目次

2.4 非臨床試験の概括評価 3
2.4.1 非臨床試験計画概略 3
2.4.2 薬理試験 4
2.4.3 薬物動態試験 5
2.4.3.1 試験方法 5
2.4.3.2 吸収及び血清中濃度 5
2.4.3.3 分布 6
2.4.3.4 代謝 6
2.4.3.5 排泄 7
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 7
2.4.3.7 その他の薬物動態試験 7
2.4.4 毒性試験 7
2.4.5 総括及び結論 10
2.4.5.1 薬理試験 10
2.4.5.2 薬物動態試験 12
2.4.5.3 毒性試験 12
2.4.6 参考文献一覧 13

非臨床試験の概括評価の略号一覧表

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ADP	adenosine diphosphate	アデノシン二リン酸
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
BWL	body weight loss	体重減少
BUN	blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CHO	Chinease hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CNS	central nervous systems	中枢神経系
CRO	contract research organization	医薬品開発業務受託機関
CT_{50}	contact time for 50% inhibition	50%阻害に要する最小接触時間
CTCL	cutaneous T-cell lymphoma	皮膚Ｔ細胞性リンパ腫
DD	denileukin diftitox	デニロイキン　ジフチトクス（遺伝子組換え）
DT	diphtheria toxin	ジフテリア毒素
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定
FDA	United States Food and Drug Administration	米国食品医薬局
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	The International Council for Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
IFNγ	interferon γ	インターフェロンγ
IL-2	Interleukin-2	インターロイキン-2
IL-2R	IL-2 receptor	インターロイキン-2 受容体
K_i	inhibition constant	阻害定数
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核球
PHA	phytohemagulutinin	フィトヘマグルチニン
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PT_{50}	processing time for 50% inhibition	50%阻害に要する処理時間
Treg	regulatory T cell	制御性Ｔ細胞
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス

2.4 非臨床試験の概括評価

デニロイキン ジフチトクス（遺伝子組換え，DD）は，Met_1 の後にジフテリア毒素（DT）の部分配列 Gly_2-Thr_{387}（DT ドメイン）とヒトインターロイキン-2（IL-2）の全配列 Ala_{389}-Thr_{521}（IL-2 ドメイン）を His_{388} で繋げたアミノ酸残基 521 個の細胞傷害性の遺伝子組換え融合タンパク質である。DD 製剤である E7272 は「悪性細胞が IL-2 受容体の構成要素 CD25 を発現している，持続性若しくは再発性の皮膚 T 細胞性リンパ腫（cutaneous T-cell lymphoma：CTCL）」を適応として ONTAK®の名称で 1999 年 2 月に米国医薬品局（FDA）に迅速承認後，2008 年 10 月に完全承認された。しかしながら，完全承認の条件であった製剤の純度の問題は未解決であったため，純度を向上させた DD 製剤である E7777（本薬）の製造・開発を行い今回の製造承認申請に至っている。

本薬の非臨床試験パッケージについて，機構相談を実施し，「既に FDA により BLA 承認された E7272 の非臨床試験パッケージによる DD の非臨床評価」に，「E7272 と本薬を用いたラットでの薬物動態及び毒性の比較試験の追加結果」，さらに「本薬の長期の非臨床反復投与安全性試験評価」を追加することで，その十分性に問題はない旨の助言を得たため，これらの試験結果を合わせ本申請の非臨床試験パッケージとしている。なお非臨床薬理では参考として E7272 の腫瘍免疫に関連する試験結果も記載している。

2.4.1 非臨床試験計画概略

DD の主薬効薬理試験は E7272 を用いて実施した。効力を裏付ける in vitro 試験として，各種がん細胞株に対する細胞傷害作用，IL-2 受容体（IL-2R）発現細胞に対する細胞傷害作用発現の作用機序，ヒト末梢血及びマウス脾臓細胞における制御性 T 細胞（Treg）の選択的除去を検討した。In vivo 試験としてマウスリンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果，各種マウス固形癌同種移植モデルにおける抗腫瘍効果を検討した。

安全性薬理コアバッテリー試験のうち，中枢神経系はマウスを用いて実施した。心血管系はラット（血圧，心拍数）及びサル（心電図，反復投与毒性試験）を用いて実施した。呼吸器系については，サルにおける反復投与毒性試験の中で評価した。また，補足的安全性薬理試験として，腎／泌尿器系についてラットを用いた検討を行った。

非臨床薬物動態試験は，E7272 及び ^{35}S 標識 DD（[^{35}S]DD）を用いて検討した。ラット及びサルに E7272 を単回及び反復静脈内投与した際の動態パラメータを評価するとともに DT で免疫したラットを用いて DD の動態に与える抗 DT 抗体の影響を検討した。DD 濃度測定に関しては 2 種の酵素免疫測定（ELISA）法並びにバイオアッセイ法を用いて高分子タンパクである DD の体内動態の精密な評価を行った。分布・排泄に関しては[^{35}S]DD を用いてラットで検討しており低分子化合物と同等の試験項目を実施した。[^{35}S]DD 投与時の試料中放射能濃度は液体シンチレーションカウンターで測定した。DD の動態特性を理解するために数種の in vitro 試験を実施した。また，本薬と E7272 投与後の DD の体内動態を比較するために，ラットを用いて単回及び反復投与後の動態試験を実施した。

