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）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

楽天メディカルジャパン株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
1. まとめ 3
2. 効力を裏付ける試験 7
2.1 緒言 7
2.2 *in vitro* 薬理試験 9
2.2.1 EGFR に対する結合親和性及び機能調節 9
2.2.2 本治療の作用機序 15
2.2.3 ファントム組織への 690 nm の光の浸透度評価 25
2.3 *in vivo* 薬理試験 27
2.3.1 マウス異種移植における抗がん活性 27
2.3.2 外科的切除に対するアジュバントとしての RM-1929 を用いた本治療 28
2.3.3 臨床で使用するレーザ（ML7710-690-ASP）による RM-1929 を介した本治療：マウス異種移植における抗がん活性 30
3. 副次的薬理試験 36
4. 安全性薬理試験 36
4.1 まとめ 36
4.2 カニクイザルに静脈内持続投与した RM-1929 の単回投与毒性試験及びトキシコキネティクス試験に組み込んだ安全性薬理試験 37
5. 薬力学的薬物相互作用試験 39
6. 考察及び結論 39
7. 図表 40
8. 参考文献 41

2.6.2 薬理試験の概要文

1. まとめ

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）はモノクローナル抗体セツキシマブと色素 IRDye®700DX NHS エステル（IR 700）が共有結合したタンパクと色素の複合体である。遊離色素である IR 700 は、一級脂肪族アミンのリジン残基といったアミノ酸と反応し得る N-ヒドロキシスクシンイミドエステルとして得られ、安定した共有結合を形成する。ASP-1929 の最終製剤（ロット番号[redacted]）及びサル GLP 適用毒性試験で使用した製剤（ロット番号[redacted]）は、抗体に対する色素の比率（DAR）値として両者とも同一の 2.9 を示した。アミド結合は安定であるが、血漿中に存在するアミダーゼにより色素が IR 700 遊離カルボン酸体として本薬の抗体から遊離する可能性がある。この遊離カルボン酸体は色素の完全な化学的中心部を含有する。本薬は無菌注射用溶液として供給される。セツキシマブと同様に、本薬は上皮成長因子受容体（EGFR）に特異的に結合する。EGFR を過剰発現しているがん細胞は本薬に結合して、光照射で薬剤が励起する際の選択的な標的とされるため、本薬を用いた治療はがん特異的である。

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。

RM-1929 の効力を裏付けるため、一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施し評価した。

すなわち、EGFR 受容体に対する結合親和性及び機能調節の解析、並びに RM-1929 を介した本治療によるがん細胞に対する殺細胞活性の機序解析を実施した。また、有効な薬理作用を発揮するのに必要な抗体と抗原の相互作用、本治療における薬物濃度、光フルエンス濃度、及び抗原発現量に対する用量依存性、ヒト HNC 細胞株に対する本治療の殺細胞活性、最適の DAR、並びに異種移植モデルを用いた *in vivo* 抗がん活性を解析するため試験を実施した。

試験に際しては種々の製造スケール及び製剤ロットの RM-1929 複合体を用いて実施した。すなわち、ミリグラムから数グラム単位で製造されたロットで、参考標準としての

ロット（ロット番号[redacted]）及びサル GLP 適用毒性試験で使用したロット（ロット番号[redacted]）が含まれる。*In vitro* 薬理試験では、FaDu（ヒト下咽頭がん細胞株）、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）及び BxPC3（膵臓腺がん細胞株）を含む、種々のがん細胞株を ATCC®より入手して使用した。これら全ての細胞株の細胞表面には EGFR が発現しており、FaDu、SCC-15、及び BxPC3 は類似の中程度量の EGFR を発現している。抗体／抗原相互作用の結合親和性及び酵素結合免疫吸着測定（ELISA）法による評価は、セツキシマブ結合部の完全なエピトープを含む、ヒト及びアカゲザルの EGFR 細胞外ドメイン由来組換えタンパク質を用いて実施した。*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、発光ダイオード（LED）及びレーザ装置を使用して実施した。LED は 690 nm の範囲で発光し、レーザ装置には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を装着した。臨床試験でヒト腫瘍組織内照射するために使用したシリンドリカルディフューザーを装着したレーザ装置を使用して本 *in vivo* 試験を実施した。

セツキシマブと IR 700 色素の複合体は、EGFR との相互作用及びその機能調節に関与しているため、*in vitro* 試験でその効力活性を評価した。これらの試験結果から、セツキシマブと IR 700 色素の複合体は、抗原である EGFR と抗体部分との結合親和性に顕著な変化は認められず、EGFR を介した機能に対する抗体部分の活性強度や有効性に対して顕著な影響は認められなかった。RM-1929 はヒト及びアカゲザルのいずれの EGFR にも高い結合親和性を示し、その解離定数（K_d）はセツキシマブと同程度であり（RM-1929 及びセツキシマブ、ヒト：107～150 pM 及び 582 pM、アカゲザル：191～247 pM 及び 579 pM）、EGFR を介したシグナル伝達機能及び細胞増殖に対して同一の阻害作用を示した。RM-1929 は抗体依存性細胞傷害（ADCC）作用を示したが、その細胞傷害作用はセツキシマブ抗体単体と比較し顕著ではなかった。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たことが原因と思われる。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る。そして、RM-1929 の *in vivo* 薬理作用は、EGFR との相互作用に関与しているので、セツキシマブと同程度であることが期待される。

次に RM-1929 薬剤の作用機序の評価に焦点を当てた試験を実施した。光フルエンスを 8 から 32 Jules/cm^2 の範囲で変動させた 690 nm の光で、RM-1929 を用いた本治療は高い効果を示し、EGFR を発現する HNC 細胞株（FaDu、SCC-15）を含む種々のがん細胞株に対して完全に細胞を死滅させることができた。この殺細胞作用は高い選択性があり、細胞の EGFR に RM-1929 が結合することが必要で、細胞に結合しない場合と比較して

10,000 倍を超える活性強度の解離が認められた。EGFR を発現していない細胞には RM-1929 を介した本治療の影響は認められなかった。一方、EGFR を発現している、隣接の細胞には RM-1929 が結合し、迅速な殺細胞作用が認められた。RM-1929 を介した本治療は RM-1929 濃度、抗原発現量、及び光フルエンスに対して用量依存性が認められた。最大活性（最大反応を得るのに比較的少ない光フルエンス）は細胞の抗原（EGFR）が RM-1929 で完全に飽和しているときに達成される。

最適状態に達していない薬物濃度でも光フルエンスを増加させることにより殺細胞作用を増加することができることから、これら全変数（RM-1929 濃度、抗原発現量、及び光フルエンス）は相互依存している。同様に、抗原である EGFR の比較的高い発現量が認められる細胞の処置には比較的低い光フルエンスしか必要とされない。RM-1929 による EGFR の占有率が飽和することにより比較的強い活性が誘導される（殺細胞作用に必要な光フルエンスは比較的低量）。光照射後 1.5 時間以内には細胞膜非透過性の色素は、容易に拡散して核内 DNA に到達することができ、光で励起した RM-1929 により細胞膜が損傷した細胞を染色できることから、作用機序には細胞膜を速やかに崩壊させることが含まれる。

抗体と色素の複合体において、抗体に対する色素の最適な比率（抗体に対する色素の比率［DAR］）を評価するために DAR 値を変動させた種々の RM-1929 複合体を用いて試験を実施した。光依存性試験により、平均 DAR 値が抗体 1 に対して 2 から 3 の比率の色素となる RM-1929 構造物質は、より高い DAR 値を有する RM-1929 構造物質と実質的に同一の薬理学的活性を有することが判明した。

これに反して、DAR 値が 2 未満となる RM-1929 構造物質は、殺細胞活性が顕著に低く、同程度の殺細胞活性を誘導するには比較的高い光フルエンス量が必要であった。抗体 1 に対して 2 から 3 の色素となる DAR 値（平均結合比率）が RM-1929 に最適であると考える。

本治療による RM-1929 の抗がん作用の薬理評価は、中程度 EGFR を発現したマウスに同所性に皮下へ異種移植して行う *in vivo* 抗がん作用評価試験で実施した。RM-1929 を静脈内投与すると、RM-1929 が速やかに腫瘍に集積するのが示された（静脈内投与後 24 時間以内）。RM-1929 の集積は IR 700 に固有の蛍光を使用してモニターできた。これらの試験結果から、RM-1929 を介した本治療は効果的で迅速な殺細胞活性を腫瘍に対して高い特異性で発揮し得ることが示された。すなわち、隣接した非腫瘍細胞に対する損傷は回避しつつ、腫瘍のみに対して処置による殺細胞作用が示された。

RM-1929 を介した本治療の直接的効果によって、腫瘍に対する殺細胞活性を誘導すること及び腫瘍増殖を減少させることを評価するために、BxPC3 膵臓腺がん細胞を移植す

る膵臓同所性異種移植マウスモデルを使用して一連の試験を実施した。RM-1929 を投与して光を照射しなかった群又は光を照射して RM-1929 を投与しなかった群と比較して、RM-1929 投与約 24 時間後に 690 nm の光を腫瘍に照射すると、腫瘍に対する迅速な殺細胞作用と腫瘍増殖の減少が数週間にわたって確認された。

BxPC3 腫瘍を移植する同所性異種移植モデルを使用した別試験から以下のことが示された。すなわち、外科的切除のアジュバントとして本治療を用いた併用療法は、手術後に取り残された可能性のあるがん遺残細胞を根絶して、腫瘍の再発を減少させるのに有効な療法であることが示された。手術のみを施行した群と比較して、RM-1929 を介した本治療と腫瘍の外科的切除との併用療法は腫瘍の再発を手術後数週間にわたって劇的に減少させることが示された。

比較的大きな BxPC3 腫瘍（最長寸約 7～10 mm）を皮下に内在しているマウス異種移植モデルを用いて臨床で使用するフロンタルディフューザー／シリンドリカルディフューザーのレーザ装置 ML7710-690-ASP を評価した。臨床で使用される光フルエンスの範囲を用いて処置を実施した。ヒト腫瘍の組織内照射をシミュレーションするためにシリンドリカルディフューザーは腫瘍に直接接触する部位に設置した。RM-1929 を静脈内投与した約 24 時間後に 690 nm のレーザを腫瘍に照射した。光照射直後から腫瘍に対する強い殺細胞作用が認められたが、光を照射していない腫瘍に影響は認められなかった。処置数日後の組織学的検査の結果、690 nm の光を照射していない腫瘍と比較して、処置した腫瘍には広範な殺細胞作用とネクローシスが認められた。重要な点として、ネクローシスが認められた腫瘍周囲の筋肉、脂肪組織、及び皮膚には組織損傷を示す証跡は全く認められなかった。このことから、臨床で使用する光フルエンスの範囲では、腫瘍周囲の正常組織への損傷を回避してがんに特異的な殺細胞作用を誘導できることが示唆された。

組織への 690 nm の光の浸透度は種々の深度のファントム組織を用いて評価した。その結果、1 cm の深度で 5～10%の 690 nm の線形な光透過性が示された。

臨床試験では被験者らは 250 J/cm まで照射されるので、約 12～25 J/cm 光フルエンスは 1 cm の深度まで到達するはずであり、この光フルエンス量は RM-1929 を励起してがんに対する殺細胞作用を誘導することができ得るエネルギー量である。したがって、690 nm のレーザを用いて RM-1929 を励起するのに効果的な処置範囲は光源から 1 cm の距離で設定される。

RM-1929 の副次的薬理試験は実施しなかった。

RM-1929 の安全性薬理試験は、カニクイザルを用いた単回投与 GLP 適用毒性試験の一部として組み込まれた安全性評価項目として試験を実施し、目測の呼吸数、心電図、神

経行動上の変化（例えば、運動や行動等の症状観察）を測定した。処置に関連した呼吸数、心電図又は神経行動上の機能や活性に影響を及ぼしたことを示す証跡は認められなかった。

楽天メディカルジャパン株式会社が実施した薬理試験の概要表は Module 2.6.3 に示した。試験報告書は Module 4.3 に示した。

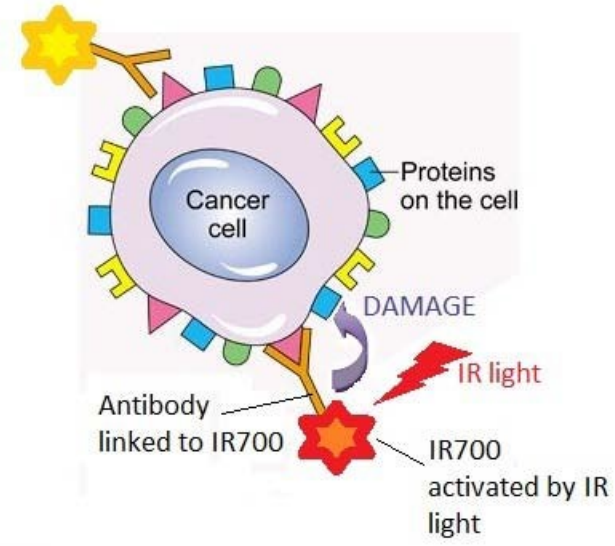
2. 効力を裏付ける試験

2.1 緒言

本申請で記述される治療法はがんを標的とした光で励起され得る新技術で、最近米国国立癌研究所で発明され、種々の論文が公表されている[1), 2), 3), 4)]。本治療は薬剤と装置を組み合わせたものであり、光で励起され得る色素 IR 700 が結合したモノクローナル抗体からなる薬剤と、腫瘍部位で薬剤を非熱性赤色光で励起するためのレーザ装置（又は類似の発光デバイス）を用いる。抗体-色素複合体の光による励起により薬力学的にがん細胞に対する殺細胞作用が引き起こされる（図 1 参照）。

本治療の各構成要素の、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）を引き起こせない。両者を組み合わせて治療することで、がん細胞に対する殺細胞作用及び腫瘍破壊を迅速に引き起こすことが可能である。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。

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.

