時間（4 時間）及び長時間（24 時間）インキュベートしたときの小核誘発性について検討した。試験結果より、IR 700-CO_2 は、ICH ガイダンスで推奨されている最高濃度 500 µg/mL でヒト末梢血リンパ球に小核を誘発しないことが示された。Ca/Mg を含まないダルベッコ・PBS に溶解した濃度 12.5 mg/mL の IR 700-CO_2 溶液をストック用として使用した。ヒト末梢血リンパ球は、Aroclor™ 1254 で誘導したラット肝臓の S9 代謝活性化系の存在下及び非存在下で、被験物質、陽性対照物質又は溶媒対照と処置した。培地中のジメチルスルホキシド濃度は 1% (v/v)であった。用量設定試験における IR 700-CO_2 の濃度は、0.977～500 µg/mL であり、最高濃度は ICH ガイダンスで推奨されている。各処置条件下で培地 1 セットに対して約 37,000 ルクスの光を 30 分間照射した群も追加した。光による励起の有無に関わらず、いずれの処置でも被験物質の最終処置で沈殿物は観察されなかった。用量設定試験での観察に基づき、小核試験で使われた標的濃度は、各処理で 62.5～500 µg/mL の濃度範囲であった。

光による励起の有無に関わらず、代謝活性化系の存在下及び非存在下でいずれの処置でも細胞毒性及び沈殿物は観察されなかった。したがって、小核の評価には、試験された 3 濃度の 125、256 及び 500 µg/mL（ICH ガイダンスで推奨されている最高濃度）が選択された。各処置条件で溶媒（光による励起状態の有無の両条件）又は 1 濃度での陽性

対照（光による励起状態なし）を添加して培養した場合での、小核誘発性の有無について解析した。小核は、実施可能なときには各濃度当たり 2000 個の 2 核細胞を観察して評価した。

いずれの試験条件下でも、被験物質で処置された培養液と溶媒対照の培養液の間で小核を有する細胞数（パーセント）に統計学的有意な上昇は認められなかった。溶媒対照群及び陽性対照群の結果より、代謝活性化系の存在下及び非存在下で染色体異常誘発原及び染色体数的異常誘発原を検出する試験系の妥当性と感度が証明された。

本試験条件下において、IR 700-CO_2 は代謝活性化系の存在下及び非存在下でヒト末梢血リンパ球に小核を誘発しないと考えられた。

4.2.3 IR 700-CO_2 の SD ラットへの静脈内（急速）投与による *in vivo* 小核試験

IR 700-CO_2 をラットに 2 日間静脈内（急速緩徐）投与し、ラット骨髄中の多染性赤血球に小核を誘発する遺伝毒性について評価した。小核試験の投与条件を決めるために用量設定試験を最初に実施した。以前に実施したラットの GLP 適用毒性試験（4.1.1）では、100 mg/kg の用量で毒性が発現して死亡がみられたため、用量設定試験では IR 700-CO_2 の投与量を 20、40 及び 80 mg/kg に設定した。

表 4：*In vivo* 小核試験（用量設定試験）

Group Number	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Volume[1] (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Number of Doses	Number of Animals[2]	
						Males	Females
1	IR 700-CO_2	20	5	4	2 (Days 1 and 2)	3	3
2	IR 700-CO_2	40	5	8	2 (Days 1 and 2)	3	3
3	IR 700-CO_2	80	5	16	2 (Days 1 and 2)	3	3

[1] No correction factor was used.
[2] Surviving animals were euthanized at approximately 18–24 hours following the last dose via carbon dioxide inhalation and discarded without necropsy.