非臨床安全性試験は，E7272 を用いた in vitro 並びにマウス，ラット，モルモット，ウサギ，サルを用いた in vivo 単回及び反復投与毒性試験，純度を向上させた製剤である本薬のラットを用いた 3 サイクル並びに 7 サイクル投与毒性試験により評価した。

2.4.2 薬理試験

ヒト皮膚 T 細胞性リンパ腫を含む 22 種のがん細胞株パネルに対する E7272 の細胞傷害作用をタンパク質合成に対する 50%阻害濃度（IC_{50}）として求めた。E7272 は，サブユニットα（CD25），β（CD122），γ（CD132）からなるαβγ型（高親和性）IL-2R を発現しているヒト皮膚 T 細胞性リンパ腫細胞株（HUT102/6TG，MJ）及び成人 T 細胞白血病細胞株（MT-2，C91/PL，C10/MJ）に対して 10^{-12}～10^{-11} mol/L の IC_{50} 値を示した。βγ型（中親和性）IL-2R を発現しているヒト皮膚 T 細胞性リンパ腫細胞株（HH），ヒト急性リンパ球性白血病細胞株（YT2C2）及びテナガザル非ホジキンリンパ腫細胞株（MLA-144）に対しては 10^{-10}～10^{-9} mol/L の IC_{50} 値を示した。高親和性 IL-2R を発現している抗 CD3 抗体で活性化処理したヒト PBMCs 及び中親和性 IL-2R を発現している休止期 PBMCs に対する IC_{50} 値はそれぞれ 10^{-12} mol/L 及び約 10^{-7} mol/L であった。高親和性 IL-2R 発現細胞を用いた各種試験により，E7272 の細胞傷害活性は，DD 分子の IL-2 ドメインと DT ドメインの両者に依存すること，IL-2 ドメインは標的細胞の IL-2R への特異的結合とそれに続く細胞内への移行に，また DT ドメインは細胞内で伸長因子 2 をアデノシン二リン酸（ADP）リボシル化することによってタンパク質合成阻害に寄与していることが確認された。

マウスリンパ腫細胞株を C57BL/6 マウスに移植した同種リンパ腫モデルにおいて，E7272 の抗腫瘍効果を，主に生存日数延長で評価した。高親和性 IL-2R を発現している CP3 リンパ腫細胞株を移植したリンパ腫モデルにおいて，E7272（7，15，30，60 μg/kg）の 1 日 1 回 10 日間静脈内投与は 30 μg/kg まで良好な忍容性を示し，全ての用量で有意な抗腫瘍効果を示した。30 μg/kg ではリンパ腫発症までの平均日数を媒体対照（26 日）より 59 日延長，また，平均生存日数を媒体対照（30 日）より 58 日延長した。本モデルにおいて，DD 製剤を構成している 2 種類の [redacted] 変化体H* 及び変化体C* の抗腫瘍効果を E7272 と比較した（それぞれ 30 μg/kg，1 日 1 回 10 日間静脈内投与）ところ，[redacted] > [redacted] > [redacted] の順で強い効果を示した。E7272（30，60 μg/kg）の 1 日 1 回 10 日間静脈内投与は，DT 免疫マウス（同じ条件で DT を投与した予備検討群の血液中に抗 DT 抗体が確認されている）を用いた CP3 リンパ腫モデルにおいても，有意な抗腫瘍効果を示した。中親和性 IL-2R を発現している EL-4 マウスリンパ腫細胞株を移植したリンパ腫モデルの 3 回の独立した試験において E7272（それぞれ 40，30，30 μg/kg）の 1 日 1 回 10 日間静脈内投与は，有意な抗腫瘍効果を示したが，IL-2R 陰性の P388 マウス白血病細胞株を DBA/2 マウスに移植した白血病モデルに対して E7272（30 μg/kg）の 1 日 1 回 10 日間静脈内投与は有意な抗腫瘍効果を示さなかった。

恒常的に高親和性 IL-2R を発現している Treg は，多くのタイプの固形腫瘍に集積し，腫瘍免疫の担い手である細胞傷害性 T 細胞等の働きを抑制する。E7272（0.57～47 nmol/L，あるいは 0.17～52 nmol/L）をヒト PBMCs あるいはマウス脾臓細胞に加えて培養すると，これら細胞集団の中で Treg 画分の選択的減少が E7272 の濃度依存的に認められた。また E7272（5.2～170 nmol/L）はマウス Treg の活性（CD4 陽性 T 細胞増殖抑制作用）を濃度依存的に抑制した。このことより，DD が宿主 T 細胞のなかから免疫抑制的に働く Treg を選択的に除去することを通じて抗腫瘍免疫を活性化させる可能性が考えられた。E7272（4.5 μg/animal，週 1 回 2 週間静脈内投与）は，IL-2R 陰性の CT26 マウス結腸癌細胞株を BALB/c マウスに移植した同種移植モデルに対し腫瘍増殖抑制作用を示したが，同細胞株を T 細胞が欠損している無胸腺マウスに移植したモデルでは腫瘍

＊新薬承認情報提供時に置き換え

増殖抑制作用を示さなかった。このことは E7272 が宿主の T 細胞依存に抗腫瘍効果を発揮していることを示唆した。

以上の結果は，DD が高親和性あるいは中親和性の IL-2R を発現するリンパ腫に対し，細胞傷害作用に基づく抗腫瘍効果を発揮すること，またその他の各種がんに対しても宿主T細胞のなかから腫瘍免疫に対し抑制的な作用をもつ Treg を選択的に除去することにより抗腫瘍効果を発揮する可能性を示唆した。

