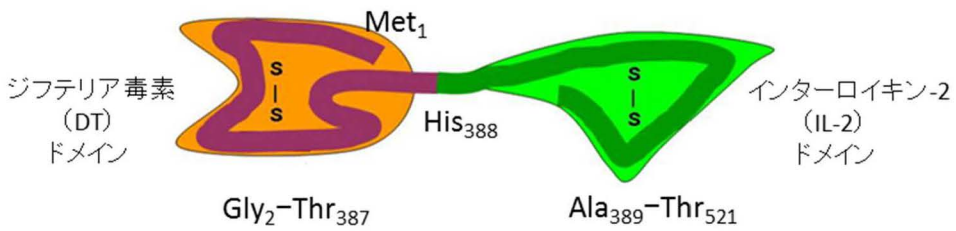
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

デニロイキン ジフチトクス（遺伝子組換え，以下 DD）は標的腫瘍細胞のヒトインターロイキン-2 受容体（IL-2R）と特異的に結合し抗腫瘍効果を示すように設計された薬剤であり，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 個の遺伝子組換え融合タンパク質である。図 2.6-1 に DD の構造を示す。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）」を適応として米国医薬品局（FDA）より，1999 年 2 月に迅速承認，2008 年 10 月に完全承認されている。その後，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。



アミノ酸配列及びジスルフィド結合

```
MGADDVVDSS  KSFVMENFSS  YHGTKPGYVD  SIQKGIQKPK  SGTQGNYDDD
WKGFYSTDNK  YDAAGYSVDN  ENPLSGKAGG  VVKVTYPGLT  KVLALKVDNA
ETIKKELGLS  LTEPLMEQVG  TEEFIKRFGD  GASRVVLSLP  FAEGSSSVEY
INNWEQAKAL  SVELEINFET  RGKRGQDAMY  EYMAQACAGN  RVRRSVGSSL
SCINLDWDVI  RDKTKTKIES  LKEHGPIKNK  MSESPNKTVS  EEKAKQYLEE
FHQTALEHPE  LSELKTVTGT  NPVFAGANYA  AWAVNVAQVI  DSETADNLEK
TTAALSILPG  IGSVMGIADG  AVHHNTEEIV  AQSIALSSLM  VAQAIPLVGE
LVDIGFAAYN  FVESIINLFQ  VVHNSYNRPA  YSPGHKTHAP  TSSSTKKTQL
QLEHLLLDLQ  MILNGINNYK  NPKLTRMLTF  KFYMPKKATE  LKHLQCLEEE
LKPLEEVLNL  AQSKNFHLRP  RDLISNINVI  VLELKGSETT  FMCEYADETA
TIVEFLNRWI  TFCQSIISTL  T
```

化学名：1-388-Toxin (*Corynebacterium diphtheriae* strain C7), *N*-L-methionyl-387-L-histidine-388-L-alanine-, (388→2')-protein with 2-133-interleukin 2 (human clone pTIL2-21a)

分子量：57.6 kDa

図 2.6-1　DD の構造

DD は，その IL-2 ドメインによって標的腫瘍細胞の 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 ドメインからアデノシン二リン酸（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ペプチド伸長因子 2 を ADP リボシル化し，その結果，タンパク質合成が阻害されて細胞死がもたらされる（Williams, et al., 1987; Bacha, et al., 1988; vanderSpek, et al., 1993）。IL-2R には α（CD25），β（CD122），γ（CD132）の 3 つのサブユニットがあり，高親和性の IL-2R は α，β，γ の三量体，中親和性の IL-2R は β，γ の二量体から構成される。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。図 2.6-2 に DD の作用機序を示す。

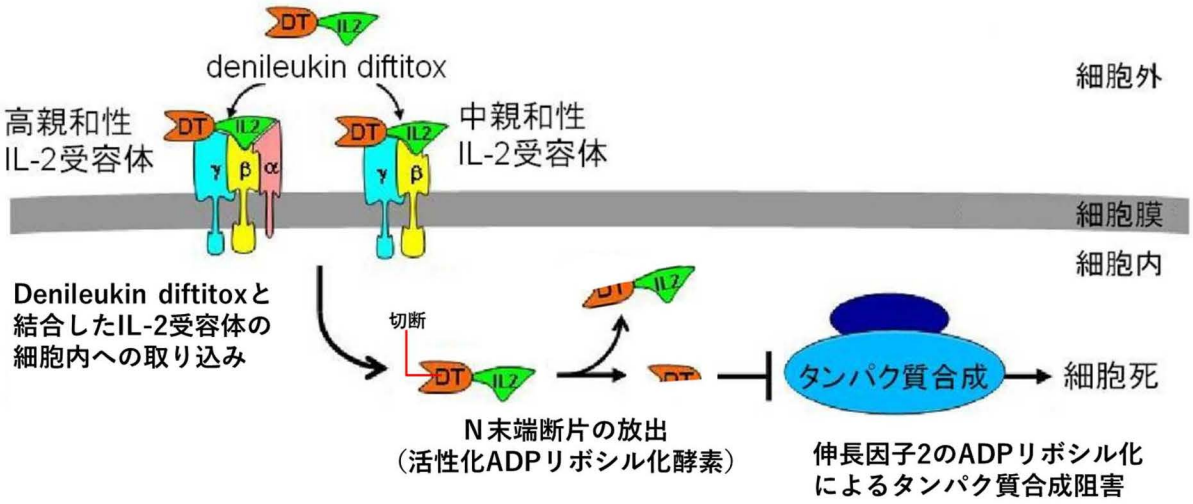


図 2.6-2　DD の IL-2R 発現細胞に対する細胞傷害作用

DD の主薬効薬理試験は E7272 を用いて実施された。E7272 は，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），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，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），テナガザル非ホジキンリンパ腫細胞株（MLA-144）に対しても 10^{-10}～10^{-9} mol/L の 50%阻害濃度（IC_{50}）値で細胞傷害性作用を示した。高親和性 IL-2R を発現している CP3 マウスリンパ腫細胞株を移植したマウス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（生存日数延長）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 リンパ腫モデルにおいても，有意な抗腫瘍効果を示した。E7272 は βγ 型（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マウス

リンパ腫モデルにおいても有意な抗腫瘍効果を示した。以上の非臨床薬理試験成績から DD がαサブユニット（CD25）陽性のみならずα（CD25）低発現のリンパ腫に対し，細胞傷害作用に基づく抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。なお，宿主の腫瘍免疫機構に対し抑制的に作用する制御性 T 細胞（Treg）も高親和性 IL-2R を発現している。非臨床薬理試験成績は DD が Treg 除去作用を有し，これに基づいて抗腫瘍効果を発揮する可能性も示した。

本薬の効能又は効果（案）並びに用法及び量（案）は以下のとおりである。

【効能又は効果】 再発又は難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫 再発又は難治性の皮膚 T 細胞性リンパ腫
【用法及び用量】 通常，成人にはデニロイキン　ジフチトクス（遺伝子組換え）として 1 日 1 回 9μg/kg を 1 時間かけて 5 日間点滴静注した後，16 日間休薬する。この 21 日間を 1 サイクルとして，最大 8 サイクル投与を繰り返す。なお，患者の状態により適宜減量する。

参考文献

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.

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.

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.

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.

目次

2.6.2. 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.3 副次的薬理試験 27
2.6.2.4 安全性薬理試験 27
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 28
2.6.2.6 考察及び結論 28
2.6.2.7 図表 31
2.6.2.8 参考文献 31

薬理試験の概要文の略号一覧表

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
BWL	body weight loss	体重減少
CT_{50}	contact time for 50% inhibition	50%阻害に要する最小接触時間
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
EF-2	elongation factor 2	伸長因子 2
GFR	glomerular filtration rate	糸球体ろ過量
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IL-2	Interleukin-2	インターロイキン-2
IL-2R	Interleukin-2 receptor	インターロイキン-2 受容体
IL-4	Interleukin-4	インターロイキン-4
K_i	inhibition constant	阻害定数
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーRNA
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核球
PHA	phytohemagglutinin	フィトヘマグルチニン
PT_{50}	processing time for 50% inhibition	50%阻害に要する処理時間
RPF	Renal plasma flow	腎血漿流量
Treg	regulatory T cell	制御性 T 細胞

2.6.2. 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

デニロイキン　ジフチトクス(遺伝子組換え，以下 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} で繋げた細胞傷害性の遺伝子組換え融合タンパク質である。DD は IL-2 ドメインによって腫瘍細胞の IL-2 受容体（IL-2R）と特異的に結合し，DT ドメインの作用によって抗腫瘍効果を示す。DD の効力を裏付ける試験として，E7272 を用いた以下の in vitro 及び in vivo 試験が実施された。

効力を裏付ける試験；

- 各種がん細胞株及びヒト末梢血単核球（PBMCs）に対する細胞傷害作用（in vitro）
- IL-2R 発現細胞に対する細胞傷害作用発現の作用機序（in vitro）
- マウスリンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果（in vivo）
- 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（in vitro）
- 各種マウス固形癌同種移植モデルにおける抗腫瘍効果（in vivo）

DD の主薬効薬理試験は E7272 を用いて実施した。

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），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），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，またβとγを発現しているがβの発現が低値であったヒトがん細胞株 4 株に対しては 10^{-9}～>10^{-7} mol/L の IC_{50} 値を示した。αとγを発現しβを発現していないヒト成人 T 細胞白血病細胞株 MT-1 及び IL-2R 陰性（γのみ発現あるいはαβγのいずれも発現していない）のヒトがん細胞株 9 株に対する IC_{50} 値はいずれも>10^{-7} mol/L であった。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（EF-2）をアデノシンニリン酸（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 マウスリンパ腫細胞株移植モデルにおいて，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] の順で強い活性を示した。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生存日数延長を示した。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移植モデルの 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，平均生存日数を媒体対照より有意に，それぞれ>13 日，4 日，54 日延長した。一方，IL-2R 陰性の P388 マウス白血病細胞株を DBA/2 マウスに移植した同種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 2 回の独立した試験ともに有意な生存日数延長を示さなかった。