本治療のがん特異性は以下の 2 つの機序で達成される。

i. 光による励起を引き起こし殺細胞作用を示すために、抗体と IR 700 の複合体が細胞の抗原に結合する必要がある。抗原を発現していない細胞に対する損傷は抑制されているので、細胞の抗原に結合していない複合体の細胞損傷作用は非常に弱い（活性において 10,000 倍を超えた差が認められた）。

ii. 光照射は表面又は組織内照射を用いて腫瘍表面上又は組織内局所に対して行われるため、腫瘍部位に集積した薬剤のみが光で励起され局所で薬理作用が示される。

本治療の効果は重要な構成要素の用量、すなわち薬剤濃度、光フルエンス（適応される総光エネルギー）及び細胞での抗原発現レベルの用量に依存している。これら全ての変動要素は相互依存しており、薬剤濃度は完全に抗原が占有されるときには完全な反応を惹起するのに必要な光フルエンスは比較的少なくても良い。このように、がん治療時の効果を最適化するために、2 つの変動要素すなわち、薬剤用量と光フルエンスは最適化される必要がある。最適化された治療とは、腫瘍内のがん細胞の抗原が完全に占有されるレベルに到達する薬剤濃度及び完全な薬理作用（腫瘍破壊）を引き起こすのに十分な光フルエンスと定義される。

2.2 *in vitro* 薬理試験

2.2.1 EGFR に対する結合親和性及び機能調節

RM-1929 はセツキシマブの脂肪族アミングループのリジン残基と色素 IR 700 の NHS エステル構造との反応により合成された。この部位非特異的な結合反応により平均 DAR 値が 2 から 3 の異質な抗体の複合体サンプルが生成される。

抗体結合親和性及び EGFR の機能調節に対する色素の結合による潜在的影響を評価するために、非標識のセツキシマブと RM-1929 を以下の点について薬理学的観点で比較する試験を実施した：（i）精製ヒト EGFR 細胞外ドメインに対する ELISA を用いた結合親和性（試験番号 SR-RM1929-P001）、（ii）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た K_d 値の測定（試験番号 SR-RM1929-P009）、（iii）がん細胞株での EGFR シグナル伝達調節（試験番号 SR-RM1929-P012）、及び（iv）EGFR を介したがん細胞増殖の調節（試験番号 SR-RM1929-P011）。

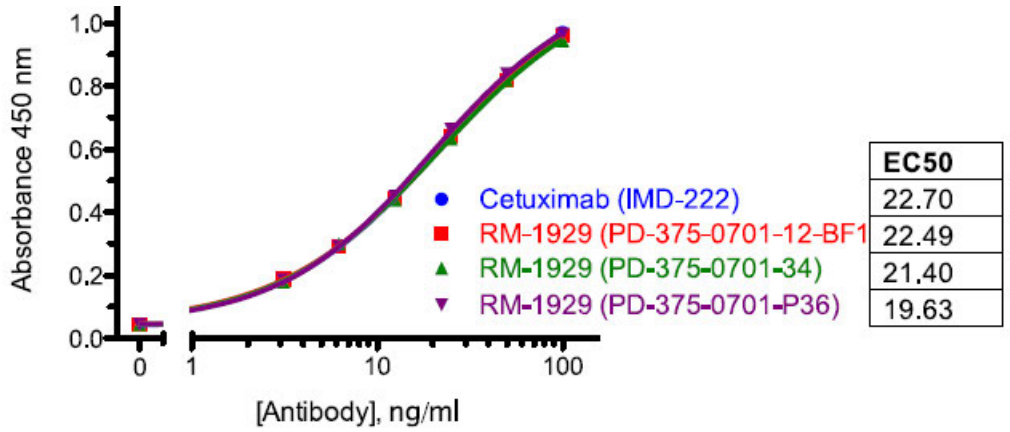
これらの試験に加えて、RM-1929 の ADCC 誘導能について評価した（試験番号 SR-RM1929-P010）。ADCC 活性はセツキシマブによる抗がん作用を調節する重要な機序と考えられているが、本治療の薬理作用に関与している可能性は低い。

2.2.1.1 ヒト EGFR 抗原に対する RM-1929 の ELISA を用いた結合親和性：セツキシマブとの比較

精製ヒト細胞外ドメイン EGFR でプレコートしたアッセイプレートと RM-1929 又はセツキシマブを用いて ELISA による評価を実施した（試験番号 SR-RM1929-P001）。RM-1929 及びセツキシマブは 3.13 ng/mL から 100 ng/mL の用量範囲において強力で特異的な濃度依存性の結合親和性を示し、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}）が得られた（図 2）。各測定点で 3 回試験を実施し、平均値 ± 標準偏差（SD）及び各用量での値に適合した非線形回帰曲線を示した。RM-1929 及びセツキシマブの最大結合能も実質的に同一であり、セツキシマブに IR 700 が結合してもヒト EGFR に対する結合親和性及び結合能は変わらないことが示された。

ELISA 結合試験は種々のロットの RM-1929 を用いて実施した。すなわち、ミリグラムから数グラム単位で製造されたロットで、製剤ロット（ロット番号 [redacted]）、参考標準としてのロット（ロット番号 [redacted]）、及びサル GLP 適用毒性試験で使用したロット（ロット番号 [redacted]）が含まれる。本試験結果から、RM-1929 は実質的にセツキシマブと同一の結合特性を有し、ELISA での EC_{50} 値はそれぞれ RM-1929：22.5、21.4、19.6 ng/mL 及びセツキシマブ：22.7 ng/mL であることが示された。

図 2　RM-1929 及びセツキシマブの ELISA を用いた結合親和性



Note: EC_{50} denoted in ng/mL

2.2.1.2　ヒト及びアカゲザル EGFR に対する結合親和性（K_d）の決定

精製ヒト及びアカゲザル細胞外 EGFR に対する RM-1929 及びセツキシマブの結合親和性を、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決定した（試験番号 SR-RM1929-P009）。ヒト IgG-Fc キャプチャー（AHC）バイオセンサーに結合して固定化したセツキシマブ及び RM-1929 を用いてキネティクス分析を実施した。バイオセンサーは 320 秒のロード時間中に標的レベルの 5 nM（0.8 mg/mL）までセツキシマブ又は RM-1929 と一緒にロードした。ヒト及びアカゲザル精製 EGFR 細胞外ドメインは 6 濃度（20、6.67、2.22、0.74、0.37、及び 0 nM）でセツキシマブ又は RM-1929 との結合親和性の解析を実施した。解析時に"0"濃度のデータ値を他のデータから差し引いた。4 から 5 個のデータセットから、Rmax をリンクせず、2：1 のヘテロなリガンド曲線フィッティングモデルを用いてデータの最適フィットが得られた。結合速度定数（K_{on}）、解離速度定数（K_{off}）及び解離定数（K_d）は 600 秒時のパラメータから算出した。結合に関する統計量は許容される $Chi^2 \leq 3.0$ 及び $R^2 \geq 0.09$ の範囲内であった。

セツキシマブと共に異なる 3 ロットの RM-1929 を平行して 3 回測定（異なる試験を 3 回実施）して評価した。評価したロットは参考標準（ロット番号 [redacted]）、サル GLP 適用毒性試験で使用したロット（ロット番号 [redacted]）及び治験薬製剤（ロット番号 [redacted]）であった。表 1 及び表 2 にセツキシマブと共に RM-1929 の全ロットの K_d 値（平均値 ± SD）及びキネティックパラメータを示す。

表 1　ヒト EGFR 細胞外ドメインに対する結合親和性及び解離キネティックス

Ligand	Immobilized mAb	Curve Fit Model	K_d ± SD（pM）、n = 3	K_{off} ± SD（1/s）n = 3（10^{-4}）
Human purified extracellular domain of EGFR	PD-375-0701-34	2:1	149 ± 46	4.95 ± 1.02
	PD-375-0701-P36	2:1	107 ± 20	3.31 ± 0.93
	G-MFR-375-FVP-1501	2:1	150 ± 0.6	4.10 ± 0.33
	Cetuximab	2:1	582 ± 112	5.17 ± 3.49

表 2　アカゲザル EGFR 細胞外ドメインに対する結合親和性及び解離キネティックス

Ligand	Immobilized mAb	Curve Fit Model	K_d ± SD（pM）	K_{off} ± SD（1/s）、（10^{-4}）
Rhesus purified extracellular domain of EGFR	PD-375-0701-34 (n = 3)	2:1	247 ± 169	0.85 ± 0.46
	PD-375-0701-P36 (n = 3)	2:1	191 ± 74	1.45 ± 0.24
	Cetuximab (n = 2)	2:1	579 ± 134	10.1 ± 0.31

RM-1929 の 3 ロットの親和性（K_d）は非常に類似しており、ロット間に顕著な一貫性があることを示している。K_d 値はヒトで 107 から 150 pM、アカゲザルで 191 から 247 pM の範囲でヒト及びアカゲザルの EGFR 細胞外ドメインに対して非常に高い親和性を示した。セツキシマブの親和性は RM-1929 と比較して僅かに低い値を示したが、セツキシマブ及び RM-1929 の K_{off} 値は実質的に非常に類似していることから、RM-1929 を形成する抗体に色素が結合していることで、ヒト EGFR との相互作用に顕著な熱力学的変更を生じさせることはないことを示している。

2.2.1.3　EGFR シグナル伝達に対する RM-1929 の作用

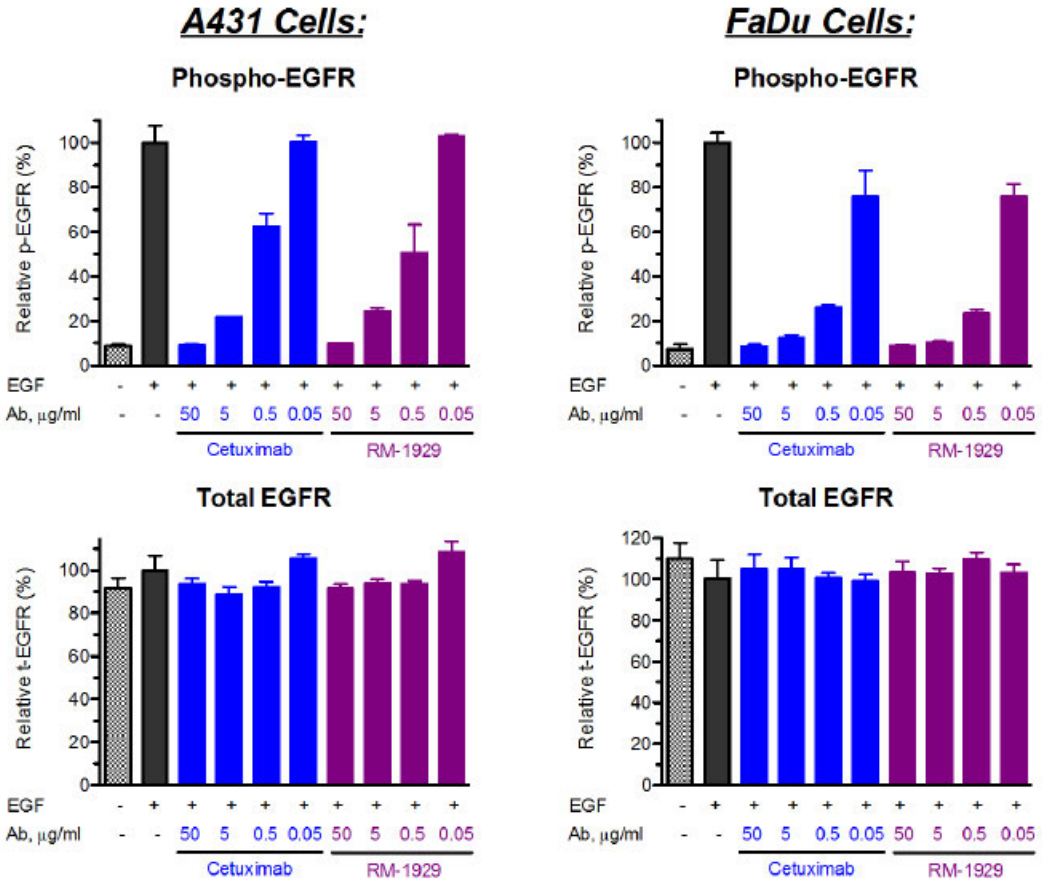
セツキシマブに結合した IR 700 が EGFR 依存性の細胞シグナル伝達を阻害する活性を有するかを評価するため、受容体シグナル伝達の指標としての EGF 活性化による EGFR 自己リン酸化に対する阻害作用を測定した（試験番号 SR-RM1929-P012）。A431 及び FaDu がん細胞株と 100 ng/mL の EGF 及び 0、0.05、0.5、5.0、及び 50 µg/mL の RM-1929（品質保証前の参考標準の原料物質、ロット番号 [redacted]）又はセツキシマブ（ロット番号 [redacted]）を用いて試験を実施した。EGFR の自己リン酸化の評価は、EGFR のリン酸化状態の 1173 チロシン残基に特異的に結合する検出抗体を利用した比色定量 In-Cell ELISA で実施した。受容体のリン酸化程度に関係なく、EGFR に特異的な検出抗体でサンプル中の総 EGFR 量を評価した。

2.6.2 薬理試験の概要文

EGF により誘導された EGFR の自己リン酸化を RM-1929 が用量依存性に阻害し、その活性と有効性はセツキシマブと同程度であることを図 3 に示す。EGFR の総量は種々のサンプルを評価する間は不変であり、このことから効果は特異的で ELISA のシグナルは EGFR の自己リン酸化のレベルと直接的な相関があることが示された。

図 3 の上図は、0.05、0.5、5.0、及び 50 µg/mL のセツキシマブ又は RM-1929 の存在下又は非存在下で 100 ng/mL の EGF 刺激により産生された pEGFR 量を示している。図 3 の下図はサンプル中の EGFR 総量（t-EGFR）を示し、サンプル間で非常に一貫していること及び pEGFR 量の違いが EGF を介した EGFR の自己リン酸化の直接的阻害作用によることを明らかにしている。左図は A431、右図は FaDu でのデータを示す。