安全性薬理コアバッテリー試験のうち，中枢神経系及び心血管系はそれぞれマウス（中枢神経系）及びラット（血圧，心拍数）を用いて実施した。心電図に与える影響については，E7272 のサルを用いた反復投与毒性試験で評価した。呼吸器系についても，E7272 のサルにおける反復投与毒性試験の中で評価した。また，補足的安全性薬理試験として，腎／泌尿器系についてラットを用いた検討も行った。

中枢神経系（CNS）：E7272 の雄マウス単回静脈内投与による評価，また，E7272 あるいは本薬のマウス，ラット，サルにおける反復投与毒性試験の中で観察された症状を含め総合的に判断し，中枢神経系に与える影響は無いと考えられた。

心血管系：血圧，心拍数に与える影響についてはラットを用いた単回及び5日間反復投与試験で，心電図に与える影響についてはサルを用いた反復投与毒性試験で評価し，いずれの試験においても生理学的に意義のある影響はみられなかった。

呼吸器系：サルにおける反復投与毒性試験で定量的に評価し，E7272 投与による影響はみられなかった。

さらに，補足的安全性薬理試験として腎／泌尿器系についてラットを用いた検討を行った結果，10 日間投与により腎血流量の軽度低下に伴う糸球体ろ過量の減少がみられた。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 試験方法

ラット及びサル血清中のDD濃度は，バイオアッセイ法あるいはELISA法を用いて測定した。

^{35}S 標識した DD を大腸菌で生合成し，組織分布及び排泄試験に用いた。

2.4.3.2 吸収及び血清中濃度

E7272 を用いたラット及びサルのトキシコキネティクス及び薬物動態試験で測定した静脈内投与後の血清中 DD 濃度の解析結果は，以下のように要約される。

- ✓ ラットでは 2～40 μg/kg/日，サルでは 2.5～25 μg/kg/日の用量範囲で血清中濃度は投与量に比例して増加した。
- ✓ 血清中濃度推移に性差はみられなかった。
- ✓ 反復投与による蓄積性はみられなかったが，抗 DD 抗体の産生によると思われる血清中濃度の低下が認められた。ただし，血清中の抗体価と血清中濃度の低下度合いの定量的な相関性は低かった。

あらかじめ DT で免疫した雌ラットに[^{35}S]DD を投与し血漿中放射能濃度，ELISA 法及びバイ

オアッセイ法による血清中濃度を測定したところ，DT で免疫した動物群では血漿あるいは血清中濃度は免疫していない動物群より低値で推移し，抗体価の高い動物群の方がより低値となった。

本薬あるいは E7272 をラットに単回静脈内及び反復静脈内投与した際の血清中 DD 濃度を ELISA 法及びバイオアッセイ法で定量し，薬物動態パラメータを求めた。また，抗 DD 抗体を測定し免疫原性についても検討した。

本薬あるいは E7272 を雄性ラットに単回静脈内投与（40 μg/kg）した時の血清中 DD 濃度を ELISA 法で測定したところ，本薬と E7272 の投与で大きな差は認められなかったが，バイオアッセイ法では本薬は E7272 に比して高い血清中濃度を示した。なお，消失半減期は両法でほぼ同等であり，0.61～0.80 時間であった。

本薬あるいは E7272 を雌雄ラットに反復静脈内投与（40.53 μg/kg）した時の血清中 DD 濃度を ELISA 法で測定したところ，本薬投与と E7272 投与で曝露量に大きな差は認められず，雌雄間でも大きな差は認められなかった。本薬と E7272 のいずれにおいても投与 29 日目の血清中濃度は投与初日に比して低く，これは，抗 DD 抗体の産生により全身クリアランスが上昇したためと思われた。

2.4.3.3 分布

ラット及びヒトの血液に[^{35}S]DD を添加後，血漿を分離したところ，大部分の放射能は血漿中に回収されたことから，DD の血液細胞成分への分布はほとんどないことが示唆された。DD は高分子量（>400 kDa）の血漿因子と特異的に非共有結合することが示唆されたが，結合割合は個体間の変動が大きかった。

DD は高分子化合物でありタンパク分解酵素により異化された後，[^{35}S]DD から遊離した標識アミノ酸はタンパク生合成に再利用されてタンパク質に取り込まれると考えられる。したがって[^{35}S]DD 投与後期の組織中放射能量は[^{35}S]DD 及びその断片に加え再利用されて標識化された内在性タンパク質の総和となると考えられる。

[^{35}S]DD を用いた放射能の組織分布は，雌雄ラットで検討した。放射能は主に肝臓と腎臓に分布した。これらの臓器には IL-2R が発現していないことから，非特異的な取り込みであると考えられた。肝臓の特異的な部位への集積は認められなかった。投与初期における肝臓中放射能濃度は DT により免疫されたラットの方が高く DD は抗 DD 抗体と結合することにより肝取り込みが促進されるものと思われた。雄ラットにおける放射能の組織分布は，雌ラットの分布と同様であり，生殖器への特異的分布は認められなかった。妊娠ラットにおける放射能の組織分布から，胎児への移行率は投与後 1 時間で投与放射能量のおよそ 1%であり，胎盤，羊膜嚢，羊水への移行はそれ以下であった。