恒常的に高親和性 IL-2R を発現している制御性 T 細胞（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。ヒト PBMCs あるいはマウス脾臓細胞に E7272（0.57～47 nmol/L あるいは 0.17～52 nmol/L）を加えて培養すると，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 細胞群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 細胞群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及びラット（血圧，心拍数）を用いて実施した。また，E7272 のサルにおける反復投与毒性試験において，心電図ならびに呼吸器系について評価した。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運動量評価，また，E7272 あるいはE7777 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，心電図に与える影響については

＊新薬承認情報提供時に置き換え

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験でそれぞれ評価し，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において定量的に評価し，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行動態の軽度低下に伴う糸球体ろ過量の減少がみられた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の一覧表は 2.6.3.1 項に記載した。

DD の主薬効薬理試験は E7272 を用いて実施した。試験報告書において in vitro 試験に用いた E7272 はモル濃度あるいは重量濃度で記載されているが，本章では一律モル濃度で記載する（重量表示をモル表示に換算するにあたっては分子量＝57.6 KDa として計算し有効数字 2 桁で記載した。In vivo 試験に用いた E7272 の用量は全て重量濃度で表示した。

2.6.2.2.1　各種がん細胞株及びヒト PBMCs に対する細胞傷害作用（添付資料 4.2.1.1.1　[試験番号 Re et al, 1996［参考］]）

本試験では，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（このうち MLA-144 はテナガザルがん細胞株，他はヒトがん細胞株）及びヒト PBMCs について，IL-2R の 3 種のサブユニット α（CD25），β（CD122），γ（CD132）のメッセンジャーRNA（mRNA）レベルでの発現状況を確認するとともに，E7272 の細胞傷害作用をタンパク質合成に対する IC_{50} 値として求めた。PBMCs は健康成人の血液より調製し抗 CD3 抗体による活性化処理をした細胞とその処理をしていない休止期の細胞を用いた。α，β，γ の発現量は Northern blot 法により測定し，HUT102/6TG ヒト皮膚 T 細胞性リンパ腫細胞株における α，β，γ の発現量を 100 とした相対値（%）として示した。発現量が 33%以上の場合，十分に発現しているとした。タンパク質合成は細胞に E7272（10^{-12}～10^{-6} mol/L）を添加して一晩培養後，[^{14}C]ロイシンの取り込みで測定した。

IL-2R は 3 種のサブユニット α，β，γ がそろった αβγ 型，β と γ からなる βγ 型等があり，それぞれ高親和性 IL-2R，中親和性 IL-2R と言われている。γ のみでは IL-2 への結合能がなく，α，β，γ のいずれも発現していない場合と同様 IL-2R 陰性とされる（Takeshita, et al., 1992; Morris and Waldmann, 2000）。本試験で用いた HUT102/6TG 及び活性化 PBMCs は αβγ 型（高親和性）IL-2R を発現していること，MLA-144 テナガザル非ホジキンリンパ腫細胞株及び休止期 PBMCs は βγ 型（中親和性）IL-2R を発現していることが知られている（Robb and Greene, 1987; Morris and Waldmann, 2000）。

表 2.6.2-1 の「サブユニット発現量」に示すように，MJ，MT-2，C91/PL，C10/MJ は HUT102/6TG や活性化 PBMCs と比べて十分量の α，β，γ を発現していることから αβγ 型（高親和性）IL-2R を発現していると判断された。HH，YT2C2，MLA-144 は休止期 PBMCs と同様，十分量の β と γ を発現していることから βγ 型（中親和性）IL-2R を発現していると判断された。C8215，SKW6.4，H9，HUT78 については，β と γ を発現しているものの，β の発現量が 8%～17%であることから，これらのヒトがん細胞株の細胞集団には βγ 型（中親和性）IL-2R の他，γ

のみ発現している細胞も含まれる可能性が考えられた。

表 2.6.2-1 の「細胞傷害作用」に示すように，E7272 は，高親和性 IL-2R 発現株 5 株（HUT102/6TG，MJ，MT-2，C91/PL，C10/MJ）に対しては，10^{-12}～10^{-11} mol/L の IC_{50} 値を示した。中親和性 IL-2R 発現株 3 株（HH，YT2C2，MLA-144）に対しては，10^{-10}～10^{-9} mol/L の IC_{50} 値を，またβとγを発現しているがβの発現が低値であった細胞株 4 株（C8215，SKW6.4，H9，HUT78）に対しては 10^{-9}～>10^{-7} mol/L の IC_{50} 値を示した。αとγを発現しβを発現していない細胞株（MT-1）及び IL-2R 陰性株 9 株に対しての IC_{50} 値はいずれも>10^{-7} mol/L であった。

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^{-11} mol/L 及び約 10^{-7} mol/L であった。

表 2.6.2-1　22 種類のがん細胞株パネル及びヒト PBMCs における IL-2R 各サブユニットの発現量及びこれらの細胞に対する E7272 の細胞傷害作用

細胞	IL-2R サブユニット発現量 (%)[a]			細胞傷害作用 (IC_{50})
	α(CD25)	β(CD122)	γ(CD132)	mol/L
HUT102/6TG（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	100	100	100	2×10^{-12}
MJ（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	280	90	98	4×10^{-12}
MT-2（成人 T 細胞白血病）	190	130	50	1×10^{-11}
C91/PL（成人 T 細胞白血病）	83	34	77	1×10^{-11}
C10/MJ（成人 T 細胞白血病）	200	150	100	1×10^{-11}
HH（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	0	130	57	4×10^{-10}
YT2C2（急性リンパ球性白血病）	0	140	66	2×10^{-9}
C8215（急性リンパ球性白血病）	0	17	63	2×10^{-9}
MLA-144（非ホジキンリンパ腫)[b]	0	110	99	6×10^{-9}
SKW6.4（急性リンパ球性白血病）	0	12	54	9×10^{-8}
H9（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	0	16	160	$>10^{-7}$
HUT78（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	0	8	96	$>10^{-7}$
MT-1（成人 T 細胞白血病）	120	0	48	$>10^{-7}$
U937（組織球性リンパ腫）	0	0	130	$>10^{-7}$
HL-60（急性前骨髄球性白血病）	0	0	46	$>10^{-7}$
Daudi（バーキットリンパ腫）	0	0	40	$>10^{-7}$
SW684（軟部肉腫）	0	0	0	$>10^{-7}$
HT1080（線維肉腫細胞）	0	0	0	$>10^{-7}$
MCF7（乳癌）	0	0	0	$>10^{-7}$
U118MG（膠芽細胞腫）	0	0	0	$>10^{-7}$
NCI-H929（骨髄腫）	0	0	0	$>10^{-7}$
THP-1（急性骨髄性白血病）	0	0	0	$>10^{-7}$
抗 CD3 抗体活性化 PBMCs	43	110	110	1×10^{-12}
休止期 PBMCs	0	35	83	8×10^{-8}

a:　HUT102/6TG における mRNA の発現量を 100 とした相対値（%）

b:　MLA-144 のみテナガザル細胞，他はヒト細胞.

細胞株は IC_{50} 値の低い順に並べた。IC_{50} = 50%阻害濃度, IL-2R = インターロイキン-2 受容体，mRNA = メッセンジャーRNA, PBMCs = 末梢血単核球.　データ引用元; Re et al, 1996

以上，各種がん細胞株及びヒト PBMCs について IL-2R の各サブユニット発現状況と E7272 の細胞傷害作用に対する感受性がほぼ相関していること，また，高親和性及び中親和性 IL-2R を発現しているヒトがん細胞株に対する E7272 の IC_{50} 値の範囲はピコモル～ナノモルオーダーであることが示された。

2.6.2.2.2　ヒト T 細胞に対する細胞傷害作用（添付資料 4.2.1.1.2 [試験番号 ■154 {参考}，添付資料 4.2.1.1.3 [試験番号 ■148 {参考}]）

CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞は，PHA や抗 CD3 抗体等のマイトゲン刺激により活性化される。その際に IL-2R のサブユニット α が一過的に発現するために IL-2R が βγ 型（中親和性）から αβγ 型（高親和性）へと転換する（Morris and Waldmann, 2000; Létourneau, et al., 2009）。本試験では，PHA 及び抗 CD3 抗体によりそれぞれ活性化したヒト CD4 陽性 T 細胞及びヒト CD8 陽性 T 細胞に対する E7272 の細胞傷害作用をタンパク質合成の IC_{50} 値として求めた。

健康成人全血より調製した新鮮 PBMCs より CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を単離し，フローサイトメータ解析でそれぞれ純度 93%以上の細胞画分を得た。両画分について PHA とともに 24～72 時間培養し，PHA 活性化 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を得た。また，抗 CD3 抗体活性化 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞については，活性化プロセスに単球の存在が必要であることから，新鮮 PBMCs をまず抗 CD3 抗体と 72 時間処理して活性化し，その後に CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞（それぞれ純度 95%以上）を単離した。

これらの細胞の活性化を確認するために IL-2R のサブユニット α（CD25）の発現をフローサイトメータで解析した。タンパク質合成は[^{14}C]ロイシンの取り込みで測定した。

表 2.6.2-2 に示すように，ヒト CD4 陽性 T 細胞，ヒト CD8 陽性 T 細胞ともに，PHA 処理時間に対応して α 発現細胞の割合が増加し，72 時間処理では，それぞれ 96%及び 86%に至った。この変化とほぼ対応し，E7272 の細胞傷害活性が増強し，PHA 72 時間処理の CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞に対する IC_{50} 値はそれぞれ 6.8 及び 3.8 pmol/L であった。CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体 72 時間処理で活性化した場合の α 発現細胞の割合はそれぞれ，81%及び 83%，またこれらの細胞に対する IC_{50} 値はともに 0.2 pmol/L であった。

表 2.6.2-2　ヒト CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞に対する E7272 の細胞傷害作用

細胞	マイトゲン	処理時間 (h)	α (CD25)発現	細胞傷害活性
			% of Cells	IC_{50} (pmol/L)
CD4 陽性 T 細胞	PHA	24	71[c]	110[a]
		48	88[c]	5.8[b]
		72	96[c]	6.8[c]
	抗 CD3 抗体	72	81[b]	0.2[b]
CD8 陽性 T 細胞	PHA	24	52[c]	68[a]
		48	77[c]	6.8[b]
		72	86[c]	3.8[c]
	抗 CD3 抗体	72	83[b]	0.2[b]