図 3　RM-1929 による EGFR シグナル伝達の阻害、EGF 誘導による EGFR 自己リン酸化（pEGFR）の評価



2.2.1.4　EGFR を介したがん細胞増殖に対する RM-1929 の作用

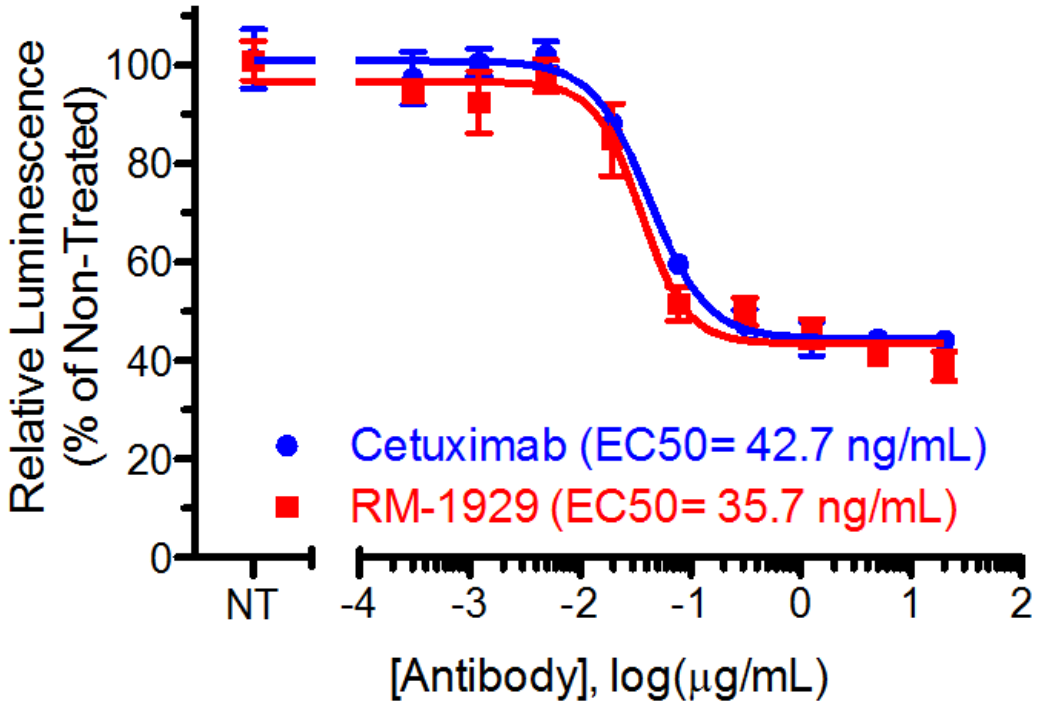
がん細胞増殖を抑制するセツシキマブの阻害機能が RM-1929 で維持されているかを評価するため、FaDu を用いて試験を実施した（試験番号 SR-RM1929-P011）。FaDu は中等

度量の EGFR 受容体を発現しており、増殖用培地内の EGF の存在によりその細胞増殖は影響を受ける。

指数関数的な増殖を可能にする 10%ウシ胎仔血清（FCS）を添加した通常の増殖用培地を添加した細胞アッセイプレートに、FaDu を低密度で播種した。一晩培養した後、0.1%ウシ血清アルブミン（BSA）を含んだ血清飢餓培地で 3 時間培養した。10%FCS に戻した培地でさらに 4 日間の培養を再開する前に、種々の濃度のセツシキマブ又は RM-1929 を培地に添加し、90 分間培養した。その後、代謝活性を有する細胞による ATP 産生を検出する発光システムを用いて、細胞生存率及び細胞数を測定した。

図 4 にセツキシマブ及び RM-1929 の阻害特性を示す。すなわち、同一の阻害活性（EC_{50} 値：それぞれ 42.7 及び 35.7 ng/mL）及び有効性が示された。RM-1929 はがん細胞増殖の制御において、セツキシマブと同じ阻害機能を維持している。RM-1929 を用いた本治療の抗がん作用は細胞増殖阻害作用には依存せず、光照射による細胞膜の破壊に依存していることを想起するのは意義がある。それでも、IR 700 との結合がセツキシマブの機能を変えないことを示す点で、この結果は重要である。

図 4　がん細胞増殖に対する RM-1929 の作用



2.2.1.5 RM-1929 による抗体依存性細胞傷害（ADCC）作用の評価

RM-1929 による ADCC 活性を評価するため、細胞ベースのレポーターアッセイを用いて試験を実施した。このアッセイでは、FcγRIIIa T 細胞受容体によるシグナル伝達及び NFAT による転写により制御されるルシフェラーゼ遺伝子リポーターシステムを用いて操作した組換え ADCC エフェクターT 細胞システムを用いた（試験番号 SR-RM1929-P010）。高感度でセツキシマブの ADCC 活性を検出するための本レポーターアッセイはバリデート済みである。

EGFR を高発現している標的細胞（A431）をセツキシマブ又は RM-1929 と 6 時間培養し、FcγRIIIa T 細胞受容体によるシグナル伝達及び ADCC 活性として、ルシフェラーゼリポーター遺伝子を定量した。

図 5 及び表 3 にセツキシマブ又は 3 種類の異なるロットの RM-1929 の ADCC 用量反応を示す。評価した RM-1929 のロットは参考標準（ロット番号 [redacted]）、サル GLP 適用毒性試験（ロット番号 [redacted]）、及び初期の製剤及び安定性試験（ロット番号 [redacted]）で使用したロットであった。セツキシマブ及び全ロットの RM-1929 は実質的に同一の活性を示し、ED_{50} 値はそれぞれ 10.9 ng/mL、16.1 ng/mL、15.5 ng/mL、及び 14.1 ng/mL であった。セツキシマブと RM-1929 の各ロットの間には ADCC 反応の大きさ（飽和時の最大反応）で顕著な差異が認められた。このことは、色素との結合が抗体と抗原との結合活性を変更しない場合でも FcγRIIIa T 細胞受容体との相互作用を減弱させ、その結果 ADCC 反応は低下することを示している。この効果は恐らく、T 細胞受容体と RM-1929 の FC 領域のリジン残基との相互作用を減弱させる、同リジン残基に結合している色素の存在に依存していると思われる。

図 5　RM-1929 及びセツキシマブの ADCC 活性

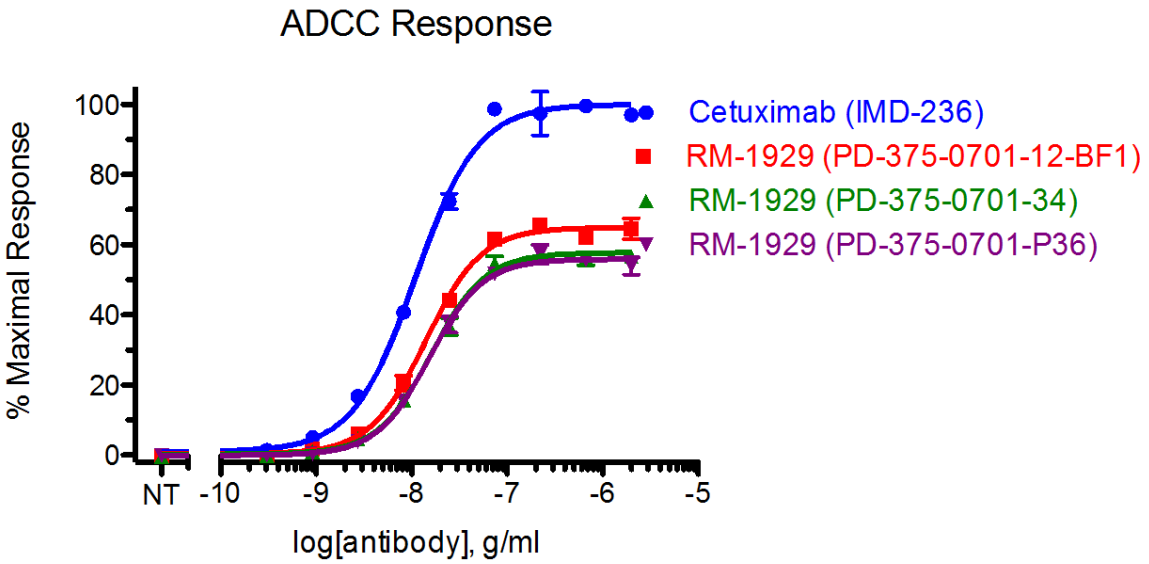


表 3　RM-1929 及びセツキシマブの EC_{50} 値及び相対最大反応

Antibody(Lot)	EC_{50}(ng/mL)	Relative Maximal Response
Cetuximab (IMD-236)	10.9 (15.6 by Promega)	100%
RM-1929 (PD-375-0701-12-BF1)	14.1	65%
RM-1929 (PD-375-0701-34)	16.1	58%
RM-1929 (PD-375-0701-P36)	15.5	56%

2.2.2　本治療の作用機序

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、*in vitro* 試験を実施した。本試験では、以下の点について評価を実施した：（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（試験番号 SR-RM1929-P002）、（ii）光照射の光フルエンス及び出力密度の用量依存性（試験番号 SR-RM1929-P005）、（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（試験番号 SR-RM1929-P003）、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（試験番号 SR-RM1929-P004）、（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（試験番号 SR-RM1929-P006）、（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（試験番号 SR-RM1929-P007）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（試験番号 SR-RM1929-P008）。

2.2.2.1 細胞での RM-1929 を介した本治療の検鏡：膜破壊及び EGFR 抗原を発現している細胞に特異的な作用

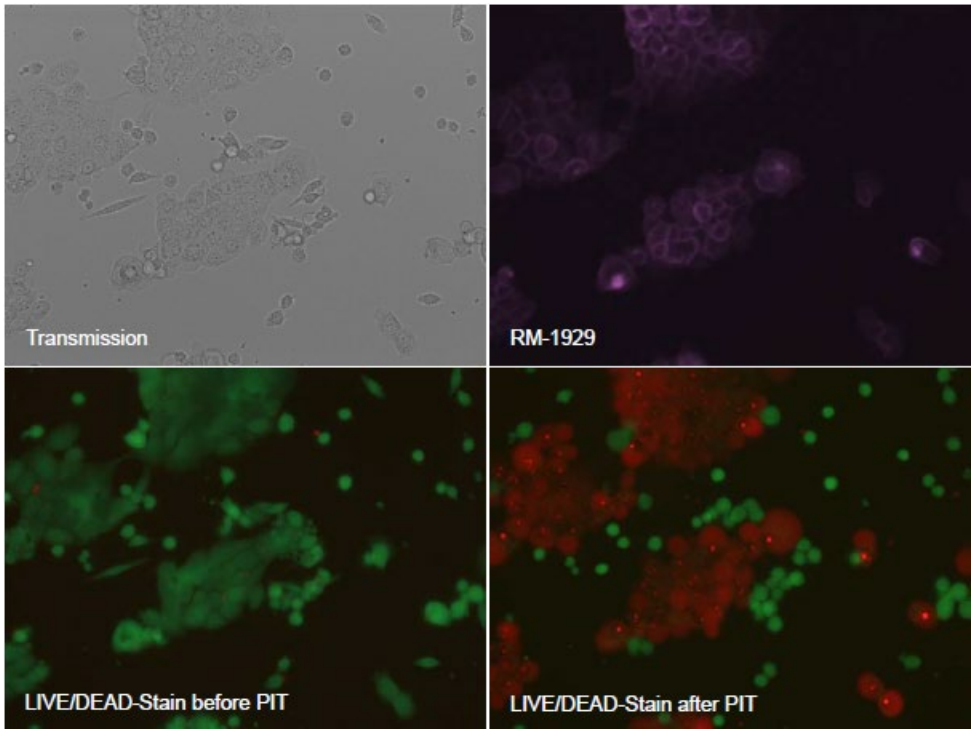
本試験は、抗原を発現している細胞のみを直接損傷し、EGFR を発現していない周辺細胞への損傷を回避する、RM-1929 を介した本治療の選択性を判断するために実施した（試験番号 SR-RM1929-P002）。これに加えて、損傷した細胞の核内 DNA だけを染色する細胞内非浸透性の色素を用いて、本治療の作用は迅速で細胞膜破壊に相関しているかを評価するため本試験を実施した。

EGFR は発現せず、関連する抗原でセツキシマブと相互作用のない HER2 を発現するように設計したマウス胚線維芽細胞 NIH/3T3 と、EGFR を発現しているヒト類上皮がん細胞 A431 を組み合わせた混合培養方式で試験を実施した。細胞は RM-1929 と 1 時間培養し、27 J/cm^2 の 690 nm 光を照射して 90 分後に 2 種類の異なる蛍光色素を用いて生細胞及び死細胞の同時蛍光染色を検出する Live/Dead Cell Double Staining Kit で培養液中の細胞の生死を判定した。使用した 2 種の色素は、緑色蛍光を発光し生細胞全てを染色する細胞膜透過性色素である緑色蛍光カルク化合物-AM、及び細胞膜が破壊された細胞の核内 DNA のみを染色する細胞膜非透過性色素である赤色蛍光エチジウム・ホモ二量体-1 である。

図 6 に顕微鏡画像を示す。RM-1929 は EGFR 抗原を発現している A431 細胞の細胞膜にのみ結合すること（上右パネル、紫色）、及び 690 nm の光照射で A431 細胞は全て損傷を受け、細胞膜非透過性色素で容易に染色されるようになったことが示された（赤色、右下パネル）。光照射前（左下パネル）では全細胞は無傷（緑蛍光色）だが、本治療後（右下パネル）の A431 細胞は損傷を受けている（赤色に染色）。一方で、NIH-3T3 細胞は損傷を受けない状態を維持していることから、RM-1929 の作用は高度に特異的であった。

本試験結果から、本治療による殺細胞作用は、EGFR を発現し RM-1929 が結合した細胞にのみ誘導されている点及び細胞死の機序には迅速な細胞膜の破壊が関与している点で、RM-1929 は高度に特異的であることが示された。