2.4.3.4 代謝

DD はタンパク分解酵素により，DT 部分の 2 つの領域を連結しているアルギニンリッチループ部分のアミド結合が切断され，nicked DD となる。Nicked DD は，DD と同等以上の細胞傷害性をもつ活性代謝物である。ラット血液に E7272 を添加後，あるいはラットに E7272 を投与後，血清あるいは血漿中の DD と nicked DD の総和並びに DD のみを 2 種の ELISA 法で定量したとこ

ろ，DD から nicked DD が生成されることが確認された。

2.4.3.5 排泄

雌雄ラットあるいはあらかじめ DT で免疫した雌ラットに[^{35}S]DD を静脈内投与後 48 時間までの尿及び糞に排泄された放射能の総和は，投与量の 25%未満であった。排泄率が低い理由は，タンパク分解を受けて遊離した標識アミノ酸が新たなタンパク質合成に再利用されたためと考えられる。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

該当せず。

2.4.3.7 その他の薬物動態試験

該当せず。

2.4.4 毒性試験

本薬の安全性は，米国で既に承認されている E7272 を用いた in vitro 並びに複数の動物種を用いた in vivo 毒性試験，純度を向上させた新製剤である本薬のラットを用いた 3 サイクル並びに 7 サイクル投与毒性試験により評価した。なお，E7272 を用いて実施したほとんどの試験については，最終報告書を除く原書類が所在不明であるが，米国承認時点では十分な信頼性が確保されていたと考えられた。

E7272 並びに本薬の活性体 DD を構成する IL-2 はヒト型であるが，ヒト，サル，マウス及びラットのリンパ球は DD の細胞傷害作用に対して同様の感受性を示し，これらの動物種を安全性の評価に用いることができると考えられた。一部のげっ歯類の試験では雌のみを使用しているが，サルを用いた試験，並びに主要なラットの試験は雌雄を用いて実施された。なお，本薬を投与した試験はラットを用いた 2 試験（試験番号 1010-0351 及び B[redacted]0280）のみであり，その他の試験は E7272 を用いた。

本薬の急性毒性評価を，ラットにおける静脈内投与による 6 週間若しくは 14 週間間歇反復投与毒性試験の 1 サイクル目の結果に基づき行った結果，10 μg/kg 以上の用量で，自発運動の低下，不安定な呼吸，軟便，ポルフィリンによる被毛の汚れ，体重・摂餌に対する影響が認められたが，最高用量の 40 μg/kg においても死亡はみられず，ラットにおける静脈内投与による概略の致死量は 40 μg/kg 以上であった。E7272 の急性毒性評価を，本薬と毒性を比較したラットにおける静脈内投与による 6 週間間歇反復投与毒性試験の 1 サイクル目の結果，並びに 10 日間反復投与毒性試験において行った結果，最高用量 90 μg/kg においても死亡が認められなかったことから，E7272 の静脈内投与における概略の致死量は 90 μg/kg 以上と考えられた。また，E7272 を用いたラットの 2430 μg/kg 単回皮下投与においては，14 日間の観察期間に軽度の体重減少（5%以下）が認められたが，死亡は認められなかったことから，概略の致死量は 2430μg/kg 以上と考えられた。さらに，マウス及びモルモットを用いた異常毒性否定試験の用量設定として実施した E7272 の単回腹腔内投与毒性試験では，マウスは 15 μg/例以上，モルモットは 450 μg/例以上で死亡例が

みられた。また，マウスは 7.5 μg/例，モルモットでは 75 μg/例以上で 8 日間の観察期間中に軽度の体重減少がみられたが，臨床症状に変化はみられなかった。したがって，概略の致死量は単位体重当たりの投与量としては，それぞれ 691 μg/kg 及び 1230 μg/kg であった。これら E7272 における概略の致死量を基に，本薬のそれを類推すると，生物活性は E7272 の約 2 倍であることから，ラットの静脈内投与においては 45 μg/kg 以上，皮下投与においては 1215 μg/kg 以上，マウス及びモルモットの腹腔内投与においてはそれぞれ 345 μg/kg 及び 615 μg/kg であると考えられた。

げっ歯類（マウス及びラット）及びサルを用いて E7272 の静脈内投与による反復投与毒性試験（投与期間：10～30 日間）を実施した。これらの試験の投与量は 2～653 μg/kg/日であった。E7272 の最大耐量（MTD）は投与期間，投与スケジュールによって異なり，短期反復投与（10～15 日間）試験ではサル＜ラット≦マウスの順であったが，1 ヵ月程度の投与においては顕著な差は見られず，臨床と同様の投与スケジュールのラット（試験番号[redacted]059）とヒト（92-04-01 試験［第 1/2 相試験］）の最大耐量はほぼ同じ（ラットが 40 μg/kg/日，ヒトは 27 μg/kg/日）であった。主要な毒性所見はいずれの動物種でも共通し，食欲減退，下痢，脱水，活動性低下，体重減少，白血球及びリンパ球の減少，好中球の増加，ALT 及び AST の増加，あるいはアルブミンの低下等がみられた。高用量ではクレアチニン及び BUN の増加もみられた。

いずれの動物種でも標的臓器は肝及び腎であり，肝細胞と腎尿細管上皮細胞の壊死がみられた。さらに，長期反復投与毒性試験では，種々の臓器に著しい単核細胞浸潤がみられた。連続反復投与試験と間歇反復投与試験の結果から，投与期間が長くなると E7272 に対する忍容性が向上することが示唆された。忍容性向上は，間歇投与における休薬期間中の毒性回復，あるいは抗体の発現による E7272 の血中濃度低下のいずれか，あるいはその両方が関与したと考えられた。