IC_{50} = 50%阻害濃度，PHA = フィトヘマグルチニン.
a, b, c: それぞれ 3 回，4 回，5 回の実験結果の中央値。
データ引用元; 試験番号 ■154, ■148

2.6.2.2.3　細胞傷害作用のキネティクス（添付資料 4.2.1.1.4［試験番号 ■084：{参考}］，添付資料 4.2.1.1.5［試験番号 ■067 {参考}］，添付資料 4.2.1.1.6［試験番号 ■147 {参考}］，添付資料 4.2.1.1.2［試験番号 ■154 {参考}］）

本試験ではE7272のIL-2R発現細胞に対する結合親和性，また細胞傷害作用を発揮するのに要する時間を検討した。

a) 標的細胞への結合親和性（試験番号 ■084）

E7272の高親和性IL-2R発現細胞への結合親和性として阻害定数（K_i）を求めた。^{125}Iで標識したIL-2の結合に対するE7272の競合阻害より，ヒト成人T細胞白血病細胞株C91/PLにおけるE7272のK_i値（中央値）は5.7×10^{-11} mol/Lであった。対照としたIL-2（非標識）のK_i値は3.0×10^{-13} mol/Lであった。

b) 細胞傷害作用発現のための標的細胞との最小接触時間（試験番号 ■067, ■147, ■154）

E7272が細胞傷害作用（タンパク質合成阻害作用）を50%発揮するのに要する標的細胞との最小の接触時間（contact time for 50% inhibition: CT_{50}）を検討した。各種ヒトがん細胞株（C91/PL，HUT102/6TG，MT-2，HH，C8215）及び抗CD3抗体で活性化したヒト細胞（PBMCs，CD4陽性T細胞，CD8陽性T細胞）に対し，E7272（0.26，0.87，8.7 nmol/L，あるいは0.01，0.1，1，10 nmol/L）を加えてインキュベーションを開始後，様々な時間（0.5～360分）に過剰のIL-2を加えることによりE7272のIL-2Rへの新たな結合をブロックした。引き続き1日間インキュベーション後，タンパク質合成を[^{14}C]ロイシンの取り込みにより測定した。

表 2.6.2-3に示すように，高親和性IL-2R発現株C91/PL，HUT102/6TG，MT-2，また中親和性IL-2R発現株HHにおいて，E7272のCT_{50}値は概ね濃度依存的に短縮し，0.87 nmol/Lでは18～270分であったが，8.7 nmol/Lでは1～35分であった。IL-2Rのサブユニットβの発現量が少ない細胞株C8215（2.6.2.2.1参照）ではCT_{50}値はいずれの濃度でも>360分であった。抗CD3抗体で活性化したヒトPBMCs，ヒトCD4陽性T細胞及びヒトCD8陽性T細胞におけるCT_{50}値は，E7272 0.1 nmol/Lでは5～11分，1 nmol/Lでは3分未満であった。

表 2.6.2-3　　E7272 が細胞傷害作用を発揮するのに要する最小の接触時間

細胞	E7272 濃度(nmol/L)	CT_{50} (min)
C91/PL（成人 T 細胞白血病）	0.26	49
	0.87	47
	8.7	25
HUT102/6TG（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	0.26	160
	0.87	270
	8.7	35
MT-2（成人 T 細胞白血病）	0.26	22
	0.87	22
	8.7	4
HH（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	0.26	51
	0.87	18
	8.7	1
C8215 急性リンパ球性白血病）	0.26	>360
	0.87	>360
	8.7	>360
抗 CD3 抗体活性化 PBMCs	0.1	10[a]
	1	1[a]
	10	<0.5[a]
抗 CD3 抗体活性化 CD4 陽性 T 細胞	0.01	84[b]
	0.1	11[b]
	1	<3[b]
抗 CD3 抗体活性化 CD8 陽性 T 細胞	0.01	110[b]
	0.1	5[b]
	1	<1[b]

a: 8 回の実験結果の中央値，b: 4 回の実験の中央値。
CT_{50} = 50%阻害に要する最小接触時間，PBMCs = 末梢血単核球．　データ引用元; 試験番号 ■067, ■147, ■154

c) 標的細胞のタンパク質合成阻害に要する時間（試験番号 ■067, ■147）

E7272 と標的細胞を継続的にインキュベーションした際に，E7272 が細胞傷害作用（タンパク質合成阻害作用）を 50%発揮するのに要する処理時間（processing time for 50% inhibition: PT_{50}）を求めた。各種ヒトがん細胞株（C91/PL，MT-2，HH）及びヒト PBMCs に，E7272（0.87，8.7 nmol/L あるいは 1，10 nmol/L）を加えて様々な時間インキュベーションした後，タンパク質合成を[^{14}C]ロイシンの取り込みにより測定した。

表 2.6.2-4 に示すように E7272 の PT_{50} 値は，がん細胞に対しては濃度が高いほうが短く，高親和性 IL-2R 発現株（C91/PL，MT-2）及び中親和性 IL-2R 発現株（HH）に対して，0.87 nmol/L では 3.0～3.4 時間であったが，8.7 nmol/L では 0.6～2.6 時間であった。IL-2R のサブユニット β の発現量が少ない細胞株 C8215 では 0.87 nmol/L では 9.9 時間であったが，8.7 nmol/L では 5.4 時間であった。抗 CD3 抗体活性化ヒト PBMCs の場合は 1，10 nmol/L ともに 4 時間であった。

表 2.6.2-4　　E7272 の細胞傷害作用発揮に要する処理時間

細胞	E7272 濃度(nmol/L)	PT_{50} (h)
C91/PL（成人 T 細胞白血病）	0.87	3.0
	8.7	2.6
MT-2（成人 T 細胞白血病）	0.87	3.4
	8.7	1.0
HH（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	0.87	3.1
	8.7	0.6
C8215（急性リンパ球性白血病）	0.87	9.9
	8.7	5.4
抗 CD3 抗体活性化 PBMCs	1	4.0[a]
	10	4.0[a]

a: 8 回測定の中央値。
PBMCs＝ 末梢血単核球，PT_{50}＝50%阻害に要する処理時間．　データ引用元; 試験番号 ■067, ■147

2.6.2.2.4　細胞傷害作用の作用機序（添付資料 4.2.1.1.6 [試験番号 ■147 {参考}]，添付資料 4.2.1.1.5 [試験番号 ■067 {参考}]，添付資料 4.2.1.1.7 [試験番号 ■011 {参考}]）

DD の細胞傷害作用の作用機序として高親和性あるいは中親和性 IL-2R を発現する各種細胞を用い，タンパク質合成阻害作用の IL-2R 依存性，細胞内取り込み機序，EF-2 の ADP リボシル化，タンパク質合成阻害と生細胞数の相関，細胞死の様式等を解析した。

a) ドメインの機能（試験番号 ■147）

本試験では，DD の細胞傷害作用には，IL-2R への特異的結合能と，DT の酵素活性の両者が重要であることを確認するために，DD 構造変異体として，IL-2R 結合能はあるが毒素の酵素活性が損なわれている $DA_{glu53}B_{389}$IL-2 及び IL-2R 結合能が損なわれているが毒素の酵素活性はある DAB_{389}IL-$2_{\Delta 8-19}$ の細胞傷害性タンパク質合成阻害作用の有無を検討した。タンパク質合成は[^{14}C]ロイシンの取り込みで測定した。

表 2.6.2-5 に示すように $DA_{glu53}B_{389}$IL-2 及び DAB_{389}IL-$2_{\Delta 8-19}$ の IC_{50} 値は C91/PL，活性化ヒト PBMCs に対し，1000～10,000 pmol/L オーダーであった。これは同時に測定した E7272 の IC_{50} 値の 2～4 桁上であり，ともにタンパク質合成阻害活性が著しく減弱した。IL-2R への特異的結合能と，DT の酵素活性がともに細胞傷害活性に必須であることが示された。

表 2.6.2-5　　DD 構造変異体の細胞傷害作用

被験物質	C91/PL	抗 CD3 抗体活性化 PBMCs
	IC_{50} (pmol/L)	IC_{50} (pmol/L)
E7272	8.7	1.8
$DA_{glu53}B_{389}$IL-2	30,000	84,000
DAB_{389}IL-$2_{\Delta 8-19}$	3500	6600

値は 4 回の実験の中央値。　IC_{50}＝50%阻害濃度，PBMCs＝ 末梢血単核球.
データ引用元; 試験番号 ■147

b)細胞傷害作用の IL-2R 依存性（試験番号 ■067, ■147）

E7272 が，高親和性あるいは中親和性 IL-2R を発現する細胞に対し強い細胞傷害作用（タンパク質合成阻害作用）を発揮することは 2.6.2.2.1 で記載した。本試験ではこのタンパク質合成阻害作用が IL-2R 依存であることを，IL-2R の内因性リガンドである IL-2 との競合性で確認した。タンパク質合成は[^{14}C]ロイシンの取り込みで測定した。

表 2.6.2-6 に示すようにヒトがん細胞株（C91/PL，HUT102/6GT，MT-2，HH，C8215）及び抗 CD3 抗体で活性化したヒト PBMCs に対する E7272 のタンパク質合成阻害活性の IC_{50} 値は，IL-2R のリガンドである IL-2 の過剰量（10 nmol/L）存在下では数十倍に上昇した。一方対照とした IL-2R のリガンドではないインターロイキン-4（IL-4）の過剰量（10 nmol/L）の存在下では変化せず，IL-2 が E7272 と IL-2R の結合を競合的に阻害することが示された。このことより，DD の細胞傷害作用は DD の IL-2R への結合に依存していると考えられた。