表 5：*In vivo* 小核試験（評価試験）

Group Number	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Volume[1] (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Number of Doses	Number of Animals[2,3]	
						Males	Females
4	Vehicle	0	5	0	2 (Days 1 and 2)	6	6
5	IR 700-CO_2	20	5	4	2 (Days 1 and 2)	6	6

Group Number	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Volume[1] (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Number of Doses	Number of Animals[2,3]	
						Males	Females
6	IR 700-CO_2	40	5	8	2 (Days 1 and 2)	6	6
7	IR 700-CO_2	80	5	16	2 (Days 1 and 2)	6	6
8	Positive Control[4]	—	—	—	—	—	—

[1] No correction factor was used.
[2] Surviving animals were euthanized at approximately 18–24 hours following the last dose via carbon dioxide inhalation for bone marrow collection.
[3] The first 5 surviving animals were utilized for bone marrow collection. The sixth animal was euthanized via carbon dioxide inhalation without bone marrow collection and discarded.
[4] Positive control article reference slides, obtained from a separate experiment with cyclophosphamide monohydrate administered once approximately 24 hours prior to harvest, were included in the slide set to verify scorer proficiency.

表 6：*In vivo* 小核試験（評価試験）-TK 試験動物-

Group Number	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Dose Volume[1] (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Number of Animals[2]	
					Males	Females
4	Vehicle	0	5	0	2	2
5	IR 700-CO_2	20	5	4	2	2
6	IR 700-CO_2	40	5	8	2	2
7	IR 700-CO_2	80	5	16	2	2

[1] No correction factor was used.
[2] Toxicokinetic animals were dosed on Day 1 only and then euthanized after the final blood collection.

用量設定試験では、全動物が安楽死予定日まで生存した（表 4）。IR 700-CO_2 の 20 mg/kg 投与群の雄、並びに 40 及び 80 mg/kg 投与群の雌雄動物の体の様々な部分及び／又は体表面の組織に緑色の変色が認められた。被験物質は緑色色素であるため、着色がみられたことは、色素が組織にかなり蓄積していたことを示唆した。体重及び摂餌量に被験物質に関連する注目すべき変化は認められなかった。

最初に実施した用量設定試験に基づき、雌雄ラットにおける小核試験（本試験）における高用量を 80 mg/kg に選択した。骨髄穿刺液を採取し、多染性赤血球での IR 700-CO_2 の小核誘発性を検討した。本試験に TK 群を追加した（表 6）。

評価試験では、80 mg/kg/day 投与群の雌 1 例が死亡した（表 5）。この動物は投与前の保定中に死亡したため、被験物質に関連したものとは考えられず、偶発的であった。それ以外の動物は安楽死予定日まで生存した。被験物質に関連した摂餌量の変化はみられなかった。被験物質投与群の雌雄動物の体の様々な部分及び／又は体表面の組織に緑

色の変色が認められた。40 及び 80 mg/kg 投与群の雌雄で尿の変色（緑色）が観察された。被験物質に関連する体重の明らかな変化はみられなかった。

小核試験の評価の結果、IR 700-CO_2 は溶媒対照群と比較していずれの用量群の雌雄でも小核を有する多染性赤血球比率に統計学的有意な用量依存的上昇を示さなかった。いずれの用量でも雌雄ラットの骨髄に細胞毒性（総赤血球数に対する多染性赤血球の減少）は認められなかった。溶媒及び陽性対照群における小核を有する多染性赤血球数及び総赤血球数に対する多染性赤血球数の群平均値は、試験施設の Charles River Skokie における背景データの 95%信頼区間の範囲内であり、アッセイの許容性が証明された。

結論として、Crl:CD(SD)ラットに IR 700-CO_2 を 20、40 及び 80 mg/kg の用量で 1 日 1 回 2 日間投与した結果、当該試験条件下で染色体異常誘発性や分裂装置の崩壊が観察されず、全用量群で骨髄小核の誘発性は認められなかった。

4.3 がん原性

がん原性試験は実施しなかった。

4.4 生殖発生毒性

生殖発生毒性試験は実施しなかった。

4.5 光毒性

GLP 適用毒性試験において、ASP-1929 をカニクイザルに単回投与し（RM-1929 のヒト曝露量に匹敵する曝露量）、臨床のレーザシステムと臨床で使用されたフルエンスを用いて動物の皮膚に波長 690 nm の光を照射し、皮膚光毒性を評価した。試験成績より、皮膚光毒性を誘発するリスクは低いことが示唆された。光照射した部位の生検では、肉眼的に変化は認められなかった。病理組織学的検査では、基底細胞層又はその近辺の極く僅かな数の上皮細胞に影響が認められた。