本薬の毒性を評価するため，雌雄の SD ラットを用いて本薬（投与量：2，10 又は 40 μg/kg/日）を 3 サイクル（各 1 サイクルは 5 日間の投与期間と 9 日間の休薬期間）静脈内投与するとともに，E7272 の 40 μg/kg/日群も設定し，本薬との直接比較を行った。なお，本薬の生物活性は E7272 の生物活性の約 2 倍であり，E7272 の最大耐量 40 μg/kg/日と同じ用量は，本薬の投与量として過剰であり，死亡が認められた。さらに，本薬の 40 μg/kg/日では体重及び摂餌量の減少，リンパ球の減少，好中球の増加，肝及び腎機能パラメータの変動，各種臓器へのリンパ球及び好酸球の細胞浸潤並びに副腎皮質の空胞化等も認められた。これらの変化の頻度及び程度は投与量に相関していた。一方，直接比較のために設定した E7272 投与群では死亡例はみられなかったものの，本薬投与群と同様に各種臓器へのリンパ球及び好酸球浸潤がみられ，体重増加量及び摂食量の減少，並びに臨床検査で薬物の影響がみられた。みられた毒性はいずれも可逆的であった。また，2 サイクル投与後に本薬群及び E7272 群のいずれにおいても抗 DD 抗体が検出された。

以上，本薬及び E7272 の毒性は質的に同じであり，過去に米国承認申請時に E7272 を用いて行われた毒性試験結果ともよく一致していた。量的な違いは両製剤の生物活性の違いに基づくものと思われた。

ラットを用いた本薬の 7 サイクル（14 週間）間歇静脈内投与試験（投与量：2，10 又は 20 μg/kg/日）では，3 サイクル投与と同様の所見が見られ，長期投与による毒性の重篤化や違い

はなかった。抗 E7777 抗体生成により，本薬の全身暴露は減少傾向を示し，薬物性の変化はむしろ 7 サイクル投与で弱くなる傾向が見られた。

遺伝毒性試験については，タンパク質では必要とされないが，E7272 の細菌を用いた復帰突然変異試験並びに培養細胞を用いた染色体異常試験を行い，いずれも陰性であった。

がん原性試験については，本剤の適応症を考慮し，実施しなかった。

生殖発生毒性試験については，本薬の薬理作用である Treg 細胞の機能低下あるいは Treg 数減少が動物でもヒトでも妊娠障害あるいは流産を引き起こすことが多くの文献で報告されていることから，実施しなかった。

局所刺激性については，静脈内投与で実施した反復投与毒性試験において投与部位を評価したが，刺激性は認められなかった。光毒性については，タンパク質は光反応性は無いため，実施しなかった。

その他の試験として，免疫機能の抑制作用，免疫化の影響，肝及び腎毒性，毛細血管透過性並びに血管内皮細胞に及ぼす影響，不純物（変化体A*）の毒性，IL-2R の組織分布，[redacted]の毒性，DD 構造変異体による特異性の確認，高コレステロール食の影響について検討をおこなった。

E7272 の無毒性量では，マウスにおいて免疫機能に関する影響は認められなかった。

DD はヒト IL-2 と DT を結合させた外来性の高分子タンパク質であり，いずれの種においても強い免疫原性を示す。抗薬物抗体の毒性に及ぼす影響をマウス及びラットを用いて調べた。マウスにおいては免疫化により毒性の明らかな軽減が確認された。ラットにおいては，抗薬物抗体を持つ動物への E7272 投与の結果，投与直後に重篤な活動性の低下とチアノーゼが一過性に観察されたが，投与日数が増えるにつれ症状は軽減した。これらの症状は，皮下投与により前処理した動物でのみ認められており，E7272 及び本薬の静脈内反復投与試験では認められていない。

本薬及び E7272 の毒性の標的臓器は肝及び腎であることから，いくつかの検討試験が行われた。ラット肝腎初代培養細胞を用いた実験では非常に高い暴露量でのみ，非特異的エンドサイトーシスによると考えられるタンパク質合成阻害が認められたが，ヒトの肝，腎スライスを用いた実験ではタンパク質合成に対する影響は認められなかった。また，ヒト各種初代培養細胞（上皮，腎，内皮，平滑筋，ケラチノサイト[角化細胞]及び線維芽細胞）においても細胞毒性は認められなかった。

E7272 の臨床における有害事象として，毛細血管漏出症候群並びに infusion reaction の発現頻度が高いため，ヒト血管内皮細胞を用いた in vitro 実験を行った。ヒトの血管内皮細胞においては

＊新薬承認情報提供時に置き換え

E7272 の直接作用は認められなかった。また，ラットを用いた毛細血管透過性並びにサイトカインの変化も検討した。ラットにおいては軽度の血管透過性の変化は認められたものの，動物の状態は良好であった。また，ラットにおける血漿中サイトカインに関してはE7272投与による明らかな影響はみられなかった。

本薬は，変化体N*以上の変化体A*が 10%以下含まれる。これらの変化体A*はラットにおいて有効成分*よりクリアランスが早く，毒性及び免疫原性が弱かった。

IL-2R の組織分布について，ラット及びヒト組織を用いて免疫組織化学的に検討した。ラットにおいてはリンパ球の膜部分の反応が強く，組織としてはリンパ組織（気管支関連リンパ組織，リンパ節，脾）及び炎症部位（腎，肝の門脈周囲）で反応がみられた。ヒト組織においてもリンパ組織（脾/リンパ節）及びリンパ球集簇がみられる内部臓器（肝門脈周囲，肺の細気管支周囲）で反応がみられた。