表 2.6.2-6　　E7272 の細胞傷害作用の IL-2R 特異性

細胞	IC_{50} (pmol/L)		
	媒体添加	IL-2 添加	IL-4 添加
C91/PL（成人 T 細胞白血病）	8.7	>1000	10
HUT102/6TG（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	5.2	300	5.2
MT-2（成人 T 細胞白血病）	200	>1000	200
HH（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	95	>1000	100
C8215（急性リンパ球性白血病）	100	6000	100
抗 CD3 抗体活性化 PBMCs	4.2	>10,000	6.6

PBMCs についての IC_{50} 値は 5 回の実験の中央値。IC_{50}＝50%阻害濃度，IL-2＝ インターロイキン-2，IL-2R＝ インターロイキン-2 受容体，IL-4＝ インターロイキン-4，PBMCs＝ 末梢血単核球. データ引用元; 試験番号 ■067,■147

c) 細胞質内移行機序（試験番号 ■147,■067）

DD は IL-2R に特異的に結合したあと，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，そこで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 末端断片はエンドソーム内の酸性環境下で立体構造が変化し細胞質移行が促進されると考えられる（vanderSpek, et al., 1993）。この機構を確認するため，エンドソーム内の pH をアルカリ性側にシフトさせることが知られているクロロキンの，E7272 の細胞傷害作用（タンパク質合成阻害作用）に及ぼす影響を検討した。

ヒトがん細胞株（C91/PL，MT-2，HH，C8215）及び抗 CD3 抗体で活性化したヒト PBMCs に，それぞれに対する IC_{50} 値に近い濃度の E7272 を加え，クロロキン（20～50 μmol/L）存在下あるいは非存在下でインキュベーションし，タンパク質合成量を[^{14}C]ロイシンの取り込みで測定した。表 2.6.2-7 に結果を示す。各細胞のタンパク合成を，E7272 を添加しない場合を 100 とした%で表示した。クロロキン非存在下での各細胞のタンパク質合成は，41%～53%であったが，クロロキン存在下での各細胞のタンパク質合成は，79%～110%と回復し，E7272 のタンパク質合成阻害はクロロキンによって解除されることがわかった。したがって，エンドソーム内の酸性環境（acidified vesicle）が DD の活性発現に重要である可能性が示された。

表 2.6.2-7　　E7272 の細胞傷害作用に対するクロロキンの影響

細胞	E7272 濃度	タンパク質合成（% of Control）	
	pmol/L	クロロキン非存在下	クロロキン存在下
C91/PL（成人 T 細胞白血病）	12	41	79
MT-2（成人 T 細胞白血病）	110	47	79
HH（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	110	50	91
C8215（急性リンパ球性白血病）	120	53	100
抗 CD3 抗体活性化 PBMCs	10	51	110

タンパク質合成はコントロール（E7272 無添加，培地対照）を 100 とした%で表示した。PBMCs についての値は 5 回の実験の中央値。PBMCs＝ 末梢血単核球．データ引用元; 試験番号 [redacted]147, [redacted]067

d) ADP リボシル化（試験番号 [redacted]067）

DD から遊離した DT ドメインの N 末端断片は ADP リボシル化酵素の活性を有しており，これが細胞質において EF-2 の ADP リボシル化を触媒して EF-2 を不活性型とし，タンパク質合成酵素を阻害すると考えられている（vanderSpek, et al., 1993）。本試験ではこの機序を確認するため，E7272 処理した細胞内 EF-2 の ADP リボシル化の程度を測定した。

あらかじめ E7272（1～1000 pmol/L）で 18～24 時間処理した C91/PL 細胞の溶解液と DT 及びニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD，ADP リボシル化の基質）の[^{3}H] 放射標識体を 30 分間インキュベーションし，細胞溶解液中の EF-2 が新たに ADP リボシル化される程度（あらかじめ E7272 処理しない場合の ADP リボシル化を 100%とした）を [^{3}H] NAD の取り込みで測定した。その結果，表 2.6.2-8 に示すように，前処理における E7272 の濃度依存的に，EF-2 の新たな ADP リボシル化が減少し，100 pmol/L 以上では新たな ADP リボシル化は全くみられなかった。このことは E7272 の前処理において，E7272 の濃度依存的に EF-2 が ADP リボシル化され，100 pmol/L 以上では細胞内のほぼ全ての EF-2 が ADP リボシル化されていたことを示唆している。

表 2.6.2-8　E7272 で前処理した C91/PL の EF-2 が E7272 で新たに ADP リボシル化される割合

E7272 濃度（pmol/L）	EF-2 が新たに ADP リボシル化される割合　(%)
1	62
10	7
100	0
1000	0

予め E7272 処理しない場合の ADP リボシル化を 100（%）とした。
ADP＝ アデノシン二リン酸，EF-2＝ 伸長因子 2.　データ引用元; 試験番号 [redacted]067

e) 細胞死の誘導（試験番号 [redacted]067, [redacted]011）

本試験ではヒトがん細胞株 C91/PL，HUT102/6TG，MT-2，HH を用い，E7272 によるタンパク質合成阻害作用の IC_{50} 値と，生細胞数減少の IC_{50} 値を比較した。タンパク質合成は[^{14}C]ロイシンの取り込みで測定し，生細胞数は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium を用いたカラーメトリックアッセイ（ミトコンドリア代謝を反映した

発色）で測定した。表 2.6.2-9 に示すように，C91/PL，HUT102/6TG，MT-2，HH に対する E7272 のタンパク質合成阻害作用（1 日間培養）の IC_{50} 値は，それぞれ 8.7，5.2，200，95 pmol/L であった。また生細胞減少（3 日間培養）の IC_{50} 値は，それぞれ 10，21，100，87 pmol/L であり，タンパク質合成阻害作用の IC_{50} 値と近似していた。従って DD によるタンパク質合成阻害は，最終的に細胞死を誘導することが確認された。

表 2.6.2-9　　E7272 のタンパク質合成阻害作用と生細胞数減少の対応

細胞	IC_{50} （pmol/L）	
	タンパク質合成阻害	生細胞数減少
C91/PL（成人 T 細胞白血病）	8.7	10
HUT102/6TG（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	5.2	21
MT-2（成人 T 細胞白血病）	200	100
HH（皮膚 T 細胞性リンパ腫）	95	87

IC_{50} = 50%阻害濃度．　データ引用元; 試験番号 ■067

抗 CD3 抗体で活性化したヒト PBMCs を用いて E7272 による細胞死の様式を検討した。DNA fragmentation 測定によりアポトーシスを，また乳酸脱水素酵素の遊離により細胞の融解（ネクローシス）を評価した。表 2.6.2-10 に示すように，E7272（0，40，10,000 pmol/L）で 24 時間処理後の抗 CD3 抗体活性化 PBMCs においてアポトーシスを起こした細胞の割合はそれぞれ 13%，32%，56%，またネクローシスを起こした細胞の割合はそれぞれ 0%，5%，9%であった。活性化 PBMCs のうち，高親和性 IL-2R を発現しているのは 67%であることから，E7272（10,000 pmol/L）により，そのほぼ全てがアポトーシスあるいはネクローシスで細胞死を起こすこと，また各濃度をとおし，アポトーシスが主たる細胞死の様式であることが示された。

表 2.6.2-10 E7272 処理した活性化ヒト PBMCs におけるアポトーシスとネクローシスの割合

E7272 濃度（pmol/L）	アポトーシス細胞（%）	ネクローシス細胞（%）
0	13	0
40	32	5
10,000	56	9

7 回の実験結果の中央値を示す。PBMCs = 末梢血単核球．　データ引用元; 試験番号 ■011

2.6.2.2.5　ヒト Treg に対する選択的除去作用（添付資料 4.2.1.1.8 [試験番号 PPC20■-06N [参考]]）

成熟 T 細胞がマイトゲン刺激によって初めて高親和性 IL-2R を発現するのに対し，Treg は恒常的に高親和性 IL-2R を発現している（Létourneau, et al., 2009）。本試験では，E7272 のヒト Treg に対する選択的除去作用について，E7272 で処理したヒト PBMCs 中の Treg のポピュレーションを測定することによって評価した。健康成人から採取した新鮮 PBMCs（1.25×10^6 cells/tube）を，細胞培地中で E7272（0.57～47 nmol/L）と 2 時間インキュベーションした後，フローサイトメータによりヒト Treg のポピュレーションを，$CD3^+CD4^+CD25^{high}FOXP3^{high}$ として計測した。対照として CD4 陽性 T 細胞全体のポピュレーションを，$CD3^+CD4^+$ として計測した。

図 2.6.2-1 に示すように，E7272 処理（2 時間）によって，ヒト PBMCs 中の Treg ポピュレーションは，濃度依存的に媒体対照に比べて有意に減少した。ヒト CD4 陽性 T 細胞全体のポピュレーションは減少していないことから，E7272 の細胞除去作用は，CD4 陽性 T 細胞中の Treg に対して選択的であった。なお，CD4 陽性 T 細胞全体のポピュレーションは高濃度の E7272 処理で媒体対照に比べむしろ有意に増加したが，これは PBMCs 中の $CD3^+CD4^+$以外の若干の細胞が E7272 の非特異的な作用によって傷害をうけた可能性が考えられた。