図 6　抗原 EGFR を発現している細胞にのみ細胞死を誘導する RM-1929 を介した本治療の顕微鏡画像



2.2.2.2　光照射の光フルエンス及び出力密度の用量依存性

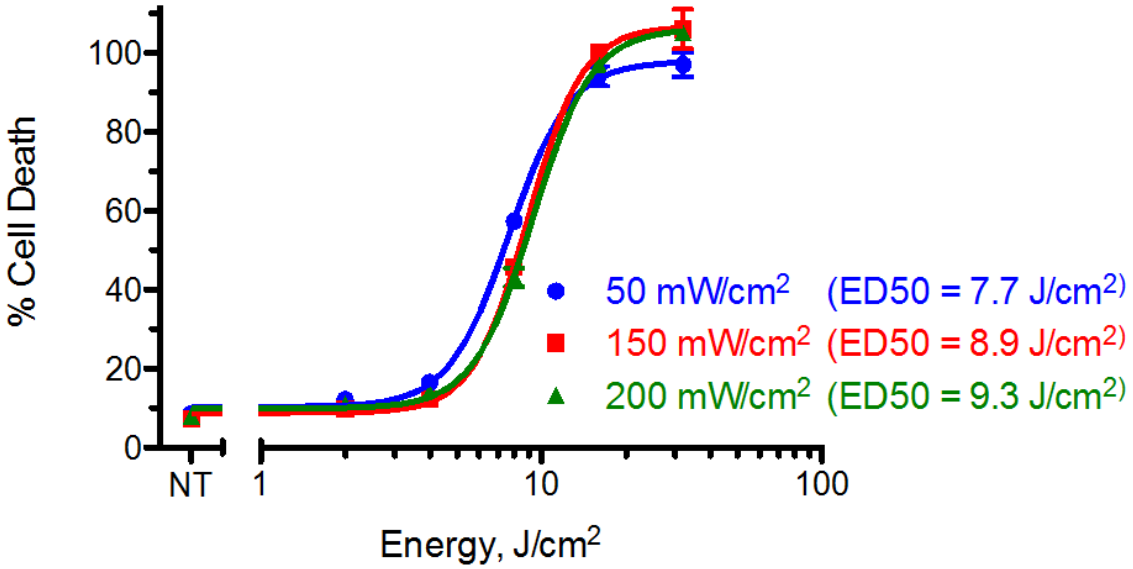
光フルエンス（J/cm^2）と共に RM1929 を介した本治療の薬理学的用量依存性を検討し、光出力密度（mW/cm^2）が抗がん活性に影響を及ぼすかを解析するために本試験を実施した（試験番号 SR-RM1929-P005）。RM-1929 の飽和濃度（10 µg/mL）及び 3 レベルの光出力密度（50、150、及び 200 mW/cm^2）を用いて滴定を実施した。これらの出力レベルは臨床で使用され得る出力密度設定であるので選択した。本試験は、FaDu 及び SCC-15 といった HNC 細胞株と同程度で中等度量の EGFR を発現する膵臓腺がん BxPC3 細胞を用いて実施した。

図 7 に RM-1929 を介した本治療は光フルエンス（J/cm^2）依存性であるが、光出力密度（mW/cm^2）に対しては非依存性であることを示す。3 レベルの光出力密度（50、150、及び 200 mW/cm^2）で滴定した結果から、いずれも非常に類似した作用強度が得られた（光フルエンスの ED_{50} 値はそれぞれ 7.7、8.9、及び 9.3 J/cm^2）。

以上の結果から、光フルエンスは最適化すべき重要なパラメータであるが、光出力密度（mW/cm^2）は薬力学に影響を及ぼさないことが示された。ヒトに使用する際には、フ

ロンタルディフューザーを用いて表面照射する場合には 150 mW/cm^2 に固定した光出力密度を使用し、シリンドリカルディフューザーを用いて組織内照射する場合には 400 mW/cm に固定した光出力密度を使用する。

図 7　24 時間後の総殺細胞率



2.2.2.3　細胞 EGFR への結合の必要性

本試験は、がん選択性が得られる機序として 690 nm の光照射直後の RM-1929 を介した殺細胞作用が EGFR 抗原と抗体の相互作用に依存する可能性を検討した（試験番号 SR-RM1929-P003）。実験には中等度量の EGFR が発現している BxPC3 膵臓腺がん細胞を使用した。EGFR への結合で RM-1929 と競合する過剰量の非標識セツキシマブ（100 µg/mL）の存在下又は非存在下で細胞を RM-1929（1 µg/mL）と培養した。陽性対照群として、セツキシマブと EGFR 結合で競合し、また EGFR と RM-1929 との相互作用を妨げることも期待される抗 EGFR 抗体であるパニツムマブで処置したサンプルを加えた。陰性対照群として、EGFR と相互作用を及ぼさない、無関係なモノクローナル IgG1 抗体（F3）で処置したサンプルを加えた。培養 1 時間後細胞に 16 J/cm^2 で 690 nm の光照射を実施し、殺細胞作用を誘導した。

図 8 に *in vitro* で 10 µg/mL の RM-1929 及び 16 J/cm^2 で 690 nm の光照射を用いた本治療処置 24 時間後の細胞死亡率（青のカラム）が 90%まで達していることを示す。過剰量の非標識抗 EGFR 抗体であり、RM-1929 と抗原との結合に競合するセツキシマブ（Cet）

又はパニツムマブ（Pan）の 100 μg/mL 存在下では、690 nm の光を照射しても殺細胞作用は誘導されず（赤及び緑カラム）、細胞生存率は未処置の細胞と同一であった（オレンジ色カラム）。EGFR に結合しないコントロールモノクローナル IgG1 抗体（F3）存在下では RM-1929 を介した本治療による殺細胞作用は妨げられない（紫色カラム）。本データにより RM-1929 を用いた本治療による殺細胞作用には EGFR 結合が必須であることが示されている。

図 8　RM-1929 を介した本治療により殺細胞作用を誘導するには EGFR に抗体が結合する必要がある

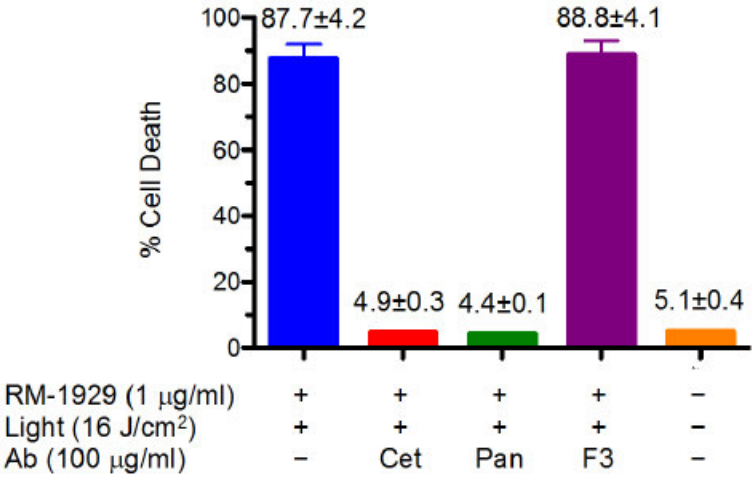


図 8 は過剰量の非標識セツキシマブ又はパニツムマブを用いて EGFR と RM-1929 との相互作用を妨げることにより本治療による殺細胞作用が完全に消失したことを示している。これに反して、陰性対照群である F3 抗体は RM-1929 を用いた本治療による殺細胞作用を妨げなかった。

本試験結果から、細胞の EGFR と RM-1929 との相互作用が本治療による殺細胞作用に必要であることが明確に示された。

2.2.2.4　RM-1929 が細胞 EGFR に結合しない場合に対して結合する場合の本治療を介した RM-1929 の相対強度

標的のない他の光感受性物質に対して、光活性化がん標的治療法として RM-1929 を用いた本治療の重要な利点は、抗原を発現していて抗体に結合する細胞のみが本治療による直接的な作用を受けることである。このがん選択性は、細胞に結合していない RM-1929 は光照射による細胞損傷活性が非常に低いとの推測に依存している。RM-1929 が結合しない細胞（腫瘍細胞の周辺細胞）の場合と、RM-1929 が結合する細胞（腫瘍細胞）の場合に対する本治療における RM-1929 の活性を比較するため、RM-1929 濃度を増加さ

せる 2 セットの試験を実施した（試験番号 SR-RM1929-P004）。一方の試験では中等度レベルの EGFR を発現する BxPC3 細胞を用いて RM-1929 を結合させた。他方の試験では RM-1929 との結合を妨げるために事前にセツキシマブで受容体結合を飽和させた BxPC3 細胞を用いて結合していない RM-1929 の光毒性作用を評価した。

RM-1929 が結合しないサンプルを作成するために、細胞 EGFR への競合結合で RM-1929 に勝るセツキシマブ 100 µg/mL の存在下又は非存在下で、BxPC3 細胞を種々の濃度の RM-1929 で処置した。抗体との培養 1 時間後に、光フルエンス飽和濃度 16 J/cm^2 及び 32 J/cm^2 で、690 nm の光照射を実施した。

図 9 で EGFR に結合していない RM-1929 の活性（過剰量のセツキシマブ存在下）及び EGFR に結合している RM-1929 の活性を比較した。本図は EGFR に結合している RM-1929（実線）又は結合していない RM-1929（点線）を漸増した場合の本治療を介した BxPC3 細胞に対する殺細胞作用を示す。RM-1929 非結合サンプルでは大過剰量のセツキシマブを添加し、EGFR への RM-1929 の結合を妨げた。本治療での光照射では、飽和量の光フルエンス（32 J/cm^2）及び飽和量に近い光フルエンス（16 J/cm^2）を用いた。RM-1929 が細胞の EGFR と相互作用していない場合（点線）と比較して、EGFR 抗原と結合している場合（実線）にその殺細胞作用を誘導するのに必要な量は 10,000 倍を超えて少なく、活性が強いことは注目に値する。結合していない RM-1929 に対して、結合している RM-1929 の相対強度は、各 EC_{50} 値がそれぞれ 178 µg/mL（32 J/cm^2）及び 352 µg/mL（16 J/cm^2）、14 ng/mL（32 J/cm^2）及び 23 ng/mL（16 J/cm^2）であり、10,000 倍を超えたシフトをしている。図中の EC_{50} 値は µg/mL の単位で示す。

図 9　細胞の EGFR に結合していない場合に対して結合している場合の本治療を介した RM-1929 の相対強度

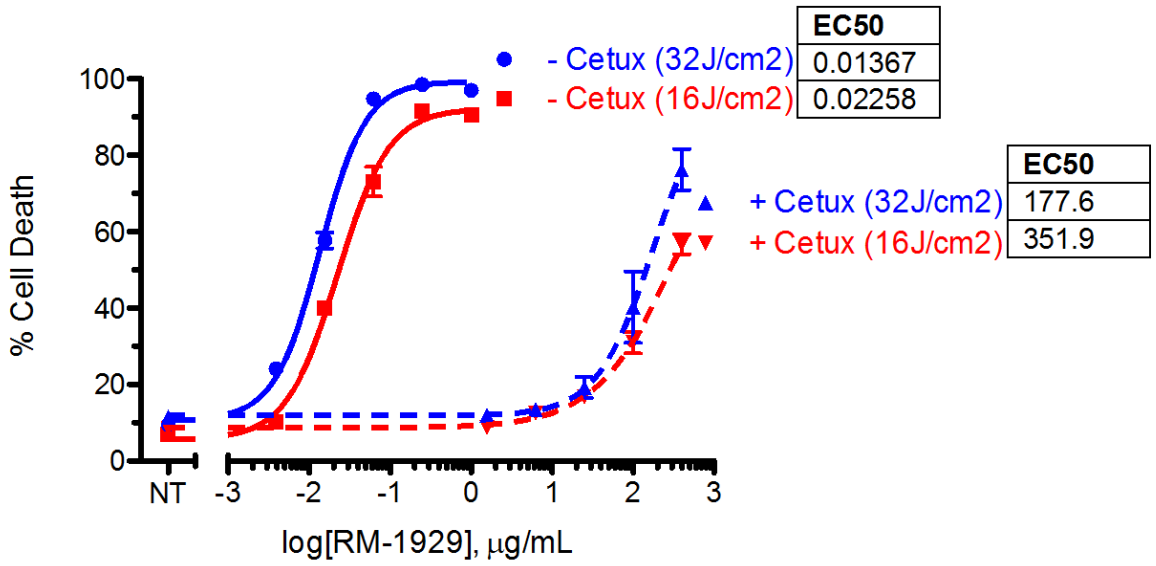


図 9 は結合している RM-1929 の活性は結合していない場合と比較して 10,000 倍を超えてシフトしていることを示す。

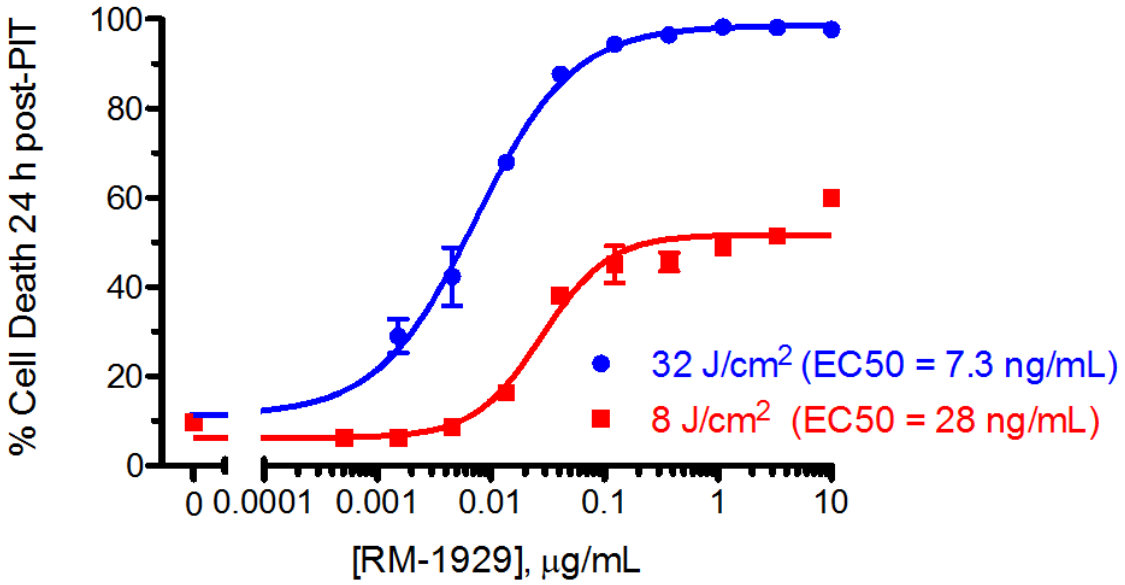
本試験結果から細胞 EGFR に結合している RM-1929 と比較して、結合していない RM-1929 は本治療を介した作用が非常に低下していることが示された。