DD は，[redacted]として変化体H*（本薬の規格で全体の[redacted]%以上）及び変化体C*（全体の約[redacted]%～[redacted]%）から構成される。これらの[redacted]について，ラットで毒性及び PK を比較した。毒性は 変化体C* が総じて強かったが，PK に差はなく，[redacted]のばらつき（ロットにより 変化体C* が全体の[redacted]%～[redacted]%の範囲）が臨床上有意な差になるとは考えられなかった。

DD は DT の一部とヒト IL-2 の融合タンパク質であるが，それぞれの構造を改変した蛋白質を用いた実験において薬効並びに毒性発現には両部分が必要であることが示された。

E7272 を投与したウサギを用いて高コレステロール食の影響を調べたが，毒性はほとんど影響を受けなかった。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 薬理試験

DD は標的腫瘍細胞の IL-2R と特異的に結合し，抗腫瘍効果を示すことを意図して設計された薬剤であり，IL-2R に結合後，エンドサイトーシスにより細胞内エンドソームに取り込まれ，細胞内プロテアーゼにより DT ドメインから ADP リボシル化酵素活性を有する N 末端断片が切り出される。N 末端断片はタンパク質合成に重要な役割をはたしている伸長因子 2 の ADP リボシル化を触媒し，その結果タンパク質合成が阻害され，最終的に細胞死がもたらされる（Williams, et al., 1987; Bacha, et al., 1988; vanderSpek, et al., 1993）。IL-2R はα（CD25），β（CD122），γ（CD132）の 3 つのサブユニットから構成され，高親和性の IL-2R はα，β及びγサブユニットの三量体から，中親和性の IL-2R は，β，γサブユニットの二量体から構成される（Takeshita, et al., 1992）。正常細胞では限られた免疫系細胞が IL-2R を発現しており，成熟 T 細胞は通常βγ型を，また免疫刺激で活性化したときはαが一過的に産生されてαβγ型の IL-2R を発現する。Treg は恒常的にαβγ型の IL-2R を発現している（Létourneau, et al., 2009）。成熟 T 細胞由来悪性腫瘍の多くはαβγ型あるいはβγ型の IL-2R を発現しており，ヒト皮膚 T 細胞性リンパ腫等ではαが血中に遊離し

＊新薬承認情報提供時に置き換え

た可溶性 IL-2R が経過観察の指標になっている（Vonderheid, et al., 1998; Morris and Waldmann, 2000）。IL-2 は αβγ 型と βγ 型の IL-2R に結合しシグナル伝達を惹起する（Waldmann, 1991; Takeshita, et al., 1992; Yu, et al., 2000）。リガンド受容体複合体のエンドサイトーシスの過程で α は初期に IL-2 から遊離して細胞表面に戻るが，β と γ はエンドソームへの移行まで IL-2 の取り込みをサポートしている（Hémar, et al., 1995）。従って DD はその IL-2 ドメインによって αβγ 型，βγ 型いずれの IL-2R を発現している細胞にも取り込まれ，細胞死を誘導することが期待される。

DD の主薬効薬理試験は E7272 を用いて実施された。高親和性 IL-2R を発現するがん細胞株あるいは活性化 PBMCs を用いた一連の in vitro 試験により上述の作用機序が確認された。E7272 は，高親和性 IL-2R を発現しているヒト皮膚 T 細胞性リンパ腫等の血液がん細胞株に対して 10^{-12}～10^{-11} mol/L，中親和性 IL-2R を発現しているヒト皮膚 T 細胞性リンパ腫等の血液がん細胞株に対しても 10^{-10}～10^{-9} mol/L の IC_{50} 値で細胞傷害性作用を示した。抗 CD3 抗体で活性化し高親和性 IL-2R を発現させたヒト PBMCs 及び中親和性 IL-2R を発現している休止期 PBMCs に対する IC_{50} 値はそれぞれ 10^{-12} mol/L 及び約 10^{-7} mol/L であった。高親和性 IL-2R を発現している CP3 リンパ腫細胞株を移植したリンパ腫モデルにおいて，E7272（7，15，30，60 μg/kg）の 1 日 1 回 10 日間静脈内投与は 30 μg/kg まで良好な忍容性を示し，全ての用量で有意な抗腫瘍効果を示した。E7272 は，DT 免疫マウス（同じ条件で DT を投与した予備検討群の血液中に抗 DT 抗体が確認されている）を用いた CP3 リンパ腫モデル，また中親和性 IL-2R を発現している EL-4 マウスリンパ腫細胞株を移植したリンパ腫モデルにおいても有意な抗腫瘍効果を示した。以上の非臨床モデルの結果は DD が αβγ 型（高親和性），βγ 型（中親和性）いずれの IL-2R を発現するリンパ腫に対しても細胞傷害作用に基づく抗腫瘍効果を発揮することを示し，DD が α（CD25）陽性のみならず α（CD25）低発現の T 細胞性リンパ腫に対しても抗腫瘍効果を発揮するという臨床結果を支持した（Prince, et al., 2013）。