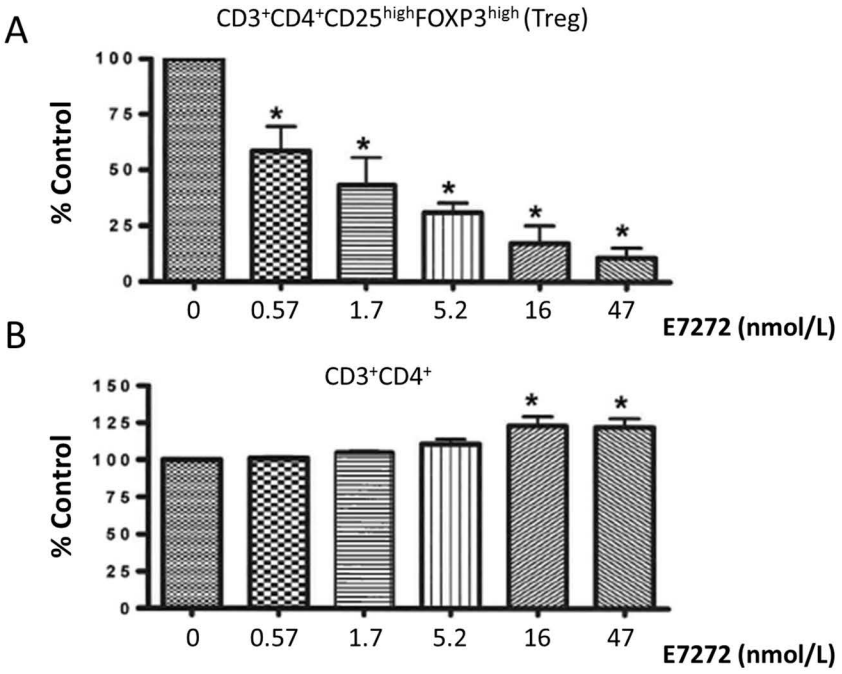


図 2.6.2-1　E7272 のヒト Treg ポピュレーションに対する作用

A: Treg ポピュレーションの変化
B: CD4 陽性 T 細胞全体のポピュレーションの変化
各カラムは 3 例の健康成人の PBMCs を用いた試験の平均+標準誤差を示す。
PBMCs = 末消血単核球，Treg = 制御性 T 細胞．　* $P<0.05$ 媒体対照群との比較（Dunnett 多重比較検定).
データ引用元; 試験番号 PPC20[redacted]-06N

2.6.2.2.6　マウス Treg に対する選択的除去作用（添付資料 4.2.1.1.9［試験番号 PPC20[redacted]-04N｛参考｝］，添付資料 4.2.1.1.10［試験番号 PPC20[redacted]-05N｛参考｝］）

本試験では，E7272 のマウス Treg に対する選択的除去作用（試験番号 PPC20[redacted]-04N）及びマウス Treg の機能阻害作用（試験番号 PPC20[redacted]-05N）について検討した。雄 BALB/c マウス脾臓から調製したマウス CD4 陽性 T 細胞（1×10^6 cells/tube）を細胞培地中で E7272（0.17～52 nmol/L）と 1 時間インキュベーションした後，細胞を洗浄し，新鮮培地中でさらに 40 時間培養した。フローサイトメータによりマウス Treg のポピュレーションを，$CD4^+CD25^+Foxp3^+$として計測した。対照として Treg を含まないマウス CD4 陽性 T 細胞（non-Treg）のポピュレーションを，$CD4^+CD25^-$として計測した。

図 2.6.2-2 に示すように，E7272 処理（1 時間）によって，マウス脾臓中の Treg ポピュレーションは，E7272 の濃度依存的に減少した。マウス CD4 陽性 T 細胞全体はほとんど変化していないことから，E7272 の細胞除去作用は，マウス脾臓中の Treg に対して選択的であった。

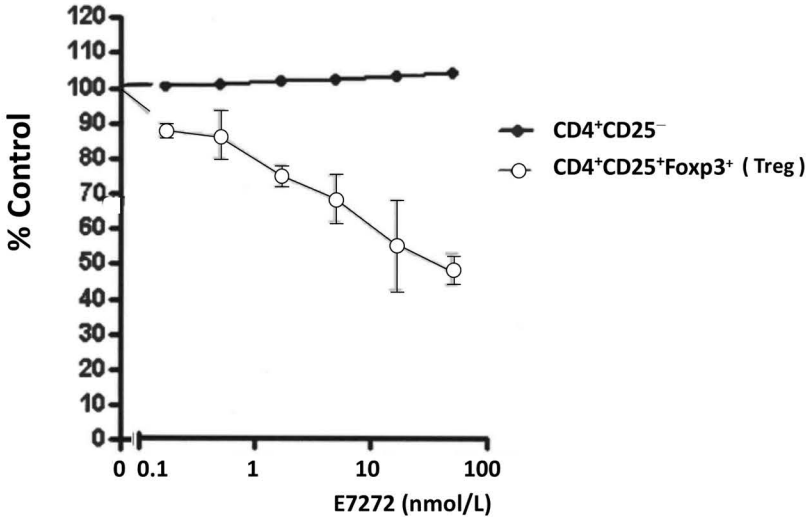


図 2.6.2-2　E7272 のマウス Treg のポピュレーションに対する作用

各値は 3 つの独立した試験の平均±標準誤差を示す。
●は Treg を含まない CD4 陽性 T 細胞のポピュレーション，○は Treg ポピュレーションを示す。
Treg = 制御性 T 細胞.
データ引用元; 試験番号 PPC20[redacted]-04N

マウス Treg の機能（エフェクターT 細胞の抗原提示細胞への応答を抑制する機能）に及ぼす E7272 の阻害効果について検討した。雌 BALB/c マウス脾臓より Treg 画分（$CD4^+CD25^+$）と，エフェクターT 細胞を含み Treg を含まない CD4 陽性 T 細胞画分（$CD4^+CD25^-$，以下 non-Treg エフェクターT 細胞画分）を調製した。Treg 画分を細胞培地中で媒体または E7272（5.2～170 nmol/L）と 1 時間インキュベーションし，洗浄後，non-Treg エフェクターT 細胞画分と 1:1 に混合した。この細胞液に，エフェクターT 細胞の細胞増殖を促進させる抗原提示細胞の代用として，抗マウス CD3 抗体及び抗マウス CD28 抗体をコートしたビーズを加え，さらに 48 時間培養した。その後，抗体刺激で促進されるエフェクターT 細胞の細胞増殖の程度を[^{3}H] チミジンの取り込みによって評価した。

図 2.6.2-3 に示すように，マウス non-Treg エフェクターT 細胞画分（$CD4^+CD25^-$）と E7272 未処理のマウス Treg 画分（$CD4^+CD25^+$）とを混合培養すると，抗原提示細胞の代用とした抗体刺激によるエフェクターT 細胞の細胞増殖が，non-Treg エフェクターT 細胞画分単独の場合に比べて顕著に抑制され，Treg の「エフェクターT 細胞の抗原提示細胞への応答を抑制する機能」が確認された。一方，non-Treg エフェクターT 細胞画分を E7272 処理した Treg 画分を混合培養すると，E7272 の濃度依存的に抗体刺激によるエフェクターT 細胞の細胞増殖が増加し，Treg による抑制が解除されたと考えられた。従って，E7272 がマウス Treg の「エフェクターT 細胞の抗原提

示細胞への応答を抑制する機能」を阻害したことが示唆された。

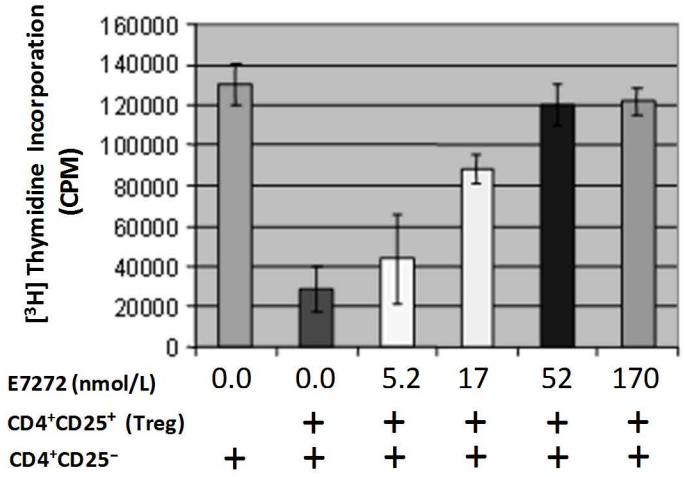


図 2.6.2-3　E7272 のマウス Treg の機能抑制作用

縦軸はエフェクターT 細胞の細胞増殖を反映する[³H]チミジンの取り込み。3 つの独立した試験の代表例を示す。各カラムは 3 つのウェルの結果の平均値±標準誤差を示す。
Treg = 制御性 T 細胞.　データ引用元; 試験番号 PPC2[redacted]-05N

2.6.2.2.7　CP3 マウスリンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果：用量依存性（添付資料 4.2.1.1.11 [試験番号 [redacted]012 [参考]]）

本試験では C57BL/6 マウスから得られた T 細胞リンパ腫細胞株 CTLL 由来の高親和性 IL-2R 発現細胞株 CP3 を用いたマウスリンパ腫モデルにおいて，E7272 の各用量における抗腫瘍効果を検討した。CP3 細胞（1×10^6 cells）を同系の雌 C57BL/6 マウスに尾静注し（Day 0），その翌日（Day 1）より媒体（生理食塩水）あるいは E7272（7，15，30，60 μg/kg）を 1 日 1 回 10 日間のスケジュールで静脈内投与した（10 例/群）。各群のリンパ節での腫瘍形成（リンパ腫発症）に至る日数と生存日数を測定し，E7272 投与群のリンパ腫発症及び生存日数が媒体対照群よりどのくらい延長したか（発症の遅延と，生存日数延長）によって E7272 の抗腫瘍効果を評価した。マウスの体重減少（BWL）は群平均として Day 1 に比べ>20%である場合，顕著とした（以下本 2.6.2 項を通じて同様）。

図 2.6.2-4 に示すように，媒体対照群では CP3 細胞を移植後 21 日～41 日にかけてリンパ節とその隣接部に触診可能な腫瘍が形成され（リンパ腫発症），24 日～41 日にかけて死亡した（平均 30 日）。これに比較して E7272 投与群（7，15，30，60 μg/kg）ではリンパ腫発症の遅延（それぞれ 17，47，59，59 日）及びこれと対応した用量依存的で有意な生存日数の延長（それぞれ 32，50，58，>60 日）が認められた（表 2.6.2-11 及び図 2.6.2-4）。忍容性は 30 μg/kg まで良好であったが，60 μg/kg では一過性ではあるが顕著な BWL が認められた。これより E7272 の 7 μg/kg 以上 1 日 1 回 10 日間静脈内投与は良好な忍容性と有意な抗腫瘍効果を示すことがわかった。

表 2.6.2-11　CP3 マウスリンパ腫モデルにおける生存日数延長効果（用量依存性）

E7272 用量（μg/kg）	平均リンパ腫発症日数（日）	平均生存日数（日）
0　(saline)	26	30
7	43	62***
15	73	80***
30	85	88***
60	85	>90***