2.2.2.5　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

適応した光出力と本治療による殺細胞作用の薬物濃度との相互依存性を測定するため本試験を実施した（試験番号 SR-RM1929-P006）。690 nm の光の 2 種の光フルエンス、8 J/cm^2（非飽和フルエンス）及び 32 J/cm^2（飽和フルエンス）を用いた場合に RM-1929 の用量を漸増して BxPC3 細胞を用いた試験を実施した。

図 10 に示すように、最大飽和レベルである 32 J/cm^2 を下回る光フルエンス 8 J/cm^2 を使用した場合、高用量の薬物でも完全な殺細胞作用を達成することはできない（赤線、飽和レベルの薬物濃度でも不完全な殺細胞作用）。同様に、細胞の EGFR 受容体を完全に占有できる薬物濃度で起きることが見込まれるように、薬物濃度が飽和レベルよりも低い場合は光出力の増加により殺細胞作用レベルを増加することができるが、最大活性を得るためには EGFR 受容体が完全に占有されることが必要である（青線）。

図 10　RM-1929 を用いた本治療は光フルエンス及び薬物濃度により変動する



こうした結果から、RM-1929 の薬理効果を最大にするには、腫瘍内のがん細胞で EGFR を完全に占有させるのに十分な薬物濃度を達成すること及び腫瘍を処置するときに十分な光出力を適応させることが重要であることが示唆された。

2.2.2.6　頭頸部がん細胞株に対する殺細胞作用を誘導する RM-1929 を用いた本治療の強度

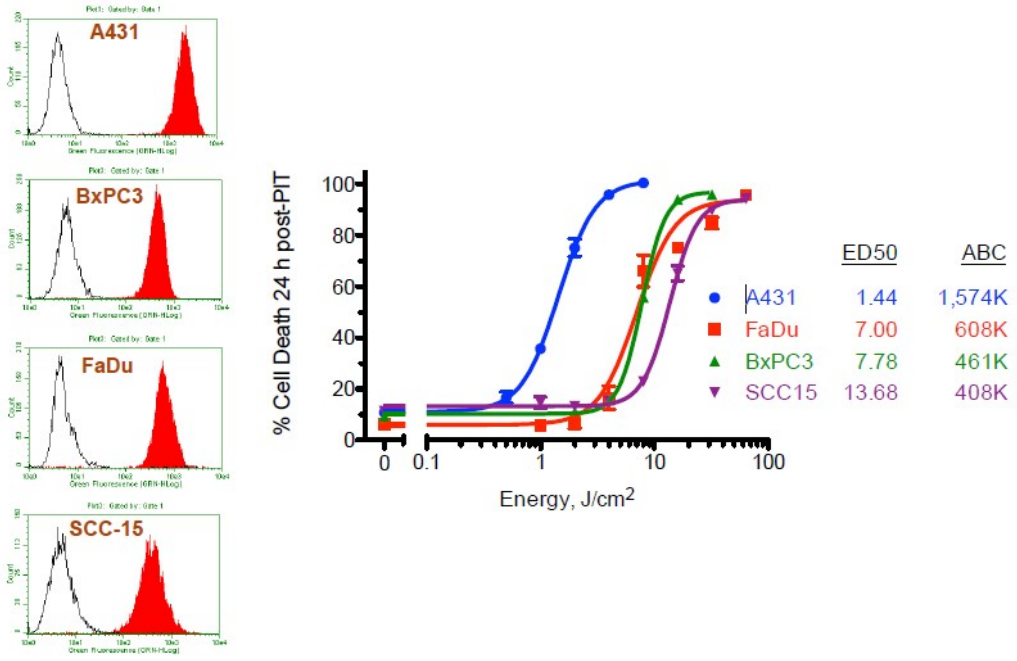
中等度量の EGFR を発現している HNC 細胞株に対して殺細胞作用を誘導する RM-1929 を用いた本治療の作用強度測定のため、及び類似又は比較的高い程度の EGFR が発現しているがん細胞株（HNC 細胞株以外）に対する殺細胞作用の相対強度を比較するために試験を実施した（試験番号 SR-RM1929-P007）。本試験は以下に示す 4 種のがん細胞株を用いて実施した。2 種は HNC 由来の細胞で FaDu、SCC-15 で、さらに HNC 細胞株以外で A431、及び BxPC3 を加えた。細胞膜上の EGFR 総発現レベルを測定して EGFR の発現レベルと RM-1929 を用いた本治療に対する比較的高い感受性との相関を測定するために、定量的なフローサイトメトリー（FC）を用いて、これら全がん細胞株の特性を解析した。EGFR 発現は校正された FC システムを用いて、細胞表面上で EGFR 抗体結合能（ABC）を測定して定量した。図 11 に 4 種の細胞株の FC 及び ABC の定量結果を示す：FaDu（ABC：608,000）、SCC-15（ABC：408,000）、BxPC3（ABC：461,000）、及び A431（ABC：1,574,000）。

2.6.2 薬理試験の概要文

細胞に RM-1929（10 µg/mL）を曝露し、690 nm の光でフルエンスの漸増を実施した。図 11 から、HNC 細胞株である FaDu 及び SCC-15 を含む、評価した全がん細胞株の完全な殺細胞作用を誘導するのに RM-1929 は効果が高いことが示された。A431 細胞は細胞表面に EGFR を約 3 倍高いレベルで発現し、RM-1929 を介した本治療による殺細胞作用に対して比較的感受性が高い（ED_{50} 値は FaDu 及び SCC-15 で 7～13.68 J/cm^2 に対して A431 は 1.44 J/cm^2）。HNC 細胞株と類似の EGFR 発現レベルの BxPC3 膵臓腺がんは RM-1929 を用いた本治療による殺細胞作用に対して類似の感受性を示した。3 倍程度の抗原発現量減少により、完全な殺細胞作用を誘導するのに 5 から 10 倍の光出力量の増加が必要となった。

類似の結果は他細胞株を用いても達成され、全ての事例で比較的高い抗原発現量は本治療の薬理作用に対する比較的高い光感受性と相関する。

図 11　RM-1929 を介した本治療が誘導する HNC 細胞株に対する強力で有効な殺細胞作用



ED_{50} values denoted in J/cm^2

本試験結果により RM-1929 は EGFR を発現している HNC 細胞に対して完全な殺細胞作用を誘導し得ることが確認された。さらに、EGFR の発現レベルが比較的高い場合、同じ活性を得るための光フルエンスは比較的低量しか必要とされないことから、完全な薬

理作用を達成するのに必要な光フルエンスは抗原発現レベルに依存することが示された。

2.2.2.7 本治療における RM-1929 の最大活性を誘導するのに最適な抗体に対する色素の比率の評価

RM-1929 の最適な DAR を測定するため、本試験（試験番号 SR-RM1929-P008）を実施した。抗体に対して種々の分子比率の色素で結合反応を実施して種々のロットの RM-1929 を合成し、抗体 1 分子につき、色素 1.3、2.7、及び 3.8 分子の平均 DAR 値を示す RM-1929 のサンプルを得た。これら RM-1929 のロットは種々の光フルエンスで完全な用量反応試験を実施し、RM-1929 の飽和濃度（10 µg/mL）を用いて本試験を実施した。

BxPC3 細胞を用いて得られた結果を図 12 に示す。類似の結果は他の細胞株（A431 細胞）からも得られた（図 13）。DAR 値 2.7（赤線）は DAR 値 3.8（緑線）と同一の光フルエンス感受性を有し、ED_{50} 値はそれぞれ 7.8 及び 7.3 J/cm^2 であった。一方、DAR 値を 1.3（青線）に減じると、十分な光フルエンスが適応された場合に完全な殺細胞活性は維持されているものの、光フルエンス感受性は軽度にシフトして ED_{50} 値は約 2 倍の 12.4 J/cm^2 であった。

図 12 BxPC3 細胞を用いた RM-1929 の介する本治療に最適な抗体に対する色素の比率（DAR）

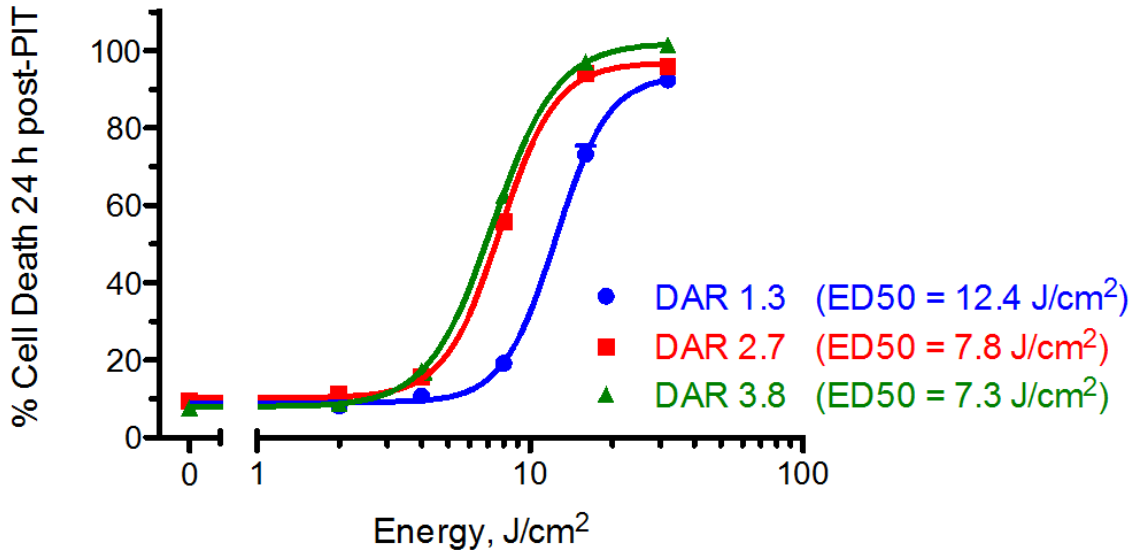
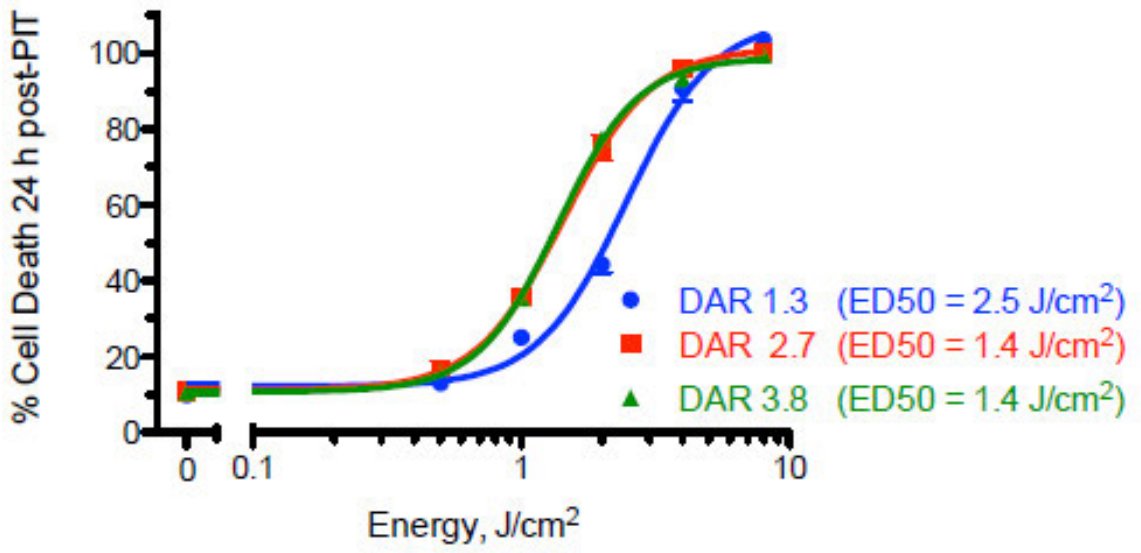


図 13　A431 細胞を用いた RM-1929 の介する本治療に最適な抗体に対する色素の比率（DAR）



比較的 DAR 値の高い RM-1929 のサンプルを使用したこれらの試験の結果から、RM-1929 を用いた本治療の光誘導性殺細胞作用に対する最適の感受性を得るには DAR 値は 2 から 3 で十分であることが示唆された。

2.2.3　ファントム組織への 690 nm の光の浸透度評価

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を使用して本試験を実施した[5)]：その組成はトリス緩衝生理食塩水、10%ゲラチン（TypeB）、170 µM ヘモグロビン（ウシ血液由来）、1%イントラリピッド（20%エマルジョン由来）から成る（試験番号 SR-RM1929-P016）。

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。線形な光透過性の評価は 690 nm の光を発光するフロンタルディフューザーを用いてファントム組織サンプルの下端に光検出器を設置して実施した。種々の厚みの組織サンプルを利用して伝達された光により、光透過量を線形的に定量し、組織の種々の深度に到達する光フルエンスを予測することが可能となった。メトヘモグロビン及びアジ化物存在下のメトヘモグロビンを用いて、2 種の異なるファントム組織の混合物を使用した。空気に曝露されるとヘモグロビンはメトヘモグロビンに変換されて酸素運搬金属タンパク質ヘモグロビン体となり、ヘムグループ内の鉄は正常ヘモグロビンでの Fe^{2+}ではなく、Fe^{3+}となる。オキシヘモグロビンとは異なり、メトヘモグロビンは酸素と結合することができない。それは青みを帯びたチョコレート色で、吸収スペクトルは正常な鉄の状態（Fe^{2+}）のヘモグロビン

とは多少異なる。これを補完するために、以下に示すメトヘモグロビンとアジ化合物との組み合わせを使用して、類似のファントム組織を作成した。そのメトヘモグロビンとは、正常な鉄の状態（Fe^{2+}）のヘモグロビンの吸収に比較的近似した新規のアジ化物-メトヘモグロビン体を形成する。

図 14 にファントム組織への 630 nm（赤線）及び 690 nm（青線）の線形な光透過性を示す。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、ヘモグロビンにより 630 nm の光波長は比較的高いレベルで吸収されるため、690 nm の光は 630 nm の光よりもかなり高い透過性を示した。生体組織と光との相互作用に対する生物物理学的解析から、690 nm の線形な光透過性は吸収よりも分散に影響を受けることが示唆される。1 cm の深度で、690 nm の線形な光透過性は、メトヘモグロビン及びアジ化物-メトヘモグロビ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。