T 細胞集団には，恒常的に高親和性 IL-2R を発現している α（CD25）陽性のサブセット Treg が存在する。Treg は免疫応答を負に制御して免疫恒常性の維持に重要な役割を担っているが，多くのがん腫において腫瘍組織内 Treg の集積が予後不良因子となり，腫瘍免疫の担い手である細胞傷害性 T 細胞等の働きを抑制することで腫瘍を宿主の免疫学的監視機構から免れさせる働きを持つことが報告されている（Curiel, et al., 2004; Létourneau, et al., 2009）。従って Treg を標的とする薬剤は Treg による免疫抑制の解除により抗腫瘍効果を発揮することが期待される。主薬効薬理試験により E7272 は T 細胞集団のなかで Treg を選択的に除去する作用を示した。また E7272（4.5 μg/animal）の週 1 回 2 週間静脈内投与は，IL-2R 陰性の CT26 マウス結腸癌細胞株同種移植モデルに対し，宿主の T 細胞に依存した抗腫瘍効果（腫瘍増殖抑制作用）を発揮した。以上のことから DD はリンパ腫以外の IL-2R 陰性の各種がんに対しても Treg 除去作用に基づく抗腫瘍効果を発揮する可能性が考えられた（Knutson, et al., 2006; Dang, et al., 2007; Litzinger, et al., 2007; Morse, et al., 2008; Rasku, et al., 2008）。

E7272 の雄マウス単回静脈内投与による Irwin 法評価，マウス，ラット，サルにおける反復投与毒性試験，さらに E7777 のラットにおける反復投与毒性試験の中で観察された症状を含め総合

的に判断し，本薬の中枢神経系に与える影響は無いと考えられた。E7272 のラットあるいはサルを用いた毒性試験において，心血管系（血圧，心拍数，心電図）に対し生理学的に意義のある影響はみられなかった。呼吸器系については，E7272 のサルにおける反復投与毒性試験において定量的に評価し，投与による影響はみられなかった。補足的安全性薬理試験として腎／泌尿器系についてラットを用いた検討を行った結果，E7272 の 10 日間投与により腎血流量の軽度低下に伴う糸球体ろ過量の減少がみられた。

2.4.5.2 薬物動態試験

薬物動態試験の概要文では，DD の薬物代謝及び薬物動態に関する in vitro 及び in vivo 試験データ，並びに医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した毒性試験から得られたトキシコキネティクスデータについて記述した。これらの情報は，動物モデルにおける DD の薬物動態プロファイルの特性評価，代謝の種差に関する評価に適切かつ十分であると考えられる。

DD 製剤をラット及びサルに静脈内投与した際，ラットでは 2～40 μg/kg/日，サルでは 2.5～25 μg/kg/日の用量範囲で血清中濃度は投与量に比例して増加した。血清中濃度推移に性差は認められなかった。反復投与による蓄積性はみられなかったが，抗 DD 抗体の産生によると思われる血清中濃度の低下が認められた。

DD は高分子化合物でありタンパク分解酵素により異化された後，構成アミノ酸はタンパク生合成に再利用されると考えられる。

[^{35}S]DD を静脈内投与後の放射能の組織分布を雌雄ラットで検討したところ，放射能は主に肝臓と腎臓に分布した。これらの臓器には IL-2R は発現していないことから，非特異的な取り込みであると考えられた。雄ラットにおける放射能の組織分布は，雌ラットの分布と同様であり，生殖器への特異的分布は認められなかった。妊娠ラットにおける放射能の組織分布から，胎児への移行率は投与後 1 時間で投与放射能量のおよそ 1%であり，胎盤，羊膜嚢，羊水への移行はそれ以下であった。

[^{35}S]DD を静脈内投与後の放射能の排泄を雌雄ラットで検討したところ，48 時間後までに尿及び糞に排泄された放射能は投与量の 25%未満であった。排泄率が低い理由は，タンパク分解を受けて遊離した標識アミノ酸が新たなタンパク質合成に再利用されたためと考えられる。

以上，非臨床薬物動態試験の結果は，動物における DD の薬物動態特性を評価する上で適切であり，十分なものであると考える。

2.4.5.3 毒性試験

本薬は，米国で承認された E7272 と同一のマスターセルバンクから得られており活性体は同じである。したがって，活性体の純度が高い本薬及び E7272 を用いて十分高い用量で実施した毒性試験結果は，その両製剤の毒性を評価するために相互に利用することができる。これを踏まえ，本薬の安全性は，E7272 を用いた in vitro 並びに複数の動物種を用いた in vivo 毒性試験，純度を向上させた本薬のラットを用いた 3 サイクル並びに 7 サイクル投与毒性試験により評価した。これまでに得られている両製剤の毒性プロファイルは同じであり，毒性所見の違いは，活性体の純度の差に基づく活性の違いを反映するものであった。

E7272 の反復投与毒性試験は，マウス，ラット，ウサギ及びサルを用いて行われたが，種並びに試験ごとに投与スケジュールが異なり，中和抗体を含む抗体産生のタイミングも種によって異なることから，毒性発現用量の単純な比較は困難であったが，類似の投与スケジュールの毒性試験の最大耐量を比較すると，1 ヵ月程度の投与においては顕著な差は見られず，臨床と同様の投与スケジュールのラット並びにヒトの最大耐量はほぼ同じ（ラットが 40 μg/kg/日，ヒトは 27 μg/kg/日）であった。