E7272 は QD×10 で静脈内投与した。図 2.6.2-4 の脚注参照. データ引用元; 試験番号 ■012

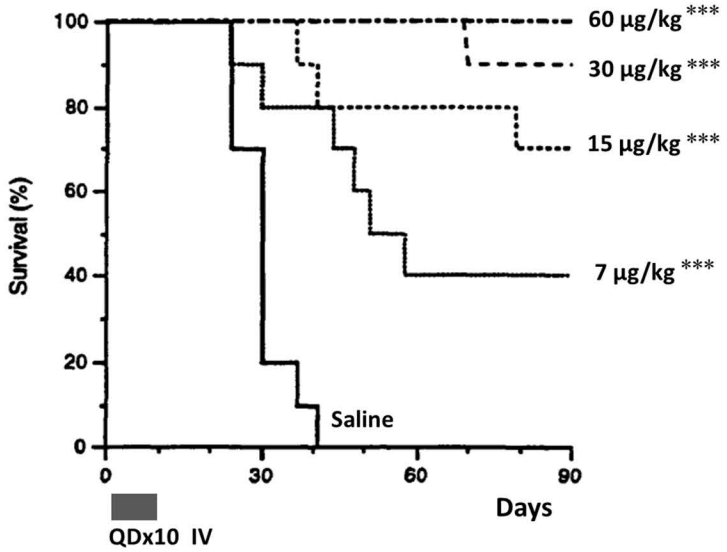


図 2.6.2-4　CP3 マウスリンパ腫モデルにおける E7272 の生存日数延長効果（用量依存性）

各群 10 例の生存率（%）を示す。横軸下のバーは E7272 の投与期間を示す。
QD×10 = 1 日 1 回 10 日間. *** P<0.001 媒体対照群との比較（log-rank 検定または一般化 Wilcoxon 検定）
データ引用元; 試験番号 ■012

2.6.2.2.8　CP3 マウスリンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果：投与スケジュール（添付資料 4.2.1.1.11 [試験番号■012 {参考}]，添付資料 4.2.1.1.12 [試験番号■042 {参考}]）

CP3 マウスリンパ腫モデルにおいて E7272 の様々な投与スケジュールでの生存日数延長効果を検討した。マウス CP3 細胞（1×10^6 cells）を雌 C57BL/6 マウスに尾静注し（Day 0），原則としてその翌日（Day 1）より媒体（生理食塩水）あるいは E7272（30 μg/kg）を表 2.6.2-12 に示す投与スケジュールで静脈内投与した（10 例/群）。E7272 投与群の生存日数延長（媒体対照群との比較）をもって抗腫瘍効果を評価した。

表 2.6.2-12 及び図 2.6.2-5 に示すように，E7272（30 μg/kg）の 1 日 1 回 10 日間の投与は媒体対照（生存日数 30 日あるいは 40 日）に比べ生存日数を 55 日あるいは 30 日延長した。投与日数を 10，7，5，3 日間と短くした場合，生存日数延長はそれぞれ 55，48，21，18 日となり，投与日数の短縮とともに生存日数の延長は短縮したが，3 日間の投与でも生存日数延長は有意であっ

た（図 2.6.2-5A）。1 日 1 回 10 日間投与と，同程度の総投与量での 2 種の間歇投与（3 日/週×3 週間，5 日/週×2 週間）を比較したところ，いずれも有意で同程度の生存日数延長を示した（図 2.6.2-5B）。

表 2.6.2-12　CP3 マウスリンパ腫モデルにおける E7272 の生存日数延長効果（投与スケジュール）

投与スケジュール	投与日(Day)	投与回数	用量（μg/kg）	平均生存日数（日）
QD×10	1 – 10	10	0 (saline)	30
			30	85****
QD×7	1 – 7	7		78****
QD×5	1 – 5	5		51****
QD×3	1 – 3	3		48**
QD×10	1 – 10	10	0 (saline)	40
			30	70*
[QD×3]×3	1 – 3, 8 – 10, 15 – 17	9		69*
[QD×5]×2	1 – 5, 8 – 12	10		71**

E7272 はいずれも静脈内投与した。平均生存日数は各群 10 例の平均を示す。
QD×n = 1 日 1 回 n 日間，[QD×n] ×m = 週 n 回投与を m 週間.
* P<0.05，** P<0.01，**** P<0.0001 媒体対照群との比較（log-rank 検定または一般化 Wilcoxon 検定).
データ引用元; 試験番号 [redacted]012

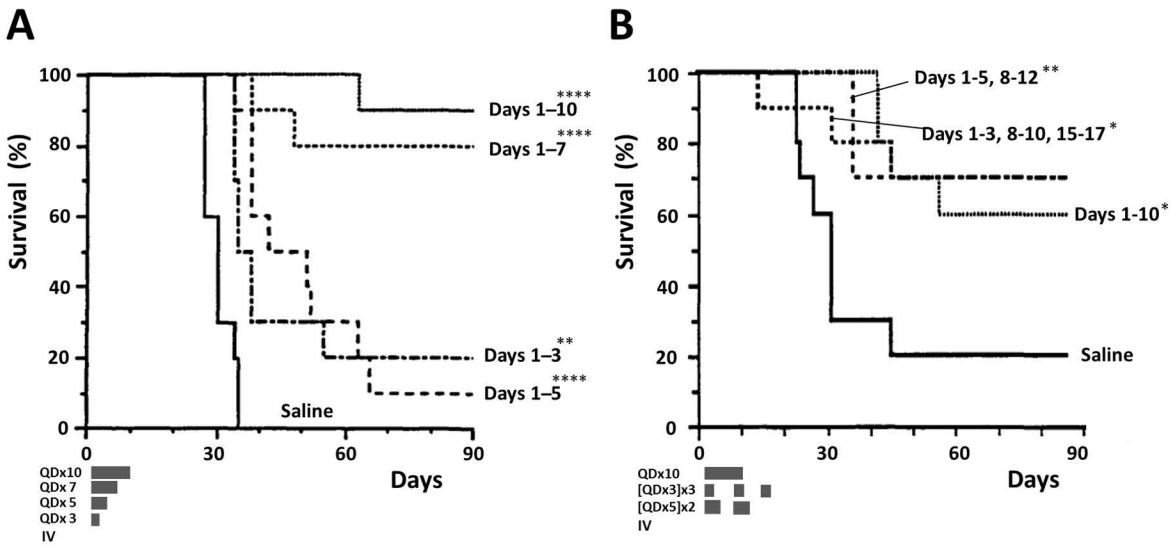


図 2.6.2-5　CP3 マウスリンパ腫モデルにおける E7272 の生存日数延長効果（投与スケジュール）

A：　QD×10, QD×7, QD×5, QD×3 の比較
B：　QD×10, [QD×3] ×3, [QD×5]×2 の比較
CP3 移植後の各群 10 例の生存率（%）を示す。横軸下のバーは E7272（30 μg/kg）の投与期間を示す。
QD×n = 1 日 1 回 n 日間，[QD×n]×m = 週 n 回投与を m 週間.
* P<0.05，** P<0.01，**** P<0.0001 媒体対照群との比較（log-rank 検定または一般化 Wilcoxon 検定).
データ引用元; 試験番号 [redacted]012

以上，E7272（30 μg/kg）の Day 1 からの 1 日 1 回，3 日～10 日間の投与スケジュールにおいては，連続 3 日間投与でも有意な抗腫瘍効果を示したが，9 日～10 日間の連続あるいは間歇投与が

より強い抗腫瘍効果を示した。

2.6.2.2.9　CP3 マウスリンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果：抗 DT 抗体の影響（添付資料 4.2.1.1.13 [試験番号 ■126 {参考}]）

融合タンパク質である DD の DT ドメインは異種タンパク質であることから抗原性が高く，この部分に対する抗体の出現が予想される。本試験ではあらかじめ DT で免疫し，体内に抗 DT 抗体の力価が確認されたマウスを用いた CP3 マウスリンパ腫モデルにおける E7272 の抗腫瘍効果を検討した。

雌 C57BL/6 マウス 40 匹に DT（20 μg/animal）を Day –18 より 1 日 1 回 4 日間のスケジュールで皮下注射した。この内 10 匹について Day 0 に血液中の抗 DT 抗体を E7272 を用いた酵素免疫測定法で測定したところ力価 1～2 の抗体が確認された。E7272 の細胞傷害活性を中和する抗 DD 中和抗体は検出限界以下であった。残る 30 匹の DT 免疫マウス及び非免疫雌 C57BL/6 マウスにマウス CP3 細胞（1×10^6 cells）を尾静注した（Day 0）。その翌日（Day 1）より媒体対照の生理食塩水あるいは E7272（DT 免疫マウスに対し 30，60 μg/kg，非免疫マウスに対し 30 μg/kg）を 1 日 1 回 10 日間静脈内投与した（10 例/群）。E7272 投与群の生存日数延長（媒体対照群との比較）をもって抗腫瘍効果を評価した。

表 2.6.2-13 及び図 2.6.2-6 に示すように，非免疫マウスのリンパ腫モデルにおいて，媒体対照群の生存日数 38 日に比べ，E7272（30 μg/kg）投与群の生存日数は 92 日であり，有意な生存日数の延長（54 日）がみられた。DT 免疫マウスでは，非免疫マウスと同様に腫瘍が形成され媒体投与群の平均生存日数は 32 日であった。この DT 免疫マウスリンパ腫モデルにおいて E7272（30，60 μg/kg）投与群の平均生存日数はそれぞれ 52，62 日であり有意な生存日数延長（ぞれぞれ 20，30 日）が認められた。以上，抗 DT 抗体を有する CP3 マウスリンパ腫モデルにおいても E7272 の抗腫瘍効果が認められたものの，同一用量では，非免疫マウスに比べ効果の減弱が認められた。

表 2.6.2-13　DT 免疫マウスを用いた CP3 マウスリンパ腫モデルにおける E7272 の生存日数延長効果

宿主	用量（μg/kg）	平均生存日数（日）
非免疫マウス	0 (saline)	38
	30	92##
DT 免疫マウス	0 (saline)	32
	30	52** ¶¶¶
	60	62**