本試験結果の示す光透過性の範囲に基づいて、臨床で使用される光フルエンスで、RM-1929 を励起させ、殺細胞作用を誘導するのに、深度 1 cm は許容される深度であることが示された（表 4）。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 の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殺細胞作用を示し得る。

図 14　ファントム組織の 690 nm 及び 630 nm の光の線形な光透過性

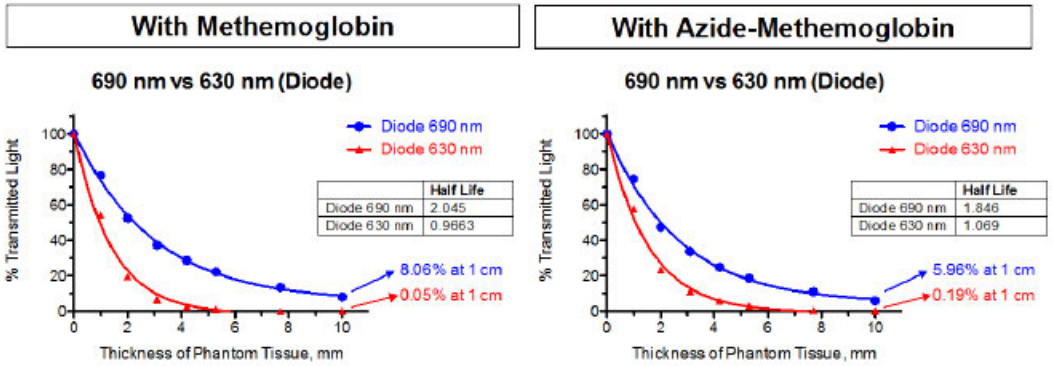


表 4　正面照射を用いて臨床で使用される光フルエンスレベルでの線形な光透過性

Fluence J/cm^2	1 cm Linear Transmission (J/cm^2)	
	6% Transmission	8% Transmission
50	3	4
150	9	12
250	15	20

2.3 *in vivo* 薬理試験

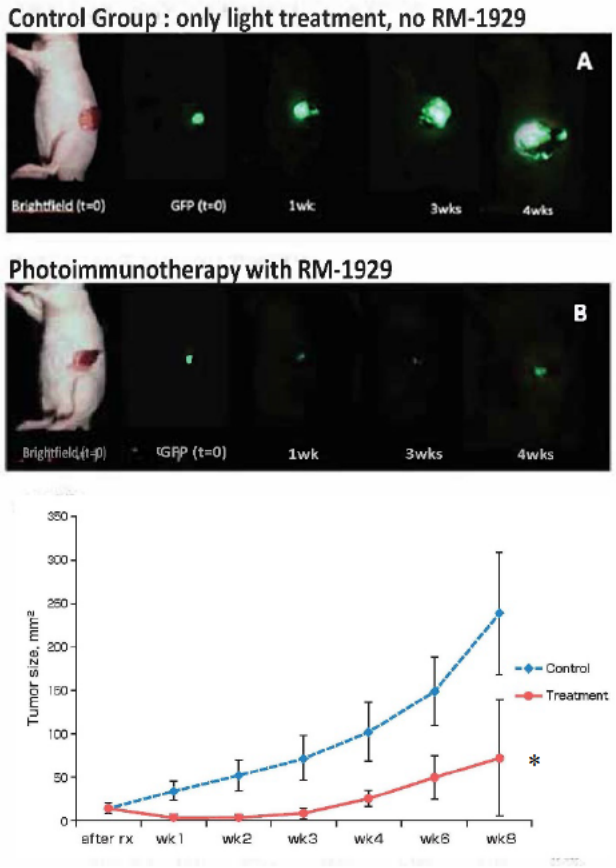
2.3.1 マウス異種移植における抗がん活性

RM-1929 を単回投与し、光照射を腫瘍に 1 回実施した後に RM-1929 を用いた本治療の *in vivo* での抗がん作用を測定するため本試験を実施した（試験番号 SR-RM1929-P013）。BxPC3 細胞（膵臓腺がん）を免疫不全胸腺欠損（nu/nu）マウスの膵臓に同所性に移植し、処置の 2～3 週間前に生着させた。本試験で使用した BxPC3 細胞を、蛍光画像化技術を用いて腫瘍の大きさをモニターするのに使用できるマーカーとして緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するように前もって改変した。本試験で使用する動物として、本治療処置前に腫瘍の最初の大きさが少なくとも 20 mm^3 となっている個体を選択した。薬剤である RM-1929 を静脈内投与（マウス 1 匹に 100 µg）して処置を開始した。対照群は媒体のみを処置し、薬剤は投与しなかった。表面照射用のフロンタルディフューザーに接続しているレーザによる光照射を可能にするために、薬剤投与 24 時間後に腫瘍を外科的に露出した。腫瘍に 690 nm の光 250 J/cm^2 を 150 mW/cm^2 で照射した。Maestro Imaging System（Perkin Elmer）を用いて *in vivo* で GFP 蛍光カウントを測定することにより、腫瘍の増殖を 8 週間まで毎週評価した。

図 15（パネル A）に溶媒を投与した対照（Control）群（n = 5）のマウスの代表例を示す。対照群では、蛍光カウントとして測定した腫瘍が第 1、3、4 及び 8 週と迅速に増殖していることは注目に値する。図 15（パネル B）に RM-1929 をマウス 1 匹当たり 100 µg 投与した群（n = 5）のマウスの代表例を示す。図 15（パネル C）に対照群（青線）又は処置群（赤線）の 8 週間にわたる腫瘍増殖の経過を示す。

図 15（パネル B、C 赤線）に示すように、RM-1929 を投与及び 690 nm の光を照射した本治療処置群の動物には、本治療処置 1 週間後に迅速な腫瘍縮小が認められた。また、その腫瘍量の増加は、光を照射したが媒体を投与した動物（パネル A、C 青線）と比べると大幅に（投与後 8 週間まで）遅延した。RM-1929 を単回投与しただけで光を照射しない場合は、測定し得る抗がん作用は認められなかった（データ示さず）。

図 15　RM-1929 を用いた本治療単回処置後のマウス同所性異種移植モデルにおける *in vivo* 抗がん活性



*：対照群に対して $p < 0.001$（Student's t 検定）

本治療処置による抗がん作用が非常に強力でもマウス異種移植での BxPC3 細胞の増殖が急速なので、腫瘍の再発が認められた。これは恐らく、処置時に薬剤曝露又は光照射が十分ではなかったために破壊されなかったがん遺残細胞の存在によると思われる。完全に腫瘍を根絶するためには 2 回以上の光照射が必要で、単回サイクル（RM-1929 投与と光照射）の本治療で完全に根絶できていないがん遺残細胞に対処するのに、次の処置サイクルが必要となると見込むのは合理的である。実際に、米国国立がん研究所により公表された異種移植試験では、IR 700 を結合した抗 EGFR 抗体を介した本治療を用いた反復光照射及び本治療の反復処置により、抗がん作用は大幅に増加し、再発率は低下することが示唆された。

2.3.2　外科的切除に対するアジュバントとしての RM-1929 を用いた本治療

局所に限定したがん処置を改善するために外科的切除と RM-1929 を用いた本治療を併用することができるか測定するため試験を実施した（試験番号 SR-RM1929-P014）。外科的切除直後に RM-1929 を介した本治療処置を行うことにより外科的切除で完全に取り除

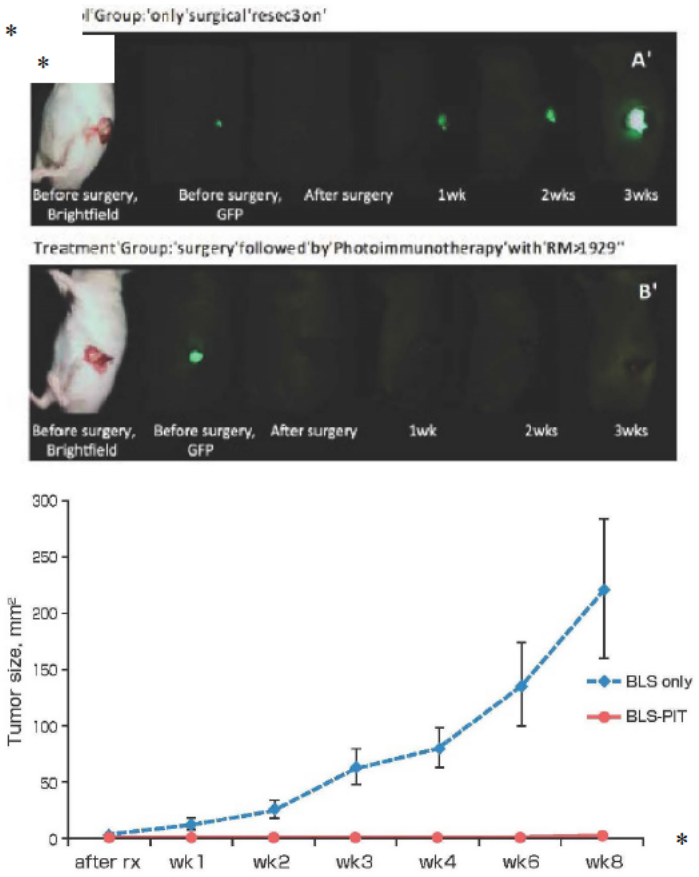
けなかったがん遺残細胞に対してさらに殺細胞作用を誘導し、手術後の腫瘍の再発を回避することができるとの仮説を立てた。

BxPC3 細胞を免疫不全胸腺欠損（nu/nu）マウスの膵臓に移植することでマウス膵臓同所性異種移植を確立した。本試験で使用した BxPC3 細胞を、蛍光画像化技術を用いて腫瘍の大きさをモニターするのに使用できるマーカーとして GFP を発現するように前もって改変した。3 週間後マウスは、RM-1929 を投与した処置群（マウス 1 匹当たり 50 µg［100 µg/mL］を静脈内投与）、及び媒体を投与した対照群の 2 群（1 群当たり 10 匹）に無作為に分けた。本試験で使用する動物は、本治療処置前に腫瘍の最初の大きさが少なくとも 20 mm^3 となっている個体を選択した。

以下に示す腫瘍の外科的切除を外科医が実施するときにバイアスがかからないように処置は盲検化して実施した。薬剤又は溶媒を投与した 1 日後、腫瘍は外科的に切除して切開面を閉じる前にその表面を 250 J/cm^2 及び 150 mW/cm^2 で 690 nm の光をレーザ装置に接続したフロンタルディフューザーにより単回照射した。明視野下での手術（BLS）を実施し、腫瘍切除時に蛍光による誘導はしなかった。

図 16 に示すように、外科的切除にアジュバントとして併用した RM-1929 を介した本治療は手術後 8 週間まで腫瘍の再発予防に顕著な影響を及ぼした。手術と溶媒のみで処置した全動物には広範な腫瘍再発が認められたが、手術と RM-1929 で処置した動物には手術後 8 週間まで検出限界ぎりぎり又は検出できない程の腫瘍再発しか認められなかった。

図 16　外科的切除と RM-1929 を用いた本治療との併用により腫瘍再発が減少する



BLS: Bright light surgery

*：対照群に対して $p < 0.001$（Student's t 検定）

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 RM-1929 を用いた本治療を併用することの潜在的医学価値が例示された。これに関連して、原発性腫瘍の再発の可能性を減少させる又は手術適応可否の境界線上の患者を手術で治療するために、手術のアジュバントとして RM-1929 を介した本治療を活用できると思われる。つまり、がん遺残を根絶するため、及び他の方法では外科的切除手術を適応できない患者の治療を可能にするために、腫瘍の大部分を手術で除去した後に、外科的に取り除くことができない腫瘍辺縁部に対して RM-1929 を介する本治療が可能であると考える。

2.3.3　臨床で使用するレーザ（ML7710-690-ASP）による RM-1929 を介した本治療：マウス異種移植における抗がん活性

臨床試験で使用するレーザ装置を使用して RM-1929 を介する本治療のマウス異種移植に対する作用を評価するため試験を実施した（試験番号 SR-RM1929-P015）。本試験の 2 つの目的を以下に示す：（i）臨床試験で使用するのと同じレーザ装置、ディフューザー

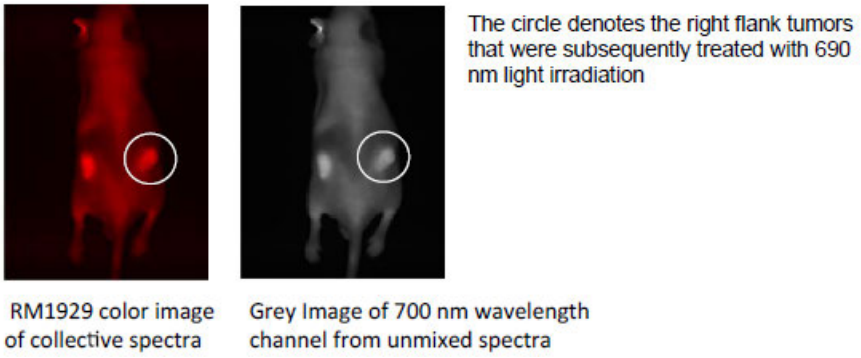
及び光フルエンスを用いて抗がん作用を実証すること及び（ii）腫瘍の組織学的検査で腫瘍ネクローシス及びがん特異性を測定すること並びに処置後の皮膚や脂肪組織及び筋肉といった周囲の正常組織の完全性を実証すること。本試験で使用した RM-1929 のロット番号はサル GLP 適用毒性試験で使用したロット（ロット番号 PD-375-0701-P36）と同一であった。

光照射は臨床試験で用いられたレーザ装置 ML7710-690-ASP 及び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用いて実施した。ヒト腫瘍の組織内照射をシミュレーションするために、腫瘍と直接接触した 1 cm 長のシリンドリカルディフューザーで比較的大きな皮下の腫瘍（10 mm 長まで）を照射して試験を実施した。臨床試験で組織内照射に使用される最低フルエンス及び最高フルエンスに対応する、光出力密度 400 mW/cm で 100 J/cm 及び 300 J/cm の 2 つのフルエンスで試験を実施した。腫瘍量に対する処置の効果及び投与後の組織学的検査による腫瘍ネクローシスの分析と周囲の正常細胞の完全性の実証を本試験で評価した。