各動物種の毒性試験における所見を比較すると，その質的特徴は一致しており，毒性プロファイルの種差は無いと考えられた。すなわち，いずれの動物種においても食欲減退，活動性低下，体重減少，白血球及びリンパ球の減少，好中球の増加，アルブミンの低下等の変化がみられた。血液生化学的検査では肝及び腎障害が示唆され，組織学的にも高用量で肝細胞と腎尿細管上皮細胞の壊死等がみられた。また，いずれの動物種においても，特に高用量群で薬理作用に関連すると考えられるリンパ球/好酸球の浸潤が多くの臓器でみられた。活性体である DD は細菌のタンパク質である DT を含む融合タンパク質であることから免疫原性が全ての動物種で認められた。いずれの動物においても連投により抗薬物抗体が産生され，暴露量の低下や毒性の減弱が認められた。本薬は Treg を選択的かつ用量依存的に傷害し，動物でも人でも妊娠障害あるいは流産を引き起こすことが報告されていることから，生殖発生毒性試験は実施しなかったが，妊婦又は妊娠している可能性のある女性には，投与すべきではないと考えられた。本薬と同一の DD を有効成分とする E7272 において，臨床上の重要なリスクとして血管漏出症候群及びインフュージョンリアクションが報告されているが，いずれも非臨床毒性試験で同様の所見は認められなかった。臨床においてはこれらについて，慎重なモニターが必要と考えられた。

本薬及び E7272 において含まれる変化体N*以上の変化体A*は，有効成分*と比較して血液中からの消失は速く，毒性に関する寄与はごく限定的と考えられた。

DD は [redacted] (変化体H* 及び変化体C*) が混在しており，毒性は変化体C* がやや強いが，製剤中のばらつきは変化体C* の変動範囲を [redacted]%～[redacted]%に制御しており，臨床において，この変動による活性並びに毒性に及ぼす影響はないと考えられた。

本薬投与による毒性については，E7272 及び本薬を用いた包括的な非臨床安全性試験により適切に評価されたと考えられた。

2.4.6 参考文献一覧

Bacha P, Williams DP, Waters C, Williams JM, Murphy JR, Strom TB. Interleukin 2 receptor-targeted cytotoxicity. Interleukin 2 receptor-mediated action of a diphtheria toxin-related interleukin 2 fusion protein. J Exp Med. 1988;167(2):612–22.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nature Med. 2004;10(9):942–9. Epub 2004 Aug 22.

Dang NH, Pro B, Hagemeister FB, Samaniego F, Jones D, Samuels BI, et al. Phase II trial of denileukin diftitox for relapsed/refractory T-cell non-Hodgkin lymphoma. Br J Haematol. 2007;136(3):439–47.

＊新薬承認情報提供時に置き換え

Hémar A, Subtil A, Lieb M, Morelon E, Hellio R, Dautry-Varsat A. Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: Distinct intracellular localization and fate of the receptor α, β, and γ chains. J Cell Biol. 1995;129(1):55–64.

Knutson KL, Dang Y, Lu H, Lukas J, Almand B, Gad E, et al. IL-2 immunotoxin therapy modulates tumor-associated regulatory T cells and leads to lasting immune-mediated rejection of breast cancers in neu-transgenic mice. J Immunol. 2006;177(1):84–91.

Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. J Allergy Clin Immunol. 2009;123(4):758–62.

Litzinger MT, Fernando R, Curiel TJ, Grosenbach DW, Schlom J, Palena C. IL-2 immunotoxin denileukin diftitox reduces regulatory T cells and enhances vaccine-mediated T-cell immunity. Blood. 2007;110(9):3192–201. Epub 2007 Jul 6.

Morris JC, Waldmann TA. Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment. Ann Rheum Dis. 2000;59 Suppl 1:i109–14.

Morse MA, Hobeika AC, Osada T, Serra D, Niedzwiecki D, Lyerly HK, et al. Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. Blood. 2008;112(3):610–8.

Prince HM, Martin AG, Olsen EA, Fivenson DP, Duvic M. Denileukin diftitox for the treatment of CD25 low-expression mycosis fungoides and Sézary syndrome. Leuk Lymphoma. 2013;54(1):69–75.

Rasku MA, Clem AL, Telang S, Taft B, Gettings K, Gragg H, et al. Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases. J Transl Med. 2008;6:12.

Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N, et al. Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor. Science. 1992;257(5068):379–82.

vanderSpek JC, Mindell JA, Finkelstein A, Murphy JR. Structure/function analysis of the transmembrane domain of DAB389-interleukin-2, an interleukin-2 receptor-targeted fusion toxin. J Biol Chem. 1993;268(16):12077–82.

Vonderheid EC, Zhang Q, Lessin SR, Polansky M, Abrams JT, Bigler RD, et al. Use of serum soluble interleukin-2 receptor levels to monitor the progression of cutaneous T-cell lymphoma. J Am Acad Dermatol. 1998;38:207–20.

Waldmann TA. The interleukin-2 receptor. J Biol Chem. 1991;266(5):2681–4.

Williams DP, Parker K, Bacha P, Bishai W, Borowski M, Genbauffe F,et al. Diphtheria toxin receptor binding domain substitution with interleukin-2: genetic construction and properties of a diphtheria toxin-related interleukin-2 fusion protein. Protein Eng. 1987;1(6):493–8.

Yu A, Olosz F, Choi CY, Malek TR. Efficient internalization of IL-2 depends on the distal portion of the cytoplasmic tail of the IL-2R common γ-chain and a lymphoid cell environment. J Immunol. 2000;165(5):2556–62.