E7272 は 1 日 1 回 10 日間静脈内投与した。図 2.6.2-6 の脚注参照。　データ引用元；試験番号 ■126

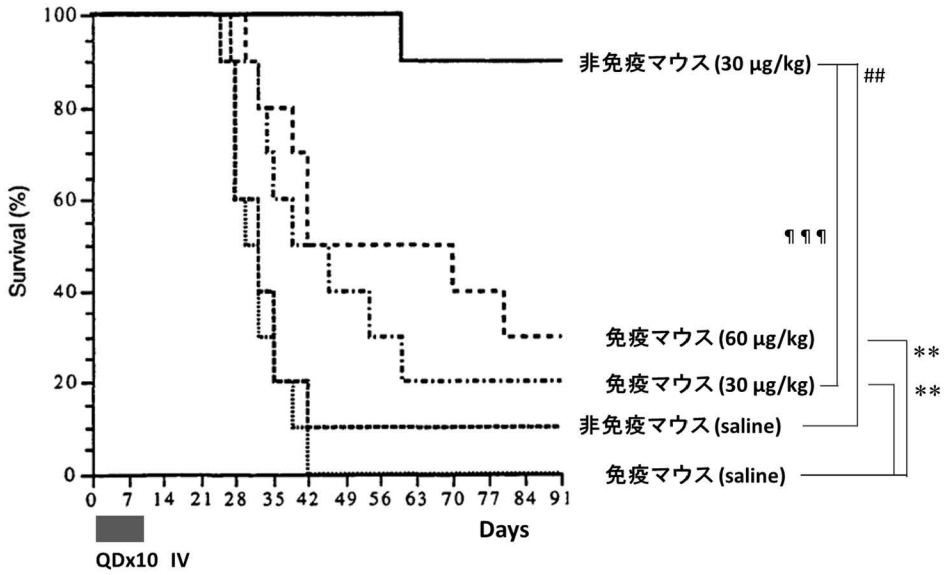


図 2.6.2-6　DT 免疫マウスを用いた CP3 マウスリンパ腫モデルにおける E7272 の生存日数延長効果

各群 10 例の生存率（%）を示す。横軸下のバーは E7272 の投与期間を示す。
DT = ジフテリア毒素，QD×10 = 1 日 1 回 10 日間.
** P<0.01 免疫マウス媒体対照群との比較；## P<0.01 非免疫マウス媒体対照群との比較；¶¶¶ P<0.001 非免疫マウス 30 μg/kg 投与群との比較（log-rank 検定）
データ引用元; 試験番号 ■126

2.6.2.2.10　CP3 マウスリンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果：E7272 耐性の有無（添付資料 4.2.1.1.14 [試験番号 ■069 〔参考〕]）

CP3 マウスリンパ腫モデル（雌 C57BL/6 マウス）において E7272 の投与群で形成された腫瘍が E7272 耐性であるか否かを検討した。同モデルの E7272 投与群（30 μg/kg，1 日 1 回 10 日間の静脈内投与）で腫瘍が形成された個体より腫瘍を含むリンパ節を採取し，この細胞（1×10^6 cells）を別の雌 C57BL/6 マウスに尾静注した（Day 0）。その翌日（Day 1）より媒体（生理食塩水）あるいは E7272（30 μg/kg，1 日 1 回 10 日間の静脈内投与）の投与を行った。リンパ腫の発症率と生存日数を測定した。（12 例/群）。E7272 投与群におけるリンパ腫発症率の低下と生存日数延長（媒体対照群との比較）をもって抗腫瘍効果を評価した。

その結果，Day 60 までのリンパ腫発症率は，媒体対照群で 92%であったのに対し，E7272 投与群では 41%であった。また，平均生存日数は，媒体対照群で 40 日であったのに対し E7272 投与群では 74 日であり，有意な生存延長（34 日）がみられた。以上，E7272 は，E7272 投与群で形成された腫瘍の再移植モデルに対しても抗腫瘍効果を示し，E7272 投与群で形成された腫瘍は E7272 耐性ではないことが示唆された。

2.6.2.2.11　CP3 マウスリンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果：[redacted]（添付資料 4.2.3.7.7.4 [試験番号[redacted]162 {参考}]）

DD 製剤では，[redacted] 変化体H*[redacted]と[redacted] 変化体C*[redacted]という 2 種類の[redacted]が存在する。これは DD の遺伝子組換え大腸菌を培養する過程で産生された DD 分子の一部において，[redacted]が酵素的に切断されるためと考えられている。両者は[redacted]で分離することができ，変化体H* の in vitro の生物学的活性は変化体C* の約[redacted]%である。

本試験では CP3 マウスリンパ腫モデルにおいて，変化体H* と変化体C* の抗腫瘍活性を E7272 と比較した。マウス CP3 細胞（1×10^6 cells）を雌 C57BL/6 マウスに尾静注し（Day 0），その翌日（Day 1）より媒体（生理食塩水），E7272（30 μg/kg），変化体H*（30 μg/kg），あるいは 変化体C*（30 μg/kg）を 1 日 1 回 10 日間静脈内投与した（10 例/群）。各投与群の生存日数延長（媒体対照群との比較）をもって抗腫瘍効果を評価した。

表 2.6.2-14 及び図 2.6.2-7 に示すように，媒体対照群の平均生存日数 38 日に対し，E7272 投与群，変化体H* 投与群，変化体C* 投与群の平均生存日数はそれぞれ，75，[redacted] 日であり，いずれも有意に生存日数を延長させた（それぞれ 37，[redacted] 日）。変化体C* は[redacted]，E7272 は変化体C*[redacted]生存日数延長を示したことから，in vitro の生物学的活性と同様，in vivo の抗腫瘍効果においても[redacted]＞[redacted]＞[redacted] であると考えられた。

表 2.6.2-14　CP3 マウスリンパ腫モデルにおける E7272 及び[redacted]の生存日数延長効果

被験物質	用量（μg/kg）	平均生存日数（日）
媒体対照（saline）	0	38#
E7272	30	75*
変化体H*	30	[redacted]
変化体C*	30	[redacted]

各被験物質は QD×10 で静脈内投与した。図 2.6.2-7 の脚注参照。 データ引用元; 試験番号 [redacted]162

＊新薬承認情報提供時に置き換え

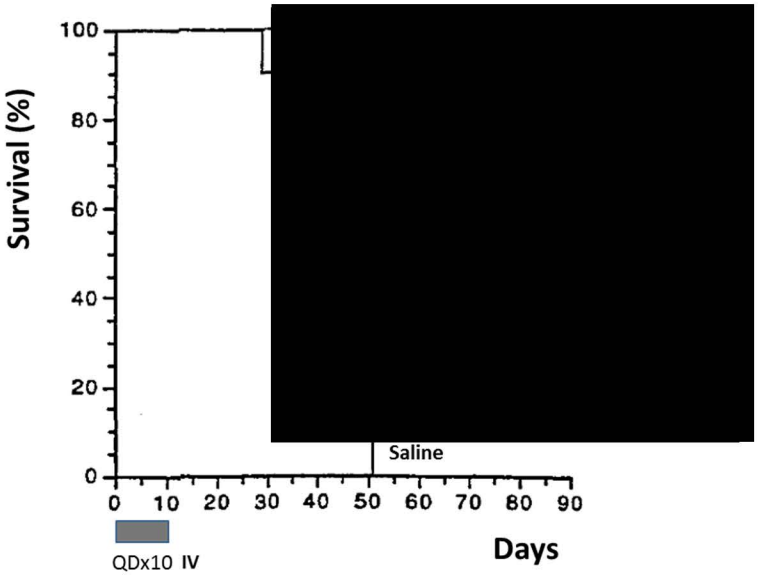


図 2.6.2-7　CP3 マウスリンパ腫モデルにおける E7272 及び[redacted]の生存日数延長効果

各群 10 例の生存率（%）を示す。横軸下のバーは E7272 及び[redacted]（30 μg/kg）の投与期間を示す。
変化体C* = [redacted]デニロイキン　ジフチトクスの[redacted],
変化体H* = [redacted]デニロイキン　ジフチトクスの[redacted]
QD×10 = 1 日 1 回 10 日間.
*$P \leq 0.05$ 媒体対照群との比較，#$P \leq 0.05$ E7272 投与群との比較（log-rank 検定または一般化 Wilcoxon 検定）データ引用元; 試験番号 [redacted]162

2.6.2.2.12　CP3 マウスリンパ腫モデルにおける抗腫瘍効果：構造変異体（添付資料 4.2.1.1.15 [試験番号[redacted]055［参考］]）

IL-2R 結合能はあるが毒素の酵素活性が損なわれている $DA_{glu53}B_{389}$IL-2 及び IL-2R 結合能が損なわれているが毒素の酵素活性はある DAB_{389}IL-$2_{\Delta 8-19}$ は 2.6.2.2.4 に記載したように in vitro 細胞傷害活性を有しない。本試験では CP3 マウスリンパ腫モデルにおいて E7272 及びその構造変異体における抗腫瘍効果を検討した。

マウス CP3 細胞（1×10^6 cells）を同系の雌 C57BL/6 マウスに尾静注し（Day 0），Day 1 より媒体（生理食塩水），E7272（30 μg/kg），$DA_{glu53}B_{389}$IL-2（30 μg/kg）あるいは DAB_{389}IL-$2_{\Delta 8-19}$（30 μg/kg）を 1 日 1 回 10 日間静脈内投与し（9～10 例/群），各投与群の生存日数延長（媒体対照群との比較）をもって抗腫瘍効果を評価した。その結果，媒体対照群の平均生存日数 32 日に対し，E7272 投与群の 92 日における生存率は 100%であり，60 日以上の有意な生存日数延長がみられた。一方，$DA_{glu53}B_{389}$IL-2 投与群及び DAB_{389}IL-$2_{\Delta 8-19}$ 投与群の平均生存日数はともに 33 日であり，生存日数延長はみられなかった。以上，in vitro で細胞傷害活性を有さない $DA_{glu53}B_{389}$IL-2 及び DAB_{389}IL-$2_{\Delta 8-19}$ には E7272 と同じ投与条件において抗腫瘍効果がみられないことが確認された。