増殖の指標として GFP を発現している膵臓腺がん BxPC3 細胞を、雄胸腺欠損（nu/nu）マウスの左右の横腹の皮下に移植した。処置を実施する日に腫瘍長をカリバスで測定し、10 mm 長に達するまで腫瘍を増殖させた。各マウスに 100 µg の RM-1929 を静脈内投与した。光を照射するタイミングである投与 24 時間後に RM-1929 が腫瘍に対して適正な指向性を有することを保障する目的で、薬剤投与 24 時間後に腫瘍へ RM-1929 が集積していることを、セツキシマブに結合した IR 700 の蛍光をモニターすることで確認した（図 17）。

固定露出時間 700 ms と 1x1 のピクセル分配で、635 nm の励起フィルタ（616～661 nm の範囲）及び 670～900 nm の範囲を 10 nm 単位でイメージングを増加して、675 nm のロングパス吸収フィルタを用いた Maestro Imaging System（Perkin Elmer）で RM-1929 の蛍光シグナルを検出した。670～900 nm の範囲で各波長からの分光蛍光データの集計結果として生じたカラー画像は Maestro software を用いて RM-1929 の関心スペクトルを含む 700 nm の RM-1929 吸収波長チャネルに分離し、灰色の画像が得られた（図 17）。関心領域（ROI）法を用いて、結果として生じた灰色画像から RM-1929 の強度データを得た。

図 17　静脈内投与 24 時間後に腫瘍へ集積する RM-1929 の *in vivo* イメージング画像



RM-1929 投与の約 24 時間後、右腹側腫瘍に 300 J/cm 又は 100 J/cm の光フルエンス、400 mW/cm の出力密度で 690 nm の光を照射した。左腹側腫瘍は右の腫瘍と同様に操作したが、レーザ装置の電源は切って光は照射せず、対照として用いた。

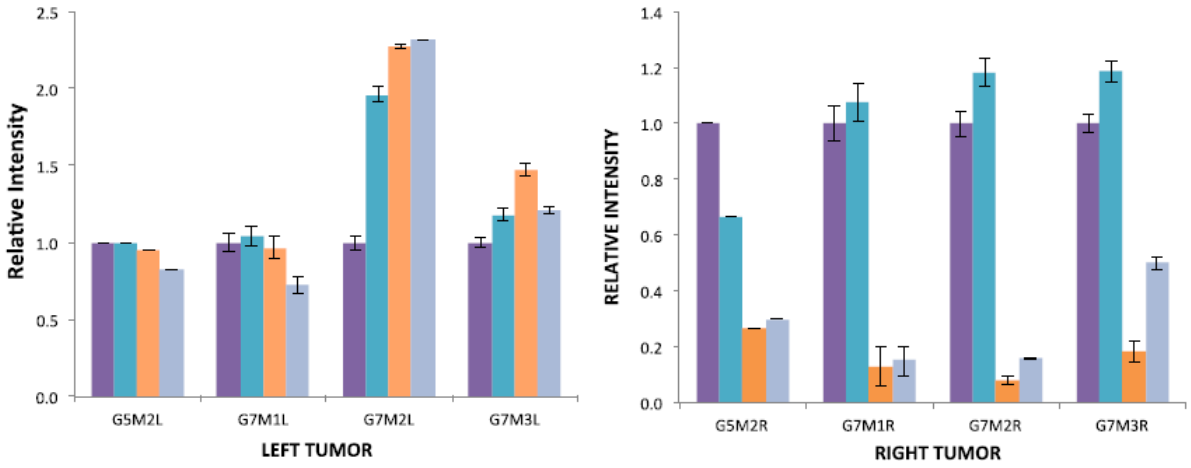
腫瘍のサイズに対する本治療の効果は、マウス上の両側の腫瘍の ROI 及び蛍光の背景データとして stage 上の ROI を手動で描いて Maestro software を用いて得られた GFP の蛍光強度データで測定した。蛍光強度のデータ測定時点は（i）RM-1929 の静脈内投与前、（ii）690 nm の光照射前、（iii）690 nm の光照射後及び（iv）試験終了時（光照射 3 日後）に設定した。固定露出時間 350 ms と 1x1 のピクセル分配で、500 から 800 nm の範囲を 10 nm 単位でイメージングを増加して、455 nm の励起フィルタ（435～480 nm の範囲）及び 490 nm のロングパス吸収フィルタを用いた Maestro pre-set Blue filter set で GFP の蛍光シグナルを検出した。500 から 800 nm の範囲で各波長からの分光蛍光データの集計結果として生じたカラー画像は Maestro software を用いて GFP の関心スペクトルを含む 510 nm の GFP 吸収波長チャネルに分離した。

蛍光強度を表すために Maestro software ではピクセルカウントを用いた。

腫瘍で GFP を発現している細胞由来の相対蛍光カウントを測定して処置前に ROI での各腫瘍の値を正規化したときに、図 18 の右パネルに、300 J/cm で光照射したことによる右の腫瘍に対する効果を示している。RM-1929 の投与のみでは GFP 蛍光に影響を及ぼさないが、両方の光フルエンス（100 J/cm 又は 300 J/cm）で光を照射した直後に処置した全動物で顕著な反応が検出されたこと及び GFP の減少レベルは光を照射した 3 日後に動物を剖検するときまで継続していた（右図のオレンジ及び灰色のカラム）ことは注目に値する。一般に、光を照射しない左の腫瘍の GFP 値（図 18 の左パネル）は処置の間で変化しないことから、本治療に対する反応は 690 nm の光による RM-1929 の励起及び本治療による腫瘍破壊に確かに相関していることが示された。RM-1929 投与後に 300 J/cm

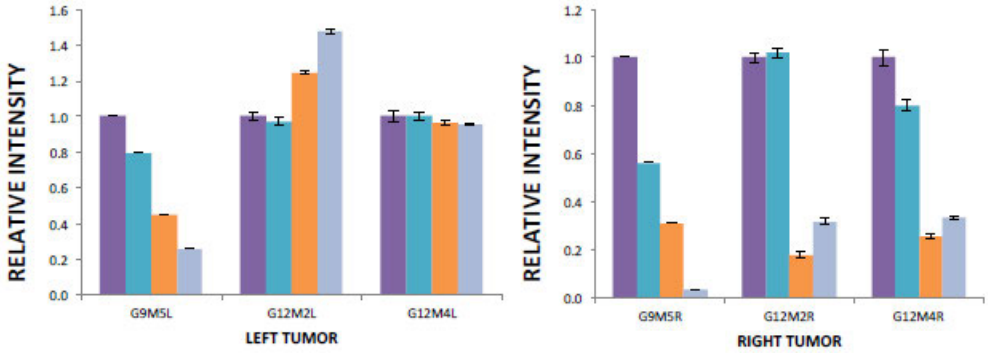
で処置された動物の 1 個体（G7M2L）で左の腫瘍（光照射されていない）の GFP カウントの増加が認められたが、これは背景のベースラインの変化に由来すると思われる。

図 18　臨床用レーザ装置 ML7710-690-ASP 及び 1 cm シリンドリカルディフューザーを用いて 300 J/cm で組織内照射したときの RM-1929 を介した本治療の抗がん作用



100 J/cm でも類似の結果が得られた（図 19）。300 J/cm での処置と同様に、処置され光を照射された腫瘍（右横腹）全てで光照射直後に GFP カウントの顕著な減少が認められた。100 J/cm で処置された動物の 1 個体（G9M5L）でも左の腫瘍（光照射されていない）の GFP カウントが低値を示したが原因は不明である。

図 19　臨床用レーザ装置 ML7710-690-ASP 及び 1 cm シリンドリカルディフューザーを用いて 100 J/cm で組織内照射したときの RM-1929 を介した本治療の抗がん作用



動物は光照射 3 日後（RM-1929 投与 4 日後）に剖検し、周囲の組織（皮膚及び筋肉）と共に腫瘍を切除し、ホルマリンで 24 時間固定した。ホルマリン固定後、腫瘍はパラフィンに包埋し、5 μm の厚さの切片を、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）組織染色のためにスライドガラスに貼り付けた。H&E 組織染色はネクローシス及び損傷を受けた組織形態を示すために実施した。ヘマトキシリン染料は細胞核を青く染色し、エオシン染料は血球細胞、皮膚及び筋肉といった他の組織構造をピンク、オレンジ又は赤に染色した。BxPC3 細胞のみが GFP マーカーを発現しているので、処置後の BxPC3 がん細胞根絶を評価するために GFP 染色を実施した。

細胞内の GFP の存在を評価するために、ポリマーベースペルオキシダーゼ系を用いた GFP 特異的な抗体で組織切片を染色した。組織切片は核選択のためのヘマトキシリン（青色）、及び残りの組織構造選択のための Fast Green FCF（緑色）で対比染色した。染色した切片の画像はデジタルカメラを備えている顕微鏡を使用して取得した。

全体的に、対照群（左腫瘍）と比較して本治療（右腫瘍）の処置後に腫瘍細胞及び細胞外マトリックス（ECM）に対する損傷を本試験で確認した。本結果は、光毒性薬剤を励起することで想定される腫瘍の組織損傷と一致していた [6), 7), 8), 9), 10)]。対照群の腫瘍と比較して、本治療を処置した腫瘍の H&E 染色切片から、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、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は対照（左横腹）及び本治療を処置された腫瘍（右横腹）の両方とも無傷であったことから、本治療の処置後に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た（図 20）。照射していない腫瘍と比較して、照射した腫瘍では 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（図 21）。上述のネクローシス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損傷は確認されなかった（図 22）。このことから、300 J/cm は 1 cm までの深度の腫瘍の処置には最適の光フルエンスであることが示された。

図 20　代表例のマウス（G5M2）由来の腫瘍サンプルの組織切片の GFP 染色（右の腫瘍に 300 J/cm で照射し、その 3 日後に剖検した）

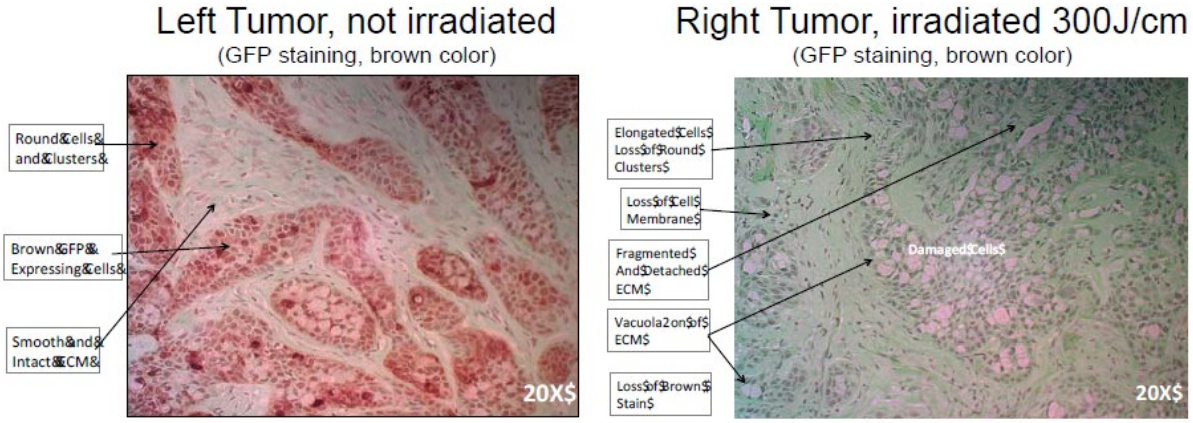


図 21　代表例のマウス（G5M2）由来の腫瘍サンプルの組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色（右の腫瘍に 300 J/cm で照射し、その 3 日後に剖検した）

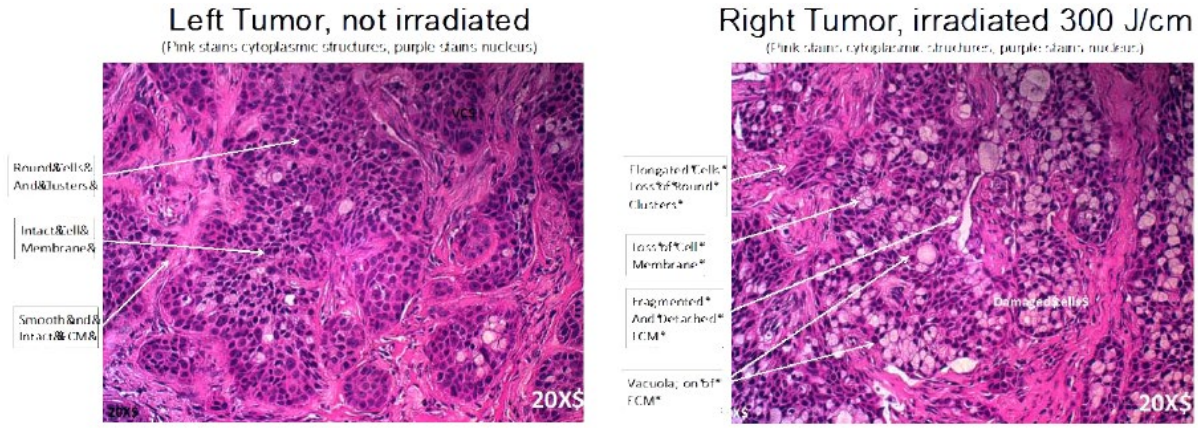
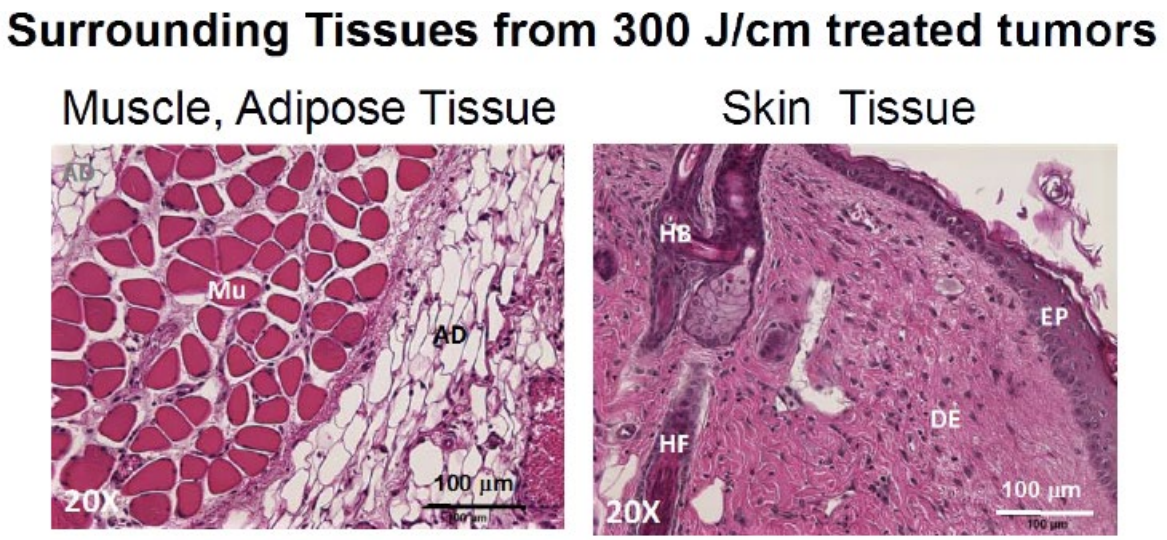