本試験では、ASP-1929 を 40 mg/kg の用量で 4 例の雄カニクイザル（実験に使用されたことがある動物）に単回投与し、24 時間後に剃毛した皮膚部位に、臨床用レーザ（Omicron Laserage; PIT690.4-2500）を用いて波長 690 nm の光を 50 J/cm^2 の光量で照射した。投与初日を Day 1 とし、投与後 24 時間目に光線量測定を行い、動物の観察期間を Day 29 までとした。観察・検査項目として、TK、臨床徴候の観察、光線量測定、動物の生死観察、切迫屠殺の確認、体重、摂餌量、眼科検査、血清生化学的検査、血液学的検査、凝固系検査、尿検査、及び皮膚生検の病理組織学的検査を実施した。

ASP-1929 投与後（Day 1 に ASP-1929 を 120 分間静脈内持続投与）、雄カニクイザルに全身毒性は認められなかった。Day 2 に皮膚一画にレーザ非熱性赤色光を照射し、観察期間中モニターし、皮膚生検を行ったいずれの部位（光線曝露及び光線非曝露部位）でも肉眼的に変化は観察されなかった。

Day 29 の生検では、表皮及び／又は毛包上皮の軽微な単細胞壊死が投与群の皮膚（例：光線曝露された皮膚の生検部位）に観察された。病理組織学的検査では、基底細胞層又はその近辺の極く僅かな数の上皮細胞に影響が認められた。サル 1 例において、2 回目の処置群サンプルでのみ、表皮の単細胞壊死が軽度な表皮の過形成と同時に認められ、この過形成は、試験終了（試験番号 1119-5883）までに回復した Day 10 にみられた痂皮と一致していた可能性があった。

5. 総括及び結論

今回の承認申請に際し、RM-1929 及び ASP-1929 の包括的非臨床試験を実施した。ラット及びカニクイザルを用いた、遊離色素 IR 700、RM-1929、及び ASP-1929 の単回投与による GLP 非適用試験及び GLP 適用試験も実施した。

非臨床薬理試験では、RM-1929 はがんに特異的な薬剤で、690 nm の非熱性赤色光の照射で容易に励起され、RM-1929 が結合したがん細胞に対して迅速な殺細胞作用を発揮することが説明されている。ASP-1929 は実質的にセツキシマブと同一の、生化学的結合親和性及び EGFR シグナル伝達の制御機能を有し、セツキシマブと同様に *in vivo* で EGFR と相互作用することが期待される。実際に、非ヒト霊長類を用いた RM-1929 の生体内分布試験より、その組織分布は、一般的に組織での EGFR 発現と相関し、セツキシマブで報告されている生体内分布と相関する [3), 4), 5), 6), 7)]。

In vivo 及び *in vitro* の薬理試験及び薬力学試験により、最大の抗がん作用を発揮するために、RM-1929 を介した本治療の最適な臨床投与量範囲の目標は、腫瘍部位で EGFR を完全に占有することを達成する用量であることを報告している。ヒトでのセツキシマブの PK 既知データに基づいて、臨床試験での目標として MFD を組織で EGFR を飽和させるのに必要な曝露量（AUC_{inf} レベルは 12,000 μg·h/mL 及び 24,000 μg·h/mL の間）として定義することができる [2)]。抗がん作用を発揮するのに必要な光フルエンス範囲は、RM-1929 を介した本治療のマウスがん異種移植モデルを用いた *in vivo* 及び *in vitro* 薬力学試験から推測できる。想定される組織への光透過性及び光フルエンス率は、効果的な照射の深度は 1 cm と定義され、効果的な表面照射としては 250 J/cm^2 の光フルエンス率及び効果的な組織内照射として 300 J/cm の光フルエンス率と定義される。臨床試験で使用した光フルエンスは、腫瘍患者を治療するのに使用するレーザ装置及びディフューザーを用いてマウス異種移植モデルで有効であることを確認した。さらに、RM-1929 を介した