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.2.2.13　EL-4 マウスリンパ腫モデル及び p388 マウス白血病モデルにおける抗腫瘍効果（添付資料 4.2.1.1.15 [試験番号 ■055 {参考}]）

中親和性 IL-2R を発現しているマウスリンパ腫細胞株 EL-4 及び IL-2R 陰性のマウス白血病細胞株 P388 を用いたマウス同系腫瘍モデルにおける E7272 の抗腫瘍効果を検討した。

マウス EL-4 細胞（1×10^6 cells）を雌 C57BL/6 マウスに尾静注し（Day 0），Day 1 より媒体（生理食塩水）あるいは E7272 を 1 日 1 回 10 日間のスケジュールで静脈内投与し（10～11 例/群），E7272 投与群の生存日数延長（媒体対照群との比較）をもって抗腫瘍効果を評価した。

表 2.6.2-15 及び図 2.6.2-8 に示すように，E7272（30，40 μg/kg）は EL-4 マウスリンパ腫モデルに対して 3 回の試験全てにおいて生存日数を有意に延長させた。試験 1：媒体対照群の生存日数 16 日，E7272（40 μg/kg）投与群は Day 29 で 100%生存しており，＞13 日の生存日数延長がみられた。試験 2：媒体対照群の生存日数は 15 日，E7272（30 μg/kg）投与群の生存日数は 19 日であり，4 日の生存日数延長がみられた。試験 3：媒体対照群の生存日数は 17 日，E7272（30 μg/kg）投与群の生存日数は 71 日であり，54 日の生存日数延長がみられた。以上，中親和性 IL-2R を発現している EL-4 マウスリンパ腫モデルにおいて E7272（30，40 μg/kg）の 1 日 1 回 10 日間の静脈内投与は抗腫瘍効果を示した。

表 2.6.2-15　EL-4 マウスリンパ腫モデルにおける E7272 の生存日数延長効果

	用量（μg/kg）	平均生存日数（日）
試験 1	0 (saline)	16
	40	>29****
試験 2	0 (saline)	15
	30	19***
試験 3	0 (saline)	17
	30	71***

E7272 は QD×10 で静脈内投与した。図 2.6.2-8 の脚注参照。　データ引用元; 試験番号 ■055

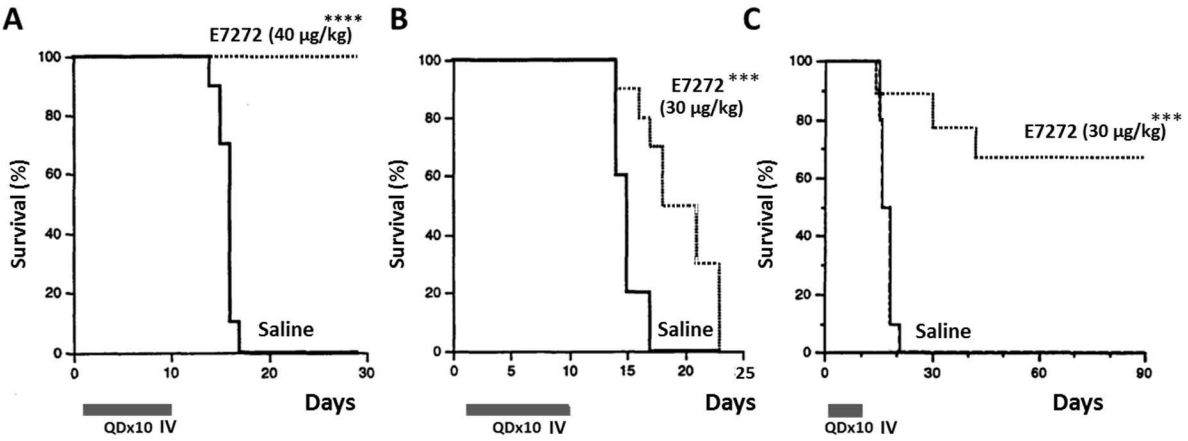


図 2.6.2-8　EL-4 マウスリンパ腫モデルにおける E7272 の生存日数延長効果

A：試験 1（40 μg/kg），　B，C：それぞれ試験 2，試験 3（30 μg/kg）
各群 10～11 例の生存率（%）を示す。横軸下のバーは E7272 の投与期間を示す。
QD×10 = 1 日 1 回 10 日間.
*** P<0.001，**** P<0.0001　媒体対照群との比較（log-rank 検定または一般化 Wilcoxon 検定）
データ引用元; 試験番号 ■055

マウス P388 細胞（1×10^3 cells）を同系の雌 DBA/2 マウスに尾静注（Day 0）後，媒体（生理食塩水），E7272，あるいは陰性対照としての $DA_{glu53}B_{389}IL\text{-}2$ と $DAB_{389}IL\text{-}2_{\Delta8\text{–}19}$（いずれも 30 μg/kg）を 1 日 1 回 10 日間静脈内投与し（10 例/群），E7272 投与群の生存日数延長（媒体対照群との比較）をもって抗腫瘍効果を評価した。

E7272 は P388 マウス白血病モデルに対して，2 回の試験ともに生存日数を延長せず，媒体対照，E7272, $DA_{glu53}B_{389}IL\text{-}2$，$DAB_{389}IL\text{-}2_{\Delta8\text{–}19}$ はともにほぼ同じ生存日数であった。表 2.6.2-16 及び図 2.6.2-9 に，2 回の試験の結果のうちの一例を示す。以上，IL-2R 陰性 P388 マウス白血病モデルにおいて E7272 の 1 日 1 回 10 日間 30 μg/kg の静脈内投与は抗腫瘍効果を示さなかった。

表 2.6.2-16　P388 マウス白血病モデルにおける E7272 の生存日数延長効果

被験物質	用量（μg/kg）	平均生存日数（日）
媒体（生理食塩水）	0	13
E7272	30	15
$DA_{glu53}B_{389}IL\text{-}2$	30	13
$DAB_{389}IL\text{-}2_{\Delta8\text{–}19}$	30	15

各験検物質は QD×10 で静脈内投与した。図 2.6.2-9 の脚注参照。　データ引用元; 試験番号 ■055

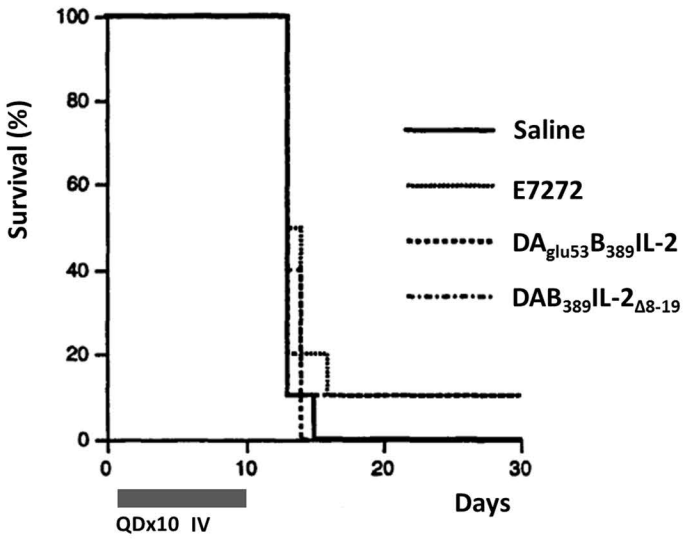


図 2.6.2-9　P388 マウス白血病モデルにおける E7272 の生存日数延長効果

P388 移植後の各群 10 例の生存率（%）を示す。横軸下のバーは E7272（30 μg/kg）の投与期間を示す。
QD×10 = 1 日 1 回 10 日間.
投与群と媒体対照群の間で log-rank 検定または一般化 Wilcoxon 検定で有意差なし。
データ引用元; 試験番号 ■055

2.6.2.2.14　CT26 マウス結腸癌移植モデルにおける抗腫瘍効果（添付資料 4.2.1.1.16 [試験番号 PPC20■-07N {参考}]，添付資料 4.2.1.1.17 [試験番号 PPC20■-08N {参考}]）

本試験では，CT26 マウス結腸癌細胞株移植モデルにおける E7272 の抗腫瘍効果を，正常免疫能を有する BALB/c マウスと，無胸腺マウスを用いた同種皮下移植モデルで検討した。正常免疫マウスでは Treg が宿主の抗腫瘍免疫に対し抑制的に機能していると考えられるのに対し，無胸腺マウスは，機能する胸腺がないため Treg を含む T 細胞をもたない。E7272 は IL-2R 陰性細胞株である CT26 には直接の細胞傷害活性をもたないと考えられる。マウス CT26 細胞（1×10^5 cells）を雌 BALB/c マウスに皮下移植（Day 0）後，Day 9（平均の腫瘍体積は約 90 mm^3）に 1 群 10 例に分け，媒体対照あるいは E7272（3.0，4.5 μg/animal）を投与した（試験番号 PPC20■-07N）。また，CT26 細胞を雌無胸腺マウス（*Nu/Nu* マウス，チャールズリバーcode008）に皮下移植後，Day 7（平均の腫瘍体積は約 100 mm^3）に 1 群 10 例に分け，媒体対照あるいは E7272（4.5 μg/animal）を投与した（試験番号 PPC20■-08N）。どちらの移植モデルにおいても E7272 の投与は，週 1 回 2 週間の静脈内投与とした。腫瘍体積とマウスの体重は週に 2 回測定し，E7272 投与群における腫瘍増殖抑制（媒体対照群との比較）をもって抗腫瘍効果を評価した。

図 2.6.2-10A に示すように，E7272（4.5 μg/animal）は，正常免疫マウスの CT26 移植モデルにおいて，媒体対照に比べ有意で用量依存的な腫瘍増殖抑制作用を示した。一方，図 2.6.2-10B に示すように，E7272（4.5 μg/animal）は，無胸腺マウスの CT26 移植モデルでは，全く腫瘍増殖抑制作用を示さなかった。正常免疫マウスの E7272 投与群において顕著な BWL はみられなかった。