図 22　代表例のマウス（G5M2）由来の腫瘍サンプルの周辺組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色（右の腫瘍に 300 J/cm で照射し、その 3 日後に剖検した）



HB, hair bulb; HF, hair follicle; EP, epidermis; DE, dermis; Mu, muscle; AD, adipose tissue

100 J/cm 処置群の腫瘍は処置後にネクローシスの特徴を示したが、300 J/cm 処置群と同様に、皮膚や脂肪組織又は筋肉といった周辺組織での損傷は確認されなかった。腫瘍組織の損傷及び GFP 染色減少がある程度認められたが、円形細胞集塊及び GFP の茶色染色の存在で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。このことから、100 J/cm は効果的な処置に必要とされる最適のフルエンスレベルを下回ることが示唆された。

3.　副次的薬理試験

RM-1929 を用いた副次的薬理試験は実施しなかった。

4.　安全性薬理試験

4.1 まとめ

In vivo 安全性薬理試験の評価項目は安全性薬理試験を単独で実施する代わりにサル GLP 適用毒性試験に組み込んで実施し、以下に示す医薬品規制調和国際会議（ICH）の 3 極調和ガイドラインに従った：バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価、薬食審査発 0323 第 1 号（平成 24 年 3 月 23 日）、安全性薬理試験ガイドライン、医薬審発 902 号（平成 13 年 6 月 21 日）、及び抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイ

ドライン、薬食審査発 0604 第 1 号（平成 22 年 6 月 4 日）。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（心電図検査）、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。心電図（ECG：3 誘導）及び呼吸数は試験第 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。さらに、セツキシマブ又は RM-1929 の光毒性と関連した皮膚毒性の可能性があるため、全個体で潜在的な皮膚刺激性を評価した。

神経行動機能（運動、行動及び理学検査により測定）、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。

4.2 カニクイザルに静脈内持続投与した RM-1929 の単回投与毒性試験及びトキシコキネティクス試験に組み込んだ安全性薬理試験

正式な安全性薬理試験は実施しなかったが、心血管系（ECG）、呼吸数（目測）、及び神経行動上の変化（例えば、運動量や一般行動の症状観察）を含む安全性薬理試験評価を組み込んだサル GLP 適用毒性試験を実施した（試験番号 11286）。カニクイザルに RM-1929 を 2 時間単回静脈内持続投与した場合のトキシコキネティクス（TK）及び毒性を評価するために試験を実施した。本試験での RM-1929 の DAR はセツキシマブ 1 分子につき、色素が 2.9 分子であった。本試験では雄及び雌のカニクイザルにリン酸緩衝生理食塩液（PBS、溶媒対照）又は RM-1929 を 40 又は 80 mg/kg の投与量で単回投与した。表 5 に試験デザインを示す。80 mg/kg は、試験施設内の動物実験委員会（IACUC）で承認されたカニクイザルへの静脈内持続投与量（1 時間当たり 8 mL/kg）に基づいて設定した最大投与量であった。さらに、色素が結合していないセツキシマブ（抗体単体）と RM-1929 の毒性プロフィールを比較するために、別コホートの動物にセツキシマブを 16 mg/kg の投与量で単回投与した。主試験群の動物は試験 15 日目に剖検し、回復期を評価する群（溶媒対照群、RM-1929 は 80 mg/kg 投与群のみ）は試験 28 日目に剖検した。標準的な安全性評価項目及び TK の評価に加え、RM-1929 の生体内分布を評価するための項目も実施した。本試験で生体内分布を評価するため、追加コホートの動物に RM-1929 を 40 mg/kg の投与量で単回投与し、試験 3 日目に剖検した。しかし、この群は安全性パラメータの評価には含めなかった。

表 5　カニクイザル単回投与 GLP 適用毒性試験

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	-[1]	3M/3F	2M/2F
2	RM-1929	40	4	2M/2F[2]	3M/3F	-[1]
3	RM-1929	80	8	-[1]	3M/3F[3]	2M/2F
4	Cetuximab Alone	16	4	-[1]	3M/3F[3]	-[1]

1 Dash indicates no animals in this group.
2 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).
3 Two animals/sex in 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.

全動物（試験 3 日目に剖検した第 2 群の動物を除く）で一般状態観察、摂餌量、体重、眼科的検査、臨床病理学的パラメータ（例えば、血液学的検査、血液凝固系検査、生化学検査、尿検査）、剖検所見、器官重量、及び組織学的検査における変化を評価した。さらに、セツキシマブ及び RM-1929 の光毒性と関連した皮膚毒性の可能性があるため、試験を通して全動物（試験 3 日目に剖検した第 2 群の動物を除く）で潜在的な皮膚刺激性を評価した。前肢の遠位内側で長さ約 5 インチの皮膚を（必要に応じて再度剃毛）評価し、皮膚刺激の兆候（例えば、紅斑、乾燥又はひび割れ、膿疱）を記録した。動物が飼育されている部屋の中央、及び薬剤を動物に投与するケージの上下で光曝露量も毎日測定した。毎日の明暗サイクルは明期（人工の蛍光灯）が 12 時間、暗期が 12 時間であった。安全性薬理試験のパラメータは本試験に組み込まれ、呼吸機能（目測による呼吸数）、心血管機能（ECG 検査）、及び中枢神経系機能に影響を及ぼす一般状態の変化（例えば運動量や一般行動の症状観察等）の評価を実施した。試験期間中に動物から採血し、総セツキシマブ量（ELISA を用いてセツキシマブ遊離体及び RM-1929 を定量）、総 RM-1929 量（サイズ排除高速液体クロマトグラフィー［HPLC-SEC］を用いて定量）、及び IR 700 遊離体量（HPLC-SEC を用いて定量）の TK 解析を実施した。血液サンプルはセツシキマブ（16 mg/kg）を投与した動物からも回収し、ELISA を用いて分析した。

単回投与の RM-1929 は忍容性が高く、全動物は予定された剖検時まで生存していた。神経行動機能（運動、行動及び理学検査により測定）、ECG、及び呼吸数に対して、いずれの用量においても、処置に関連した影響を示す証跡は認められず、皮膚への影響も認められなかった。TK 及び生体内分布の結果は Module 2.6.4 に示した。毒性試験の結果は Module 2.6.6 に示した。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

RM-1929 を用いた薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

6. 考察及び結論

今般 RM-1929 の製造販売承認申請に際し、実施した包括的非臨床薬理試験を評価した。

セツキシマブと比較して、RM-1929 は、抗原である EGFR と実質的に同一の生化学的相互作用、及び同一の EGFR 機能の制御を示した。RM-1929 は、EGFR 細胞外ドメインに高い親和性を有する結合剤で、類似の K_d 値及び実質的に同一の K_{off} 値を示す。RM-1929 は、同じ効能及び同じ効果で、EGFR のシグナル伝達及び EGFR を介したがん細胞増殖の阻害剤としてセツキシマブの機能制御を再現する。これらの結果は、EGFR の観点から、RM-1929 の主な薬理効果がセツキシマブと同一であることを示唆する。HNC 細胞の EGFR が高頻度発現しているならば、RM-1929 は再発 HNC がん患者の本治療を有効にするヒト HNC 腫瘍に分布及び蓄積する。

RM-1929 は、セツキシマブと同一の効能の *in vitro* ADCC 活性を示すが、最大効果は顕著に低かった。ADCC 活性が *in vivo* でセツキシマブの抗がん活性に寄与する機序と考えられる場合でも、本治療において RM-1929 の使用に ADCC 活性が関係しているとは非常に考えにくい。RM-1929 を使用する本治療は、薬剤が細胞の EGFR に結合して 690 nm の光で励起されている限り迅速な殺細胞作用を誘導する。そのため、ADCC 活性が本治療を用いた RM-1929 の主要な薬理効果に寄与する可能性は極めて低い。

RM-1929 を介した本治療は、*in vitro* 及び *in vivo* において迅速、特異的、かつ効果的な殺細胞作用を誘導できる。効果は EGFR 発現量に依存するため HNC 細胞株を含む EGFR 発現がん細胞株は本治療及び RM-1929 を使用した殺細胞作用に対する感受性が高い。がん細胞の特殊性は、光照射による強力な殺細胞作用を引き出すために細胞の EGFR に RM-1929 が結合する必要があることによって生じる。*In vitro* における混合培養細胞及び *in vivo* で使用したマウス異種移植で本治療が誘導した腫瘍の破壊及びネクローシスが観察されたが、正常な周囲の組織は処置による影響を受けなかったことから、非結合 RM-1929 の細胞傷害を引き起こす薬理活性の欠落は、抗体／抗原をターゲットとすることでがん特異性が向上し、周囲の正常組織にダメージを与えるリスクを低減させることを示唆する。

2.6.2 薬理試験の概要文

薬効を裏付ける試験で重要なのは、組織に照射される光量及び RM-1929 濃度の投与量依存性である。RM-1929 が細胞の EGFR を完全に占有した場合、最大効果（殺細胞作用の誘導に必要な最低光フルエンス）は飽和薬剤濃度でのみ達成可能である。これは、至適薬効用量が腫瘍 EGFR の完全占有が達成可能な用量であることを支持する。

完全な EGFR の占有であっても、RM-1929 を使用する本治療の効力は EGFR の発現量に依存しており、抗原の低発現では殺細胞作用を誘導する高い光フルエンスの適応が必要であることと相関する。

同所性異種移植及び皮下異種移植マウスを用いた試験は、RM-1929 を介した本治療の使用で迅速で効果的な腫瘍破壊を示唆した。抗がん効果は、腫瘍量又は腫瘍再発の有意な縮小が RM-1929 及び 690 nm の光照射の併用で処置された動物で確認されたことから、光照射直後に観察可能であり、数週間持続した。臨床用レーザ及びヒト腫瘍の組織内照射に使用されるシリンドリカルディフューザーを使用して実施された試験結果は、300 J/cm の光フルエンスががん細胞の完全な殺細胞作用により強力な腫瘍損傷を達成できることを示す。組織検査は、RM-1929 及び 690 nm の光照射で処置された腫瘍の広範なネクローシスを説明するが、690 nm の光照射をせず RM-1929 の曝露をした腫瘍ではネクローシスがなかった。さらに、組織検査は、300 J/cm での腫瘍の処置が脂肪細胞、筋肉及び皮膚のような周辺正常組織の健常性に影響しないことを示した。100 J/cm の低光フルエンスは、部分的な腫瘍反応で不完全な薬効を引き起こすが、周辺正常組織の損傷はないという特異性が保存された。これは、臨床試験における 100 J/cm の光フルエンスが不完全な反応を引き起こす可能性を示唆する。

690 nm 光の効果的な線形透過は 1 cm であると設定した。その深度又は光源からの距離で光の線形透過の 6～8%が検出され、高フルエンス範囲の 250 J/cm^2 及び 300 J/cm では、RM-1929 の励起及び殺細胞作用を誘導するのに十分な出力は 1 cm の距離に存在するがん細胞に到達すると考えられた。

したがって、RM-1929 の有効性は関連した *in vitro* 及び *in vivo* 試験で確認された。これらの結果は、RM-1929 には明白な異常所見を示さずに、潜在的な有効性を有することを裏付けた（Module 2.6.6 参照）。

7. 図表

図表は本文中に示した。

8. 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. Mitsunaga M, Nakajima T, Sano K, Choyke PL, Kobayashi H. Near infrared theranostic photoimmunotherapy (PIT): repeated exposure of light enhances the effect of immunoconjugate. Bioconjugate chemistry. 2012;23(3):604-9.
3. Nakajima T, Sano K, Mitsunaga M, Choyke PL, Kobayashi H. Real-time Monitoring of In Vivo Acute Necrotic Cancer Cell Death Induced by Near Infrared Photoimmunotherapy Using Fluorescence Lifetime Imaging. Cancer Research. 2012;72(18):4622-8.
4. Mitsunaga M, Nakajima T, Sano K, Kramer-Marek G, Choyke PL, Kobayashi H. Immediate in vivo target-specific cancer cell death after near infrared photoimmunotherapy. BMC cancer. 2012;12:345.
5. Pleijhuis RG, Langhout GC, Helfrich W, Themelis G, Sarantopoulos A, Crane LM, et al. Near-infrared fluorescence (NIRF) imaging in breast-conserving surgery: assessing intraoperative techniques in tissue-simulating breast phantoms. European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology. 2011;37(1):32-9.
6. Peng CL, Shih YH, Lee PC, Hsieh TM, Luo TY, Shieh MJ. Multimodal image-guided photothermal therapy mediated by 188Re-labeled micelles containing a cyanine-type photosensitizer. ACS nano. 2011;5(7):5594-607.
7. De Magalhaes N, Liaw LH, Berns M, Cristini V, Chen Z, Stupack D, et al. Applications of a new In vivo tumor spheroid based shell-less chorioallantoic membrane 3-D model in bioengineering research. Journal of biomedical science and engineering. 2010;3(1):20-6.
8. Hilario E, Canavate ML, Lacalle J, Alonso-Alconada D, Alvarez A., Cell death. A comprehensive approximation. Delayed cell death., Necrosis. Microscopy: Science, Technology, Application and Education 3 2010:1017-24.
9. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. Anatomia, histologia, embryologia. 2002;31(4):214-23.

10. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. The American journal of pathology. 1995;146(1):3-15.