本治療で処置した後で、周囲の正常組織（例えば、脂肪組織、皮膚、筋肉）の組織破壊は回避されており、処置された腫瘍は損傷を受けていたことから、該当する光フルエンスでは高いがん特異性が示された。

サル及びラットの毒性試験で RM-1929 の 80 mg/kg（NOAEL）及び IR 700 の 30 mg/kg（NOAEL）が推定され、ヒト初回用量として、RM-1929 のサルにおける NOAEL の 1/6 量未満の 12.4 mg/kg（500 mg/m^2）に設定した。RM-1929 のヒトでの CL に対するサルの CL のアロメトリックスケーリングにより、臨床試験の中で MFD を含む用量レベル（500、900 及び 1200 mg/m^2）が想定・選択され、カニクイザルの NOAEL における RM-1929 の曝露量の 1／数倍に相当するヒト曝露量から安全域が得られるよう用量設定された。

ASP-1929 をカニクイザルに単回投与した後、波長 690 nm の非熱性赤色光を 50 J/cm^2 の光量で照射して皮膚光毒性を評価した。皮膚生検を行ったいずれの部位でも（光線曝露及び光線非曝露部位）肉眼的な変化は観察されなかった。病理組織学的検査では、基底細胞層又はその近辺の極く僅かな数の上皮細胞に影響が認められた。

IR 700-CO_2 の遺伝毒性は *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験で評価した。*In vitro* 試験として、小核試験及び細菌を用いる Ames 試験を実施した。IR 700-CO_2 は本試験条件下の代謝活性化系存在下及び非存在下でヒト末梢血リンパ球に小核を誘発しないと考えられた。IR 700-CO_2 は本試験条件下の代謝活性化系存在下及び非存在下でネズミチフス菌株 TA1537、TA98、TA100 及び TA1535、並びに大腸菌株 WP2 *uvrA* において変異原性を誘発しなかった。*In vivo* 遺伝毒性試験では、IR 700-CO_2 を Crl:CD(SD)ラットに 20、40 及び 80 mg/kg の用量で 1 日 1 回 2 日間投与した結果、当該試験条件下で染色体異常誘発性及び／又は分裂装置の崩壊が観察されず、全用量で骨髄小核誘発性は認められなかった。

したがって、RM-1929 の安全性及び有効性は適切な動物モデルにより確立された。非臨床試験成績は ASP-1929 の安全性及び有効性を裏付けており、明らかな異常所見は認められなかった。以上をまとめると、薬理、薬物動態及び毒性プロファイルは、HNC 患者に対する有効性及び安全性を裏付けるのに十分であると考えられる。

6. 参考文献

1. Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. Nature medicine. 2011;17(12):1685-91.

2. Fracasso PM, Burris H, Arquette MA, Govindan R, Gao F, Wright LP, et al. A phase 1 escalating single-dose and weekly fixed-dose study of cetuximab: pharmacokinetic and pharmacodynamic rationale for dosing. 2007;13(3):986-93.

3. FDA. Erbitux, FDA Summary Basis of Approval. 2004.

4. Nanney LB, McKanna JA, Stoscheck CM, Carpenter G, King LE. Visualization of epidermal growth factor receptors in human epidermis. The Journal of investigative dermatology. 1984;82(2):165-9.

5. Playford RJ, Hanby AM, Gschmeissner S, Peiffer LP, Wright NA, McGarrity T. The epidermal growth factor receptor (EGF-R) is present on the basolateral, but not the apical, surface of enterocytes in the human gastrointestinal tract. Gut. 1996;39(2):262-6.

6. Yano S, Kondo K, Yamaguchi M,mond G, Hutchison M, Wakeling A, et al. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. Anticancer research. 2003; 23(5A)(3639-50).

7. FDA. Vectibix, FDA Summary Basis of Approval. 2006.

8. Wang W, Prueksaritanont T. Prediction of human clearance of therapeutic proteins: simple allometric scaling method revisited. Biopharmaceutics & drug disposition. 2010;31(4):253-63.